

Karakterisasi Tipe *Plaque* Bakteriofag yang Menginfeksi Bakteri *Stenotrophomonas* sp. yang diisolasi dari Tanah di Lingkungan Rumah Burung Walet

Ni Luh Nilasari Ayuningtyas

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

Email: luluhayu13@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik tipe plak bakteriofag yang menginfeksi bakteri *Stenotrophomonas* sp. yang diisolasi dari tanah di lingkungan rumah burung walet. Sampel yang digunakan yaitu bakteri *Stenotrophomonas* sp. Bakteri *Stenotrophomonas* sp. dikultur dengan mengambil koloni bakteri yang telah tumbuh pada media BHIA lalu dicampurkan ke dalam BHIB dan diinkubasi. *Spot test* dilakukan dengan mencampur 500 μ L Host BHIB dan TSA semisolid 3 ml lalu dituang ke media TSA Agar kemudian filtrat bakteriofag diteteskan sebanyak 10 μ L lalu diinkubasi 30 °C selama 24 jam. Zona bening yang muncul kemudian dilakukan *plaque assay* dengan pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-6} lalu masing-masing pengenceran dicampurkan ke TSA semisolid 3 ml lalu dituang ke media TSA dan diinkubasi 30 °C. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa bakteriofag dapat melisis bakteri *Stenotrophomonas* sp. yang ditandai dengan munculnya plak namun tidak menunjukkan karakteristik yang spesifik. Karakteristik tipe plak bakteriofag uji pada penelitian ini menunjukkan adanya potensi tipe *clear*.

Kata kunci : Bakteri *Stenotrophomonas* sp., Bakteriofag, Karakteristik, Plak, Tanah

Abstract

This study aims to determine the characteristics of bacteriophage plaque types that infect Stenotrophomonas sp. bacteria isolated from soil in the swallow house environment. The samples used were Stenotrophomonas sp. bacteria. Stenotrophomonas sp. bacteria were cultured by taking bacterial colonies that had grown on BHIA media and then mixed into BHIB and incubated. Spot tests were carried out by mixing 500 μ L of Host BHIB and 3 ml semisolid TSA and then poured onto TSA media then bacteriophage filtrate was dripped as much as 10 μ L and then incubated at 30 °C for 24 hours. The clear zone that appeared was then carried out plaque assay with dilutions of 10^{-3} to 10^{-6} then each dilution was mixed into 3 ml semisolid TSA then poured into TSA superscript media and incubated at 30°C. The results showed that bacteriophages could lyse Stenotrophomonas sp. bacteria characterized by the appearance of plaque but did not show specific characteristics. The plaque type characteristics of the tested bacteriophages in this study showed the potential of clear type.

Keywords: Bacteriophages, Plaque, *Stenotrophomonas* sp. Bacteria, Soil.

PENDAHULUAN

Budidaya burung walet di Indonesia saat ini berkembang dengan baik. Meningkatnya permintaan sarang burung walet di pasaran, maka diperlukan kualitas yang baik pada sarang burung walet. Kualitas sarang burung walet harus aman bagi tubuh. Salah satunya dengan rendahnya kandungan nitrit pada sarang burung walet, kadar nitrit yang memenuhi standart ekspor yaitu dibawah 30 ppm. Nitrit dapat bersifat racun dan berbahaya bagi tubuh karena dapat menyebabkan kondisi methemoglobinemia yng berujung pada gangguan aliran oksigen dan kesulitan bernapas (Saputro, *et al.*, 2016). Pencemaran nitrit pada sarang burung walet terjadi pada saat sarang tersebut masih berada di habitatnya (Utomo, *et al.*, 2018).

