

## **III. MATERI DAN METODE**

### **3.1 Lokasi dan Waktu**

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) selama satu bulan pada bulan Februari 2024.

### **3.2 Materi Penelitian**

#### **3.2.1 Alat Penelitian**

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.

#### **3.2.2 Bahan Penelitian**

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, *Tryptic Soy Agar* (TSA) semisolid, SM Buffer, dan isolat *Lysinibacillus* sp.

### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional laboratorik. Deskriptif yang dimaksud adalah memaparkan hasil penelitian dan menerangkan hasil penelitian yang didapatkan.

### 3.3.2 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan beberapa variabel, yaitu :

- a. Variabel bebas : Bakteriofag
- b. Variabel kontrol : *Lysinibacillus* sp.

### 3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

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). Sampel tertentu yang dimaksud yaitu sampel diambil dari 2 rumah burung walet.

### 3.3.4 Kultur Bakteri

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.

## 3.4 Prosedur Penelitian

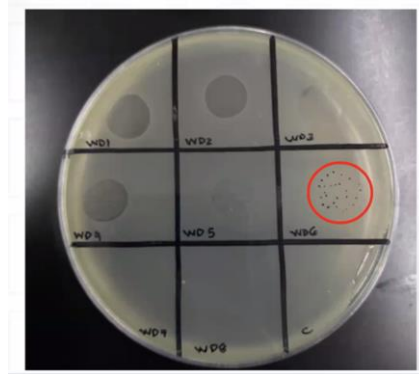
### 3.4.1 Isolasi Bakteri

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.

#### **3.4.2 Spot test**

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. Hasil *scrub* disentrifuge dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Kemudian supernatan dipisahkan dan dipindahkan pada tabung yang baru.

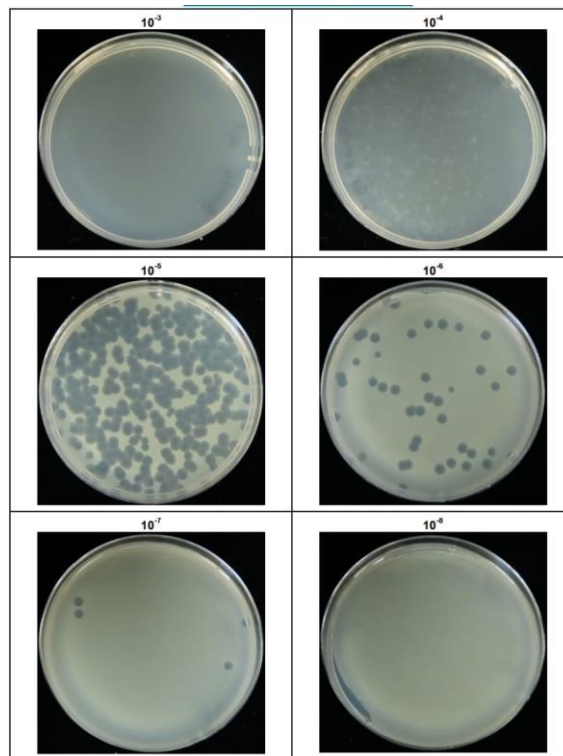


**Gambar 3.1** Hasil *spot test* (Ningrum, 2023)

### 3.4.3 *Plaque assay*

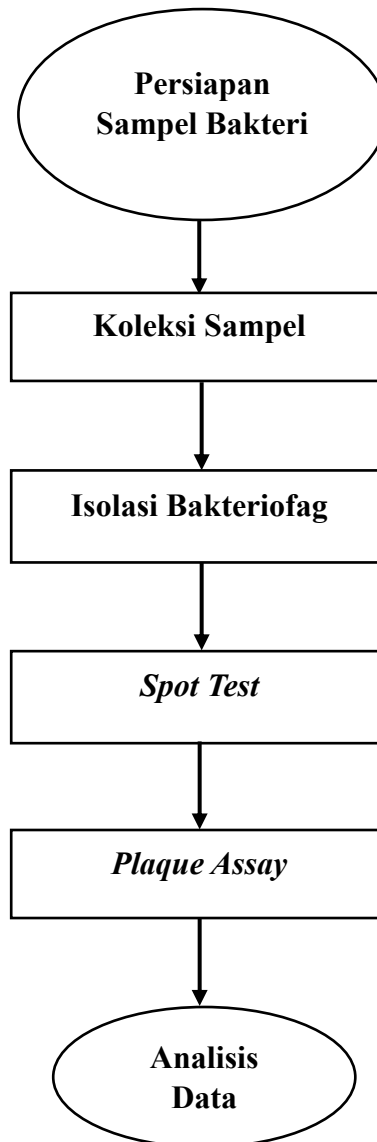
Supernatan sebanyak 100  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke dalam SM buffer sebanyak 500  $\mu\text{l}$  (sampai pengenceran  $10^{-6}$ ). Tahap pengenceran ( $10^{-1}$  s.d  $10^{-6}$ ) bakteriofag diambil 100  $\mu\text{l}$  pada tiap – tiap pengenceran untuk ditambahkan ke dalam 500  $\mu\text{l}$  yang mengandung kultur bakteri *Lysinibacillus* sp. pada tabung 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  $30^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Plak yang terbentuk di *picking* dan dilakukan pengenceran kembali sampai pengenceran  $10^{-6}$ . Plak yang terbentuk pada cawan petri yang memenuhi syarat (kisaran 25 – 250 plak) diamati dan dihitung menggunakan rumus berikut:

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



**Gambar 3.2** Hasil *plaque assay*  
(Virtual Southeast Asia Phage Workshop, 2022)

### 3.5 Kerangka Penelitian



### 3.6 Analisis Data

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