SKRIPSI_20820109_RAFIDA PUTRI ARIFIN

by - -

Submission date: 11-Jun-2024 05:57PM (UTC-0700)
Submission ID: 2400735385
File name: SKRIPSI_20820109_RAFIDA_PUTRI_ARIFIN.pdf (954.32K)
Word count: 4800
Character count: 28999

ISOLASI BAKTERIOFAG DARI FESES BURUNG WALET MENGGUNAKAN METODE *PLAQUE ASSAY*

Rafida Putri Arifin

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya keberadaan bakteriofag dari feses burung walet yang diisolasi menggunakan metode *plaque assay*. Dua puluh sampel feses burung walet, yaitu; sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet *wild* / campuran (sampel FW), dilakukan isolasi terhadap bakteri penghasil nitrit *Lysinibacillus* sp. Menggunakan metode plaque assay. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteriofag dari feses burung walet dapat diisolasi menggunakan metode *plaque assay* Dengan masing – masing titer yaitu $2{,}1\ x\ 10^5$ PFU/mL dan $2{,}7\ x\ 10^6$ PFU/mL. Penelitian ini memberikan informasi bahwa bakteriofag dapat diisolasi terhadap bakteri penghasil nitrit *Lysinibacillus* sp. menggunakan metode *plaque assay*.

Kata kunci : Bakteriofag, walet, *plaque assay*, *Lysinibacillus* sp., nitrit

ISOLATION OF BACTERIOPHAGES FROM SWIFTLET FECES USING PLAQUE TEST METHOD

Rafida Putri Arifin

ABSTRACT

This investigation aimed to determine the presence of bacteriophages from swiftlet feces are isolated using the plaque test method. Twenty samples of swiftlet feces, ten samples of swiftlet feces from coventional swiftlet house (FK samples) and ten samples of swiftlet feces from wild / mixed swiftlet house (FW samples), isolation for the nitrite-producing bacteria Lysinibacillus sp. are using the plaque test method. The results of the investigation is that bacteriophages from swiftlet feces could be isolated using the plaque test method with titre of $2{,}1\ x\ 10^5\ PFU/mL$ *dan* $2{,}7\ x\ 10^6 PFU/mL$*, respectively. This study provide information about the bacteriophages can be isolated of nitrite-producing bacteria Lysinibacillus sp. using the plaque test method.*

Keywords: Bacteriophage, swiftlet, plaque test, Lysinibacillus sp., nitrite.

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sarang burung walet saat ini telah menjadi konsumi masyarakat diberbagai negara. Indonesia termasuk sebagai salah satu pemasok sarang burung walet terbesar di dunia. Terdapat banyak industri rumah burung walet di indonesia. Permasalahan dengan meningkatnya permintaan sarang burung walet ini sangat menguntungkan bagi industri sarang burung walet terutama bagi pemilik rumah burung walet. Sejalan dengan meningkatnya konsumsi sarang burung walet banyak peneliti yang melakukan penelitian terhadap sarang burung walet. Salah satunya mengenai kadar nitrit yang sering kali ditemukan pada sarang burung walet dengan jumlah yang cukup tinggi melebihi batas toleran yang telah dinyatakan oleh *World Health Organization* (WHO) adalah 0–3,7 mg/kg berat badan per hari atau setara dengan 222 mg/hari untuk orang dewasa dengan berat badan 60 kg.

Menurut Ningrum *et al*., (2023) nitrit dapat ditemukan pada sarang burung walet karena kontaminasi dari rumah burung walet yang lembab, kotoran dan feses burung walet. Tingginya kadar nitrit yang ditemukan pada sarang burung walet inilah yang membuat penulis tertarik untuk melakukan penelitian untuk mencari solusi menghilangkan kadar nitrit pada sarang burung walet. Bakteriofag dapat menjadi solusi untuk mengatasi permasalahan tingginya kadar nitrit pada sarang burung walet.

Virus yang menginfeksi bakteri atau yang dikenal sebagai bakteriofag atau fag, ditemukan lebih dari satu abad yang lalu, dari situlah penelitian terhadap fag dengan bakteri memberikan dampak besar (Mahler *et al.,* 2023). Bakteriofag merupakan virus yang menginfeksi bakteri untuk bereplikasi. Menurut Nikolich *et al*., (2020) keberadaan fag sangat melimbah di bumi, diperkirakan terdapat lebih dari 1030 virion individu terdapat di bumi. Bakteriofag ini jumlahnya sangat berlimpah, serta dapat ditemukan dimana pun ketika ada kehidupan prokariotik disitulah bakteriofag berada. Bakteriofag terdeteksi dibanyak tempat, seperti tanah, air, dan di dalam tubuh, dalam feses, air liur, dahak, darah, serta urin (Narulita *et al*., 2023).

Bakteriofag membunuh bakteri dalam inang yang sempit jangkauannya. Bakteriofag akan bereplikasi dan dianggap sebagai pengganti alternatif yang potensial dari antibiotik (Ahmed *et al.,* 2019). Bakteriofag menginfeksi bakteri melalui penyerapan pada membran bakteri dan dimediasi reseptor, kemudian diikuti dengan injeksi asam nukleat ke dalam bakteri (Federici *et al*., 2023). Sifat virulen bakteriofag terhadap bakteri inilah yang akan menginfeksi bakteri, ini menjadi solusi untuk mengatasi bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik (Narulita *et al*., 2023).

Fag memiliki beragam manfaat dibandingkan antibiotik atau bahan kimia lainnya, karena hanya menargetkan patogen yang diinginkan, tidak mempengaruhi kondisi normal mikroflora, serta tidak ada efek buruk terhadap sistem kekebalan tubuh manusia atau hewan. Bakteriofag dapat digunakan untuk mengobati infeksi

dari bakteri, termasuk infeksi yang sangat sulit untuk disembuhkan dan yang telah resisten terhadap antibiotik. Saat ini bakteriofag dieksplorasi secara luas untuk meminimalkan muatan patogen dalam produk makanan yang berasal dari hewan maupun tumbuhan (Rahaman *et al*., 2014).

