

Isolasi bakteriofag dari limbah cair dengan aktivitas litik terhadap *Escherichia coli*

¹Boby Franswinsky, ²Maya Savira

¹Universitas Riau - Pekanbaru
Email: mayadonel@yahoo.co.id

Abstrak. Bakteriofag adalah virus yang menginfeksi bakteri tertentu secara spesifik. Pemanfaatan bakteriofag sudah mulai diterapkan dalam bidang kedokteran sejak meningkatnya kasus resistensi antibiotik. Salah satu pemanfaatannya adalah terapi bakteriofag yang bertujuan untuk mengatasi atau mencegah infeksi bakteri. MDR *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri yang memiliki strain MDR yang telah menjadi masalah kesehatan di beberapa negara. *E.coli* merupakan bakteri basil gram negatif yang merupakan organisme penyebab banyak penyakit seperti diare, disentri, sistitis tanpa komplikasi, pneumonia, bakteremia, dan peritonitis. Dalam penelitian ini, bakteriofag litik yang dapat menginfeksi *E.coli* diisolasi dari limbah cair instalasi pengolahan limbah rumah sakit. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteriofag litik *E.coli*, serta melihat potensinya sebagai agen antibakteri terhadap *E.coli* ATCC 35218 . Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif laboratorik yang diuji pada metode spot test dan plaque assay. Sediaan bakteriofag phage#1a yang merupakan produk akhir pada penelitian ini menunjukkan hasil spot test positif dan memiliki konsentrasi $\pm 7.7 \times 10^6$ PFU/mL. Hasil penelitian ini menandakan bahwa bakteriofag dapat diisolasi dari limbah cair rumah sakit dan telah diuji dapat digunakan sebagai bahan antibakteri. Bakteriofag yang berhasil diisolasi ini diharapkan dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan resistensi antibiotik yang selalu meningkat setiap tahunnya.

Kata kunci: Bakteriofag, Resistensi antibiotik, MDR, *Spot test*, *Plaque assay*

Abstract. Bacteriophages are viruses that infect certain bacteria specifically. The use of bacteriophages has been applied in the medical field since the beginning of the case of antibiotic resistance. One of its uses is bacteriophage therapy which aims to treat or prevent bacterial infections. MDR *Escherichia coli* is one of the bacteria that has an MDR strain which has become a health problem in several countries. *E.coli* is a gram-negative bacillus that is the cause of many diseases such as diarrhea, dysentery, uncomplicated cystitis, pneumonia, bacteremia, and peritonitis. In this study, a lytic bacteriophage that can infect *E.coli* was isolated from wastewater from a hospital sewage treatment plant. This study aims to identify the lytic bacteriophage of *E.coli*, and to see its potential as an antibacterial agent against *E.coli* ATCC 35218 . This research is a descriptive laboratory study that was tested on the spot test and plaque test methods. The preparation of phage#1a bacteriophage which is the final product in this study showed positive spot test results and had a concentration of $\pm 7.7 \times 10^6$ PFU/mL. The results of this study isolated that bacteriophages can be obtained from hospital wastewater and have been tested to be used as antibacterial agents. It is hoped that the isolated bacteriophage can be used to overcome the problem of antibiotics which is increasing every year.

Keywords: Bacteriophage, Antibiotic resistance, MDR, *Spot test*, *Plaque assay*

Pendahuluan

Pada tahun 2019, PBB, badan-badan internasional dan para ahli merilis sebuah laporan terobosan yang menuntut tindakan segera, terkoordinasi dan ambisius untuk mencegah krisis resistensi obat yang berpotensi menjadi bencana. Laporan tersebut berisi tentang peringatan bahwa saat ini penyakit yang resisten terhadap antibiotik menyebabkan 700.000 kematian

setiap tahunnya dan pada tahun 2050 kematian akibat resistensi terhadap antibiotik ini meningkat menjadi 10 juta kematian setiap tahunnya.¹

