



PROSIDING SEMINAR NASIONAL KUSUMA III
Kualitas Sumberdaya Manusia
“Refleksi Budaya Kemajapahitan: *SDM Unggul Menuju Indonesia Emas 2045 berbasis Sainstek Berwawasan Lingkungan dan Kewirausahaan*”

**Bakteriophage Dari Limbah Burung Walet Menggunakan Metode
*Plaque Assay***

Ananda Maudya Savitri¹, Siti Gusti Ningrum^{2*}

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya^{1,2}

*email korespondensi penulis: sitiningrum@uwks.ac.id

Abstrak

Latar belakang: Bakteriophage atau *phage* adalah virus yang menyerang sel bakteri. Karena fag adalah musuh alami bakteri yang sering terdapat dalam air limbah, fag dapat digunakan sebagai agen biokontrol yang efisien untuk mikroorganisme bawaan yang berbahaya. Manfaat bakteriophage adalah kemampuannya menghasilkan enzim lisozim, yang memungkinkan mereka menginfeksi dan melisis bakteri tertentu. Ini adalah salah satu manfaat penggunaan bakteriophage untuk melakukan biokontrol bakteri dengan cara yang lebih aman. **Tujuan:** Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi bakteriophage dari limbah di lingkungan rumah burung walet menggunakan metode *plaque assay*. **Metode:** Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional laboratorik. Pengambilan sampel dalam penelitian ini dilakukan secara acak dengan menggunakan metode *purposive sampling*. Sampel diambil dari 2 rumah burung walet, dengan jumlah 20 sampel limbah burung walet yang diperoleh dari rumah burung walet di Sumedang. Kultur bakteri yang digunakan sebagai inang untuk isolasi bakteriophage adalah *Lysinibacillus* sp. *Spot test* dilakukan dengan mencampurkan 500µl bakteri dan TSA semisolid lalu dituangkan ke media TSA kemudian filtrat bakteriophage di teteskan sebanyak 10µl dan diinkubasi. Setelah zona bening muncul maka dilakukan *plaque assay* dengan pengenceran $10^{-1} - 10^{-6}$ kemudian masing-masing pengenceran dicampur ke TSA dan diinkubasi pada suhu 30°C. *Picking plaque* dilakukan dengan mengambil *single plaque*. **Hasil:** Hasil *spot test* dalam penelitian ini terdapat 2 sampel LHW dan LPW yang menunjukkan zona *clear*, hasil *plaque assay* diperoleh satu sampel LPW dengan titer $2,5 \times 10^5$ PFU/ml. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, isolasi bakteriophage dari limbah burung walet menggunakan metode *plaque assay* dapat mengisolasi satu bakteriophage terhadap bakteri penghasil nitrit *Lysinibacillus* sp. **Kesimpulan:** Penelitian ini berhasil mengisolasi bakteriophage terhadap *Lysinibacillus* sp.

Kata Kunci: Bakteriophage, Rumah burung walet, *Plaque assay*

PENDAHULUAN

Bakteriophage atau *phage* adalah virus yang menyerang sel bakteri. Pada kasus bakteriophage jenis litik, bakteriophage dapat mengganggu metabolisme bakteri dan menyebabkan bakteri menjadi lisis (pecah) (Ritonga et al., 2023).

Karena fag adalah musuh alami bakteri yang sering terdapat dalam air limbah, fag dapat digunakan sebagai agen biokontrol yang efisien untuk mikroorganisme bawaan yang berbahaya. Bakteriophage alami, atau virus bakteri yang menginfeksi dan berkembang biak di air limbah, banyak ditemukana di sana,



PROSIDING SEMINAR NASIONAL KUSUMA III
Kualitas Sumberdaya Manusia
“Refleksi Budaya Kemajapahitan: *SDM Unggul Menuju Indonesia Emas 2045* berbasis Sainstek Berwawasan Lingkungan dan Kewirausahaan”

dan pada inang tertentu yang tahan terhadap perubahan suhu dan pH. Fag dapat menampilkan siklus hidup litik atau lisogenik (Bhardwaj *et al.*, 2015).

Manfaat bakteriofag adalah kemampuannya menghasilkan enzim lizozim, yang memungkinkan mereka menginfeksi dan melisis bakteri tertentu. Ini adalah salah satu manfaat penggunaan bakteriofag untuk melakukan biokontrol bakteri dengan cara yang lebih aman. Pada penelitian ini menggunakan metode *plaque assay* untuk pengujian. *Plaque assay* digunakan untuk mengetahui unit infeksi pada virus. Efek samping yang umum dari infeksi virus pada sel inang adalah pembentukan plak. Selanjutnya adanya interpretasi positif terhadap keberadaan plak berasal dari lapisan sel inang, warna bening pada lapisan sel inang ini disebut plak, dan diperkirakan menandakan bahwa setiap plak berasal dari satu partikel virus (Damayanti *et al.*, 2016).