Tahapan untuk memperoleh bakteriofag yaitu terlebih dahulu melakukan pengambilan sampel yang kemudian akan dilakukan isolasi untuk mempeoleh bakteriofag. Isolasi bakteriofag merupakan tahapan penting untuk mendapatkan bakteriofag, ditunjukkan oleh adanya *zona transparan* (*plaque*) dalam lingkaran yang berlatar belakang warna hitam. *Zona transparan* (*plaque*) yang terbentuk menunjukkan bahwa bakteriofag yang diisolasi telah berhasil didapatkan dan telah menginfeksi bakteri. *Plaque* dapat terbentuk dengan ukuran dan morfologi yang beragam dengan jenis bakteriofag yang menginfeksi bakteri (Yasmine dkk., 2023).

Metode yang akan penulis gunakan untuk mengisolasi guna meningkatkan titer bakteriofag adalah metode *plaque assay*. Hasil dari isolasi bakteriofag ini kemudiaan akan digunakan untuk melihat karakter dan morfologi serta kegunaan bakteriofag sebelum diaplikasikan sebagai biokontrol untuk menginfeksi bakteri penghasil nitrit pada rumah burung walet.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah bakteriofag dapat ditemukan pada feses burung walet yang berada di lingkungan rumah burung walet menggunakan metode *plaque assay* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk menemukan dan mengisolasi bakteriofag yang berasal dari feses burung walet menggunakan metode *plaque assay*.

1.4 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah dalam penelitian ini maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

H0 : Tidak ada bakteriofag yang ditemukan dari feses burung walet

H1 : Bakteriofag dapat ditemukan dari feses burung walet

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan hasil dari bakteriofag yang diisolasi dari feses burung walet. Penelitian ini akan menghasilkan luaran berupa jurnal nasional bereputasi dan skripsi. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa S1 Kedokteran Hewan dalam melakukan penelitian pada bidang Kedokteran Hewan khususnya bakteriofag. Penelitian ini khususnya bertujuan sebagai syarat kelulusan bagi mahasiswa S1 Kedokteran Hewan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteriofag

Virus yang menginfeksi bakteri, atau fag memainkan peran dalam ekologi mikroba. Infeksi fag diawali dengan perlekatan (adsorpsi) virus ke reseptor molekul ekstraseluler pada bakteri amplop sel. Adsorpsi ini diikuti dengan menyuntikkan materi genetik virus ke dalam bakteri, ekspresi fag replikasi gen serta DNA fag, akhirnya perakitan virion dan lisis sel (Ofir and Sorek, 2017).

Seperti virus lainnya, fag memiliki struktur sederhana, terdiri dari kapsid protein dan inti. Berdasarkan ciri morfologi dan strukturnya ada tiga jenis fag: *Caudovirales* yang terbagi menjadi *Siphoviridae, Podoviridae, dan Myoviridae*, *Ballabactivirus, dan Inoviridae* (Liang *et al*., 2023). Bakteriofag sangat bergantung terhadap inang bakterinya untuk bertahan hidup dan berkembang biak, tetapi pertumbuhan bakteri dapat menjadi tidak stabil secara berkala bahkan dihabitatnya yang tidak bergizi (Venturini *et al*., 2022).

Terapi menggunakan fag muncul sebagai salah satu alternatif yang efektif melawan bakteri yang resisten terhadap berbagai obat infeksi. Fag diyakini sebagai agen terapi yang efektif dan produk berbasis fag telah banyak digunakan dalam beberapa tahun terakhir (Ramesh *et al*., 2019). Bakteri yang resistan terhadap berbagai antibiotik dikaitkan dengan morbiditas dan mortalitas yang jauh lebih tinggi. Kemungkinan untuk menemukan antibiotik baru sangatlah terbatas, namun terapi fag dengan menggunakan bakteriofag (virus yang dapat menginfeksi bakteri) untuk menyembuhkan infeksi akibat bakteri menjadi alternatif. Terapi

menggunakan fag telah banyak digunakan pada mamalia besar seperti babi, sapi, dan domba. Menambahkan fag ke dalam pakan dapat mengurangi indeks diare, mengatur aktivitas enzim pencernaan pada usus anak babi yang disapih (Liang *et al*., 2023).

Plaque adalah populasi dari bakteriofag yang dibatasi secara spasial, terlihat oleh mata karena secara lokal dapat menghabiskan sejumlah bakteri yang rentan. *Plaque* akan tumbuh dan berkembang pada padat atau semi padat. Media tersebut biasanya terbuat dari bahan dasar agar (Abedon, 2021).