Bakteriofag adalah jenis virus yang dapat membunuh bakteri. Bakteriofag merupakan virus yang mempunyai sifat parasit obligat terhadap bakteri (Doffkay, *et al.*, 2015). Virus ini mengandung DNA atau RNA dan protein reseptor spesifik yang cocok dengan inang bakteri target, sehingga aktivitas bakteriofag sangat spesifik. Bakteriofag merupakan salah satu alternatif untuk mengatasi masalah infeksi bakteri pathogen (Hardanti, dkk., 2018). Penggunaan bakteriofag di bidang kedokteran hewan khususnya budidaya walet dengan cara menginfeksi bakteri penghasil nitrit dengan bakteriofag. Dalam penelitian ini, peneliti akan melakukan karakterisasi tipe plak bakteriofag yang menginfeksi bakteri *Stenotrophomonas* sp. yang diisolasi dari tanah di lingkungan rumah burung walet. Dengan tujuan dapat menentukan karakteristik tipe plak bakteriofag yang akan digunakan di penelitian selanjutnya.

MATERI DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Kelompok Riset Pemulihan Mikrobiologis, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong pada bulan Maret 2024.

Kultur Bakteri

Kultur bakteri dilakukan dengan cara pengambilan bakteri lalu memilih koloni bakteri yang paling sedikit menggunakan ose bulat yang sudah disterilkan. Setelah itu, ose digores pada permukaan BHI Agar secara kuadran. Semua tahapan dilakukan di dekat api bunsen, untuk menjaga agar tetap steril. Bakteri yang sudah di kultur, kemudian dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam, hasil kultur ini berwarna krem keruh (Azni dan Ramadhan, 2021).

Pengkayaan (*enrichment*) adalah tahap memperbanyak bakteri yang akan digunakan dan menghambat pertumbuhan bakteri lainnya. Bakteri yang telah tumbuh di media BHI Agar diambil koloni terpisah menggunakan ose steril dan dicampurkan kedalam BHI Broth sebanyak 50ml. BHI Broth kemudian diinkubasi dengan suhu 30°C overnight. Hasil inkubasi ini yang selanjutnya digunakan sebagai host bakteri (Melinda, 2021).

Spot Test

Inokulasi bakteri dilakukan dengan mengambil 500 µL Host BHI cair yang dicampurkan kedalam TSA semisolid 3 ml lalu di vortex dan dituang ke media TSA Agar sampai rata lalu diamkan selama 10 menit. *Spot test* dilakukan dengan

meneteskan 10 μL filtrate fag ke media TSA Agar dengan jarak 1cm. tempatkan cawan petri didekat Bunsen dengan tutup yang sedikit terbuka selama 5 menit sampai kering. Inkubasi cawan petri pada suhu 30 °C selama 24 jam (Franswinsky, 2023). Hasil positif berupa munculnya *clear zone* sedangkan negatif tidak ditandai dengan munculnya *clear zone* setelah diinkubasi.

Plaque Assay

Clear zone yang muncul dari *spot test* di ambil dan dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml berisi SM Buffer 900 μL lalu di vortex dan didiamkan suhu ruang selama 1 jam. Tube disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 15.000 rpm. Supernatan diambil dan disaring dengan filter 0,45 μm . Pengenceran dilakukan dengan menambahkan 100 μL filtrat kedalam 900 μL SM Buffer lalu dihomogenkan dengan vortex, dilakukan berulang hingga pengenceran 10^{-6} . Dari setiap pengenceran diencerkan kembali dengan mengambil 100 μL dan dimasukkan ke tube berbeda sesuai pengenceran berisi 500 μL host bakteri.

Plating dilakukan dengan mencampur masing-masing pengenceran pada tube 1,5 ml ke dalam TSA semisolid lalu divortex dan dituangkan ke media TSA Agar secara merata. Diamkan cawan petri selama 10 menit hingga memadat dan inkubasi terbalik pada suhu 30°C selama 24 jam (Damayanti, dkk., 2016).

