

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian uji viabilitas bakteri *indigenous* air rendaman kenaf pada media tapioka dan lama penyimpanan dengan proses *freeze drying* berupa diskriptif kualitatif. Perlakuan media tumbuh digunakan 2 faktor perlakuan yaitu media tapioka dan skim (Media 1) dan media tapioka, skim dan glukosa (Media 2) masing-masing dilakukan dua ulangan. Perlakuan lama penyimpanan dengan 4 faktor yaitu 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 Februari - November 2011 di Laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang untuk pembuatan media dan penanaman mikroorganisme. Untuk proses *freeze-drying* dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Malang (UMM).

#### **3.3 Alat dan Bahan**

##### **3.3.1 Alat**

Alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, *beacker glass*, *erlemeyer*, mikro pipet, bunsen, jarum ose, kertas label, tabung *sentrifuge*, tabung

film, plastik *wrap*, mikro pipet, tub, autoklaf, *water bath*, *laminar air flow* (LAF), alat *freeze-drying*, *sentrifuge*, *shakker 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 Balai Penelitian Tembakau dan Serat (BALITTAS) Malang, media Nutrient Broth (NB), Nutrient Agar (NA), aquades, tapioka, skim, glukosa, molase 5%.

### 3.4 Metode Kerja

#### 3.4.1 Tahap 1: Persiapan Isolat Bakteri

1. Alat dan bahan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C, selama 15 menit.
2. Diinokulasikan pertama, isolat bakteri *indigenous* dari biakkan murni pada media NB sebanyak 100 ml.
3. Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C dengan menggunakan *shakker water bath* dengan kecepatan putaran 120 rpm selama 24 jam.
4. Diinokulasikan kedua, biakkan bakteri *indigenous* di media NB 100 ml pada media NB 300 ml.
5. Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C dengan menggunakan *shakker water bath* dengan kecepatan putaran 120 rpm, selama 18 jam sampai pertumbuhan optimum (fase log) sekitar jumlah sel 10<sup>8</sup> – 10<sup>9</sup> cfu/ml.
6. Dimasukan dalam tabung senrifuge masing-masing 10 ml

7. Disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit
8. Diperoleh biomassa basah

### **3.4.2 Tahap 2: Persiapan Media Pembawa**

#### **3.4.2.1 Media I**

1. Ditimbang tapioka 10 g dan skim 10 g
2. Dimasukan dalam aquadest steril 100 ml
3. Disterilisasi dengan water bath dengan suhu 70<sup>0</sup>C selama 30 menit
4. Didinginkan

#### **3.4.2.2 Media II**

1. Ditimbang tapioka 10 g, skim 10 g dan glukosa 10 g
2. Dimasukan dalam aquadest steril 100 ml
3. Disterilisasi dengan water bath dengan suhu 70<sup>0</sup>C selama 30 menit
4. Didinginkan

### **3.4.3 Tahap 3: Proses *Freeze Drying***

1. Diambil isolat bakteri dari tahap 1 lalu diinokulasikan ke dalam media pembawa dengan perbandingn 1:1.
2. Dimasukan dalam tabung film masing-masing 10 ml
3. Dibekukan pada suhu -20<sup>0</sup>C selama 1 hari
5. Dimasukkan dalam alat *freeze drying*.
6. Kultur kering

### **3.4.4 Tahap 4: Uji Viabilitas**

1. Diambil 0,1 g kultur kering hasil *Freeze drying*

2. Dinokulasikan isolat kultur kering ke dalam media molase 5% 9 ml.
3. Dihomogenkan dengan menggunakan vortex
4. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan
5. Dilakukan seri pengenceran TPC -4,-5,-6,-7 dan -8
6. Dilakukan pengamatan uji viabilitas pada 0, 4, 6 dan 8 minggu

### 3.5 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini dibagi menjadi dua yaitu :

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

### 3.6 Teknik Analisis

Teknik analisis dalam penentuan jumlah viabilitas bakteri *indigineous* air rendaman kenaf menggunakan jumlah bakteri dalam *coloni forming unit* (CFU)/ml (Chotiah, 2006).

Teknik menghitung koloni bakteri *Indigenous* yang hidup dengan cara sebagai berikut :

$$\frac{\text{Jumlah koloni pengenceran -8}}{\text{Jumlah koloni pengenceran -7}} = > 2 \text{ Maka memakai jumlah koloni pengenceran -8}$$

$$\frac{\text{Jumlah koloni pengenceran -8}}{\text{Jumlah koloni pengenceran -7}} = < 2 \text{ Maka memakai jumlah koloni pengenceran -7}$$