2.1.1 Morfologi Bakteriofag

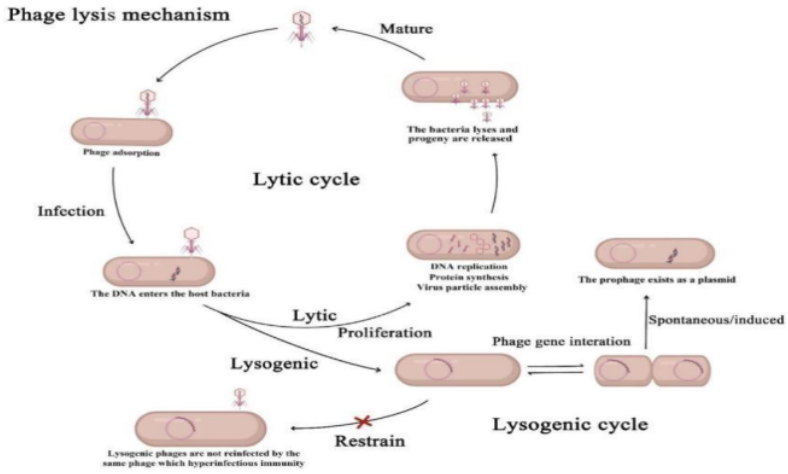
Morfologi *plaque* yang di bentuk oleh bakteriofag memiliki banyak faktor. Salah satu faktor yang berpengaruh besar adalah media dan suplemen yang digunakan pasa agar sebagai media melakukan *plaque assay*, pada penelitian yang dilakukan oleh Ramesh *et al*., (2019) morfologi *plaque* yang dibentuk oleh bakteriofag tampak berbeda pada semua agar, yaitu pada Nutrient Agar (NA), *Luria-Bertani* agar (LB), *Brain Heart Infution* Agar (BHIA), *Mueller-Hinton* agar (MHA), *Tryptic Soy* Agar (TSA). Perbedaan morfologi *plaque* pada fag litik dan lisogenik adalah fag litik akan menghasilkan *plaque* bening, sedangkan fag lisogenik akan menghasilkan *plaque* keruh.

Hampir smua fag yang diketahui terdiri dari kepala (kapsid) yang melekat pada ekor, dan berisikan DNA berantai ganda. Ekor pada bakteriofag sangat penting, karena fag akan menyuntikkan DNA ke dalam bakteri dengan menembus amplop pada sel agen bakteri (Kokko, 2023). Menurut Hardy *et al*., (2022) terdapat tiga macam bentuk struktur ekor yang dimiliki oleh bakteriofag yaitu, bentuk ekor

kontraktil (*myovirus*), ekor pendek dan tidak kontraktil (*podovirus*), dan ekor panjang tidak kontraktil (*siphovirus*).

2.1.2 Siklus Hidup Bakteriofag

Bakteriofag memiliki dua keadaan utama yaitu keadaan litik dan keadaan lisogenik. Keadaan litik merupakan keadaan dimana bakteriofag sedang dalam keadaan sangat virulen, ditandai dengan produksi virion yang dapat melisiskan inangnya. Sedangkan keadaan lisogenik merupakan keadaan dimana bakteriofag hanya dapat mereplikasi asam nukleat, namun tidak adanya virion baru yang dapat terbentuk (Federici *et al*., 2023).



Gambar 2.1 Mekanisme Kerja Fag Litik dan Fag Lisogenik.

Fag menginfeksi inang bakterinya melalui siklus hidup litik atau lisogenik. Fag litik membunuh inang bakterinya melalui lisis sel, sedangkan fag lisogenik berintegrasi dalam genom inang bakteri. Buttimer *et al*., (2023) menjelaskan bahwa karakterisasi biologis, analisis genom dan filogenik dari enam fag terkait pada tingkat genus hingga subfamili yang menginfeksi.

2.2 *Plaque Assay*

Metode *Plaque assay* dilakukan karena konsentrasi sediaan bakteriofag yang masih terlalu tinggi untuk dihitung jumlah *plaque*-nya, hal ini berdasarkan dari hasil *spot assay* yang menunjukkan *clear zone* yang dihasilkan sangat jernih pada area yang ditetesi dengan menggunakan sediaan bakteriofag. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sanders, (2012) *plaque* bakteriofag *E. Coli* yang terbentuk pada permukaan agar (*Enchanced Haemolysis* Agar) EHA berukuran 1mm. Pada penelitiannya, sediaan bakteriofag dengan konsentrasi $2x10^8$ PFU/mL. *Plaque assay* merupakan *gold standart* yang harus digunakan dalam mengisolasi bakteriofag.

Menurut Cacciabue *et al*., (2019) *plaque assay* telah digunakan sejak lama untuk menentukan titer infeksius dan mengkarakterisasi virus *prokariotik* dan *eukariotik* yang membentuk *plaque*. *Plaque assay* merupakan sistem *standart* kuantifikasi dalam virologi untuk memverifikasi bakteriofag. Perhitungan *plaque* dilakukan secara manual masing – masing *plate*. *Plaque* dihitung menggunakan plate reader yang digunakan untuk bakteri (Misol *et al*., 2020).

2.3 Nitrifikasi

Proses nitrifikasi terjadi pada membran sel organisme (Nwankwo *et al*., 2023). Nitrifikasi didefinisikan sebagai proses dua langkah dimana amonia (NH_3) atau amonium (NH_4^+) akan bereaksi dengan oksigen yang kemudian akan membentuk nitrit (NH_2^-). Setelah itu nitrit akan bereaksi dengan oksigen atau air membenruk nitrat (NO_3^-). Bakteri nitrifikasi merupakan inti pada proses nitrifikasi (Sloots, 2014).

Kadar nitrit pada sarang burung walet secara alami terbentuk sebagai hasil proses alamiah dari perubahan nitrogen menjadi nitrit oleh bakteri yang terdapat pada lingkungan rumah burung walet (Widiyani dkk., 2021). Bakteri pengoksidasi amonium (*Nitrosomonas sp*.) sebagai indikasi terjadinya perubahan warna media dari merah menjadi kuning yang disebabkan perubahan pH media akibat oksidasi amonium menjadi nitrit, sedangkan adanya bakteri penghasil nitrat *(Nitrobacter sp*.) diindikasikan dengan perubahan warna media dari bening menjadi keruh (Pratiwi, 2011).

Nitrit yang terkandung dalam makanan dapat menyebabkan kematian jika dikonsumsi dalam konsentrasi tinggi (Cvetković *et al*., 2019). Menurut Chamandoost *et al*., (2016) mengonsumsi makanan yag mengandung nitrit secara menerus dalam rentang waktu lama akan menyebabkan kanker gastrointestinal.