Mikroskop Digital

Mikroskop digital berfungsi untuk memperbesar objek kecil mikroskopik yang tidak mungkin dapat dilihat dengan mata telanjang. Mikroskop digital memiliki hasil perbesaran yang lebih tinggi dibandingkan mikroskop optik lainnya. Mikroskop digital

telah mempunyai sumber cahaya sendiri sehingga tidak memerlukan cahaya matahari. Cawan petri diletakkan di meja pengamatan, cahaya dan perbesaran diatur sehingga plak terlihat jelas. Hasil gambar akan ditampilkan di layar monitor.

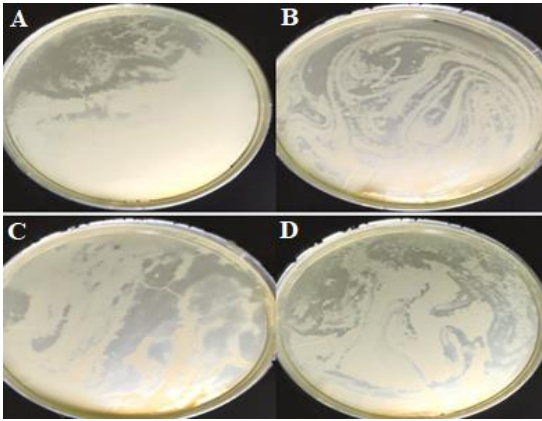
HASIL

Identifikasi bakteriofag melalui *spot test* menggunakan tanah yang ada di lingkungan rumah burung walet yang sudah diolah melalui tahap *enrichment*. Hasil positif berupa munculnya *clear zone* sedangkan negatif tidak ditandai dengan munculnya *clear zone* setelah diinkubasi. Hasil *spot test* dapat dilihat melalui Gambar 1



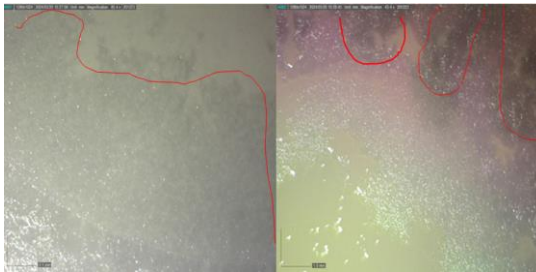
Gambar 1 Hasil *Spot test*

Pada hasil *spot test* didapatkan hasil positif dengan *clear zone* di sebagian area *spot test* dan diluar area *spot test*. Hal ini membuktikan tanah yang diambil di lingkungan rumah burung walet mengandung bakteriofag yang litik terhadap *Stenotrophomonas* sp. *Clear zone* yang terbentuk kemudian diambil dan dilanjutkan *plaque assay*. Hasil *plaque assay* dapat dilihat pada Gambar 2



Gambar 2 Hasil *Plaque Assay*, A. Pengenceran 10^{-3} B. Pengenceran 10^{-4} C. Pengenceran 10^{-5} D. Pengenceran 10^{-6}

Hasil *plaque assay* pada media agar menunjukkan pembentukan plak yang menyebar dan tidak rata pada pengenceran $10^{-3} - 10^{-6}$.



Gambar 3 Hasil Mikroskop Perbesaran 1280x1024

Hasil mikroskop dari plak yang muncul menunjukkan adanya *clear zone* pada permukaan agar yang ditumbuhi bakteri. *Clear zone* yang muncul menunjukkan bakteri yang dapat terlisiskan oleh bakteriofag. Hasil plak yang menyebar maka morfologi plak tidak dapat diidentifikasi dengan ciri-ciri yang tidak spesifik.

PEMBAHASAN

Sarang burung walet merupakan bahan pangan asal hewan yang mempunyai nilai

ekonomi yang sangat tinggi karena memiliki manfaat untuk kesehatan. Banyaknya permintaan ekspor untuk sarang burung walet menyebabkan kualitas sarang burung walet harus memenuhi standart sebagai upaya menjamin kesehatan masyarakat, salah satunya dengan kandungan nitrit yang rendah. Nitrit yang terdapat pada sarang burung walet berasal dari air liur burung walet dan kontaminasi dari lingkungan. Keberadaan nitrit di lingkungan dibantu oleh bakteri nitrifikasi yang dapat mengubah ammonia (NH_3) dioksidasi menjadi nitrit (NO_2^-) yang selanjutnya diubah menjadi nitrat (NO_3^-) (Ningrum, 2021).