Ada banyak jenis bakteri yang memiliki strain resisten terhadap antibiotik, salah satu bakteri yang akan terlibat dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* (*E.coli*). *Escherichia coli* merupakan bakteri

patogen umum yang terkait dengan komunitas serta infeksi nosokomial. Dalam beberapa tahun terakhir, banyak dilaporkan kemunculan dan penyebaran luas strain *E.coli* yang menunjukkan resistensi terhadap beberapa antibiotik.² Sebuah hasil penelitian AMRIN-Study (antimicrobial resistance in Indonesia) tentang resistensi bakteri dari flora normal gastro-intestinal menunjukkan bahwa *E.coli* yang diisolasi dari 781 pasien rumah sakit, sebanyak 81% dari pasien memiliki strain *E.coli* yang resisten terhadap satu antibiotik atau lebih.³

Selama beberapa dekade terakhir, munculnya bakteri patogen yang resisten terhadap beberapa antibiotik memicu penggunaan alternatif yaitu terapi bakteriofag.⁴ Bakteriofag atau *phage* adalah virus yang menyerang sel bakteri. Pada kasus bakteriofag jenis litik, bakteriofag dapat mengganggu metabolisme bakteri dan menyebabkan bakteri menjadi lisis (pecah).⁵ Sejarah penemuan bakteriofag telah menjadi bahan perdebatan panjang, termasuk kontroversi mengenai klaim prioritas. Sejak dahulu kala, bakteriofag telah mengendalikan pertumbuhan dan penyebaran bakteri di seluruh dunia. Bakteriofag dapat ditemukan dengan mudah di manapun bakteri berkembang, seperti di selokan, pembuangan limbah, sungai, bahkan urin dan tinja pasien.⁶ Limbah rumah sakit merupakan sumber bakteriofag yang sangat tepat. Seperti yang ditunjukkan oleh banyak penelitian, bakteriofag yang diisolasi dari air limbah rumah sakit dapat digunakan untuk mengatasi bakteri resisten.⁷

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif laboratorik yang dilakukan dengan cara observasi untuk mengidentifikasi sampel bakteriofag yang diambil melalui limbah cair Instalasi Pengolahan Limbah (IPAL) RSUD Arifin Achmad Provinsi Riau, Pekanbaru. Identifikasi dan potensi bakteriofag diinterpretasikan secara deskriptif kualitatif pada metode *spot test* dan secara kuantitatif pada metode *plaque assay (double layer agar)*.

Sampel limbah cair yang diambil dari IPAL dilakukan identifikasi *E.coli* sebagai inang bakteriofag terlebih dahulu. Setelah *E.coli* berhasil diidentifikasi dengan agar Endo, limbah sudah memenuhi syarat sebagai kandidat sumber bakteriofag. Sampel limbah cair digunakan pada tahap *Enrichment*, yaitu proses untuk meningkatkan jumlah dan konsentrasi bakteriofag. Proses ini dimulai dengan sentrifugasi sampel limbah cair pada kecepatan 8000 rpm dalam 10 menit, pada suhu 4°C. Supernatant disaring dengan filter 0.45µm, dan 10 ml

hasilnya ditampung pada LB Broth *double strength* sebanyak 10 ml di dalam tabung erlenmeyer. Tabung kemudian diinokulasikan 0.1 ml *E.coli* yang berumur 4 jam (fase log *E.coli*). Tabung erlenmeyer berisi campuran tersebut kemudian diinkubasi pada *incubator shaker* dengan suhu 37°C dengan kecepatan 60 rpm dalam semalam (12-24 jam). Campuran yang sudah diinkubasi kemudian dicentrifuge dan kemudian difilter lagi menggunakan filter 0.45µm. Hasil filtrasi ditampung pada tabung reaksi. Hasil tersebut merupakan sediaan bakteriofag yang akan dipakai untuk *spot test*, *serial dilution* dan *plaque assay* berikutnya.

Spot test dilakukan dengan dengan meneteskan 10µL sediaan yang akan diuji pada *double layer agar* (LB agar 1,4% dan LB *soft top agar* 0,7%). *Soft top agar* ditambahkan dengan CaCl₂ dan MgCl₂ sebagai suplemen bakteriofag, dan diinokulasikan dengan 0.1 ml *E.coli* (dalam broth LB) berumur 90 menit untuk membuat media pertumbuhan bakteri. Pada uji *spot test* variabel perlakuan adalah sediaan bakteriofag dan variabel bebas adalah bakteriofag itu sendiri. Variabel kontrol negatif pada penelitian ini berupa *phage buffer* (100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, dan 0,01% gelatin pH 7.5) dan broth LB, sedangkan variabel kontrol positifnya adalah *antibiotic disc*. Interpretasi positif berupa munculnya *clear zone* sedangkan negatif tidak ditandai dengan munculnya *clear zone* setelah diinkubasi dalam 24 jam pada suhu 37°C.