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif observational laboratorik. Deskriptif yang dimaksud adalah memaparkan hasil penelitian dan memaparkan hasil penelitian yang didapatkan.

A. Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dalam penelitian ini dilakukan secara acak dengan menggunakan metode purposive sampling. *Purposive sampling* adalah teknik yang digunakan untuk mengumpulkan atau mengidentifikasi sampel tertentu (Fauzy, 2019).

B. Kultur Bakteri

Kultur bakteri yang digunakan sebagai inang untuk isolasi bakteriofag adalah *Lysinibacillus* sp. *Lysinibacillus* sp. diperbanyak 10 ml di dalam media *Braint Heart Infusion* (BHIA) agar. Biakan bakteri *lysinibacillus* sp. kemudian diinokulasikan ke dalam media BHI semisolid dan diinkubasikan selama 48 pada suhu 30°C.

C. Isolasi Bakteri

Sebanyak 20 sampel limbah burung walet yang diperoleh dari rumah burung walet di Sumedang kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Terapan, BRIN, Cibinong. Sebanyak 50 mL dari masing – masing sampel disentrifus pada kecepatan 400 rpm, selama 20 menit pada suhu 4°C untuk mendapatkan supernatan. Supernatan dikoleksi sebanyak 20 mL ditambahkan TSB 10 mL dalam botol kultur 100 mL *Lysinibacillus* sp, masing – masing sebanyak 5 mL secara aseptis, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Setelah diinkubasi, suspensi dimasukkan

ke dalam tabung sentrifugasi sebanyak 15 mL untuk dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit sebanyak tiga kali secara berurutan. Bagian supernatan diambil dan disaring menggunakan membran filter dengan diameter pori 0,22 µm dan 0,45 µm sehingga didapatkan filtrat bakteriofag.

D. *Spot test*

Isolat bakteri yang sudah ditanam pada media BHIB ditambahkan pada media TSA semisolid dan divorteks. Media yang sudah dihomogenkan dituang ke dalam cawan petri secara merata. Filtrat sampel diteteskan pada media yang sudah mengering sebanyak 10 µl secara merata dengan jarak 1 cm tiap tetesan. Inkubasi media pada suhu 30°C selama 24 jam. Jika muncul zona bening pada hasil *spot test* lakukan *scrubbing* menggunakan ose bulat. Hasil *scrub* dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml yang sudah berisi 900 µl SM buffer. Hasil *scrub* disentrifuge dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Kemudian supernatan dipisahkan dan dipindahkan pada tabung yang baru.

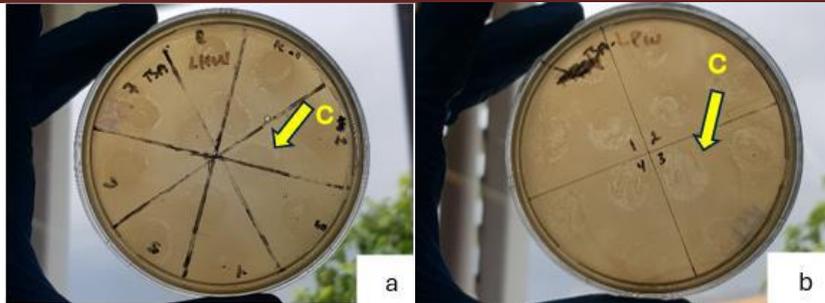
E. *Plaque assay*

Supernatan sebanyak 100 µl ditambahkan ke dalam SM buffer sebanyak 500 µl (sampai pengenceran 10⁻⁶). Tahap pengenceran (10⁻¹ s.d 10⁻⁶) bakteriofag diambil 100 µl pada tiap – tiap pengenceran untuk ditambahkan ke dalam 500 µl yang mengandung kultur bakteri *Lysinibacillus* sp. pada tabung yang berbeda sesuai jumlah pengenceran dan dihomogenkan. TSA semisolid dicampurkan dengan masing – masing pengenceran dan dihomogenkan. Suspensi dituang ke dalam cawan petri berbeda yang telah berisi TSA agar dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Plak yang terbentuk di *picking* dan dilakukan pengenceran kembali sampai pengenceran 10⁻⁶. Plak yang terbentuk pada cawan petri yang memenuhi syarat (kisaran 25 – 250 plak) diamati dan dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\frac{\text{Jumlah plak yang dihitung (PFU)}}{\text{Volume plated (tn mL)}} \times \text{faktor pengenceran} = \text{titer} \left(\frac{\text{PFU}}{\text{mL}} \right)$$