Kandungan nitrit yang tinggi pada sarang burung walet dapat menjadi racun dan berbahaya karena dapat menyebabkan methemoglobinemia yang dapat menghambat aliran oksigen dan menyebabkan gangguan pernapasan (Setryawati & Kurnia, 2020). Nitrit yang terkonsusmsi berdampak buruk dengan menyebabkan kanker lambung, kanker vesika urinaria, dan kanker pancreas (Ningrum, 2021). Kadar nitrit yang memenuhi standart ekspor yaitu dibawah 30 ppm, oleh karena itu kadar nitrit dalam sarang burung walet harus diturunkan (Ningrum, 2023).

Bakteri *Stenotrophomonas* sp. adalah bakteri yang berperan sebagai agen denitrifikasi, yang dapat mengubah nitrat (NO_3) menjadi gas nitrogen (N_2). Bakteri ini banyak ditemukan salah satunya di tanah terutama *rhizosphere*. Pada kondisi yang beragam bakteri *Stenotrophomonas* sp. dapat bertahan dengan baik di alam. Sebagai bakteri denitrifikasi, bakteri *Stenotrophomonas* sp. berperan baik membantu mencegah terjadinya proses nitrifikasi yang dapat menyebabkan tingginya kandungan nitrit

dalam sarang burung walet. Peran bakteri *Stenotrophomonas* sp., selain sebagai agen denitrifikasi yaitu sebagai resistensi dan detoksifikasi beberapa jenis logam berat seperti tembaga, emas, timbal, dan perak. Bakteri ini juga dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan jamur (Rupaedah, dkk., 2018).

Bakteriofag merupakan virus yang dapat menginfeksi bakteri. Bakteriofag ini mempunyai dua siklus hidup yaitu yang bersifat litik dan bersifat lisogenik. Siklus litik menyebabkan lisis atau matinya sel bakteri yang membentuk plak atau bercak pada permukaan media agar (Wally, dkk., 2021). Siklus lisogenik, bakteriofag tidak melisis bakteri inang tetapi hanya memperlambat pertumbuhannya (Martin, 2016). Untuk mengetahui infeksi bakteriofag maka dibutuhkan uji *plaque assay*. Uji *plaque assay* merupakan suatu metode yang digunakan untuk menentukan unit infeksi virus yang ditandai dengan munculnya *clear zone* atau plak (Damayanti, dkk., 2016).

Mekanisme pembentukan plak dimulai dengan fag menginfeksi bakteri dan melisis satu sel bakteri inang. Kemudian fag yang baru terbentuk dilepaskan dari sel yang telah lisis dan fag akan menginfeksi sel bakteri di sekitarnya. Siklus ini akan terus berulang hingga sel bakteri yang ada di sekitar fag mengalami lisis dan terbentuk plak (Deshanda, dkk., 2018). Dalam penelitian ini, hasil *plaque assay* menunjukkan adanya plak atau *clear zone* yang terbentuk pada permukaan media agar. Bagian permukaan yang keruh tanpa munculnya plak dikarenakan *Stenotrophomonas* sp. tumbuh dengan baik dan sel bakteri inang tidak terinfeksi oleh bakteriofag. Hasil plak dari uji *plaque assay* menunjukkan bahwa bakteri

Stenotrophomonas sp. dapat terlisiskan oleh bakteriofag, namun ciri-ciri plak tersebut tidak spesifik dan bentuknya yang menyebar tidak rata.

