

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

Rafida Putri Arifin¹

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya¹
email: rafidaputri1705@gmail.com

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 $2,1 \times 10^5$ PFU/mL dan $2,7 \times 10^6$ 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

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 conventional 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 $2,1 \times 10^5$ PFU/mL dan $2,7 \times 10^6$ 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.

PENDAHULUAN

Sarang burung walet saat ini telah menjadi konsumsi 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. Sarang burung walet yang berasal dari Indonesia dapat diterima oleh Tiongkok, ketika telah memenuhi syarat, yaitu kadar nitrit tidak lebih dari 30 ppm.

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 melimpah 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 memperoleh 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 kemudian akan digunakan untuk melihat karakter dan morfologi serta kegunaan bakteriofag sebelum diaplikasikan sebagai biokontrol untuk menginfeksi bakteri penghasil nitrit pada rumah burung walet.

MATERI DAN METODE

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.

Alat dan Bahan Penelitian

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

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*, dan isolat *Lysinibacillus* sp.

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

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.

A. 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°C. Supernatan dikoleksi sebanyak 20 mL ditambahkan *Brain Heart Infusion* (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.

B. 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.

C. 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 selama 48 jam. *Plaque* yang terbentuk pada cawan petri yang memenuhi syarat (kisaran 25- 250 *plaque*).

D. 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,

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

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*.

Analisis Data

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

HASIL

A. 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 :

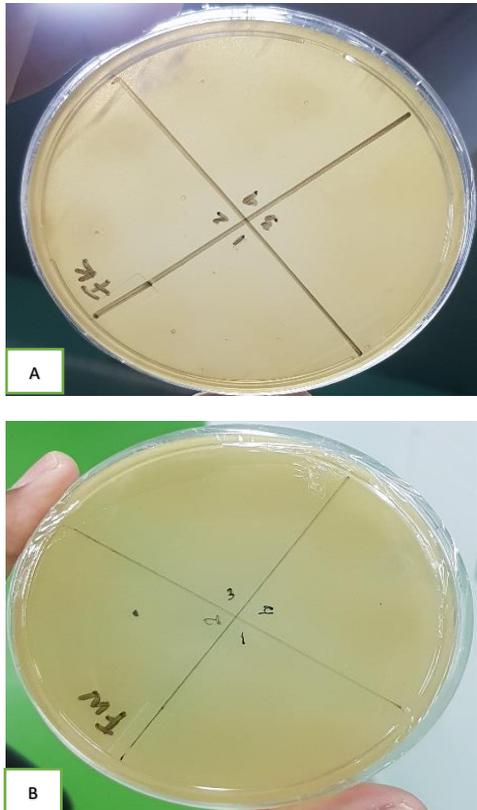
a) Hasil *Spot Assay* Positif



Gambar 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 setelah melalui inkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. 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 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 bahkan setelah melalui inkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C 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).

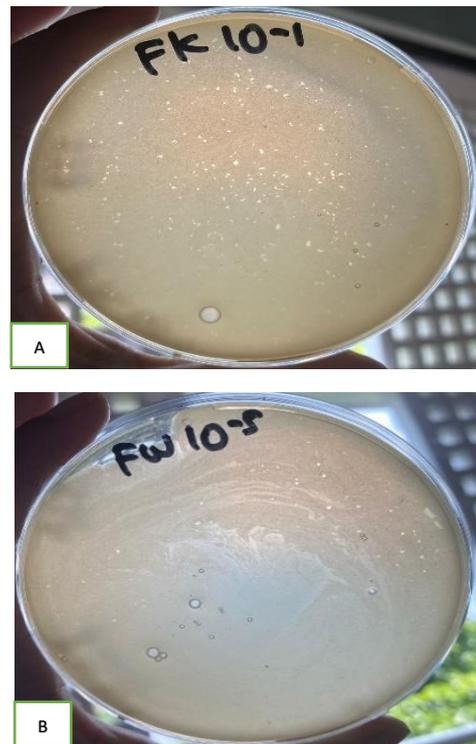
B. Hasil *Plaque Assay*

Berdasarkan penelitian yang telah

dilakukan oleh penulis, pada metode *plaque assay* ini penulis berhasil mendapatkan *plaque* setelah diinkubasi pada suhu 30°C 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 *Plaque Assay* Positif



Gambar 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 setelah melalui inkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. 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 *Plaque Assay* Negatif



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

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°C *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).

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

C. 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:

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

dari rumus tersebut maka akan diperoleh titer sebagai berikut :

- a. Titer dari sampel FK

$$\frac{208}{10^{-1}} \times \frac{1}{10^{-2}} = 2,08 \times 10^5$$
$$= 2,1 \times 10^5 \text{ PFU/mL}$$

- b. Titer dari sampel FW

$$\frac{27}{10^{-1}} \times \frac{1}{10^{-4}} = 2,7 \times 10^6 \text{ PFU/mL}$$

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.

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 $2,1 \times 10^5$ PFU/mL

merupakan titer yang diperoleh dari sampel FK dan $2,7 \times 10^6$ 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 dalam sarang 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 berulang kali 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 sarang 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.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan 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 $2,1 \times 10^5$ PFU/mL dan $2,7 \times 10^6$ PFU/mL.

