

Pemencilan dan pengelasan morfologi kolifaj daripada sampel makanan

(Isolation and morphology classification of coliphages from food samples)

Nur ilida Mohamad, Mohd Effendi Mohamed Nor dan Nur Baizura Sa'dom

Pengenalan

Bakteriofaj adalah sejenis virus yang hanya menyerang dan membiak dalam sel hosnya iaitu bakteria. Sebaik sahaja bakteriofaj berjaya menyuntik dan memindahkan molekul yang mengandungi maklumat genetiknya ke dalam sel bakteria, ia akan memecahkan sel bakteria dan membunuhnya. Bakteriofaj mula ditemui dan dipencilkan buat pertama kali pada awal 1900-an dan semenjak itu kajian telah ditumpukan bagi kegunaan terapeutik dan diagnostik. Kajian kemudiannya turut dijalankan untuk melihat potensi penggunaannya dalam bidang lain termasuk industri makanan.

Partikel virus bakteriofaj terdiri daripada molekul genetik DNA atau RNA bebenang tunggal atau dwibebenang dan dilapisi oleh protein atau lipoprotein. Pengelasan saintifik untuk bakteriofaj dilakukan mengikut ketetapan *International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV)* yang telah melakukan pengelasan bakteriofaj berdasarkan morfologi dan juga komposisi asid nukleiknya. Berdasarkan kaedah ini, kebanyakan bakteriofaj yang dapat membunuh bakteria patogenik yang menyebabkan penyakit bawaan makanan didapati berada dalam order Caudovirales iaitu bakteriofaj yang terdiri daripada DNA dwibebenang dan mempunyai ekor.

Bakteriofaj dalam order Caudovirales ini pula terdiri daripada tiga famili yang dibezakan oleh morfologi ekornya iaitu Siphoviridae, Myoviridae dan Podoviridae. Sewaktu menyerang sel bakteria, ekor bakteriofaj akan melekat di permukaan sel bakteria berkenaan. Ekor ini akan menjadi laluan untuk memindahkan bahan genetik iaitu DNA atau RNA ke dalam sel bakteria sebelum proses memusnahkan sel hos tersebut dapat dilakukan. Pengelasan mikroorganisma termasuk juga bakteriofaj perlu dijalankan untuk membolehkan ia dikenal pasti mengikut sistem pengelasan yang standard dan asal usulnya dapat diketahui sebelum kajian lanjut berkaitan penggunaannya dapat dilakukan.

Penggunaan bakteriofaj dalam industri makanan

Dalam industri makanan, banyak kajian dijalankan bagi mengkaji potensi penggunaan bakteriofaj untuk melawan bakteria yang signifikan dengan isu keselamatan makanan seperti *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria* sp. dan juga *Staphylococcus aureus*. Kumpulan bakteria yang banyak memberi risiko kepada keselamatan makanan dan boleh menyebabkan penyakit bawaan makanan ini juga dikenali dengan istilah patogen. Kumpulan patogen ini boleh merebak melalui beberapa cara, antaranya adalah melalui pemrosesan dan penyediaan makanan dalam keadaan yang tidak bersih, proses memasak dan memanaskan semula makanan yang tidak sempurna dan juga penggunaan air yang tidak bersih dan tercemar. Keadaan tersebut menyebabkan pencemaran dan menggalakkan pertumbuhan patogen dalam makanan yang boleh membahayakan kesihatan pengguna.

Di peringkat antarabangsa, *US Food and Drug Administration* (USFDA) iaitu agensi yang bertanggungjawab mengawasi keselamatan makanan di Amerika Syarikat telah membenarkan penggunaan LISTEX™ dalam produk makanan di negara tersebut. Produk LISTEX™ adalah sejenis bakteriofaj tersedia yang dapat membunuh bakteria *Listeria* sp. telah diklasifikasikan sebagai *Generally Recognized As Safe* (GRAS) iaitu selamat untuk digunakan. Produk yang sama juga telah memperoleh status organik di negara-negara Kesatuan Eropah (EU) dan penggunaannya dibenarkan sama ada dalam produk organik dan bukan organik.

