

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Observasi berlangsung pada bulan Januari – Februari 2024

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan yaitu sarung tangan laboratorium, botol semprot, kertas/tisu, plastic, kapas, karet tabung 50ml, tabung 15 ml, tempat sampah, kaldu TSB (*Tryotone Soya Agar*), labu Erlenmeyer, piring agar TSA, plat TSA, pipet dan ujung pipet, inkubator, tabung mikrosentrifugasi, sentrifuge, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, kertas lebel, dan spidol permanen.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu air yang diambil dari lingkungan rumah burung walet, alkohol 70%, aquades steril, larutan buffer SM steril, dan media nitrifikasi.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian metode deskriptif laboratorik yakni penelitian bertujuan untuk mengetahui informasi secara alamiah tentang bakteriofag yang diisolasi dari air lingkungan rumah burung walet.

3.3.2 Variabel Penelitian

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

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Bakteriofag
2. Variabel terikat dalam penelitian ini ialah air lingkungan sarang burung walet
3. Variable kontrol adalah variable kendali pada penelitian ini yaitu suhu pada air di lingkungan rumah burung walet

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini, sampel yang di gunakan air pada lingkungan rumah burung walet. Air yang di gunakan pada penlitian ini sebanyak 20 sampel yang diambil menggunakan metode *purposive sampling*. *Purposive sampling* adalah teknik yang digunakan untuk mengumpulkan atau mengidentifikasi sampel dalam keadaan tertentu (Fauzy, 2019). Sampel yang digunakan berupa air yang di ambil dari lingkungan burung walet yang didapatkan dari Sumedang.

3.4 Tahap Penelitian

3.4.1 Pembuatan Media

3.4.1.1 Media TSA

Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan lalu timbang media TSA menggunakan perkamen setelah itu masukkan TSA ke dalam Erlenmeyer lalu tambahkan aquades, masukkan magnet dalam Erlenmeyer untuk menghomogenkan dengan stirrer setelah homogen lakukan cek PH (jika kurang

basah/naik tetesan NaOH, jika kurang asam/turun teteskan HCL). Lalu ssesuaikan PH yang diinginkan, setelah itu masukkan agar dan hommogenkan kembali. Setelah hommogen keluarkan magnet pasang sumbat, plastic, kertas dan karet. Lalu massukkan ke dalam autoclaf dan tunggu kurang lebih 2 jam jika sudah tidak terlalu panas, maka siap dicetak pada cawan petri lakukan didalam laminar dan nyalakan UV selama 15 menit untuk mensterilkan media, setelah itu bungkus dan masukkan lemari pendingin.

3.4.1.2 Media Nitrifikasi

Siapkan seluruh bahan beserta alat yang akan digunakan lalu timbang bahan satu persatu dengan dialan kertas perkamen pada timbangan pastian menimbang bahan dengan akurat setelah semua bahan ditimbang tambahkan aquades sebanyak 1000 ml masukkan magnet pada tabung Erlenmeyer kemudian letakkan tabung Erlenmeyer diatas *hot plate stirrer* pastikan magnet berada ditengah kemudian nyalakan *hot plate stirrer* dan atur kecepatannya. Setelah bahan homogen matikan *hot plate stirrer* kemudian cek PH larutan dengan menggunakan PH meter pastikan larutan mengandung PH 7,8 (Max 7,82) lalu tuang dan bagi larut sebanyak 300 ml pada erlenmeyer 500 ml sumbat tabung Erlenmeyer beri kertas penutup dan plastic kemudian diberi karet setelah itu masukkan kedalam autoclaf tunggu hingga mesin mati dan suhu dibawah 70°C keluarkan media nitrifikasi setelah suhu 70°C lakukan pengecoran pada cawan petri.

3.4.2 Isolasi Bakteriofag

Sebanyak 20 sampel air yang diperoleh dari air di lingkungan rumah burung walet Sumedang. Sampel dikumpulkan secara aseptik dalam vial 50 mL dan dikirim ke Laboratorium Mikrobiologi Terapan BRIN di Cibinong. Untuk mengekstrak supernatan, 50 mL masing-masing sampel disentrifugasi pada 4000 rpm dan 4°C selama 20 menit. Supernatan dikumpulkan sebanyak 20 mL, dicampur dengan 10 mL kaldu kedelai triptik (TSB) dalam botol kultur 100 mL dan 5 mL kultur (*Lysinibacillus* sp) secara aseptik, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, suspensi dipindahkan ke tabung sentrifugasi 15 mL dan disentrifugasi tiga kali pada 2500 rpm, suhu 4°C, masing-masing selama 10 menit. Filtrat bakteriofag diperoleh dengan menyaring supernatan melalui membran yang memiliki diameter pori 0,22 µm dan 0,45 µm.

