

## III MATERI DAN METODE

### 3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian karakterisasi tipe plak bakteriofag yang menginfeksi bakteri *Stenotrophomonas* sp. yang diisolasi dari tanah di lingkungan rumah burung walet ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Kelompok Riset Pemulihan Mikrobiologis, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong pada bulan Maret 2024.

### 3.2. Materi Penelitian

#### 3.2.1. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan antara lain gloves, spidol, mikroskop digital, tube 1,5 ml, batang ose, bunsen, inkubator, cawan petri, pipet, mikropipet, tabung reaksi, vortex, erlenmeyer, autoklaf, centrifuge, dan filter 0,22 µL.

#### 3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan dalam penelitian ini yang digunakan antara lain, SM Buffer, BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*), BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*), bakteri *Stenotrophomonas* sp. yang sudah diisolasi, TSA (*Tryptic Soy Agar*), bakteriofag uji yang diisolasi dari tanah di lingkungan rumah burung walet.

### 3.3. Metode Penelitian

Jenis penelitian adalah penelitian deskriptif laboratorik. Deskriptif yang dimaksud yaitu dengan menerangkan dan memaparkan hasil dari penelitian yang sudah didapat.

### 3.4. Parameter Penelitian

Parameter penelitian yang digunakan untuk mengetahui karakterisasi tipe plak bakteriofag yang diisolasi dari tanah di lingkungan rumah burung walet.

### 3.5. Variable Penelitian

Variabel penelitian yaitu variabel bebas yaitu karakterisasi tipe plak bakteriofag dan variabel terikatnya adalah tanah rumah burung walet.

### 3.6. Prosedur Penelitian

#### 3.6.1. Kultur Bakteri *Stenotrophomonas* sp.

Bakteri yang telah tumbuh pada media *Stenotrophomonas* sp. dan membentuk koloni kemudian di ambil dan diinokulasikan pada media agar. Media agar bakteri *Stenotrophomonas* sp. dilakukan pada media BHIA yang sering digunakan untuk membuat stok biakan atau *culture stock* bakteri aerob (Azni dan Ramadhan, 2021).

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 semalaman. Hasil inkubasi ini yang selanjutnya digunakan sebagai host bakteri (Melinda, 2021).

### **3.6.2. Spot Test**

*Spot test* adalah cara cepat untuk memeriksa apakah sample mengandung bakteriofag yang dapat menginfeksi bakteri. Uji ini dengan meneteskan setitik fag ke petri yang telah diinokulasikan dengan bakteri yang selanjutnya diinkubasi. Hasil positif berupa munculnya *clear zone* sedangkan negatif tidak ditandai dengan munculnya *clear zone* setelah diinkubasi.

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  $\mu\text{L}$  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 ( Franswinsly, 2023).

### 3.6.3. *Plaque Assay*

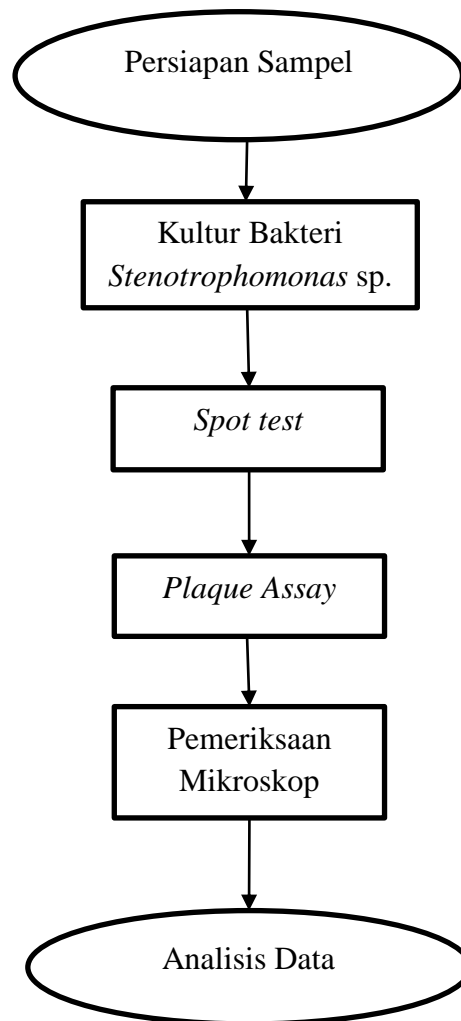
*Clear zone* yang muncul dari *spot test* di ambil dan dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml berisi SM Buffer 900  $\mu\text{L}$  lalu di vortex dan didiamkan suhu ruang selama 1 jam. Tube disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 15.000 rpm. Supernatan diambil dan disaring dengan filter 0,22  $\mu\text{L}$ . Pengenceran dilakukan dengan menambahkan 100  $\mu\text{L}$  filtrat kedalam 900  $\mu\text{L}$  SM Buffer lalu dihomogenkan dengan vortex, dilakukan berulang hingga pengenceran  $10^{-6}$ . Dari setiap pengenceran kemudian diambil 100 $\mu\text{L}$  dan dimasukkan ke tube berbeda sesuai pengenceran berisi 500 $\mu\text{L}$  host bakteri.

Plating dilakukan dengan mencampur masing-masing pengenceran pada tube 1,5 ml ke dalam TSA semisolid lalu divortex dan di tungkan 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).

#### **3.6.4. Mikroskop Digital**

Mikroskop digital adalah kombinasi mikroskop optik dan kamera digital yang dapat disimpan di dalam komputer. Seperti mikroskop lainnya, 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 (Hidayat, dkk., 2023).

### 3.7. Kerangka Operasional Penelitian



### 3.8. Analisis Data

Hasil data dalam penelitian ini dianalisis secara deskriptif menggunakan tabel dan gambar.