Serial dilution atau pengenceran bertahap, dilakukan pada sediaan bakteriofag yang sudah positif pada uji *spot test* hingga mencapai faktor dilusi 10⁻⁷. Pengenceran dilakukan dengan perbandingan 1:10, yang berisi 1 ml sediaan bakteriofag, dan 9 ml *phage buffer*. *Plaque assay* dibuat dengan teknik *double layer agar* (LB agar 1,4% dan LB *soft top agar* 0,7%). *Soft top agar* ditambahkan dengan CaCl₂ dan MgCl₂ sebagai suplemen bakteriofag dan diinokulasikan dengan 0.1 ml *E.coli* (dalam broth LB) berumur 90 menit untuk membuat media pertumbuhan bakteri. *Soft top agar* juga ditambahkan 0.1 ml sediaan bakteriofag dari masing-masing faktor dilusi. Hasil pembentukan plaque diamati setelah inkubasi dalam 24 jam pada suhu 37°C. Konsentrasi sediaan bakteriofag dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) dapat dihitung dengan mengamati hasil *plaque assay*.

Hasil Penelitian

Identifikasi *E.coli* dilakukan dengan melakukan penanaman sampel limbah pada agar Endo yang

kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Pertumbuhan *E.coli* diidentifikasi dengan perubahan warna agar menjadi merah gelap dan koloni bakteri tumbuh dengan tekstur licin dan memiliki warna kilap logam seperti yang ditunjukkan panah pada gambar 1:



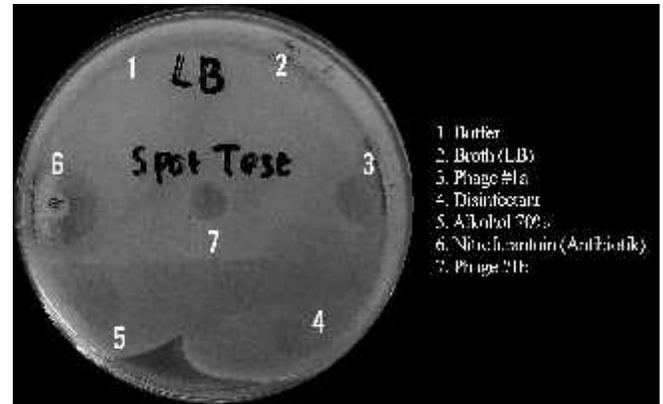
Gambar 1. Identifikasi *E.coli* sampel limbah pada agar Endo

Identifikasi bakteriofag pada limbah cair RSUD Arifin Achmad Pekanbaru dengan aktivitas litik dikonfirmasi melalui spot test menggunakan limbah cair yang sudah diolah melalui tahap Enrichment. Hasil identifikasi bakteriofag dapat dilihat melalui Tabel 1 :

Tabel 1. Isolasi Bakteriofag Litik Terhadap *E.coli*

No	Sampel	Isolasi Bakteriofag	Spot test	Diameter Plaque
1	Limbah Cair #1	+	+	0.5-1.8 mm
2	Limbah Cair #2	-	-	-

Berdasarkan tabel 1, limbah cair kedua (Limbah cair #2) yang diambil lima hari setelah sampel pertama tidak ada ditemukan *clear zone* pada uji *spot test*. Oleh karena itu limbah cair#2 tidak dilanjutkan ke tahap *plaque assay*. Pada hasil *spot test* limbah cair pertama (limbah cair #1) didapatkan hasil positif dengan *clear zone* yang sangat jelas. Hal ini membuktikan bahwa limbah cair#1 yang diambil dari IPAL RSUD Arifin Achmad mengandung bakteriofag litik terhadap *E.coli* ATCC 35218. Hasil *spot test* limbah cair #1 dapat dilihat pada tanda nomor 3 dan nomor 7 pada Gambar 2 :