Bentuk plak bakteriofag ini tidak beraturan karena adanya variasi morfologi bakteriofag yang digunakan. Bakteriofag memiliki kapsid dengan bentuk polyhedral yang diselubungi oleh protein dan memiliki ekor menyerupai benang yang terdiri dari beberapa bagian. Variasi ini dapat menyebabkan bentuk plak yang tidak seragam dan bervariasi seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 4.1 (Hardanti, dkk., 2018). Hasil tersebut menunjukkan bahwa morfologi plak yang bervariasi mengindikasikan beragamnya bakteriofag yang diperoleh (Nindita & Wardani, 2013).

Penelitian ini belum berhasil menunjukkan tipe karakteristik bakteriofag terhadap *Stenotrophomonas* sp. Faktor-faktor yang menyebabkan kegagalan karakterisasi dalam penelitian ini yaitu, kondisi lingkungan yang berbeda, pertumbuhan inang, dan adanya sistem pertahanan bakteri terhadap bakteriofag (Saefunida, dkk., 2016). Kondisi lingkungan seperti suhu, pH, dan konsentrasi nutrisi dapat mempengaruhi aktivitas bakteriofag dan bentuk plak yang dihasilkan. Bakteri *Stenotrophomonas* sp. optimal pada suhu 37 °C selama 24 jam dan pH optimal 7. Konsentrasi nutrisi penting untuk pertumbuhan bakteri *Stenotrophomonas* sp. bakteri ini membutuhkan sumber nitrogen seperti dari ammonia, nitrit, dan nitrat serta sumber mineral yang sesuai. Ketersediaan nutrisi yang cukup dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri dan bentuk plak yang dihasilkan. Bakteri yang memerlukan nutrisi yang berbeda dapat menghasilkan bentuk plak yang berbeda pula (Kuswari, 2021).

Dalam penelitian ini, bakteri *Stenotrophomonas* sp. diinkubasi pada suhu 30 °C dengan media yang memiliki pH 7,5 oleh karena itu bakteri ini tidak dapat tumbuh dengan maksimal. Pertumbuhan inang dapat mempengaruhi afinitas bakteriofag terhadap bakteri target dan jumlah bakteriofag yang dibutuhkan untuk menginfeksi bakteri target. Jika bakteri *Stenotrophomonas* sp. tumbuh lebih cepat, maka bakteriofag juga akan menyesuaikan tingkat produksi progeninya. Selain itu, sistem pertahanan bakteri terhadap infeksi bakteriofag dapat mempengaruhi kemampuan bakteriofag dalam melisiskan bakteri target. Jika sistem pertahanan lebih kuat, maka bakteriofag harus menyesuaikan strategi infeksi yang digunakan (Christin, dkk., 2022).

KESIMPULAN

Karakterisasi tipe plak bakteriofag yang menginfeksi bakteri *stenotrophomonas* sp. yang diisolasi dari tanah di lingkungan rumah burung walet ini menunjukkan adanya potensi tipe *clear*, namun tidak memiliki karakteristik yang khas.