Keselamatan makanan adalah satu perkara signifikan dalam industri makanan. Kewujudan isu yang berterusan berkaitan pencemaran makanan yang disebabkan oleh bakteria patogenik telah mendorong saintis untuk membangunkan satu kaedah antimikrob baru sebagai alternatif kepada kaedah sedia ada. Selain itu, kewujudan isu berkaitan kesan buruk penggunaan beberapa agen sanitasi berasaskan kimia yang biasa digunakan turut mendorong saintis dan mereka yang terlibat dengan industri makanan untuk mencari alternatif yang lebih bersifat semula jadi. Aplikasi penggunaan bakteriofaj sebagai agen yang mencegah dan mengawal penyakit yang disebabkan oleh bakteria telah lama dilaksanakan dengan pelbagai bukti penggunaan yang selamat dan memberi kesan yang positif. Namun begitu, potensi penggunaannya untuk memperbaiki tahap keselamatan makanan dalam industri makanan adalah agak baru dan terkini.

Kehadiran dan pemencilan bakteriofaj daripada sampel makanan

Bakteriofaj wujud secara semula jadi dalam persekitaran kita. Seperti juga hosnya iaitu bakteria, bakteriofaj dapat ditemui dalam pelbagai persekitaran. Kajian terdahulu menunjukkan

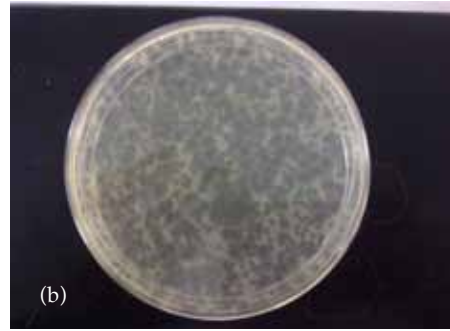
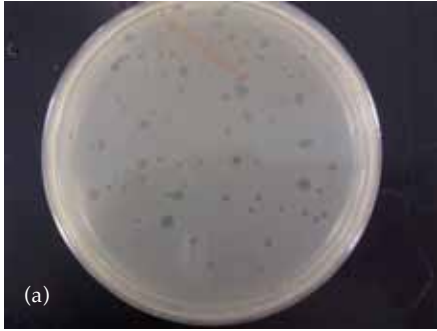
bahawa bakteriofaj telah ditemui dalam jumlah yang tinggi dalam sampel air laut dan juga air sungai. Ia juga pernah dipencilkan daripada sampel tanah, air kumbahan dan juga makanan.

Bakteriofaj sangat bergantung kepada kewujudan hosnya iaitu bakteria. Secara umumnya dapat dinyatakan bahawa kewujudan sesuatu jenis bakteriofaj dapat dihubungkan dengan persekitaran yang dihuni oleh hosnya iaitu bakteria. Kebergantungan ini tidak dapat dielakkan kerana bakteriofaj adalah bersifat memerlukan hos untuk hidup dan membiak. Oleh itu, penyelidik biasanya akan memencilkan bakteriofaj dari persekitaran yang turut didiami oleh hosnya. Penyelidik yang cuba memencilkan bakteriofaj yang dapat membunuh bakteria seperti *Listeria* sp. telah melakukan proses pemencilan menggunakan sampel makanan tenusu dan berasaskan tenusu seperti keju. Ini kerana, *Listeria* sp. banyak ditemui dalam sampel keju dan telah menyebabkan banyak kes penyakit bawaan makanan.

Bakteriofaj yang berjaya dipencilkan kemudiannya dibiakkan dalam kuantiti yang banyak dan dituliskan sebelum dapat digunakan untuk melawan kembali bakteria *Listeria* sp. dalam sampel makanan. Terdapat juga kajian pemencilan bakteriofaj yang telah dijalankan untuk kawalan *Staphylococcus* sp. yang dilakukan dengan menggunakan sampel susu daripada lembu yang dijangkiti penyakit mastitis. Bakteriofaj telah berjaya dipencilkan daripada sampel susu lembu berpenyakit berbanding dengan susu daripada lembu yang sihat kerana susu daripada lembu berpenyakit mengandungi lebih banyak bakteria *Staphylococcus* sp.