Gambar 2. Hasil *Spot Test* Sampel Limbah Cair #1

Interpretasi kedua kontrol negatif berupa Buffer Bakteriofag (100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, dan 0,01% gelatin pH 7.5) dan Broth LB tidak menunjukkan perubahan pada media yang ditumbuhi bakteri. *Spot test* juga dilakukan dengan menggunakan disinfektan dan alkohol 70%. Pada uji menggunakan disinfektan hasil terlihat meragukan karena zona inhibisi tidak sepenuhnya terlihat jernih (*clear*). Hal ini juga ditemukan pada Alkohol 70%, tetapi hasil menunjukkan Alkohol 70% masih sangat opaque jika dibandingkan dengan kontrol positif. *Spot test* dengan menggunakan alkohol dan disinfektan dapat dijadikan sebagai referensi untuk hasil dengan interpretasi meragukan Kontrol positif pada penelitian ini adalah kontrol dengan menggunakan antibiotic disc nitrofurantoin. Antibiotik menunjukkan hasil *clear zone* yang sangat jelas dengan diameter 2 cm. Perlakuan menggunakan Phage#1a dan Phage#1b menunjukkan hasil *clear zone* yang sangat jelas. *Spot test* Phage#1a memiliki diameter 1 cm, sedangkan Phage#1b memiliki diameter 0,8 cm. Berikut merupakan variabel, bahan kandungan dan hasil dari *spot test* limbah cair#1 yang dapat dilihat pada Tabel 2 :

Tabel 2. Hasil dan Interpretasi *Spot Test*

No	Variabel	Bahan Kandungan	Hasil	Interpretasi
1	Kontrol Negatif	Buffer 100mM NaCl, 10mM MgCl ₂ , 50mM Tris-HCl, dan 0,01% gelatin (pH 7.5)	-	Tidak ditemukan <i>clear zone</i>
2	Kontrol Negatif	Broth LB	-	Tidak ditemukan <i>clear zone</i>

	Perlakuan	Sampel		
3	(Phage #1a)	Limbah kedua yang sudah diolah dan melalui tahap enrichment.	+	Clear zone jelas
4	N/A	Disinfektan (Ethanol 100% dan Propanol)	-/+	Clear zone meragukan
5	N/A	Alkohol 70%	-/+	Clear zone meragukan
6	Kontrol Positif	Antibiotic Disc (Nitrofurantoin)	+	Clear zone jelas
7	(Phage #1b)	Sampel Limbah kedua yang sudah diolah dan melalui tahap enrichment.	+	Clear zone jelas

Plaque assay dilakukan dengan teknik double layer dengan top agar yang terdiri dari soft agar 0.7%, 100µL inokulat *E.coli* ATCC 35218, dan 100µL larutan bakteriofag untuk masing-masing faktor dilusinya. Agar kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, menghasilkan plaque seperti yang dapat dilihat pada gambar 3 :



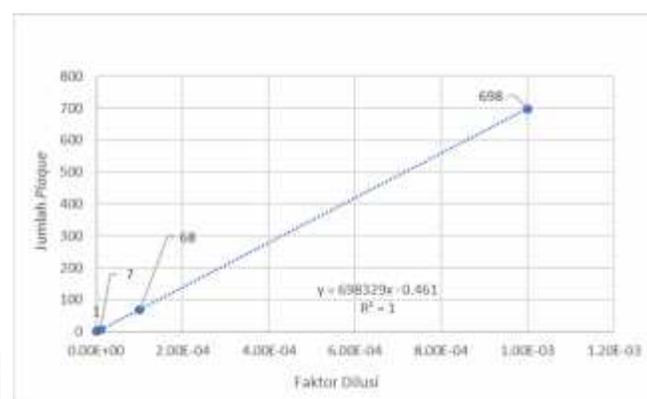
Gambar 3. Hasil Plaque Assay

Hasil plaque assay pada agar menunjukkan pembentukan plaque dengan jumlah yang bervariasi pada masing-masing perlakuan faktor dilusi larutan bakteriofag. Plaque dalam hal ini merupakan zona inhibisi, titik jernih, atau clear zone yang berukuran sangat kecil (0.5-1.8 mm) pada permukaan agar yang ditumbuhi bakteri. Jumlah plaque yang dibentuk oleh bakteriofag pada setiap faktor dilusi dapat dilihat pada Tabel 3 :