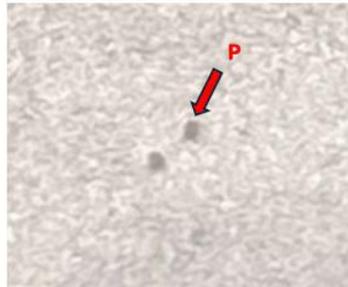
HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil *spot test* dalam penelitian ini terdapat 2 sampel LHW dan LPW yang menunjukkan zona *clear* (Gambar 4.1)



Gambar 1 Hasil spot test LHW (a) dan LPW (b) pada media terlihat zona clear (C) tanda panah berwarna kuning.

Berdasarkan hasil *plaque assay* diperoleh satu sampel LPW. Hasil yang menunjukkan zona *clear* pada plak dapat dilihat pada Gambar 2 dan hasil perhitungan *plaque assay* dapat dilihat pada tabel dibawah ini (Tabel 1)



Gambar 2 Hasil plaque assay (P) tanda panah berwarna merah.

Setelah melakukan perhitungan plaque lalu dilanjutkan dengan perhitungan titer bakteriofag berdasarkan jumlah plaque yang telah diperoleh pada metode plaque assay. Jumlah titer bakteriofag yang menginfeksi sel bakteri dapat ditentukan melalui perhitungan *Plaque Forming Units* (PFU). Hasil titer dari sampel LPW1 pada pengenceran 10^{-3} adalah 2.5×10^5 PFU/ml.

Hasil pada penelitian ini diperoleh dua sampel positif dari 20 koleksi sampel pada pengujian *spot test*, yaitu LPW dan LHW yang diperoleh dari 2 rumah burung walet. Dua sampel ini telah menunjukkan adanya bakteriofag yang ditunjukkan dengan zona *clear*, tetapi pada saat metode *plaque assay* hanya menunjukkan satu sampel yang positif yaitu LPW dengan titer $2,5 \times 10^2$ PFU/ml.

Variasi titer bakteriofag pada tiap pengenceran disebabkan karena adanya sistem pertahanan bakteri terhadap infeksi bakteriofag, sifat bakteriofag dan perlakuan pengenceran. Hal ini dikarenakan virus yang tidak mampu menginfeksi bakteri dapat disebabkan karena partikel bakteriofag yang dihasilkan selama infeksi memiliki beberapa bagian yang tidak sempurna. Selain itu terdapat faktor lain yaitu suhu. Suhu merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam mempengaruhi pertumbuhan dan daya tahan hidup bakteri. Suhu mempengaruhi reaksi kimia yang

terjadi didalam tubuh bakteri sehingga tingkat pertumbuhannya juga ikut terpengaruhi. Selain suhu, pH atau tingkat keasaman juga mempengaruhi pertumbuhan bakteri (Madigan *et al.*, 2012).

Tabel 1 Hasil perhitungan *plaque assay* berdasarkan masing – masing pengenceran sebanyak 20 sampel

Kode Sampel	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6
LHW1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LHW2	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LHW3	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LHW4	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LHW5	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LHW6	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LHW7	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LHW8	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LHW9	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LHW10	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LPW1	44	33	28	13	6	4
LPW2	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LPW3	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LPW4	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LPW5	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LPW6	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LPW7	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LPW8	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LPW9	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
LPW10	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif

Pada penelitian ini berhasil mengisolasi satu bakteriofag terhadap *Lysinibacillus* sp. yang terdapat pada limbah di lingkungan rumah burung walet. Bakteriofag yang telah menginfeksi sel inang *Lysinibacillus* sp. maka sel yang tumbuh akan menjadi semakin terkikis sehingga akan tampak zona bening yang disebut plak. Plak yang terbentuk dari hasil penelitian ini memiliki potensi bahwa bakteriofag mampu melisis bakteri inangnya. Beberapa faktor perlu diperhatikan seperti suhu dan pH. Adanya faktor lain seperti penyimpanan dan perlakuan sampel dengan benar juga penting. Faktor pengenceran juga berpengaruh pada kemunculan plak. Semakin tinggi pengenceran maka plak semakin terlihat renggang dan mudah di amati (Pratiwi, 2021).