Kajian pemencilan kolifaj di MARDI

Bakteria *E. coli* adalah satu indikator yang digunakan untuk menunjukkan tahap kebersihan sesuatu produk makanan. Kehadiran bakteria penunjuk tahap kebersihan ini walaupun tidak dapat mengesahkan tahap keselamatan produk, tetapi dapat menjadi petunjuk awal kepada amalan kebersihan yang lemah semasa pemprosesan. Sebahagian daripada strain *E. coli* juga adalah bersifat patogenik dan dapat menyebabkan penyakit bawaan makanan yang serius dan sepatutnya tidak boleh hadir dalam produk makanan. Kajian telah dilakukan di Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, MARDI bagi memencilkan kolifaj, iaitu bakteriofaj yang dapat membunuh bakteria *E. coli*. Pemencilan kolifaj dilakukan dengan menggunakan beberapa jenis sampel makanan yang biasa dicemari oleh *E. coli* seperti daging dan susu mentah. Pencilan kolifaj ini kemudiannya dikelaskan mengikut bentuk morfologi ekornya. Kolifaj yang telah berjaya dipencilkan dan dikelaskan akan digunakan dalam kajian lanjut pada masa depan untuk melihat aplikasinya dalam industri makanan.



Gambar 1(a). Kolifaj membentuk zon lingkaran cerah berbentuk bulat atau halo zone di permukaan agar lembut, di dalam piring petri makmal manakala kawasan tanpa halo zone adalah kawasan yang dipenuhi oleh *E. coli* yang belum dipecahkan oleh kolifaj.
 (b). Kolifaj membiak dengan banyaknya di permukaan agar membentuk lebih banyak zon-zon lingkaran cerah berbentuk bulat yang bertindih dan memenuhi piring agar

Kaedah pemencilan kolifaj pada agar lembut dalam piring petri makmal

Bagi kajian di makmal, terdapat protokol dan kaedah tertentu yang digunakan untuk memencilkan bakteriofaj termasuk kolifaj daripada sampel makanan. Kajian pemencilan kolifaj biasanya dilakukan menggunakan agar lembut di dalam piring petri makmal. Kolifaj yang berjaya diasingkan daripada sampel makanan akan dipencilkan di permukaan agar lembut dengan kehadiran hosnya sekali iaitu sel bakteria *E. coli*.

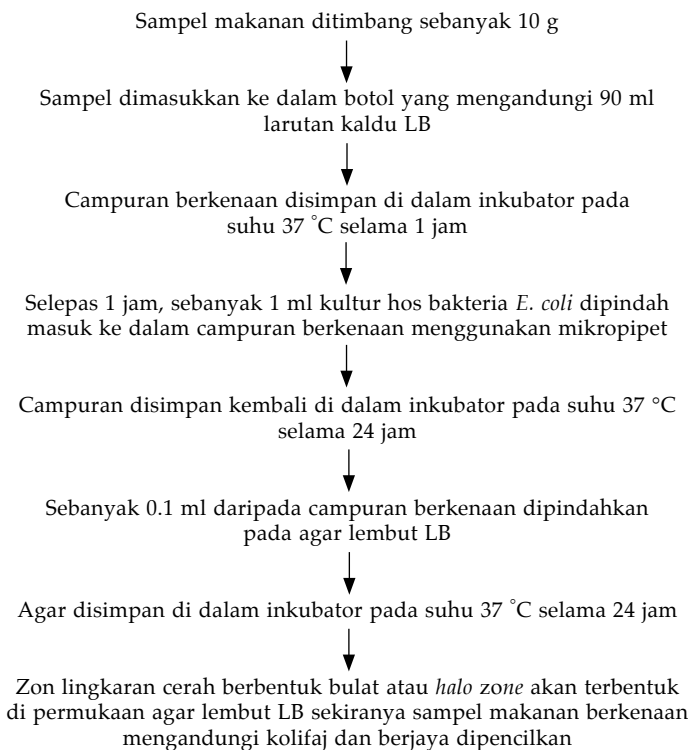
Kolifaj yang wujud dalam sampel makanan tadi akan memecahkan sel *E. coli* pada permukaan agar lembut dan membentuk zon lingkaran cerah berbentuk bulat atau *halo zone*. Kawasan tanpa *halo zone* ialah sel *E. coli* yang belum dipecahkan oleh kolifaj [Gambar 1(a)]. Proses pembiakan di permukaan agar lembut, di dalam piring petri makmal akan dibiarkan berlaku selama 24 jam dan akhirnya kolifaj akan membiak dengan banyaknya di permukaan membentuk lebih banyak zon lingkaran cerah berbentuk bulat yang bertindih dan memenuhi piring agar [Gambar 1(b)]. Gambar 2 pula menunjukkan antara sampel makanan yang terlibat dalam kajian ini. Carta alir 1 menunjukkan secara ringkas kaedah yang digunakan untuk pemencilan kolifaj daripada sampel makanan di makmal.