2.4 *Lysinibacillus* sp.

Menurut Wu *et al*., (2023) Penghapusan nitrogen secara simultan melalui nitrifikasi *heterotrofik* dan denitrifikasi *aerobik* telah mendapat perhatian luas. Strain baru *Lysinibacillus fusiformis*, yang secara efektif menghilangkan polutan nitrogen melalui reaktor *aerobik* tanpa akumulasi nitrit. Ini menunjukkan efisiensi penyisihan nitrogen yang optimal, sitrat sebagai sumber karbon. Nitrogen amonium lebih sering terkonsumsi. Analisis keseimbangan nitrogen menunjukka bahwa 83,25% amonium diubah menjadi gas nitrogen.

Menurut Ahmed *et al*., (2007) *Lysinibacillus* terdiri dari 30 spesies. *Lysinibacillus* sp merupakan bakteri gram positif berbentuk batang dengan ujung membulat. Sel bersifat motil melalui flagela lateral. *Lysinibacillus* sp tergolong

unik diantara famili *Bacillaceae* karena mereka dicirikan oleh peptidoglikan dinding sel khusus jenis A4α (L-Lys–D-Asp), peptidoglikan mengandung asam amino alanin, lisin, glisin, dan asam aspartat. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Lu and Liu (2021) *Lysinibacillus* sp dapat tumbuh pada media LB dengan suhu optimal 30°C dan pada pH optimal 7,0. Kemudian morfologi koloni dapat diamati setelah 24 jam inkubasi secara aerobik. *Lysinibacillus* sp tidak dapat tumbuh pada NaCl 10%.

2.5 Burung Walet

Burung walet termasuk burung yang memiliki sayap meruncing, bulu ekor panjang, dengan warna bulu hitam dan bagian bawah tubuhnya bulu berwarna cokelat. Burung walet mempunyai ciri fisik yang berbeda dengan burung pada umumnya. Burung walet juga mempunyai nilai mistik pada setiap pergerakannya seperti harapan untuk kesuksesan, cinta kasih, kesuburan lingkungan dan alam sekitar. Terdapat banyak jenis burung walet, diantaranya adalah burung walet sarang putih, burung walet sarang hitam, dan burung walet gunung (Rifai, 2022).

Menurut Hamzah *et al*., (2013) terdapat lebih dari 24 spesies burung walet ekolokasi pemakan serangga di seluruh dunia. Namun, saat ini hanya ada dua spesies burung walet yang bertanggung jawab menghasilkan sarang burung walet yang bernilai komersial. Mereka merupakan spesies dari suku *Apodidae*, *Collocalia*, yakni *Aerodramus fuciphagus* (walet sarang putih) dan *Aerodramus maximus* (walet sarang hitam).

2.5.1 Sarang Burung Walet

Menurut Zhao *et al*., (2016) kebudayaan masyarakat Tiongkok percaya bahwa sarang burung walet merupakan makanan yang dapat meningkatkan imunitas. Pada masa pandemic Covid-19, permintan produk dari sarang burung walet mengalami peningkatan dan hal tersebut mendorong perekonomian Indonesia karena indonesia merupakan pemasok sarang burung walet terbesar di dunia (Jamalluddin *et al*., 2019). Cina merupakan pasar terbesar yang melakukan impor sarang burung walet dari berbagai negara termasuk Indonesia (Ma *et al*., 2018).

Sarang burung walet dibuat oleh burung walet dengan menggunakan cairan kelenjar ludahnya yang berada di bawah lidah. Sarangnya bisa dijadikan sebagai tempat berlindung burung kenari untuk berkembang biak dan bertengger (Yeo *et al*., 2021). Selama reproduksi, glikoprotein musin disekresikan dalam air liur dari sepasang kelenjar sublingual unik di bawah lidah burung walet, berulang kali terjalin bersama untuk membangun sarang putih berbentuk setengah mangkuk, seukuran telapak tangan (Shim and Lee, 2018).

III. MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Lokasi

Penulis telah melakukan penelitian ini pada bulan Januari sampai dengan Februari 2024. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Kelompok Riset Pemulihan Mikrobiologis, Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan penulis yaitu neraca analitik, laminator air flow, sentrifus, vortex, tabung erlemenyer steril, cawan petri, ose, pembakar bunsen, spuit, mikropipet, tabung reaksi, yellow tipe, filter, autoclaft, falcon, mikrotube, rak falcon, rak mikrotube.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet wild / campuran (sampel FW), media *Lactose Broth* (LB), media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), media *Tryptic Soy Agar* (TSA), *sm buffer,* isolat *Lysinibacillus* sp.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan oleh penulis menggunakan metode *plaque assay*, bertujuan untuk mengetahui informasi secara alamiah mengenai bakteriofag yang di isolasi dari feses burung walet.

3.3.2 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang digunakan oleh penulis dalam melakukan penelitian ini adalah menggunakan variabel bebas dan variabel terikat.

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian yang dilakukan oleh penulis adalah random sampling. Penulis akan melakukan pengambilan sampel sebanyak dua puluh sampel feses burung walet, yaitu sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet *wild* / campuran (sampel FW) diambil pada rumah burung walet di Sumedang dengan kriteria sebagai berikut; feses burung walet yang telah mengering dan tanpa tercampur bulu, cangkang, maupun tanah.

3.4 Tahap Penelitian

3.4.1 Isolasi Bakteriofag

Sebanyak dua puluh sampel feses burung walet yang berasal dari; sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet *wild* / campuran (sampel FW) diperoleh dari rumah burung walet di Sumedang kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Terapan, BRIN, Cibinong. Untuk mendapatkan supernatan dari feses burung walet maka feses burung walet perlu untuk dilakukannya pengenceran terhadap sampel menggunakan *sm buffer*, kemudian disentrifus pada kecepatan 3500 rpm, selama 20 menit pada suhu 4^{o}C. Supernatan dikoleksi sebanyak 20 mL ditambahkan *Brain Heart Infution* (BHI) 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 2500 rpm, 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.

