

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen secara deskriptif yang memberikan informasi tentang uji viabilitas bakteri *indigenous* air rendaman kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) dalam media tepung beras dan lama penyimpanan dengan metode *freeze drying*. Dua variabel perlakuan yaitu media pembawa berupa tepung beras dan lama penyimpanan. Media pembawa yang digunakan yaitu tepung beras yang ditambahkan skim dan tepung beras ditamba skim dan glukosa dengan lama penyimpanan 0, 4 minggu, 6 minggu dan 8 minggu untuk mengetahui viabilitas bakteri *indigenous* air rendaman kenaf.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian Ini dilaksanakan mulai bulan Februari - November 2011 di Laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang untuk pembuatan media dan penanaman mikroorganisme. Untuk proses *freeze-drying* dilaksanakan di Laboratorium Jurusan Nutrisi dan Pakan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya dan Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Universitas Muhammadiyah Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Dalam penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas ukur, mikro pipet, tip, tabung sentrifugase, bunsen, kertas label, aluminium foil, plastik, koloni counter dan alat *freeze drying*.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *bacillus* SB1, SB2, SB6, dan *paenibasillus* SB7 dan SB10 dari BALITAS Malang, aquades, alkohol, tepung beras, skim, sukrosa, gula, natrium agar (NA), natrium broth (NB) dan molase.

3.4 Metode Kerja

3.4.1 Persiapan Isolat Bakteri

1. Alat dan bahan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C , selama 15 menit.
2. Diinokulasikan 5 isolat bakteri *indigenous* air rendaman kenaf dari biakkan murni masing-masing 1 ose pada media NB sebanyak 100 ml dalam erlenmeyer.
3. Diinkubasi dengan *shaker water bath* pada suhu 37°C , selama 24 jam.
4. Diinokulasikan lagi biakkan bakteri *indigenous* air rendaman kenaf dari media NB 100 ml ke media NB 300 ml sebanyak 30 ml.
5. Diinkubasi dengan *shaker water bath* pada suhu 37°C , selama 18 jam. Sampai pertumbuhan optimum (fase log) sekitar jumlah sel $10^8 - 10^9$ sel/ml.
6. Diambil 10 ml NB dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifius.
7. Disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit sampai media NB dan bakteri memisah.
8. Supernatan dibuang dan diperoleh suspensi

3.4.2 Persiapan Media Pembawa

1. Dibuat media tepung beras 10% dengan ditambahkan susu skim 10% dalam aquades 100 ml.

2. Dibuat media tepung beras ditambahkan susu skim 10% dan glukosa 10% dalam aquades 100 ml.
3. Media 1 dan 2 disterilisasi dengan cara pasteurisasi dengan suhu 62,9°C selama 30 menit.

3.4.3 Proses *Freeze-drying*

1. Diambil suspensi basah dalam tabung sentrifius lalu dimasukkan ke dalam botol film yang berisi 10 ml media pembawa menggunakan mikro pipet.
2. Dilakuakn langkah no. 1 hingga semua suspensi basah dan media pembawa di masukkan ke dalam botol film.
3. Dibekukan pada suhu -20°C selama 1 hari.
4. Didiamkan hingga mencair lalu diambil sebanyak 1 ml untuk dilakukan pengenceran pada aquades steril yaitu 7 kali pengenceran.
5. Diambil 1 ml dari masing-masing pengenceran dengan mikro pipet untuk ditaman pada media NA selama 2 hari.
6. Dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media NA dengan alat Koloni Counter (CFU/ml).
7. Dimasukkan media tumbuh yang telah dibekukan ke dalam alat *freeze-drying*.
8. Didapatkan biomassa kering.

3.4.4 Uji Viabilitas kultur kering

1. Di ambil 0,1 gr isolate kering dan diencerkan dengan aquades steril 0,9 ml lalu di dihomogenkan menggunakan vortex.
2. Diinokulasikan isolat kultur kering yang telah di homogenkan ke dalam media molase 5% sebanyak 9 ml selama 24 jam pada suhu 37°C.

3. Di ambil 1 ml molase 5% dengan mikro pipet untuk pengenceran yaitu 7 kali pengenceran dengan aquades steril.
4. Di ambil 1 ml dari masing-masing pengenceran menggunakan mikro pipet untuk ditanam pada cawan petri yang berisi media NA selama 2 hari. Setiap pengenceran dilakukan dua ulangan.
5. Dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media NA dengan alat Koloni Counter (CFU/ml).
6. Dilakukan uji viabilitas kultur kering pada 0, 4 minggu, 6 minggu dan 8 minggu.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini dibagi menjadi dua yaitu :

1. Variabel terikat : berupa perlakuan pada media tepung beras yang masing-masing diberi substrat yang berbeda serta lama pengamatan.
2. Variabel bebas : berupa jumlah koloni mikroba indigineous air rendaman kenaf.