Semakin banyak jumlah plak yang teramati, maka semakin tinggi pula konsentrasi bakteriofag di dalam sampel. Menurut (Rahaju, 2014), Interpretasi positif yang ditandai dengan adanya bakteriofag yaitu terbentuknya zona bening (*clear*). Hal ini dikarenakan virus menginjeksikan material genetiknya (DNA atau

RNA) untuk bereplikasi dan berkembang menjadi partikel virus dengan menggunakan 'mesin reproduksi' sel bakteri dan menyebar dengan melisis sel tersebut. Bakteriofag hanya dapat menginfeksi satu atau beberapa strain atau spesies bakteri, dan akan menyerap ke daerah tertentu dari selubung sel inang kemudian menembus sel inang dengan seluruh virion masuk ke sel genom (Rahaju, 2014).

Bakteri *Lysinibacillus sphaericus* merupakan bakteri kelompok *Lysinibacillus*. Bakteri ini awalnya merupakan anggota genus *Bacillus* yang ditemukan Meyer dan Neide pada tahun 1904 dengan nama awalnya adalah *Bacillus sphaericus*. Ahmed et al. (2007) mengusulkan untuk mengubah genus *L. sphaericus* yang awalnya *Bacillus* menjadi *Lysinibacillus*. Hal ini berdasarkan komposisi kimia yang meliputi asam lemak selular dan lemak polar serta genotipnya (Saraswati., 2020). Bakteri *L. sphaericus* berpotensi mengikat nitrogen dan merupakan bakteri nitrifikasi (Martínez *et al.*, 2017). *Lysinibacillus* banyak ditemukan di berbagai habitat alami dan sering tumbuh di media Nutrient Broth (NB) dan Lactose Broth (LB). Selain itu, MRS, media kaya nitrogen yang dilengkapi dengan mikronutrien seperti amonium asetat, kalium hidrogen sulfat mendukung pertumbuhan *Lysinibacillus* yang lebih baik daripada NB dan LB. Oleh karena itu, komponen dapat mendukung sintesis enzim atau komponen protein lain yang diperlukan untuk melakukan proses pendukung kehidupan sel bakteri yang diisolasi. Selain itu, keberadaan elemen seperti amonium asetat dalam media MRS mungkin terlibat dalam netralisasi asam, yang dihasilkan oleh aktivitas metabolisme sel bakteri yang diisolasi. pH perkembangan maksimum *Lysinibacillus* pada 6-10, tetapi pertumbuhan tertinggi antara pH 6 dan 8. *Lysinibacillus* dikatakan tumbuh paling baik antara 30°C – 37, cukup baik antara 20° dan 40°C, dan dengan jumlah pertumbuhan paling sedikit pada 4°C dibawah 20°C dan diatas 40°C (Ahmad *et al.*, 2014).

Kontaminasi nitrit pada sarang burung walet terjadi saat sarang masih berada di habitatnya (Utomo *et al.*, 2018). Kandungan nitrit ini diduga berkaitan dengan sumber makanan dari burung walet dan juga kondisi habitatnya. Umumnya pada sarang burung walet terdapat kotoran burung walet yang mengandung amoniak. Amoniak tersebut akan teroksidasi oleh oksigen menjadi nitrit yang kemudian teroksidasi lagi menjadi nitrat (Chan *et al.*, 2013). Pembentukan nitrit pada sarang burung walet sebagai hasil proses alamiah dari adanya proses perubahan nitrogen yang ada di lingkungan rumah walet dan diduga dapat dipengaruhi oleh bakteri penghasil nitrit yang terdapat pada sarang burung walet dan mengubah nitrat menjadi nitrit sehingga diperlukan kajian lebih dalam mengenai jenis bakteri nitrifikasi, proses nitrifikasi serta peranan bakteri nitrifikasi tersebut pada sarang burung walet (Widiyani dkk., 2021).



PROSIDING SEMINAR NASIONAL KUSUMA III
Kualitas Sumberdaya Manusia
“Refleksi Budaya Kemajapahitan: SDM Unggul Menuju Indonesia Emas
2045 berbasis Sainstek Berwawasan Lingkungan dan Kewirausahaan”

Sarang burung walet memiliki kandungan nitrit yang beragam dan nitrit diketahui merupakan senyawa beracun apabila dikonsumsi dalam konsentrasi yang tinggi (Payder *et al.*, 2013). Nitrit seringkali dimanfaatkan sebagai zat aditif dalam bahan pangan. Penggunaan nitrit sangat dibatasi untuk mencegah keracunan pada konsumen (Saputro *et al.*, 2016).