3.4.2 *Spot Assay*

Spot assay dilakukan dengan meneteskan 10 μL sediaan yang akan diuji pada *double layer* agar (LB agar 1,4% dan LB *soft top* agar 0,7%). Diteteskan 10 μL setiap fag yang telah diencerkan ke bagian yang ditandai pada *plate* agar. Tempatkan *plate* agar ditempatkan dekat pembakar bunsen yang telah menyala dengan tutup bagian atas sedikit terbuka selama kurang lebih 5 menit, atau hingga larutan yang bernoda mengeras. Selanjutnya melakukan inkubasi *plate* selama 48 jam pada suhu 30°C.

3.4.3 *Plaque Assay*

Stok bakteriofag sebanyak 0,1 mL ditambahkan ke dalam NaCL 0,85% sebanyak 0,9 mL (sampai pengenceran 10^{-6}). Kemudian dari setiap tahap pengenceran (10^{-1} s.d 10^{-6}) bakteriofag diambil 100 μl untuk ditambahkan ke dalam 4 mL TSA 0,6% yang mengandung kultur bakteri penghasil nitrit *(Lysinibacillus* sp.*)* awal fase log sebanyak 200 μl dan dihomogenkan dengan vortex. Kemudian suspensi dituang ke dalam cawan petri berbeda yang telah berisi TSA dan diinkubasi pada suhu 30°C selam 48 jam. *Plaque* yang terbentuk pada cawan petri yang memenuhi syarat (kisaran 25- 250 *plaque*).

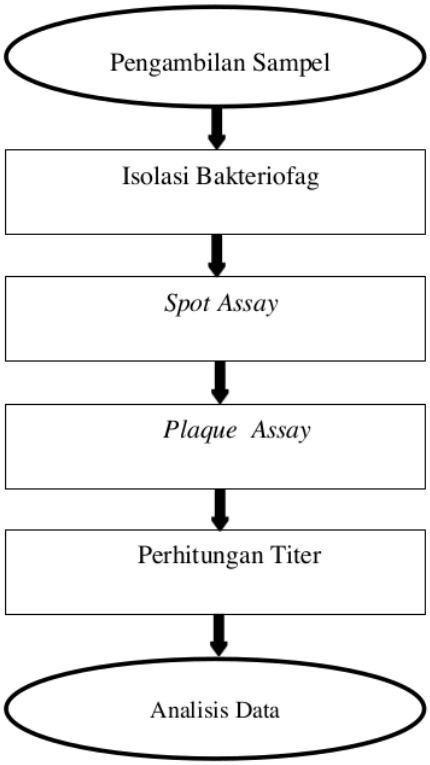
3.4.4 Perhitungan titer

Perhitungan titer dapat dilakukan setelah membaca hasil hitung jumlah *plaque*. Kemudian jumlah *plaque* yang diperoleh kemudian dimasukkan dalam rumus untuk perhitungan titer bakteriofag. Rumus perhitungan titer yaitu,

$$\frac{\boldsymbol{Number\ of\ plaques\ counted\ (PFU)}}{\boldsymbol{Volume\ plated\ (in\ mL)}}\ \boldsymbol{x\ dilution\ factor = titre}\ \left(\frac{\boldsymbol{PFU}}{\boldsymbol{mL}}\right)$$

Plaque forming units (PFU) merupakan jumlah *plaque* dibagi dengan volume bakteriofag yang ditambahkan yaitu sebanyak 100 μl, kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran sesuai dengan jumlah *plaque* yang dipilih, yaitu yang memenuhi syarat (kisaran 25 - 250 *plaque*). Setelah dimasukkan dalam perhitungan rumus itulah, akan diperoleh titer dari bakteriofag yang di isolasi dari feses burung walet menggunakan metode *plaque assay*.

3.5 Kerangka Penelitian



3.6 Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh penulis setelah melakukan penelitian akan dianalisiskan secara deskriptif menggunakan tabel dan gambar.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

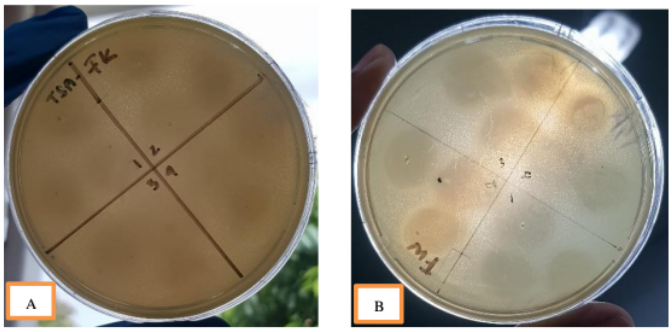
4.1 Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini memiliki tujuan untuk mendapatkan informasi mengenasi isolasi bakteriofag dari feses burung walet menggunakan metode *plaque assay*. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh penulis, penulis melakukan isolasi bakteriofag dari dua puluh sampel feses burung walet, sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet *wild* / campuran (sampel FW), yang. Fag yang diisolasi dari feses burung walet dapat tumbuh dan kemudian perhitungan titer dapat dilakukan oleh penulis.

