

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen secara deskriptif yang memberikan informasi tentang pengaruh media bekatul terhadap viabilitas bakteri *indigenous* air rendaman kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) dengan metode *freeze drying*. Pada perlakuan media tumbuh digunakan 2 (dua) perlakuan yaitu media bekatul ditambah dengan susu skim, dan media bekatul ditambah dengan susu skim dan glukosa. Perlakuan lama penyimpanan 0, 4, 6, dan 8 minggu. Data pengamatan meliputi jumlah koloni (viabilitas bakteri *indigenous*) pada rentang waktu yang telah ditentukan.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret - November 2011 di Laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang untuk pembuatan media dan penanaman mikroorganismenya. 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

Alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, mikro pipet, bunsen, jarum ose, kertas label, autoklaf, *water bath*, *laminar air flow* (LAF), alat *freeze-drying*, sentrifuge, *shaker water bath* dan freezer.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah Isolat bakteri *Bacillus* SB1, *Bacillus* SB2, *Bacillus* SB6, dan *Paenibacillus* SB7, *Paenibacillus* SB10 hasil isolasi dari BALITTAS Malang, media Nutrient Broth (NB), Nutrient agar (Na), Aquades, bekatul, skim, glukosa, molase 5%.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini dibagi menjadi dua bagian yaitu :

1. Variabel terikat : berupa perlakuan pada bekatul yang masing-masing diberi substrat yang berbeda serta lama penyimpanan.
2. Variabel bebas : berupa jumlah koloni mikroba *indigenous* air rendaman kenaf.

3.5 Metode Kerja

3.5.1 Persiapan Isolat Bakteri

1. Alat dan bahan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C, selama 15 menit.
2. Diambil 1 jarum ose masing-masing isolat bakteri dari biakkan murni air rendaman kenaf dan diinokulasikan pada media NB sebanyak 100 ml dalam erlenmeyer.

3. Diinkubasi pada *shaker water bath* dengan kecepatan 110 rpm, suhu 37°C, selama 24 jam.
4. Diinokulasikan bakteri dari biakkan pertama sebanyak 10% pada media NB sebanyak 300 ml dalam erlenmeyer dan diinkubasi pada *shaker water bath* dengan kecepatan 110 rpm, suhu 37°C, selama 18 jam. Sampai pertumbuhan optimum (fase log) sekitar jumlah sel $10^8 - 10^9$ sel/ml.
5. Dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge, masing-masing tabung berisi sebanyak 10 ml biakkan kedua.
6. Disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit sampai bakteri dan media NB memisah
7. Supernatan dibuang dan diperoleh suspensi basah

3.5.2 Persiapan Media Pembawa

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

3.5.3 Proses Freeze-drying

1. Diambil suspensi basah (hasil sentrifugasi), masing-masing botol sentrifuge ditambah dengan 10 ml media pembawa kemudian dikocok.
2. Dimasukkan media pembawa yang bercampur bakteri ke dalam botol film dan ditutup.

3. Dibekukan pada suhu -20°C selama 24 jam.
4. Dimasukkan mikroorganismenya yang sudah beku pada alat *freeze-drying* dan proses *freeze-dry* selama 2 hari atau sampai kering.
3. Didapatkan biomassa kering.

3.5.4 Uji Viabilitas

1. Diambil 0,1 gr isolat kultur kering ke dalam 0,9 ml aquades (pengenceran 10^{-1}) dan di vortex sampai homogen dan diinokulasikan pada media molase 5% dari 100 ml aquades, sebanyak 9 ml larutan molase (pengenceran 10^{-2}). Molase digunakan untuk mengaktifkan kembali bakteri dari keadaan dorman.
2. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C .
3. Diambil 1 ml isolat dalam molase dan diencerkan dengan 9 ml aquades steril (pengenceran 10^{-3}) dan dihomogenkan
4. Diambil sampel 1 ml dan kemudian diencerkan kembali hingga pada konsentrasi 10^{-4} dan 10^{-8} .
5. Diambil dengan mikro pipet sebanyak 1 ml sampel hasil pengenceran, disebar ke dalam cawan petri dan dituang media NA di atas bakteri. Pada tahap ini masing-masing pengenceran dibuat 2 ulangan.
6. Diinkubasi kultur selama 48-72 jam pada suhu ruang.
7. Dihitung jumlah koloni dengan menggunakan *colony counter*.
8. Dilakukan uji viabilitas kultur kering pada 0, 4 minggu, 6 minggu, dan 8 minggu