Tabel 3. Jumlah Plaque Pada Setiap Faktor Dilusi

Faktor Dilusi	Jumlah Plaque
10 ⁻¹	Tidak dapat dihitung
10 ⁻²	Terlalu banyak untuk dihitung
10 ⁻³	698
10 ⁻⁴	68
10 ⁻⁵	7
10 ⁻⁶	1

Hal yang pertama kali dapat diperhatikan dengan sekilas pada hasil plaque assay adalah jumlah plaque yang semakin sedikit sejalan dengan faktor dilusi yang semakin kecil. Jumlah plaque yang dihitung dipastikan korelasinya sejalan dengan faktor dilusi dapat dilihat pada Gambar 4 :



Gambar 4. Korelasi Jumlah Plaque dengan Faktor Dilusi

Hasil menunjukkan nilai R=1 yang berarti ini adalah korelasi positif yang kuat. Hal ini berarti bahwa Faktor Dilusi sejalan dengan Jumlah Plaque. Setelah jumlah plaque dianggap sejalan dengan faktor dilusi, maka konsentrasi bakteriofag dapat dihitung dengan rumus berikut :

$$\frac{\text{Jumlah Plaque}}{\text{Volume Inokulasi Bakteriofag (ml)} \times \text{Faktor Dilusi}} = \text{PFU/mL}$$

Dalam hal ini Volume Inokulasi Bakteriofag adalah volume larutan bakteriofag yang dicampur dengan soft agar. Volume yang digunakan pada penelitian ini adalah 100µL atau 10⁻¹ml.

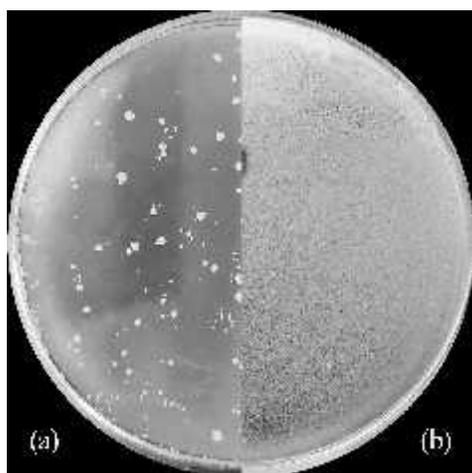
Jumlah plaque kemudian dikonversikan berdasarkan faktor dilusi dan volume inokulasi bakteriofag untuk mendapatkan konsentrasi bakteriofag dengan satuan PFU/mL. Hasil konversi dapat dilihat pada Tabel 4 :

Tabel 4. Faktor Dilusi, Jumlah *Plaque*, PFU/mL dan Log PFU/mL

Faktor Dilusi	Jumlah <i>Plaque</i>	PFU/mL	Log PFU/mL
10 ⁻¹	Tidak dapat dihitung	-	-
10 ⁻²	Terlalu banyak untuk dihitung	-	-
10 ⁻³	698	6.98E+06	6.843855
10 ⁻⁴	68	6.80E+06	6.832509
10 ⁻⁵	7	7.00E+06	6.845098
10 ⁻⁶	1	1.00E+07	7.000000
Rata-Rata		7.70E+06	6.880365

Setelah semua konsentrasi bakteriofag dihitung, maka didapatkan rata-rata konsentrasinya adalah $\pm 7.7 \times 10^6$ PFU/mL. Grafik perbandingan rata-rata PFU/mL.