4.1.1 Hasil *Spot Assay*

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh penulis dari dua puluh sampel feses burung walet, sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet *wild* / campuran (sampel FW). Fag dapat ditemukan menggunakan metode *spot assay*. *Spot assay* ini merupakan metode yang digunakan untuk tahap awal guna mengetahui apakah fag dapat tumbuh atau tidak, karena *spot assay* ini hanya memerlukan satu *plate* untuk tiap - tiap sampel, jadi cukup menguntungkan bagi penulis ketika melakukan penelitian ini. Hasil fag yang telah diperoleh dari *spot assay* kemudian dilanjutkan menggunakan metode *plaque assay*. Berikut merupakan hasil *spot assay* pada penelitian yang telah dilakukan oleh penulis :

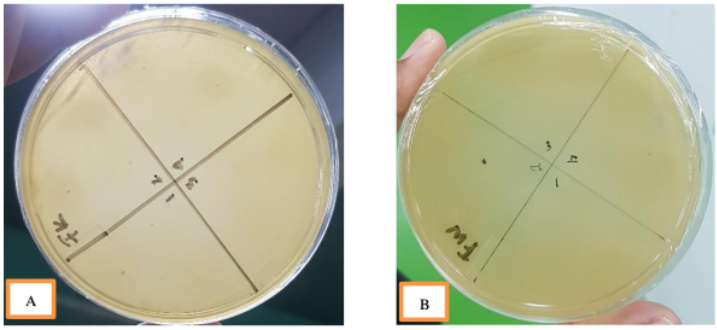
a) Hasil *Spot Assay* Positif



Gambar 4.1 Hasil Positif *Spot Assay* Sampel FK (A) dan FW (B).

Hasil positif pada *spot assay* ditandai dengan munculnya *spot – spot* yang dapat dilihat seperti pada gambar 4.1 setelah melalui inkubasi selama 48 jam pada suhu 30^0C. Gambar A merupakan hasil positif *spot assay* yang diperoleh dari sampel feses burung walet yang berasal dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan gambar B merupakan hasil positif *spot assay* yang diperoleh dari sampel feses burung walet yang berasal dari rumah burung walet *wild* / campuran (sampel FW).

b) Hasil *Spot Assay* Negatif



Gambar 4.2 Hasil Negatif *Spot Assay* Sampel FK (A) dan FW (B).

Hasil negatif pada *spot assay* tidak ditemukan munculnya *spot – spot* yang dapat dilihat seperti pada gambar 4.1, bahkan setelah melalui inkubasi selama 48

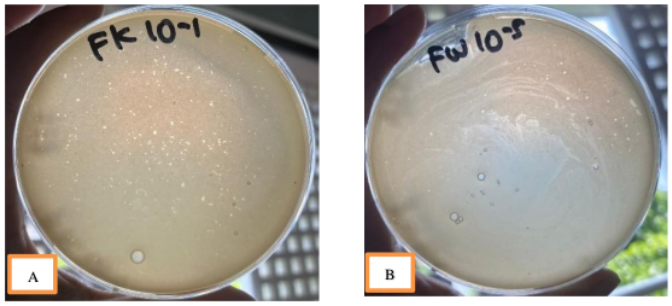
jam pada suhu 30^0C fag tidak tumbuh. Gambar A merupakan hasil negatif *spot assay* yang diperoleh dari sampel feses burung walet yang berasal dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan gambar B merupakan hasil negatif *spot assay* yang diperoleh dari sampel feses burung walet yang berasal dari rumah burung walet *wild* / campuran (sampel FW).

4.1.2 Hasil *Plaque Assay*

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh penulis, pada metode *plaque assay* ini penulis berhasil mendapatkan *plaque* setelah diinkubasi pada suhu 30^0C selama 48 jam sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh penulis jurnal terdahulu sebagai dasar tolak ukur dilakukannya penelitian ini.

Penulis kemudian melakukan perhitungan jumlah *plaque* secara manual, perhitungan dilakukan tiap masing – masing *plate*. Menurut Choudhry (2016) meskipun penentuan jumlah *plaque* secara manual, semua *plaque* akan dihitung terlepas dari diameter dan bentuknya. Perhitungan jumlah *plaque* ini tentunya membutuhkan ketelitian penulis.

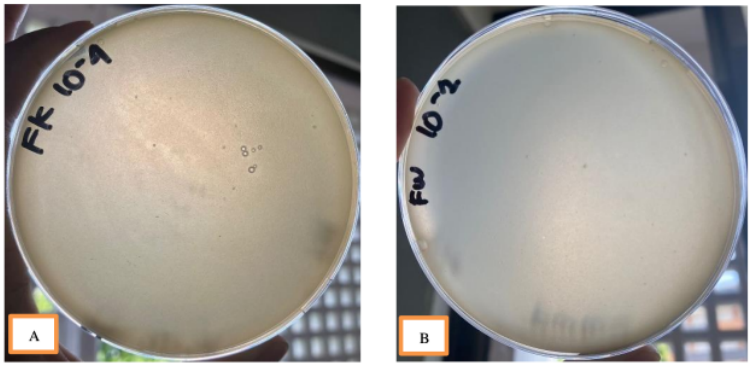
a) Hasil Positif *Plaque Assay*



Gambar 4. 2 Hasil Positif *Plaque Assay* Sampel FK (A) dan FW (B).

Hasil positif pada *plaque assay* ditandai dengan munculnya *clear zone* yang dapat dilihat seperti pada gambar 4.3 setelah melalui inkubasi selama 48 jam pada suhu 30^0C. Gambar A merupakan hasil positif *plaque assay* yang diperoleh dari sampel feses burung walet yang berasal dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan gambar B merupakan hasil positif *plaque assay* yang diperoleh dari sampel feses burung walet yang berasal dari rumah burung walet *wild* / campuran (sampel FW).

b) Hasil Negatif *Plaque Assay*



Gambar 4. 4 Hasil Negatif *Plaque Assay* Sampel FK dan FW

Hasil negatif pada *plaque assay* tidak ditemukan munculnya *clear zone* yang dapat dilihat seperti pada gambar 4.4, bahkan setelah melalui inkubasi selama 48 jam pada suhu 30^0C *plaque* tidak ditemukan. Gambar A merupakan hasil negatif *plaque assay* yang diperoleh dari sampel feses burung walet yang berasal dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan gambar B merupakan hasil negatif *plaque assay* yang diperoleh dari sampel feses burung walet yang berasal dari rumah burung walet *wild* / campuran (sampel FW).