Kaedah pemerhatian morfologi pencilan kolifaj di bawah mikroskop elektron transmisi

Kolifaj berjaya dipencilkan daripada sampel makanan dan membentuk zon lingkaran cerah di permukaan agar Luria Bertani (LB). Namun begitu, morfologi atau bentuk dan struktur fizikalnya tidak akan dapat dilihat dengan mata kasar kerana saiz virus yang terlampau kecil. Oleh itu, alat mikroskop elektron transmisi telah digunakan untuk mengkaji morfologi kolifaj. Pencilan kolifaj ini diperhatikan di bawah



Gambar 2. Antara sampel yang digunakan untuk pemencilan kolifaj

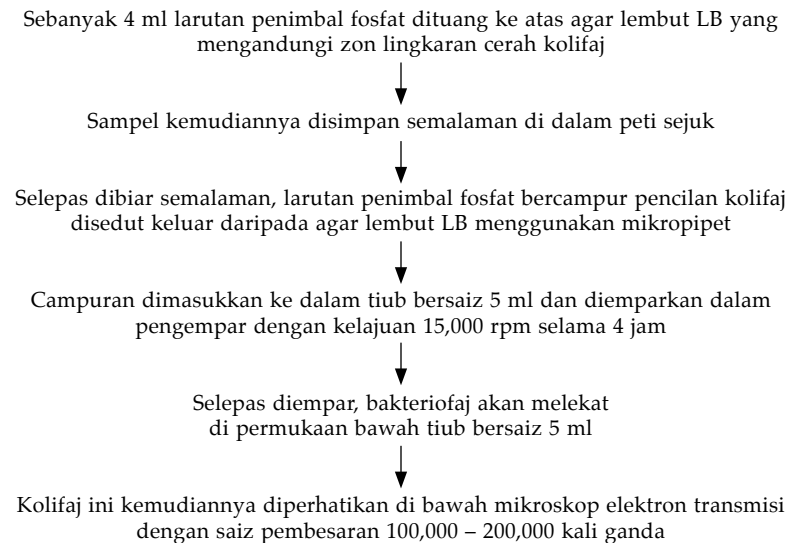


Carta alir 1. Penerangan ringkas kaedah yang digunakan untuk pemencilan kolifaj daripada sampel makanan di makmal

mikroskop elektron dengan saiz pembesaran 100,000 – 200,000 kali ganda. Kajian yang dijalankan ke atas morfologinya akan membantu penyelidik mengelaskan kolifaj ini mengikut sifat morfologinya. *Carta alir 2* menunjukkan secara ringkas, kaedah yang digunakan di makmal untuk penyediaan pencilan kolifaj bagi tujuan pemerhatian di bawah mikroskop elektron.

Sifat kolifaj yang dipencilkan daripada sampel makanan di atas agar lembut Luria Bertani

Sebanyak 23 pencilan kolifaj telah diperoleh daripada 96 sampel makanan yang dianalisis (*Jadual 1*). Kesemua pencilan kolifaj diperoleh daripada sampel daging ayam mentah (15 pencilan), daging lembu mentah (4 pencilan) dan susu segar (4 pencilan). Kehadiran pencilan kolifaj ini dikesan berdasarkan pembentukan kawasan zon lingkaran cerah atau *halo zone* pada agar LB. Saiz zon lingkaran cerah ini direkodkan sebagai bacaan diameter dengan nilai 2 – 6 mm. Zon lingkaran ini boleh memberi petunjuk awal kepada kebolehan kolifaj yang dipencilkan untuk membunuh strain *E. coli*. Pencilan dengan saiz zon yang lebih besar menunjukkan kebolehan kolifaj dalam zon berkenaan mempunyai potensi yang lebih baik untuk membunuh strain *E. coli* berbanding dengan zon yang lebih kecil.