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) didefinisikan sebagai konsentrasi antibiotik terendah yang dapat membunuh 99,9% inokulat bakteri.⁸ Dalam hal ini, MBC dapat dihitung dengan serial dilution dan *plaque assay*. Konsentrasi sediaan bakteriofag yang merupakan konsentrasi tertinggi pada penelitian ini adalah $\pm 7.7 \times 10^6$ PFU/mL, yaitu sediaan *phage#1a*. Kontrol yang digunakan sebagai pembanding adalah hasil *plaque assay* faktor dilusi 10⁻⁷ yang memiliki bakteri yang masih utuh sepenuhnya. Pada Gambar 5 dapat diamati *plaque assay* konsentrasi tertinggi yang menggunakan sediaan *phage#1a* masih ada sedikit koloni bakteri (clearance <99.9%). Hal ini berarti MBC untuk sediaan *phage#1a* pada penelitian ini belum tercapai, dan MBC >7.7x10⁶ PFU/mL.



Gambar 5. *Plaque assay phage#1a* (a) dan Faktor Dilusi 10⁻⁷ (b)

Pembahasan

Pada hasil penelitian ini sampel bakteriofag memiliki hasil positif berupa *clear zone* pada area yang ditetaskan sampel variabel perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa sampel yang bersumber dari limbah cair RSUD Arifin Achmad Pekanbaru mengandung bakteriofag litik terhadap *E.coli* ATCC 35218. Dengan dikonfirmasi sampel limbah cair mengandung bakteriofag, sampel yang sama yaitu sampel *Phage#1a* dapat digunakan untuk *plaque assay*.

Pada penelitian ini tidak dilakukan penelitian untuk mencari strain spesifik dan *host range* bakteriofag karena keterbatasan alat, bahan dan jenis bakteri yang tersedia. Pada penelitian Montso et al., *host range* bakteriofag *E.Coli* yang diisolasi dari feses sapi dilakukan dengan menguji delapan bakteriofag litik, terhadap 50 *host* yang terdiri dari berbagai spesies dan strain. Hasil penelitiannya menyebutkan bahwa semua bakteriofag menghasilkan *clear zone* pada semua *spot test* terhadap *E.coli* O177 (100%). Sedangkan pada strain *E.coli* lain seperti pada *E.coli* O26, *clear zone* yang dihasilkan bakteriofag dihasilkan sebanyak 83-100% pada *spot test*. Pada strain *E.coli* O157 *clear zone* dihasilkan sebanyak 75-83% pada *spot test*. Pada penelitiannya, *host range* terhadap spesies lain seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella sp* tidak ditemukan *clear* pada keseluruhan *spot test* (0%).⁹

Pemahaman tentang spesifisitas bakteriofag penting untuk menggambarkan keberhasilan atau efek samping dalam penggunaan bakteriofag, terutama pada terapi bakteriofag. Hal ini didasari oleh sifat bakteriofag yang kadang hanya menginfeksi strain, spesies, atau bahkan genus bakteri tertentu.¹⁰ Dengan *host range* bakteriofag yang sangat luas pada spesies yang sama, sediaan bakteriofag *phage#1a* memiliki kemungkinan besar dapat menginfeksi *Multi-drug Resistant E.coli*, dan dapat digunakan sebagai solusi alternatif resistensi antibiotik.

Serial dilution dan *plaque assay* dilakukan karena konsentrasi sediaan bakteriofag diasumsikan masih terlalu tinggi untuk dihitung jumlah *plaque*nya. Asumsi ini berdasarkan hasil *spot test* pertama yang menunjukkan *clear zone* yang dihasilkan sangat jernih pada area yang ditetaskan oleh sediaan bakteriofag. Pada penelitian oleh Sanders, *plaque* bakteriofag *e.coli* yang terbentuk pada permukaan agar EHA (*Enhanced Haemolysis Agar*) berukuran 1

mm. Pada penelitiannya, sediaan bakteriofag memiliki konsentrasi 2×10^8 PFU/mL.¹¹

Morfologi *plaque* yang dibentuk oleh bakteriofag memiliki banyak faktor. Salah satu faktor yang berpengaruh besar adalah media dan suplemen yang digunakan pada agar sebagai media melakukan *plaque assay*. Pada penelitian Ramesh et al., morfologi *plaque* yang dibentuk oleh bakteriofag tampak berbeda pada semua agar, yaitu pada NA, LB, BHI, MHA dan TSA. Hal yang perlu dicatat adalah penambahan suplemen CaCl_2 yang berpengaruh signifikan terhadap ukuran dan morfologi *plaque*. Pada media TSA, MHA, dan BHI dengan suplemen CaCl_2 , ukuran *plaque* yang dihasilkan jauh lebih besar jika dibandingkan dengan media tanpa suplemen CaCl_2 .¹²