Tabel 1.1 Hasil Perhitungan Jumlah *Plaque* Berdasarkan Pengenceran.

Jumlah *Plaque* Dalam Satuan PFU (*Plaque Forming Units*)						
Kode Sampel	**10^{-1}**	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-5}**	**10^{-6}**
FK1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FK2	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FK3	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FK4	300	208	8	17	4	13
FK5	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FK6	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FK7	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FK8	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FK9	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FK10	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FW1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FW2	322	4	108	27	116	30
FW3	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FW4	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FW5	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FW6	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FW7	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FW8	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FW9	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
FW10	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif

4.1.3 Perhitungan Titer Bakteriofag

Perhitungan titer bakteriofag dapat dilakukan setelah dilakukan perhitungan jumlah *plaque*. Penulis melakukan perhitungan titer bakteriofag berdasarkan dari jumlah *plaque* yang telah diperoleh penulis pada metode *plaque assay*. Perhitungan titer bakteriofag, menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\frac{\boldsymbol{Number\ of\ plaques\ counted\ (PFU)}}{\boldsymbol{Volume\ plated\ (in\ mL)}}\ \boldsymbol{x\ dilution\ factor = titre}\ (\frac{\boldsymbol{PFU}}{\boldsymbol{mL}})$$

Dari rumus tersebut maka akan diperoleh titer sebagai berikut :

a. Titer dari sampel FK

$$\frac{\mathbf{208}}{\mathbf{10^{-1}}}\ \boldsymbol{x}\ \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{10^{-2}}} = \mathbf{2,08\ x\ 10^{5} = 2,1\ x\ 10^{5}\ PFU/mL}$$

b. Titer dari sampel FW

$$\frac{\mathbf{27}}{\mathbf{10^{-1}}}\ \boldsymbol{x}\ \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{10^{-4}}} = \mathbf{2,7\ x\ 10^{6}\ PFU/mL}$$

Jumlah *plaque* yang dipilih untuk dilakukannya perhitungan titer adalah jumlah *plaque forming units* (PFU) yang sesuai dengan faktor pengencerannya. Dimana ketika faktor pengencerannya rendah maka seharusnya jumlah *plaque* yang tumbuh adalah berbanding terbalik yaitu tinggi, sedangkan ketika faktor pengenceran tinggi maka seharusnya jumlah *plaque* yang didapatkan adalah berbanding terbalik yaitu rendah.

4.2 Pembahasan

Penelitian yang dilakukan oleh penulis ini berhasil menemukan dua bakteriofag yang berasal dari sampel yang berbeda, yaitu sampel FK dan FW dengan masing – masing titer yang diperoleh adalah $2{,}1\ x\ 10^5$ PFU/mL merupakan titer yang diperoleh dari sampel FK dan $2{,}7\ x\ 10^6$ PFU/mL merupakan titer yang diperoleh dari sampel FW. Bakteriofag yang ditemukan oleh penulis merupakan bakteriofag yang mampu menginfeksi bakteri *Lysinibacillus* sp. yaitu bakteri penghasil nitrit, kadar nitrit inilah yang tidak boleh terdapat pada sarang walet yang akan diolah kemudian nantinya akan dikonsumsi.

Perubahan nitrit dan nitrat mungkin disebabkan oleh perbedaan lingkungan gua dan peternakan burung walet, seperti kelembapan, pH, dan iklim. Usia sarang burung walet saat panen, kontaminasi selama panen dan proses pembersihan sarang burung walet yang dikumpulkan dapat menyebabkan perbedaan konsentrasi nitrat dan kadar nitrat (Paydar *et al*., 2013; Tan *et al*., 2020). Menurut Chan *et al*., (2018) feses dan air dari lokasi rumah peternakan burung walet mengandung banyak nitrat bukan nitrit. Oleh karena itu, nitrit pada sarang burung walet mungkin disebabkan oleh pencemaran lingkungan dan nitrat serta mikroba nitrat reduktase.

Kandungan nitrit pada sarang burung walet harus dikendalikan untuk memastikan sarang burung walet dapat dimakan dengan aman. Proses pembersihan yang tepat dapat mengurangi konsentrasi nitrit dan nitrat dalamsarang burung walet (Chan G. 2013; Hamzah *et al*., 2013). Jumlah kadar nitrit yang dapat diterima oleh *World Health Organization* (WHO) adalah 0–3,7 mg/kg berat badan per hari atau setara dengan 222 mg/hari untuk orang dewasa dengan berat badan 60 kg. Di dalam

tubuh, nitrit dapat diubah menjadi oksida nitrat (molekul pemberi sinyal) yang dapat menyebabkan pembuluh darah membesar dan menurunkan tekanan darah. Ketika nitrit dan asam amino hidup berdampingan, senyawa karsinogenik yang disebut nitrosamin terbentuk selama pemasakan pada suhu tinggi (Gunnars, 2020).

Ningrum *et al*., (2022) menyatakan bahwa warna sarangburung walet menandakan kadar nitrit pada sarang burung walet tersebut. Semakin gelap warna sarang burung walet menunjukkan bahwa kandungan kadar nitrit pada sarang burung walet tersebut adalah tinggi. Begitu juga sebaliknya, semakin terang warna sarang burung walet menunjukkan bahwa kandungan kadar nitrit pada sarang burung walet tersebut adalah rendah. Hal tersebut yang mempengaruhi harga jual sarang burung walet.

