

### **III. MATERI DAN METODE**

#### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian skripsi di lakukan di labolatorium Badan Riset dan Inovasi Nasional(BRIN) dan Laboratorium Mikrobiologi Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis Universitas IPB. Penelitian berlangsung pada bulan 10 Juni – 01 Juli 2024.

#### **3.2 Materi Penelitian**

##### **3.2.1 Alat Penelitian**

Alat penelitian yang digunakan yaitu *gloves*, *nurse cap*, tisu, kapas, plastik klip 2 kg dan 1 kg, *cotton swab*, sendok plastik, marker permanen, label, gunting, *cutter*, falcon ukuran 50 ml, *coolbox*, *ice gell*, karet, incubator, erlenmeyer, bunsen, mikropipet, neraca analitik, autoklaf, cawan petri, *hot plate*, dan PH meter, jarum ose lurus dan jarum ose bulat, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *cell spreader*, mikroskop, kaca objek dan kaca penutup.

##### **3.2.2 Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang dipakai yaitu media *triptic soy agar* (TSA) media nitrifikasi cair dan padat, aquadest, air, etanol / alcohol, sarang burung walet seriti, larutan kristal violet, larutan lugol, safranin, oil imersi, media agar dan cair; glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol, indol, urea, sitrat, *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), oksidase-fruktosa (OF), dan gliserol.

### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini merupakan penelitian metode deskriptif labolatorik yakni penelitian bertujuan untuk mengetahui informasi secara alamiah tentang bakteri yang diisolasi dari sarang burung walet.

#### **3.3.2 Variabel Penelitian**

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas, varabel terikat dan variabel kontrol.

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bakteri nitrifikasi,
2. Variabel terikat dalam penelitian ini ialah sarang burung walet,
3. Variabel kontrol adalah variabel kendali yaitu lingkungan sekitar sarang burung walet.

#### **3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel**

Sampel yang di gunakan sarang burung walet. Sarang burung wallet yang digunakan pada penlitian ini sebanyak 20 sampel sarang walet, koleksi sampel akan dilakukan secara *random sampling*. Sampel yang dipakai berupa sarang walet di ambil dari rumah burung walet di Sumedang.

### 3.4 Tahap Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan Sampel

Tahap persiapan sampel yaitu menyiapkan sarang burung walet putih yang telah di ambil dari rumah burung walet kemudian ditimbang seberat 500 gram dan siapkan media spesifik (media nitrifikasi) cair dalam falkon 15 ml untuk isolasi bakteri penghasil nitrit. Sampel sarang burung walet yang sudah ditimbang dimasukkan pada Falkon yang mengandung 15 mL media nitrifikasi cair dan dihomogenisasi. Suspensi dikultur selama 7 hari dalam media nitrifikasi cair dengan pH 7,8 suhu 28°C dan kecepatan 130 rpm.

#### 3.4.2 Pembuatan Media Spesifik (Media Nitrifikasi)

Tahapan dalam membuat media nitrifikasi langkah pertama adalah siapkan tabung erlenmeyer, aquades sebanyak 1 liter dan Setiap 1000 mL media spesifik mengandung: 2 g amonium sulfat, 0.5 g natrium karbonat, 0.5 g dikalium fosfat, 50 mg magnesium (II) sulfat heptahidrat, 5 mg kalsium klorida dihidrat, 2 mg mangan sulfat tetrahydrae, 0.2 g EDTA, 0,18 g Besi(II) sulfat 0.1 mg Tembaga sulfat pentahidrat, 0.05 mg *natrium molybdate*, 0.001 mg cobalt chloride hexahydrate, 0.1 mg *zinc sulfate heptahydrate*, dan 0.5 g glukosa (Sukmawati dkk., 2022). Semua bahan ditimbang sesuai takaran dan selanjutnya ditambahkan aquades sebanyak 1 liter homogenkan dengan *hot plate* dan dilakukan pengecekan PH hingga mencapai 7,8 setelah media mencapai PH yang telah diinginkan, media dipanaskan hingga bahan-bahan media nitrifikasi yang berbentuk serbuk homogen dengan aquades, setelah larut sumbat tabung yang berisi media nitrifikasi dan lanjut diautoklaf selama dua jam media siap digunakan.