Carta alir 2. Penerangan ringkas kaedah yang digunakan untuk membiakkan dan menuliskan kolifaj di makmal bagi tujuan pemerhatian morfologinya di bawah mikroskop elektron transmisi

Jadual 1. Pencilan kolifaj yang diperoleh daripada sampel makanan

Sumber makanan	Diameter zon cerah kolifaj (mm)	Kod kolifaj
Ayam mentah	4.0	ΦA
Ayam mentah	2.0	ΦAE3
Ayam mentah	2.0	ΦBE3
Ayam mentah	4.0	ΦCE3
Ayam mentah	2.0	ΦAE6(1)
Ayam mentah	2.0	ΦAE6(2)
Ayam mentah	2.0	ΦAE7(1)
Ayam mentah	2.0	ΦAE7(2)
Ayam mentah	2.0	ΦAE9(1)
Ayam mentah	2.0	ΦAE9(2)
Ayam mentah	2.0	ΦBE9
Ayam mentah	4.0	ΦAEATC
Ayam mentah	4.0	ΦBEATC
Ayam mentah	4.0	ΦAEUN
Ayam mentah	4.0	ΦBEUN
Daging lembu mentah	2.0	ΦBE6(1)
Daging lembu mentah	2.0	ΦBE6(2)
Daging lembu mentah	2.0	ΦCE9
Daging lembu mentah	6.0	ΦCE9b
Susu segar	2.0	ΦCE6(1)
Susu segar	2.0	ΦCE6(2)
Susu segar	2.0	ΦXCS6
Susu segar	2.0	ΦBE8

Pengelasan kolifaj berdasarkan morfologi di bawah mikroskop elektron transmisi

Kolifaj yang berjaya dipencilkan daripada sampel makanan dan membentuk zon lingkaran cerah pada agar lembut LB kemudiannya dibiak dan dituliskan di makmal. Morfologi pencilan kolifaj kemudiannya diperhatikan di bawah mikroskop elektron transmisi. Imej pencilan kolifaj yang dilihat melalui kaedah ini dapat memberi beberapa informasi berkaitan sifat morfologinya termasuk saiz kepala, ekor dan juga saiz keseluruhan setiap pencilan. Sebanyak 13 pencilan dikenal pasti sebagai famili Myoviridae, Podoviridae (3 pencilan) dan Siphoviridae (7 pencilan). Ketiga-tiga famili biasanya dibezakan oleh morfologi ekornya di mana famili Myoviridae biasanya mempunyai ekor yang kelihatan seperti berlapis manakala famili Siphoviridae biasanya memiliki ekor yang halus dan panjang. Famili Podoviridae pula mudah dikenali dan dibezakan daripada kedua-dua famili tadi kerana ekornya yang sangat pendek dan gabuk atau gemuk. Imej mikroskop elektron transmisi ini juga dapat memberikan morfologi kepala setiap pencilan kolifaj. Namun begitu, morfologi kepala dan saiz keseluruhan biasanya tidak

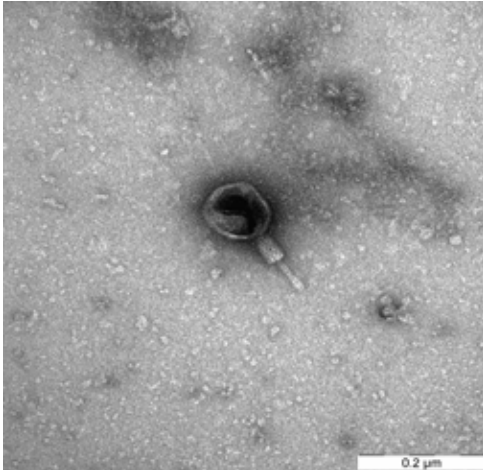
dapat membantu untuk pengelasan secara tepat seperti mana pengelasan menggunakan morfologi ekor. Ia biasanya hanya dicatatkan sebagai rekod. Penerangan berkaitan morfologi setiap pencilan kolifaj ini seperti yang dilihat di bawah mikroskop ditunjukkan seperti dalam *Jadual 2* dan gambar morfologi ditunjukkan seperti dalam *Gambar 3, 4 dan 5*.