Pengendalian terhadap kadar nitrit pada sarang burung walet yang telah dipanen bisa dilakukan dengan beberapa cara, tetapi masih banyak industri yang enggan untuk melakukan proses pencucian pada sarang burung walet sebelum dijual. Proses pencucian dapat menurunkan kadar nitrit pada sarang burung walet, tetapi jika kandungan nitrit terlalu tinggi pada sarang burung walet sangat sulit untuk menurunkan kadar nitrit, maka proses pencucian harus dilakukan berulangkali yang mana hal tersebut memerlukan banyak air, waktu dan tenaga pekerja, karena proses pencuciannya harus dilakukan berulang kali hingga kadar nitritnya mencapai ambang batas kandungan nitrit yang dapat dikonsumsi manusia.

Penelitian yang telah dilakukan oleh penulis terhadap bakteriofag inilah diharapkan dapat menjadi solusi ketika industri enggan melakukan proses pencucian pada sarang burung walet sebelum dijual adalah dengan pengaplikasian

bakteriofag pada industri rumah burung walet untuk menghilangkan bakteri penghasil nitrit guna mengendalikan kadar nitrit pada rumah burung walet, tujuannya adalah untuk menghilangkan kadar nitrit pada sarang burung walet bahkan sebelum dipanen.

González *et al.,* (2020) mengkonfirmasi bahwa inang fag G adalah *Lysinibacillus megaterium*, identitas protein inang dalam analisis spektrometri massa, urutan genom inang fag G dan kisaran inang fag G.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah di lakukan oleh penulis, bakteriofag dapat diisolasi dari feses burung walet dengan metode *plaque assay*. Penulis telah berhasil mengisolasi dua bakteriofag terhadap bakteri penghasil nitrit *Lysinibasillus* sp. dengan masing – masing titer yaitu $2{,}1\ x\ 10^5$ PFU/mL dan $2{,}7\ x\ 10^6$ PFU/mL.

5.2 Saran

Penulis berharap dengan adanya penelitian yang telah dilakukannya ini dapat dikembangkan dan dilanjutkan untuk mengetahui jenis fag hingga penerapan bakteriofag guna menurunkan kadar nitrit yang berada dirumah burung walet, sehingga sarang burung walet yang akan dipanen dapat terhindar dari temuan kadar nitrit yang tinggi.

Penulis berharap pada penelitian selanjutnya untuk dapat menemukan bakteriofag yang spesifik terhadap *Lysinibacillus* sp. ataupun bakteri penghasil nitrit lain yang sering ditemukan dalam kadar tinggi pada sarang burung walet di rumah burung walet, dan pengunaan bakteriofag untuk menghilangkan bakteri penghasil nitrit guna mengendalikan kadar nitrit pada sarang burung walet.

SKRIPSI_20820109_RAFIDA PUTRI ARIFIN

ORIGINALITY REPORT

17%	17%	5%	3%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to iGroup Student Paper	2%
2	journal.uinsgd.ac.id Internet Source	2%
3	id.123dok.com Internet Source	1%
4	www.jurnal.unsyiah.ac.id Internet Source	1%
5	repository.ub.ac.id Internet Source	1%
6	text-id.123dok.com Internet Source	1%
7	123dok.com Internet Source	1%
8	docplayer.info Internet Source	1%
9	Bee-Hui Yeo, Teck-Kim Tang, Shew-Fung Wong, Chin-Ping Tan, Yong Wang, Ling-Zhi Cheong, Oi-Ming Lai. "Potential Residual	1%

Contaminants in Edible Bird's Nest", Frontiers in Pharmacology, 2021
Publication

10	jurnal.fp.unila.ac.id Internet Source	<1 %
11	e-journal.uajy.ac.id Internet Source	<1 %
12	repository.unej.ac.id Internet Source	<1 %
13	katalog.ukdw.ac.id Internet Source	<1 %
14	ojs.unimal.ac.id Internet Source	<1 %
15	docobook.com Internet Source	<1 %
16	repository.uinjkt.ac.id Internet Source	<1 %
17	erepository.uwks.ac.id Internet Source	<1 %
18	rama.unimal.ac.id Internet Source	<1 %
19	repository.poltekkesbengkulu.ac.id Internet Source	<1 %

20	Submitted to Fakultas Ekonomi Universitas Indonesia Student Paper	<1 %
21	Widya Sari, Chindy Nur Rosmeita. "IDENTIFIKASI MOLEKULER CENDAWAN ENTOMOPATOGEN Beauveria Bassiana DAN Metarhizium Anisopliae ASAL ISOLAT CIANJUR", Pro-STek, 2020 Publication	<1 %
22	digilib.uinsa.ac.id Internet Source	<1 %
23	docslib.org Internet Source	<1 %
24	journal.ipb.ac.id Internet Source	<1 %
25	a-research.upi.edu Internet Source	<1 %
26	id.scribd.com Internet Source	<1 %
27	journal.uin-alauddin.ac.id Internet Source	<1 %
28	lib.ui.ac.id Internet Source	<1 %
29	repository.iainbengkulu.ac.id Internet Source	<1 %

30	M.Bayu Aji Maulana, Budi Darmawan, Johan Masjhur. "PLUMMER'S PATIENT WITH DISTANT METASTASIS CARCINOMA THYROID: A CASE REPORT", Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan, 2023 Publication	<1 %
31	anitapurwati.wordpress.com Internet Source	<1 %
32	e-journals.unmul.ac.id Internet Source	<1 %
33	hrcak.srce.hr Internet Source	<1 %
34	link.springer.com Internet Source	<1 %
35	repository.unhas.ac.id Internet Source	<1 %
36	www.academicoo.com Internet Source	<1 %
37	www.scribd.com Internet Source	<1 %
38	idoc.pub Internet Source	<1 %

Exclude quotes	Off	Exclude matches	Off
Exclude bibliography	On		