Pada penelitian Tkhalishvili et al., yang meneliti tentang bakteriofag yang menginfeksi MRSA, dijelaskan bahwa MBC terhadap inokulum $1-5 \times 10^6$ CFU/ml adalah 1×10^7 PFU/mL.¹³ Hal ini sejalan jika dibandingkan dengan konsentrasi sediaan *phage#1a* yang belum mencapai *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), yaitu $7,7 \times 10^6$. Jika dilihat pada gambar 5 permukaan agar hampir membersihkan permukaan agar dari pembentukan koloni bakteri. Maka dari itu, konsentrasi bakteriofag *phage#1a* yang lebih tinggi dibutuhkan untuk mendapatkan MBC. *Minimum Bactericidal Concentration* bakteriofag sangat penting, karena konsentrasi bakteriofag akan menentukan berhasil atau tidaknya bakteriofag dalam penggunaannya, terutama pada terapi yang menggunakan bakteriofag.¹³

Kesimpulan

Berdasarkan hasil pembahasan, dapat diambil kesimpulan bahwa bakteriofag litik terhadap *E.coli* dapat ditemukan pada limbah cair rumah sakit. Bakteriofag yang ditemukan berpotensi digunakan sebagai agen antibakteri berdasarkan hasil *spot test*. Sediaan bakteriofag *phage#1a* dengan konsentrasi $\pm 7,7 \times 10^6$ PFU/mL pada penelitian ini belum mencapai *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC).

Daftar Pustaka

1. World Health Organisation. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis [Internet]. Vol. 29, Joint News Release. 2019. p. 2019–22. Available from: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>

2. Ibrahim ME, Bilal NE, Hamid ME. Increased multi-drug resistant *Escherichia coli* from hospitals in Khartoum state, Sudan. *Afr Health Sci*. 2012;12(3):368–75.
3. Hadi U, Kuntaman K, Qiptiyah M, Paraton H. Problem of Antibiotic Use and Antimicrobial Resistance in Indonesia: Are We Really Making Progress? *Indones J Trop Infect Dis*. 2013;4(4):5.
4. Borysowski J, Górski A. Is phage therapy acceptable in the immunocompromised host? Vol. 12, *International Journal of Infectious Diseases*. 2008. p. 466–71.
5. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris J. Bacteriophage therapy. Vol. 45, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001. p. 649–59.
6. Pirnay JP. Phage Therapy in the Year 2035. *Front Microbiol*. 2020;11(June).
7. Klai N, Sellamuthu B. Bacteriophages isolated from hospital wastewater and its role in controlling drug-resistant pathogens [Internet]. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. BV; 2020. 327–376 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-819722-6.00010-9>
8. Misra R, Sahoo SK. Antibacterial activity of doxycycline-loaded nanoparticles [Internet]. 1st ed. Vol. 509, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.; 2012. 61–85 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00004-6>
9. Montso PK, Mlambo V, Ateba CN. Characterization of Lytic Bacteriophages Infecting Multidrug-Resistant Shiga Toxigenic Atypical *Escherichia coli* O177 Strains Isolated From Cattle Feces. *Front Public Heal*. 2019;7(November).
10. Koskella B, Meaden S. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. *Viruses*. 2013;5(3):806–23.
11. Sanders ER. Aseptic laboratory techniques: Plating methods. *J Vis Exp*. 2012;(63):1–18.
12. Ramesh N, Archana L, Madurantakam Royam M, Manohar P, Eniyan K. Effect of various bacteriological media on the plaque morphology of *Staphylococcus* and *Vibrio* phages. *Access Microbiol*. 2019;1(4):1–4.
13. Tkhalishvili T, Wang L, Tavanti A, Trampuz A, Di Luca M. Antibacterial Efficacy of Two Commercially Available Bacteriophage Formulations, *Staphylococcal Bacteriophage* and *PYO Bacteriophage*, Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevention and Eradication of Biofilm Formation and Control of a Syst. *Front Microbiol*. 2020;11(February).