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengisolasi bakteriofag terhadap *Lysinibacillus* sp. Dari sampel limbah (LPW1) dengan titer $2,5 \times 10^2$ PFU/ml. Perlu optimasi suhu dan waktu inkubasi yang sesuai dengan *Lysinibacillus* sp. dan perlu uji *host range* pada bakteri tersebut terhadap bakteri nitrifikasi lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., dan Fujiwara, T. 2007. *Proposal of Lysinibacillus boronitolerans gen. nov. sp. nov., and transfer of Bacillus fusiformis to Lysinibacillus spaericus comb. nov.* International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology. 5: 1117-1125.
- Bhardwaj, N., Bhardwaj, S. K., Deep, A., Dahiya, S., dan Kapoor, S. 2015. *Lytic Bacteriophages as Biocontrol Agents of Foodborne Pathogens.* Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 10(11) : 708 – 723.
- Chan GKL., Zhu KY, Chou DJY., Guo AJY., Dong TTX., Tsin KWK. 2013. *Surveillance of nitrite level in cubilose: Evaluation of removal method and proposed origin of contamination.* Food Control. 34(2) : 637 – 644.
- Damayanti, R., Jannah, S. N., Rahaju, S. H. 2016. *Isolasi Bakteriofag Salmonella spp. Dari Biofilm Pada Sistem Air Minum Isi Ulang.* Jurnal Biologi. 5(2) : 59 – 67.
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., and Herskovits, A. A. 2015. *A New Perspective on Lysogeny: Prophages As Active Regulatory Switches Of Bacteria.* Nature Reviews Microbiology. 13(10) : 641.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., and Clark, D. 2012. *Brock Biology of Microorganism.* Thirteenth Edition. Pearson Benjamin Cummings. United States America.
- Martinez, Sergio. A., and Jenny Dussan. G. 2017. *Lysinibacillus spaericus plant growth promoter bacteria ad lead phytoremediation enhancer with canavalia ensiformis.* Environmental Progress and Sustainable Energy. 37(1).
- Ningrum, S. G. 2021. *Deteksi Kandungan Nitrit Dan Hidrogen Peroksida dalam Produk Sarang Burung Walet Bersih Asal Indonesia.* Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma. 10(1) : 20.
- Payder M., Wong YL., Wong WF., Hamdi OAA, Kadir NA, Looi CY. 2013. *Prevalence of nitrite and nitrate contents and its effect on edible bird nest's color.* J Food Sci. 78(12).
- Pratiwi, R. H. 2021. *Virus Bakteri sebagai Terapi untuk Penyakit Infeksi.* BIOEDUSAINS: Jurnal Pendidikan Biologi Dan Sains. 4(2) : 193 – 204.



PROSIDING SEMINAR NASIONAL KUSUMA III
Kualitas Sumberdaya Manusia
“Refleksi Budaya Kemajapahitan: SDM Unggul Menuju Indonesia Emas
2045 berbasis Sainstek Berwawasan Lingkungan dan Kewirausahaan”

- Rahaju, S.H. 2014. *Metoda Pengkayaan, Filtrasi, dan Pertumbuhan untuk Isolasi Bakteriofag Spesifik Salmonella typhimurium pada Sampel Air*. Journal Sains, Teknologi, dan Kesehatan. 4(1) : 315 – 322.
- Ritonga, B. F., and Savira, M. 2023. *Isolasi bakteriofag dari limbah cair dengan aktivitas litik terhadap Escherichia coli*. Jurnal Kedokteran Syiah Kuala. 23(1).
- Sandri, D. 2009. Bakteri hidrokarbonoklastik tanah tercemar penghasil biosurfaktan: skrining dan identifikasi bakteri, optimasi produksi dan karakterisasi produknya. *Tesis*. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Saputro, E., Bintror, V., Pramono, Y. 2016. *Agen Kyuring Alami Pengganti Natrium Nitrit Sintesis pada Kyuring Daging Sapi*. Mediagro. 12(1):65 – 75.
- Saraswati, F. 2020. *Pertumbuhan Populasi Kutu Daun Aphis gossypii Glover (Hemiptera Aphididae) pada Tanaman Cabai Rawit (Capsicum frutescens L) dengan Pemberian Bakteri Lysinibacillus spaericus*. Doctoral dissertation. Universitas GadjahMada.
- Utomo, B., Widyaratri, Y., Widyanto, R. M. 2018. *Metode untuk Mempertahankan kandungan Nitrit Sarang Burung Walet Selama Penyimpanan*. Jurnal Kedokteran Fakultas Brawijaya.
- Widiyani, P., Latif, H., Lukman, D. W., and Sudarwanto, M. B. 2021. *Artikel Review: Bakteri Nitrifikasi dan Peranannya Dalam Keberadaan Nitrit Pada Sarang Burung Walet*. Jurnal Kajian Veteriner. 9(2) : 98 – 109.