

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Terapan, BRIN, Cibinong pada bulan Maret 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop digital, ose bulat, laminar air flow, tube, bunsen, inkubator, cawan petri, tip, mikropipet, tabung reaksi, vorteks, centrifuge, membran filter.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk mendukung penelitian adalah BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*), BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*) bakteri *Pseudomonas putida* isolasi BRIN, SM Buffer, TSA (*Tryptic Soy Agar*) dan bakteriofag uji yang diisolasi dari air di lingkungan rumah burung walet.

3.3 Metode Penelitian

Jenis penelitian adalah penelitian deskriptif observasional. Deskriptif yang dimaksud adalah dengan menerangkan dan memaparkan hasil dari penelitian yang didapat.

3.4 Parameter Penelitian

Parameter penelitian yang digunakan untuk mengetahui karakteristik tipe *plaque* bakteriofag yang diisolasi dari air di lingkungan rumah burung walet.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah variable terikat yaitu morfologi bakteriofag dan variabel bebas yaitu air di lingkungan rumah burung walet.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Kultur Bakteri *Pseudomonas putida*

Media yang digunakan adalah BHIA dan BHIB. Kultur bakteri *Pseudomonas putida* pada media BHIA dengan teknik kuadran dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 30°C. Bakteri diambil koloni terpisah dengan ose bulat lalu dicelupkan pada erlen yang berisi BHIB dan diinkubasi sampai terlihat keruh pada *incubator shaker* dengan suhu 30°C.

3.6.2 *Spot Test*

Isolat bakteri yang sudah ditanam pada media BHIB ditambahkan pada media TSA semisolid dan divorteks. Media yang sudah dihomogenkan dituang ke dalam cawan petri secara merata dan tunggu hingga kering. Setelah itu, filtrat sampel diteteskan pada media sebanyak 10 µl secara merata dengan jarak 1 cm tiap tetesan. Setelah mengering, kemudian ditutup dan diberikan *plastic wrap* di sekeliling *petridish*. Media diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Jika muncul zona bening pada hasil *spot test* maka lakukan *scrubbing* menggunakan ose bulat. Hasil *scrub* dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml yang sudah berisi 900 µl SM buffer. Hasil *scrub* kemudian di *centrifuge* dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan pada tube baru.

3.6.3 *Plaque Assay*

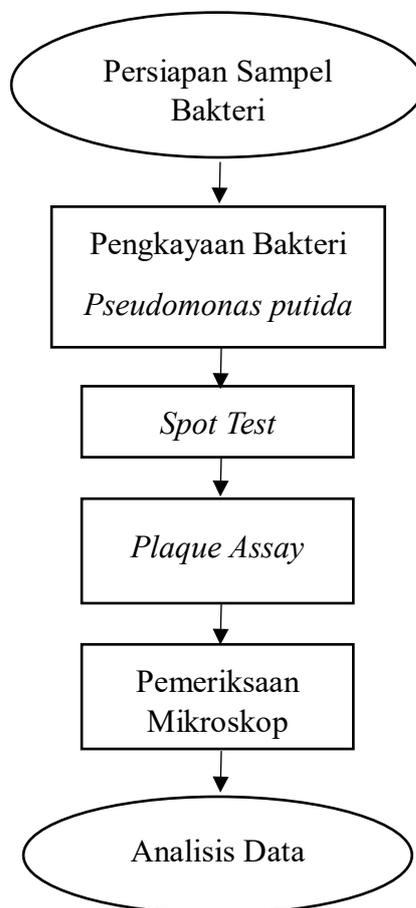
Plaque assay dilakukan dengan menambahkan 100 μl supernatan yang mengandung bakteriofag ke dalam 500 μl SM buffer untuk mendapatkan pengenceran 10^{-1} . Dilanjutkan dengan melakukan pengenceran serial hingga pengenceran 10^{-10} . Setiap tahap pengenceran melibatkan pengambilan 100 μl dari larutan sebelumnya dan menambahkannya ke dalam 500 μl buffer baru. Pada setiap tahap pengenceran (10^{-1} hingga 10^{-10}), mengambil 100 μl dari masing-masing pengenceran dan tambahkan ke dalam 500 μl kultur host bakteri yang sudah dipersiapkan di tube yang berbeda sesuai dengan jumlah pengenceran. Homogenkan campuran ini dengan baik untuk memastikan bahwa bakteriofag tercampur rata dengan host bakteri. TSA dicampurkan dengan semisolid dengan masing-masing campuran pengenceran tadi dan homogenkan. Campuran ini lalu tuang ke dalam cawan petri yang sudah berisi TSA agar. Cawan petri diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

3.6.4 **Pengamatan Dengan Mikroskop Digital**

Setelah inkubasi selama 24 jam, keluarkan cawan petri yang mengandung campuran TSA dan bakteri dari inkubator. Cawan petri dipastikan berada pada suhu ruangan agar tidak ada kondensasi yang dapat mengganggu pengamatan. Kemudian menghubungkan mikroskop digital USB ke laptop menggunakan kabel USB. Memastikan aplikasi mikroskop digital sudah terinstal dan siap digunakan pada laptop. Setelah itu, mikroskop digital dinyalakan dan membuka aplikasi mikroskop di laptop.

Cawan petri ditempatkan di bawah mikroskop digital, dengan memastikan cawan petri dalam posisi yang stabil. Penelitian dilakukan dengan menggunakan fokus mikroskop digital yang sesuai untuk mendapatkan gambar plak yang jelas. Kemudian mengamati plak yang terbentuk dan catat karakteristiknya, seperti diameter, bentuk plak (berbentuk bulat, tidak beraturan, atau memiliki tepi yang jelas), kejernihan plak (transparan atau keruh).

3.7 Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Penelitian

3.8 Analisis Data

Hasil dalam penelitian ini dianalisis secara deskriptif menggunakan gambar.