### 3.4.3 Isolasi Bakteri Penghasil Nitrit

Sampel diencerkan hingga  $10^{-6}$  dan diambil 8 mL suspensi dari pengenceran ke  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  dituang pada cawan petri berisi media nitrifikasi padat tersebut dan diratakan di seluruh permukaan media agar menggunakan penyebar. Bakteri selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  (Sukmawati dkk., 2022). Setelah itu dilakukan perhitungan bakteri dan, dilanjutkan dengan pengulturan bakteri ke media umum seperti TSA. Isolat murni yang digunakan untuk uji selanjutnya.

### 3.4.4 Uji Morfologi Media Selektif Nitrifikasi (Pewarnaan Gram)

Isolat yang diperoleh akan diamati secara morfologis dan dilakukan pewarnaan gram. Salah satu metode untuk mengidentifikasi kelompok bakteri adalah dengan melakukan pewarnaan Gram. Langkah-langkahnya dimulai dengan mengambil isolat bakteri yang telah tumbuh dari media TSA menggunakan ose atau loop steril. Selanjutnya, isolat bakteri tersebut ditempatkan di atas gelas objek untuk membuat preparat ulas. Setelah itu, preparat tersebut difiksasi dengan mengarahkan ke api bunsen untuk mengamankan bakteri pada gelas objek.

Setelah proses fiksasi preparat bakteri ditetesi dengan larutan kristal violet dan didiamkan selama satu menit. Kemudian, preparat dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya, larutan lugol ditetesi ke preparat dan didiamkan selama satu menit lagi, kemudian dicuci lagi dengan air mengalir. Setelah itu, preparat dikeringkan. Langkah berikutnya preparat ditetesi dengan alkohol 96% hingga warna ungu dari larutan kristal violet hilang. Preparat kemudian dibasuh dengan air mengalir. Setelah itu,

preparat ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama satu menit. Preparat kemudian dicuci kembali dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat yang sudah dikeringkan kemudian diamati di bawah mikroskop menggunakan minyak imersi untuk melihat struktur dan sifat pewarnaan bakteri yang teridentifikasi (Rahmatullah dkk., 2021). Isolat yang menunjukkan Gram negatif akan diuji secara biokimia.