REFERENSI

- Azni, I. N., Ramadhan, M. F. 2021. *Modul Praktikum Mikrobiologi Pangan*. Universitas Sahid.
- Christin, Mawarni., Verawaty Marieska., Sunarti Riri Novita. 2022. *Isolasi dan Uji Kemampuan Lisis Bakteriofag Terhadap Escherichia Coli dari Lingkungan Akuatik di Indralaya, Ogan Ilir*. Undergraduate Thesis, Sriwijaya University.
- Damayanti, Rahayu., Siti Nur Jannah., Wijanarka., Sri Hartin Rahaju. 2016. *Isolasi Bakteriofag Salmonella spp. dari Biofilm pada Sistem Air Minum Isi Ulang*. Jurnal Biologi, Volume 5 No 2 : 59-67
- Deshanda, Rizky Putri., Rahmad Lingga., Nur Annis Hidayati., , Eka Sari., Rossy Hertati. 2018. *Fag Salmonella Asal Limbah Pasar Ikan dan Air Sungai di Sekitar Kampus Universitas Bangka Belitung*. Ekotonia: Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi dan Mikrobiologi ISSN: 2443-2393 Volume 03 Nomor 2 Desember 2018
- Doffkay, Z., Dömötör, D., Kovács, T., Rákhely, R. 2015. *Bacteriophage Therapy Against Plant, Animal, and Human Pathogens*. Acta Biologica Szegediensis. 59: 291-302.
- Franswinsly, Bobby., Maya Savira., 2023. *Isolasi Bakteriofag dari Limbah Cair dengan Aktivitas Litik Terhadap Escherichia coli*. Universitas Riau – Pekanbaru. Jurnal Kedokteran Syiah Kuala ISSN: 1412-1026 Volume 23, Number 1, Maret 2023
- Hardanti, Sri ., Agustin Krisna Wardani., Widya Dwi Rukmi Putri. 2018. *Isolation and Identification of Salmonella Typhi Bacteriophage Specific from Chicken Skin*. Jurnal Teknologi Pertanian Vol. 19 No. 2 : 107-116
- Kuswari, Putri Marina. 2021. *Antagonisme Bakteri Yang Berasal Dari Usus Ikan Sapu-sapu (Hypostomus Plecostomus) Terhadap Bakteri Patogen*. Other thesis, Universitas Islam Riau.
- Melinda, Yulis. 2021. *TA : Uji Cemaran Salmonella sp. dalam Sampel Kembang Gula di BBPOM Bandar Lampung*. Diploma thesis, Politeknik Negeri Lampung.
- Nindita, Lia Oriana., Agustin Krisna Wardani. 2013. *Purifikasi Phage Cocktail Serta Spektrum*

- Penghambatannya Terhadap Bakteri Penyebab Foodborne Disease.* Universitas Brawijaya. Jurnal Teknologi Pertanian Vol. 14 No. 1 [April 2013] 47-56.
- Ningrum, Siti Gusti. 2021. *Deteksi Kandungan Nitrit dan Hidrogen Peroksida dalam Produk Sarang Burung Walet Bersih Asal Indonesia.* Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma 10(1): 20-26.
- Ningrum, Siti Gusti. 2023. *Food Safety Management System in Edible Bird's Nest Industry: A Review.* Faculty of Veterinary Medicine, Wijaya Kusuma University, Surabaya-Indonesia. Journal of Applied Veterinary Science & Technology: 04(1).2023.41-51.
- Rupaedah, Bedah., Debby Viola Amanda., Reni Indrayanti., Nia Asiani., Bambang Sukmadi., Asep Ali., Abdul Wahid., Taufiq Firmansyah., Mahmud Sugianto. 2018. *Aktivitas Stenotrophomonas Rhizophila dan Trichoderma Sp. dalam Menghambat Pertumbuhan Ganoderma Boninense.* Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (Jbbi) 5(1):53
- Saputro E, Bintoro V, Pramono Y. 2016. *Agen Kyuring Alami Pengganti Natrium Nitrit Sintetis pada Kyuring Daging Sapi.* Mediagro. 12(1):65±75.
- Saefunida, Dani Sukma., Wijanarka., M.G Isworo Rukmi., Novik Nur Hidayat. 2016. *Isolasi Bakteriofag Escherichia coli dari Sistem Distribusi Air Minum Isi Ulang sebagai Antibiofilm.* Jurnal Biologi, Volume 5 No 2, April 2016
- Utomo, Budi., Djalal Rosyidi., Lilik Eka Radiate., Hari Purnomo. 2015. *Metode Penurunan Kandungan Nitrite dengan Pencucian Menggunakan Asam Askorbat pada Tiga Jenis Sarang Burung Walet Asal Indonesia.* Efektor Issn. 2355-956x ; 2355-7621
- Wally, Arga Darmawan., Eko S. Pribadi., Surachmi Setyaningsih. 2021. *Bakteriofag Spesifik Escherichia Coli yang Diisolasi dari Berbagai Sumber Air di Bogor Tengah, Kota Bogor sebagai Antibiotika Alternative.* Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Jurnal Biologi Udayana 25(2): 183-188