

III. MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Lokasi

Penulis telah melakukan penelitian ini pada bulan Januari sampai dengan Februari 2024. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Kelompok Riset Pemulihan Mikrobiologis, Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan penulis yaitu neraca analitik, sendok, plastik klip, laminator air flow, sentrifus, vortex, tabung erlenmeyer steril, cawan petri, ose, pembakar bunsen, spuit, mikropipet, tabung reaksi, yellow tipe, filter, autoclave, falcon, mikrotube, rak falcon, dan rak mikrotube.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet campuran (sampel FW), media *Lactose Broth* (LB), media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), media *Tryptic Soy Agar* (TSA), *sm buffer*, dan isolat *Lysinibacillus* sp.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan oleh penulis menggunakan metode *plaque assay*, bertujuan untuk mengetahui informasi secara alamiah mengenai bakteriofag yang diisolasi dari feses burung walet.

3.3.2 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang digunakan oleh penulis dalam melakukan penelitian ini adalah menggunakan variabel bebas dan variabel terikat.

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian yang dilakukan oleh penulis adalah random sampling. Penulis akan melakukan pengambilan sampel sebanyak dua puluh sampel feses burung walet, yaitu sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet campuran (sampel FW) diambil pada rumah burung walet di Sumedang dengan kriteria sebagai berikut; feses burung walet yang telah mengering dan tanpa tercampur bulu, cangkang, maupun tanah.

3.4 Tahap Penelitian

3.4.1 Isolasi Bakteriofag

Sebanyak dua puluh sampel feses burung walet yang berasal dari; sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet konvensional (sampel FK) dan sepuluh sampel feses burung walet dari rumah burung walet campuran (sampel FW) diperoleh dari rumah burung walet di Sumedang kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Terapan, BRIN, Cibinong. Untuk mendapatkan supernatan dari feses burung walet maka feses burung walet perlu untuk dilakukannya pengenceran terhadap sampel menggunakan *sm buffer*, kemudian disentrifus pada kecepatan 3500 rpm, selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan dikoleksi sebanyak 20 mL ditambahkan *Brain Heart Infusion* (BHI) 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 2500 rpm, 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 Assay*

Spot assay dilakukan dengan meneteskan 10 µL sediaan yang akan diuji pada *double layer* agar (BHIA 1,4% dan BHIA *soft top* agar 0,7%). Diteteskan 10 µL setiap fag yang telah diencerkan ke bagian yang ditandai pada *plate* agar. Tempatkan *plate* agar ditempatkan dekat pembakar bunsen yang telah menyala dengan tutup bagian atas sedikit terbuka selama kurang lebih 5 menit, atau hingga larutan yang bernoda mengeras. Selanjutnya melakukan inkubasi *plate* selama 48 jam pada suhu 30°C.

3.4.3 *Plaque Assay*

Stok bakteriofag sebanyak 0,1 mL ditambahkan ke dalam NaCL 0,85% sebanyak 0,9 mL (sampai pengenceran 10^{-6}). Kemudian dari setiap tahap pengenceran (10^{-1} s.d 10^{-6}) bakteriofag diambil 100 µl untuk ditambahkan ke dalam 4 mL TSA 0,6% yang mengandung kultur bakteri penghasil nitrit (*Lysinibacillus* sp.) awal fase log sebanyak 200 µl dan dihomogenkan dengan vortex. Kemudian suspensi dituang ke dalam cawan petri berbeda yang telah berisi TSA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. *Plaque* yang terbentuk pada cawan petri yang memenuhi syarat (kisaran 25- 250 *plaque*).

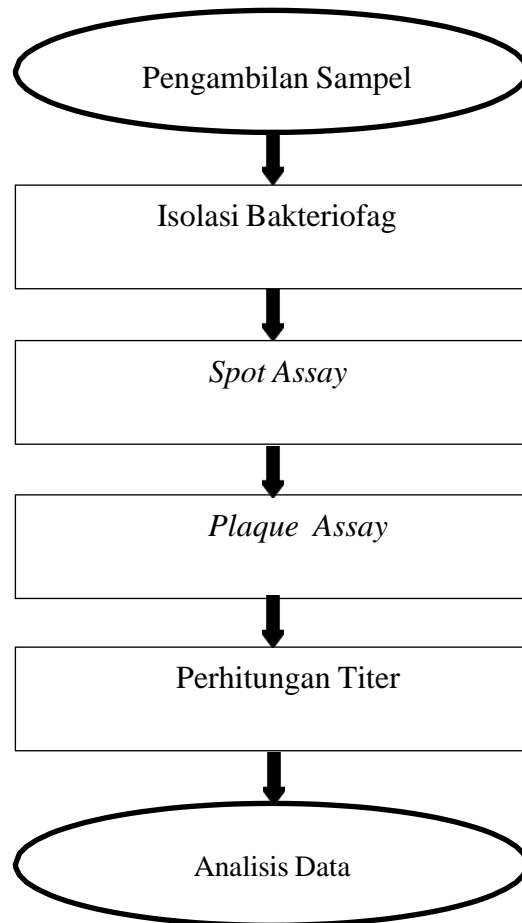
3.4.4 Perhitungan titer

Perhitungan titer dapat dilakukan setelah membaca hasil hitung jumlah *plaque*. Kemudian jumlah *plaque* yang diperoleh kemudian dimasukkan dalam rumus untuk perhitungan titer bakteriofag. Rumus perhitungan titer yaitu,

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

Plaque forming units (PFU) merupakan jumlah *plaque* dibagi dengan volume bakteriofag yang ditambahkan yaitu sebanyak 100 μl , kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran sesuai dengan jumlah *plaque* yang dipilih, yaitu yang memenuhi syarat (kisaran 25 - 250 *plaque*). Setelah dimasukkan dalam perhitungan rumus itulah, akan diperoleh titer dari bakteriofag yang di isolasi dari feses burung walet menggunakan metode *plaque assay*.

3.5 Kerangka Penelitian



3.6 Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh penulis setelah melakukan penelitian akan dianalisis secara deskriptif menggunakan tabel dan gambar.