

# ISOLASI BAKTERIOFAG DARI LIMBAH BURUNG WALET MENGGUNAKAN METODE *PLAQUE ASSAY*

Ananda Maudya Savitri

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma

Email: [maudyaananda0@gmail.com](mailto:maudyaananda0@gmail.com)

## **Abstract**

*This research was conducted how to isolate bacteriophages from waste in the swallow house environment using the Plaque assay method. Sampling in this research was carried out randomly using the purposive sampling method. Samples were taken from 2 swiftlet houses, with a total of 20 swallow waste samples obtained from swiftlet houses in Sumedang. The spot test results in this study contained 2 LHW and LPW samples which showed a clear zone, the plaque assay results obtained were one LPW sample. Based on the results of research that has been carried out, the isolation of bacteriophages from swiftlet waste using the plaque assay method can isolate one bacteriophage against the nitrite-producing bacteria *Lysinibacillus* sp.*

**Keywords :** Bacteriophage, Swallow nests, Plaque assay

## **PENDAHULUAN**

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) (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. Bakteriofag alami, atau virus bakteri yang menginfeksi dan berkembang biak di air limbah, banyak ditemukana di sana, 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 lisozim, 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 untit 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).

## **MATERI DAN METODE**

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) selama satu bulan pada bulan Februari 2024. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah centrifuge, autoklaf, laminar air flow, falcon, erlenmeyer steril, inkubator, bunsen, cawan petri, pipet, mikro pipet, tabung reaksi, ose bulat, tip, vorteks, dan microtube 1,5 ml. Bahan yang digunakan untuk mendukung penelitian adalah limbah yang diambil dari lingkungan rumah burung walet konvensional dan campuran, media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), *Tryptic Soy Agar* (TSA) solid, TSA semisolid, SM Buffer, dan isolat *Lysinibacillus* sp. Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif observational. Deskriptif yang dimaksud adalah memaparkan hasil penelitian dan memaparkan hasil penelitian yang didapatkan.

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). 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.

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.

Isolat bakteri yang sudah ditanam pada media BHIB ditambahkan pada media TSA semisolid dan divorteks. Media yang sudah dihomogenkan dituang kedalam 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. Sentrifus hasil *scrub* dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit.

Supernatan sebanyak 100 µl ditambahkan ke dalam SM buffer sebanyak 500 µl (sampai pengenceran 10<sup>-6</sup>). Tahap pengenceran (10<sup>-1</sup> s.d 10<sup>-6</sup>) bakteriofag diambil 100 µl pada tiap – tiap pengenceran untuk ditambahkan ke dalam 500 µl yang mengandung kultur bakteri *Lysinibacillus* sp. pada tube yang berbeda sesuai

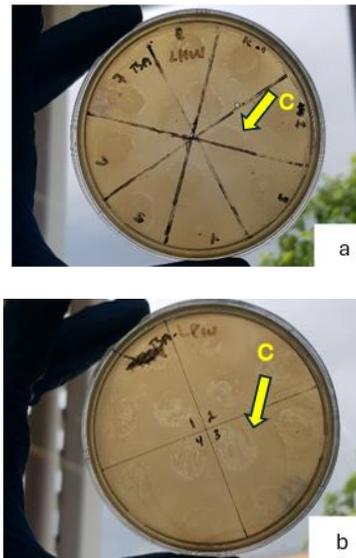
jumlah pengenceran dan dihomogenkan. TSA semisolid dicampurkan dengan masing – masing pengenceran dan dihomogenkan. Suspensi dituang ke dalam cawan petri berbeda yang telah berisi TSA agar dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Plak yang terbentuk di *picking* dan dilakukan pengenceran kembali sampai pengenceran 10<sup>-6</sup>. Plak yang terbentuk pada cawan petri yang memenuhi syarat (kisaran 25 – 250 plak) diamati.

Kemudian hasil dihitung menggunakan rumus berikut :

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

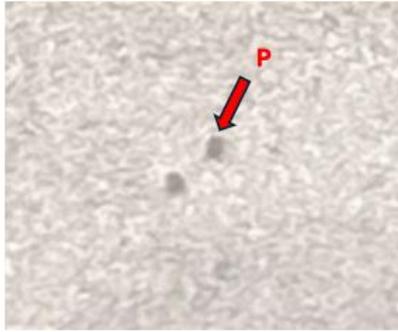
## HASIL

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.

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

Kode Sampel	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$
LHW 1	-	-	-	-	-	-
LHW 2	-	-	-	-	-	-
LHW 3	-	-	-	-	-	-
LHW 4	-	-	-	-	-	-
LHW 5	-	-	-	-	-	-
LHW 6	-	-	-	-	-	-
LHW 7	-	-	-	-	-	-
LHW 8	-	-	-	-	-	-
LHW 9	-	-	-	-	-	-
LHW 10	-	-	-	-	-	-
LPW1	44	33	28	13	6	4
LPW2	-	-	-	-	-	-
LPW3	-	-	-	-	-	-
LPW4	-	-	-	-	-	-
LPW5	-	-	-	-	-	-
LPW6	-	-	-	-	-	-
LPW7	-	-	-	-	-	-
LPW8	-	-	-	-	-	-
LPW9	-	-	-	-	-	-
LPW10	-	-	-	-	-	-

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  $2.5 \times 10^2$  PFU/ml.

## PEMBAHASAN

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).

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. Selain itu, bakteri ini juga dapat memproduksi *Indole Acetic Acid* (IAA) (Martínez et al., 2017).

Golongan *Lysinibacillus* dapat tumbuh pada kisaran suhu 16 – 45° C dan pada kisaran nilai pH 6,0 – 9,5 (Ahmed et al., 2007). Menurut Sandri (2009) *L. Sphaericus* dapat tumbuh optimum dalam medium *Bushnell-Haas* dengan urea sebagai sumber nitrogen dan *crude* gliserol sebagai sumber karbon pada pH 6.

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).

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.

## REFERENSI

- 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.
- 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.
- 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.