Kesimpulan

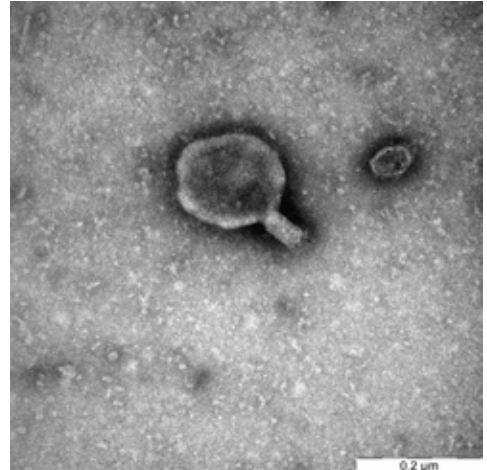
Kolifaj telah berjaya dipencilkan daripada sampel makanan mentah iaitu daging dan susu mentah. Pencilan kolifaj ini didapati telah berjaya memecahkan sel hos iaitu bakteria *E. coli* dengan membentuk zon lingkaran cerah di permukaan agar. Pemerhatian di bawah mikroskop elektron transmisi telah berjaya mengelaskan pencilan bakteriofaj ini berdasarkan morfologi iaitu bentuk ekornya.

Jadual 2. Penerangan berkaitan morfologi pencilan kolifaj seperti yang dilihat di bawah mikroskop elektron transmisi

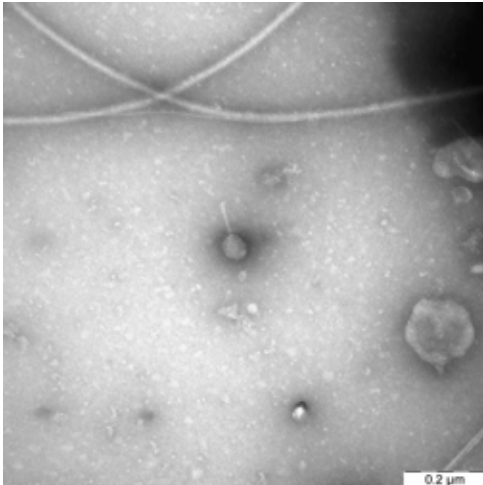
Kod kolifaj	Morfologi kolifaj			Famili
	Morfologi kepala	Morfologi ekor	Anggaran saiz keseluruhan	
ΦA	Tidak isometrik	Tidak mengecut	181.76	Myoviridae
ΦCE6(2)	Isometrik	Satu lapisan	226.60	Myoviridae
ΦBE3	Panjang	Satu lapisan	272.90	Myoviridae
ΦCE3	Tidak isometrik	Dua lapisan	230.00	Myoviridae
ΦAE6(1)	Panjang	Satu lapisan	224.98	Myoviridae
ΦAEUN	Isometrik	Satu lapisan	301.14	Myoviridae
ΦBE9	Panjang	Satu lapisan	280.00	Myoviridae
ΦAE7(2)	Isometrik	Satu lapisan	316.68	Myoviridae
ΦAE9(1)	Isometrik	Dua lapisan	220.00	Myoviridae
ΦBEUN	Isometrik	Satu lapisan	356.10	Myoviridae
ΦBE6(2)	Isometrik	Satu lapisan	265.14	Myoviridae
ΦBE6(1)	Panjang	Satu lapisan	322.00	Myoviridae
ΦBEATC	Isometrik	Satu lapisan	314.00	Myoviridae
ΦAE3	Tidak isometrik	Pendek, gabuk	208.00	Podoviridae
ΦCE9	Tidak isometrik	Pendek, gabuk	217.67	Podoviridae
ΦCE9b	Tidak isometrik	Pendek, gabuk	220.00	Podoviridae
ΦAE6(2)	Isometrik	Panjang, lurus	510.00	Siphoviridae
ΦAE9(2)	Isometrik	Panjang, lurus	380.00	Siphoviridae
ΦAE7(1)	Panjang	Panjang, lurus	363.31	Siphoviridae
ΦCE6(1)	Isometrik	Panjang, lurus	421.81	Siphoviridae
ΦAEATC	Isometrik	Panjang, lurus	366.25	Siphoviridae
ΦXCS6	Isometrik	Panjang, lurus	420.00	Siphoviridae
ΦBE8	Isometrik	Panjang, lurus	454.00	Siphoviridae