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 penggunaan bakteriofag untuk menghilangkan bakteri penghasil nitrit guna mengendalikan kadar nitrit pada sarang burung walet.

REFERENSI

- Abedon, S. T. 2021. *Detection of bacteriophages: Phage plaques. Bacteriophages: biology. Technology Therapy.* 507-538.
- Ahmed, H., Flockhart, A., Foley, S., and Foley, J. 2019. *Isolation of Streptococcus mutans and its bacteriophage from human plaque samples.* Saudi J Oral Dent Res. 4(8): 561-564.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., and Fujiwara, T. 2007. *Proposal of Lysinibacillus boronitolerans gen. nov. sp. nov., and Transfer of Bacillus fusiformis to Lysinibacillus fusiformis comb. nov. and Bacillus sphaericus to Lysinibacillus sphaericus comb. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57(5): 1117-1125.
- Buttimer, C., Khokhlova, E. V., Stein, L., Hueston, C. M., Govi, B., Draper, L. A., and Hill, C. 2023. *Temperate bacteriophages infecting the mucin-degrading bacterium Ruminococcus gnavus from the human gut.* Gut Microbes. 15(1).
- Cacciabue, M., Currá, A., and Gismondi, M. I. 2019. *Viral Plaque: a Fiji Macro for Automated Assessment of Viral Plaque Statistics.* PeerJ. 7.
- Chamandoost, S., Fateh, M., and Hosseini, M., 2016. *A Review of Nitrate and Nitrite Toxicity in Foods.* Journal Human Environ. Health Promot. 1(2): 80–86.
- Chan, G. K. L. p. *The Quality Assurance of Edible Bird's Nest: Removal of Nitrite Contamination and Identification of an Indicative Chemical Marker* (Doctoral Dissertation).
- Chan, G. K., Wu, K. Q., Fung, A. H., Poon, K. K., Wang, C. Y., Gridneva, E., and Tsim, K. W. 2018. *Searching For Active Ingredients in Edible Bird's Nest.* Journal of Compliment Medicine and Alternative Healthcare. 6.
- Choudhry, P. 2016. *High-throughput Method for Automated Colony and Cell Counting by Digital Image Analysis Based on Edge Detection.* PLoS ONE. 11(2).
- Cvetković, D., Živković, V., Lukić, V., and Nikolić, S., 2019. *Sodium Nitrite Food Poisoning in One Family.* Forensic Science Medicine and Pathology. 15(1): 102–105.
- Federici, S., Kviatcovsky, D., Valdes-Mas, R., and Elinav, E. 2023. *Microbiome- phage Interactions in Inflammatory Bowel Disease.* Clinical Microbiology and Infection. 29(6): 682-688.
- González, B., Monroe, L., Li, K., Yan, R., Wright, E., Walter, T., and Jiang, W. 2020. *Phage G Structure at 6.1 Å Resolution, Condensed DNA, and Host Identity Revision to a Lysinibacillus.* Journal of Molecular Biology. 432(14): 4139-4153.
- Gunnars, K. 2020. *Are nitrates and nitrites in foods harmful?.* Healthline.
- Hamzah, Z., Ibrahim, N. H., Sarojini, J., Hussin, K., Hashim, O., and Lee, B. B. 2013. *Nutritional Properties of Edible Bird Nest.* Journal of Asian Scientific Research. 3(6): 600.
- Hardy, J. M., Dunstan, R. A., Lithgow, T., and Coulibaly, F. 2022. *Tall Tails: Cryo-electron Microscopy of*