#### **3.4.5 Uji Biokimia**

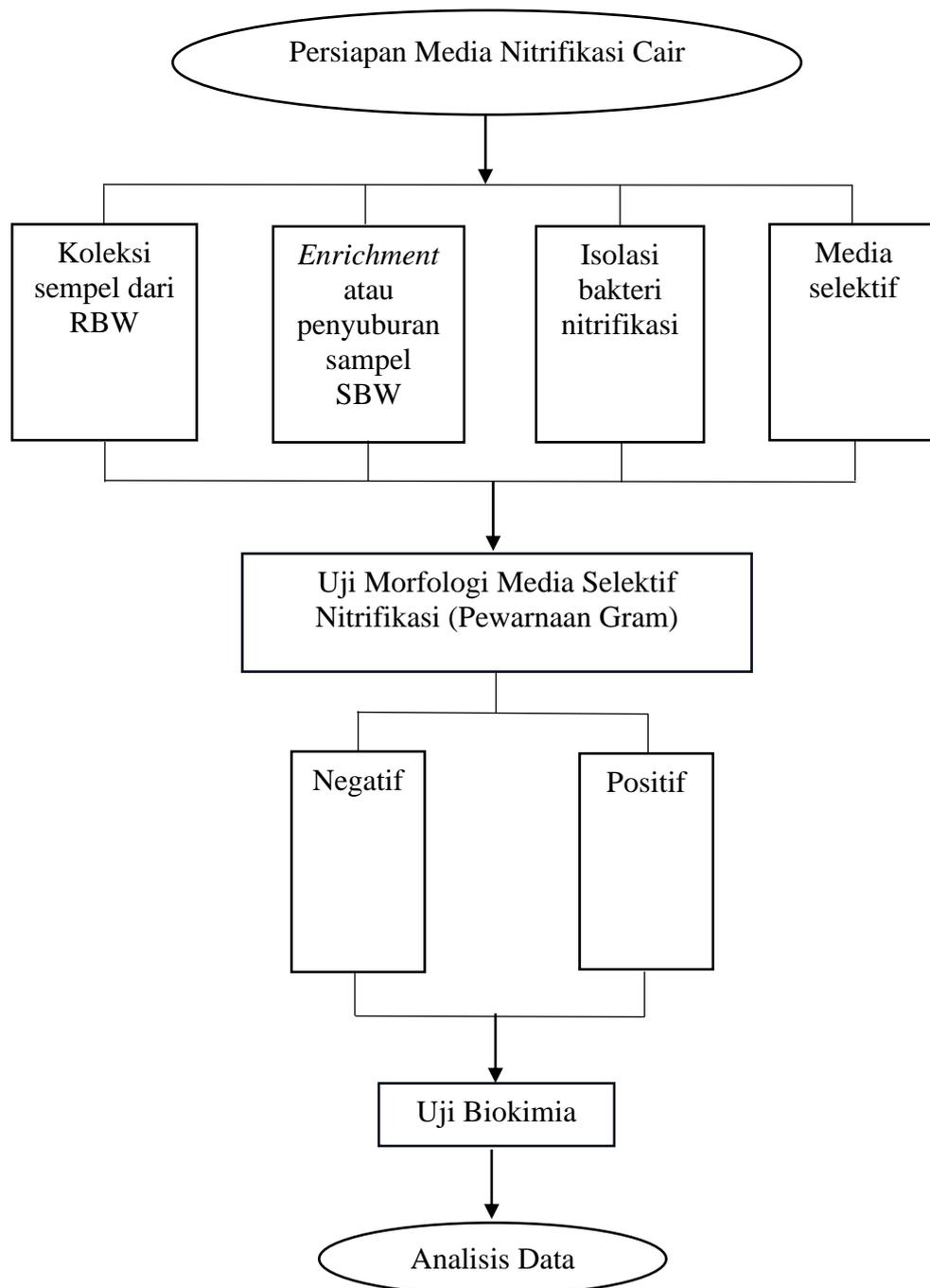
Pengujian biokimia dilakukan dengan mempersiapkan api bunsen, ose lurus dan bulat, tabung reaksi sebanyak 11 buah yang berisikan bahan media padat, media miring, dan media cair yang mengandung nutrisi untuk mendukung pertumbuhan bakteri uji fermentasi gula yaitu, glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol, indol, urea, sitrat, TSIA, OF, uji katalase, dan uji gliserol (Santi dkk., 2014). Bakteri ditanam pada 11 media di dekat api bunsen kemudian inkubasi selama 48 jam lakukan pengamatan dan mulai mencatat perubahan yang didapat dilanjutkan dengan menganalisis data yang didapat.

#### **3.4.5 Uji *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)**

Pengujian *KEGG* dilakukan dengan membuka browser web dan kunjungi situs resmi *KEGG* Di halaman utama *KEGG*, kemudian akan menemukan beberapa pilihan untuk menjelajahi basis data, seperti *KEGG PATHWAY*, *KEGG GENOME*, *KEGG COMPOUND*, dan lain sebagainya sesuai dengan kebutuhan. Untuk mencari informasi tentang gen atau protein, pilih *KEGG GENOME*, setelah memilih hasil pencarian, web akan mengarahkan ke halaman yang berisi informasi

detail mengenai jenis bakteri yang dicari. Berikut merupakan link situs *KEGG* yang dapat di akses melalui website <https://www.genome.jp/kegg/>

### 3.4 Kerangka Prosedur Penelitian



### 3.6 Analisis statistika

Semua hasil dalam penelitian ini akan dianalisis secara deskriptif menggunakan tabel dan gambar.