3.4.3 Spot Assay

Spot assay dilakukan dengan meneteskan 10 µL sediaan yang akan diuji pada *double layer agar*. Oleskan 10 µL setiap fag yang diencerkan ke bagian yang ditandai pada *plate agar*. Tempatkan *plate agar* di tempatkan di bawah pembakar bunsen yang telah menyala dengan tutup bagian atas sedikit terbuka sela kurang lebih 5 menit, atau hingga larutan yang bernoda mengeras. Inkubasi plate selama 48 jam pada suhu 30°C.

Plak di hitung pada titik pengenceran yang sesuai. Pembentuk plak dihitung per milimeter (PFU/mL) menggunakan rumus berikut;

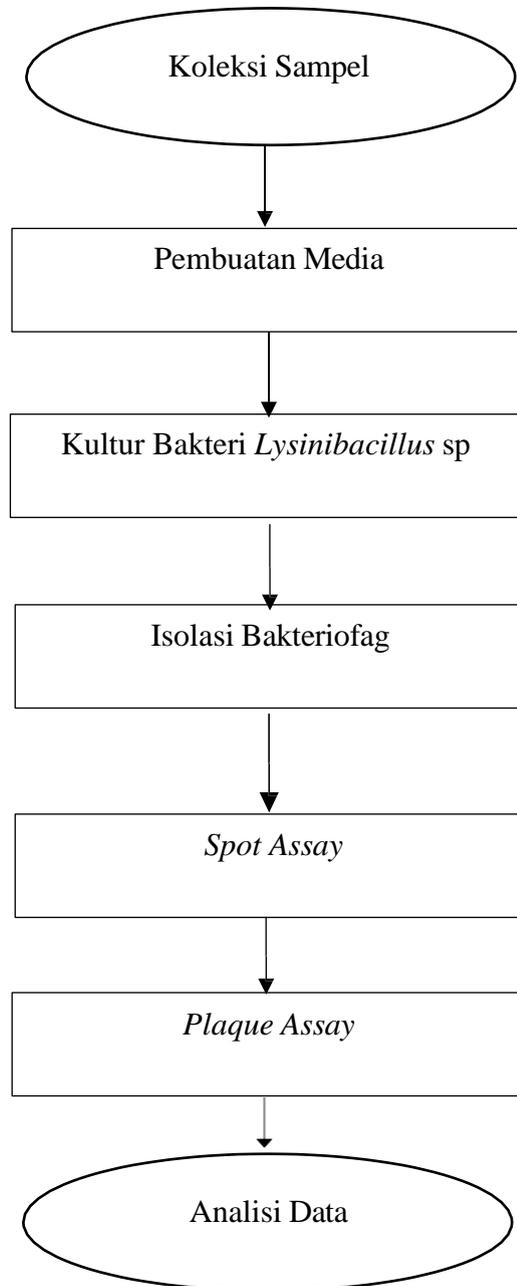
$$\frac{\text{Number of plaques counted (PFU)}}{\text{Volume plated (in mL)}} \times \text{dilution factor} = \text{titre } \left(\frac{\text{PFU}}{\text{mL}} \right)$$

3.4.4 Plaque Assay

Stok bakteriofag sebanyak 0,1 mL dicampur dengan 0,9 mL NaCL 0,85% (pengenceran 10^{-6}). Setelah setiap langkah pengenceran (10^{-1} hingga 10^{-6}), 100 μ l bakteriofag ditambahkan ke 4 mL TSA 0,6% dengan 500 μ l kultur bakteri *Lysinibacillus* sp fase log awal dan dihomogenisasi. Suspensi kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri terpisah yang mengandung TSA dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. *Plaque* yang dihasilkan pada cawan petri yang memenuhi kriteria (kisaran 25-250 plak) diperiksa dan dihitung menggunakan rumus berikut:

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

3.5 Kerangka Prosedur Penelitian



3.6 Analisis Data

Semua data dalam penelitian ini dianalisis secara deskriptif menggunakan grafik dan tabulasi.