- Phage Tail DNA Ejection Conduits*. Biochemical Society Transactions. 50(1): 459.
- Jamalluddin, N.H., Tukiran, N. A., Fadzillah, N. A., and Fathi, S. 2019. *Overview of Edible Bird's Nests and Their Contemporary Issues*. Food Control. 104: 247–255.
- Kokko, S. 2023. *Characterization of Megaphage FKy-1: Morphology, Infection Cycle and Stability*. Journal of Molecular Biology. 94(4): 555-565.
- Liang, S., Qi, Y., Yu, H., Sun, W., Raza, S. H. A., Alkhorayef, N., and Zhang, L. 2023. *Bacteriophage Therapy as an Application for Bacterial Infection in China*. Antibiotics. 12(2): 417.
- Lu, J. R., and Liu, G. H. 2021. *Lysinibacillus agricola sp. nov., Isolated From Soil*. Archives of Microbiology. 203(7): 4173-4178.
- Mahler, M., Costa, A. R., van Beljouw, S. P., Fineran, P. C., and Brouns, S. J. 2023. *Approaches for Bacteriophage Genome Engineering*. Trends in Biotechnology. 41(5): 669-685.
- Ma, L., Hu, L., Feng, X., and Wang, S. 2018. *Nitrate and Nitrite in Health and Disease*. Aging and Disease. 9(5): 938.
- Misol, Jr, G. N., Kokkari, C., and Katharios, P. 2020. *Biological and Genomic Characterization of a Novel Jumbo Bacteriophage, vB_VhaM_pir03 With Broad Host Lytic Activity Against Vibrio Harveyi*. Pathogens. 9(12): 1051.
- Narulita, E., Cahyati, V. I. N., Febrianti, R. A., and Iqbal, M. 2023. *Potential Bakteriophages to Overcome Bacterial Infection of Alcaligenes Faecalis in Diabetic Ulcer*. Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism. 29(1).
- Ningrum, S. G., Candra, A. Y. R., and Wardhani, H. C. P. 2023. *The Potency of Citrus Aurantiifolia Swingle and Sea Salt Solution as a Cleansing Agent for Edible Bird's Nests*. Makara Journal of Science. 27(1): 4.
- Ningrum, S. G., Palgunad, B. U., and Sasmita, R. 2022. *Evaluation of Nitrite Concentration in Edible Bird's Nest (White, Yellow, Orange, and Red Blood)*. Makara Journal of Science. 26(1): 7.
- Nwankwo, C. J., Odokuma, L. O., and Ogugbue, C. J. 2023. *Toxicity of Bitumen on Soil Fertility Bacteria-Nitrobacter and Nitrosomonas From Tekulu Waterside, Rivers State, Nigeria*. GSC Advanced Research and Reviews. 16(3): 053-061.
- Ofir, G., and Sorek, R. 2017. *Vesicles Spread Susceptibility to Phages*. Cell. 168(1): 13-15.
- Paydar, M., Wong, Y. L., Wong, W. F., Hamdi, O. A. A., Kadir, N. A., and Looi, C. Y. 2013. *Prevalence of Nitrite and Nitrate Contents and its Effect on Edible Bird Nest's Color*. Journal of Food Science, 78(12): 1940-1947.
- Pratiwi, Y. R., 2011, *Isolasi dan Seleksi Bakteri Penitrifikasi dari Sampel Tanah di Sekitar Kandang Ternak di Kabupaten Bogor*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rahaman, M. T., Rahman, M., Rahman, M. B., Khan, M. F. R., Hossen, M. L., Parvej, M. S., and Ahmed, S. 2014. *Poultry Salmonella Specific Bacteriophage Isolation and Characterization*. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine. 12(2).
- Ramesh, N., Archana, L., Madurantakam Royam, M., Manohar, P., and Eniyan, K. 2019. *Effect of various bacteriological media on*

- the plaque morphology of Staphylococcus and Vibrio phages*. Access Microbiology. 1(4).
- Rifai, A. 2022. *Burung Walet Dengan Pop Art Style Pada Busana Kasual*. Doctoral Dissertation. ISI Yogyakarta.
- Sanders, E. R. 2012. *Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods*. Journal of Visualized Experiments. 63: 1- 18.
- Shim, E. K. S., and Lee, S. Y. 2018. *Nitration of Tyrosine in the Mucin Glycoprotein of Edible Bird's Nest Changes its Color From White to Red*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66(22): 5654-5662.
- Sloots, P. 2014. *Basistheorie Milieuchemie*. Redoxreacties in Het Milieu. 2: 3-16.
- Tan, S. N., Sani, D., Lim, C. W., Ideris, A., Stanslas, J., and Lim, C. T. S. 2020. *Proximate Analysis and Safety Profile of Farmed Edible Bird's Nest in Malaysia and its Effect on Cancer Cells*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
- Venturini, C., Ptrovic Fabian, A., Fajardo Lubian, A., Barbirz, S., and Iredell, J. 2022. *Biological Foundations of Successful Bacteriophage Therapy*. EMBO Molecular Medicine. 4(7).
- Widiyani, P., Latif, H., Lukman, D. W., dan Sudarwanto, M. B. 2021. *Artikel Review: Bakteri Nitritasi dan Peranannya dalam Keberadaan Nitrit pada Sarang Burung Walet*. Jurnal Kajian Veteriner. 9(2): 98-109.
- Wu, S., Lv, N., Zhou, Y., and Li, X. 2023. *Simultaneous Nitrogen Removal Via Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification by a Novel Lysinibacillus fusiformis B301*. Water Environment Research. 95(3).
- Yasmine, C., Setiawan, A. W., dan Handoko, Y. A. 2023. *Isolasi Bakteriofag Xanthomonas oryzae Dari Lahan Sawah Di Kelurahan Kecandran, Kecamatan Sidomukti, Salatiga dan Stabilitasnya Terhadap Berbagai pH*. Jurnal Agrotek Tropika. 11(3): 401-408.
- Yeo, B. H., Tang, T. K., Wong, S. F., Tan, C. P., Wang, Y., Cheong, L. Z., and Lai, O. M. 2021. *Potential Residual Contaminants in Edible Bird's Nest*. Frontiers in Pharmacology, 12:
- Zhao, R., Li, G., Kong, X. J., Huang, X. Y., and Li, W. 2016. *The Improvement Effects of Edible Bird's Nest on Proliferation and Activation of B Lymphocyte and Its Antagonistic Effects on Immunosuppression Induced By Cyclophosphamide*. Drug Design Development and Therapy. 10: 371- 381.