Gambar 3. Morfologi kolifaj daripada famili Myoviridae



Gambar 4. Morfologi kolifaj daripada famili Podoviridae



Gambar 5. Morfologi kolifaj daripada famili Siphoviridae

Penghargaan

Pengarang mengucapkan terima kasih kepada Pn. Irmazian Abd. Shukor dari Unit Mikroskopi, Institut Biosains, Universiti Putra Malaysia yang turut terlibat semasa kajian ini dijalankan.

Bibliografi

- Abedon, S.T. dan Yin, J. (2008). Bacteriophage plaques: theory and analysis. *Methods Mol. Biol.* 501: 161 – 174
- Ackermann, H.W. (2007). 5500 phages examined in the electron microscope. *Journal of Arch. Virol.* 152: 227 – 243
- Allwood, P.B., Malik, Y.S., Maherchandani, S., Vought, K., Johnson, L.E., Braymen, C., Hedberg, C.W. dan Goyal, S.M. (2004). Occurrence of *Escherichia coli*, noroviruses and F-specific coliphages in fresh market-ready produce. *Journal of Food Protection* 67: 2387 – 2390

- EBI Food Safety (2007). FDA extends GRAS approval LISTEX™ to all food products. Diperoleh pada 3 Julai 2016 dari www.ebifoodsafety.com
- Muniesa, M., Lucena, F. dan Jofre, J. (1997). Study on the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *Journal of Appl. Microbiol.* 87: 402 – 409
- Nidham, J., Roger, P.J., Robert, F., Andrew, M.K., Erika, J.L. dan Carlton, L.G. (2007). Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Vet. Microbiol.* 124: 47 – 57
- Pieter, J.C. dan Rob, L. (2010). Introduction to bacteriophage biology and diversity. Dalam: *Bacteriophages in the control of food and waterborne pathogens*, (Parviz, M.S. dan Mansel, W.G., ed.), Washington D.C.: ASM Press

Ringkasan

Bakteriofaj adalah sejenis virus yang secara eksklusifnya menjadikan bakteria sebagai sasaran dan tempat pembiakannya. Bakteriofaj yang menjangkiti bakteria *Escherichia coli* dikenali sebagai kolifaj. Kebelakangan ini, potensi penggunaan bakteriofaj untuk mengawal bakteria yang penting untuk kualiti dan keselamatan makanan semakin mendapat perhatian. Kajian ini dijalankan bertujuan untuk memencilkan kolifaj daripada sumber makanan tempatan yang berpotensi digunakan untuk kawalan biologi terhadap *E. coli* dalam industri makanan pada masa depan. Kolifaj yang telah berjaya dipencilkan kemudiannya dikaji morfologinya di bawah mikroskop elektron transmisi bagi tujuan pengelasan.

Summary

Bacteriophages are viruses that exclusively target and reproduce within bacteria. Bacteriophage that infected *Escherichia coli* is known as coliphage. The potential use of bacteriophages to control bacteria of importance to food quality and safety has been the subject of recent review. This study was conducted to isolate coliphage from local foods for future use as biological control of *E.coli* in food industry. The isolated coliphages later classified based on its morphology under transmission electron microscopy.

Pengarang

Nur ilida Mohamad

Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM 43400 Serdang, Selangor

E-mel: ilida@mardi.gov.my

Mohd Effendi Mohamed Nor dan Nur Baizura Sa'dom

Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM 43400 Serdang, Selangor