

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan April - Mei 2015 di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *laminar air flow cabinet*, *otoklaf*, oven, *hot plate magnetic stirrer*, neraca analitik, pH meter, *water bath*, *ultrasonic cleaner*, *incubator*, erlenmeyer, *micropipett* dan pipet tip, cawan petri, tabung reaksi dan rak tabung, *beaker glass*, kapas, kertas saring, kertas label, *alumunium foil*, pipet volumetri dan pump, bunsen, dan gelas ukur..

2. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi isolat bakteri asam laktat dari tempoyak (BT3, BT4) dan isolat bakteri asam laktat (B3, B4) koleksi Sutrisna, Liman, dan Ekowati (2012), medium MRS Agar (*de Man Rogosa and Sharpe Agar*), medium MRS Broth (*de Man Rogosa and Sharpe Broth*), *lab lemco-powder*, *yeast extract*, glukosa, K_2HPO_4 (di-potassium hidrogen fosphat), larutan *tween 80*, sodium asetat, $MgSO_4$

(magnesium sulfat), MnSO₄ (mangan sulfat), tepung ikan, nasi, dan aquadest.

C. Metode Penelitian

Viabilitas bakteri asam laktat ditentukan dari jumlah generasi dan waktu generasi masing - masing isolat berdasarkan hasil perhitungan ALT (Angka Lempeng Total). Penelitian ini menggunakan isolat bakteri asam laktat dari tempoyak (BT3, BT4), dan isolat bakteri asam laktat dari usus itik (B3, B4) koleksi Sutrisna, Liman, dan Ekowati (2012). Keempat isolat bakteri tersebut diinokulasikan pada keempat media perlakuan yang berbeda, yaitu media MRS sebagai kontrol, media tepung ikan + glukosa, media tepung ikan + nasi, dan media modifikasi tepung ikan dari komposisi media MRS. Penelitian disusun dengan percobaan faktorial 4 x 4. Faktor A adalah 4 macam media perlakuan, yaitu : media MRS (kontrol), media A (tepung ikan + glukosa), media B (tepung ikan + nasi), dan media C (media MRS yang dimodifikasi dengan tepung ikan). Faktor B adalah 4 jenis isolat BAL, yaitu BAL dari tempoyak (BT3, BT4) dan BAL dari usus itik (B3, B4). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

D. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Analisis Ragam dengan taraf 5%.

E. Cara Kerja

1. Peremajaan

Isolat bakteri asam laktat dari tempoyak (BT3, BT4) dan isolat bakteri asam laktat (B3, B4) koleksi Sutrisna, Liman, dan Ekowati (2012) diremajakan pada tabung reaksi yang berisi media MRS broth, kemudian di inkubasi selama 48 ± 2 jam didalam inkubator pada suhu 30°C .

2. Pembuatan Media Tumbuh Bakteri Asam Laktat (BAL)

Tabel 4. Komposisi media

KOMPOSISI MEDIA (gram/ 100 ml)			
Kontrol	Media A	Media B	Media C
Triammonium citrate 0,2 g	Tepung ikan 2,8 g	Tepung ikan 4 g	Tepung ikan 1,2 g
Lab-lemco powder 0,8 g	Glukosa 1 g	Nasi 2 g	Lab-lemco powder 0,8 g
Yeast extract 0,4 g			Yeast extract 0,4 g
Glukosa 2 g			Glukosa 2 g
Sorbitan mono-oleat 0,1 ml			Sorbitan mono-oleat 0,1 ml
Sodium acetate 0,5 g			Sodium acetate 0,5 g
K_2HPO_4 0,2 g			K_2HPO_4 0,2 g
MnSO_4 0,02 g			MnSO_4 0,02 g
MgSO_4 0,005 g			MgSO_4 0,005 g
Pepton 1 g			

Bahan-bahan yang tertera di tabel 4 ditimbang sesuai dengan ukuran yang tertera di tabel 4, kemudian dilarutkan kedalam 100 ml aquadest menggunakan alat *hot plate magnetic stirrer*. Setelah larut, pH media diatur sehingga mencapai nilai $6,2 \pm 0,2$. Jika $\text{pH} < 6,2 \pm 0,2$ maka ditambahkan NaOH , dan jika $\text{pH} > 6,2 \pm 0,2$ maka ditambahkan HCl . Media dipanaskan hingga mendidih lalu dipindahkan kedalam erlenmeyer. Media dimasukkan kedalam otoklaf untuk dilakukan sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

3. Uji Viabilitas

Uji viabilitas BAL ditentukan dari jumlah generasi dan waktu generasi dari masing-masing isolat berdasarkan hasil perhitungan ALT (Angka Lempeng Total).

1. Perhitungan jumlah koloni awal (0 Jam)

Sebanyak 1 ml suspensi BAL (berumur 48 jam \pm 2 jam) diencerkan dalam larutan garam fisiologis untuk mengurangi kerapatan populasi BAL (10^{-1} - 10^{-7}). Diambil sebanyak 1 ml suspensi kedalam cawan petri steril, lalu dituang media MRS Agar sebanyak 15 ml. Setelah dituang cawan petri digoyangkan supaya suspensi dan media tercampur merata (*Pour Plate Method*). Setelah media memadat, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 48 \pm 2 jam. Dihitung jumlah koloni yang tumbuh sebagai jumlah koloni awal BAL.

2. Perhitungan jumlah koloni akhir (48 Jam)

Biakan BAL yang berumur 48 jam dalam MRS broth dipindahkan ke dalam 4 macam media perlakuan dalam tabung reaksi sebanyak 0,5 ml biakan kedalam 4,5 ml media perlakuan. Biakan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 48 \pm 2 jam. Setelah 48 jam, diambil sebanyak 1 ml suspensi BAL dari masing – masing media perlakuan, lalu diencerkan dalam larutan garam fisiologis untuk mengurangi kerapatan populasi BAL yang disebut sebagai pengenceran 10^{-1} dan seperti itu seterusnya sampai pengenceran 10^{-7} . Diambil sebanyak 1 ml masing-masing suspensi dari pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} ,

10^{-6} , dan 10^{-7} untuk dituang kedalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan medium MRS Agar sebanyak 15 ml. Cawan petri digoyangkan supaya suspensi dan media tercampur merata (*Pour Plate Method*). Setelah media memadat, diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 48 ± 2 jam. Dihitung jumlah koloni yang tumbuh sebagai jumlah koloni akhir BAL.

Setelah didapatkan jumlah koloni BAL yang tumbuh kemudian dimasukkan kedalam rumus ALT sebagai berikut :

$$N = \frac{\Sigma C}{(n1 \times 1) + (n2 \times 0,1)} \times d \text{ (BSN, 2006)}$$

Keterangan :

N = Jumlah koloni / gram

ΣC = Total koloni yang dapat dihitung

$n1$ = Jumlah cawan petri pada pengenceran pertama yang dihitung

$n2$ = Jumlah cawan petri pada pengenceran kedua yang dihitung

d = Pengenceran pertama yang dihitung

3. Penentuan jumlah generasi (n) dan waktu generasi (G)

Jumlah generasi (n) ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \quad (\text{Sumarsih, 2003})$$

Keterangan :

n = Jumlah generasi

N = Jumlah koloni akhir/gram

No = Jumlah koloni awal/gram

Waktu generasi (G) dihitung dengan menggunakan rumus :

$$G = \frac{t}{n} \quad (\text{Sumarsih, 2003})$$

Keterangan :

G = Waktu generasi (jam)

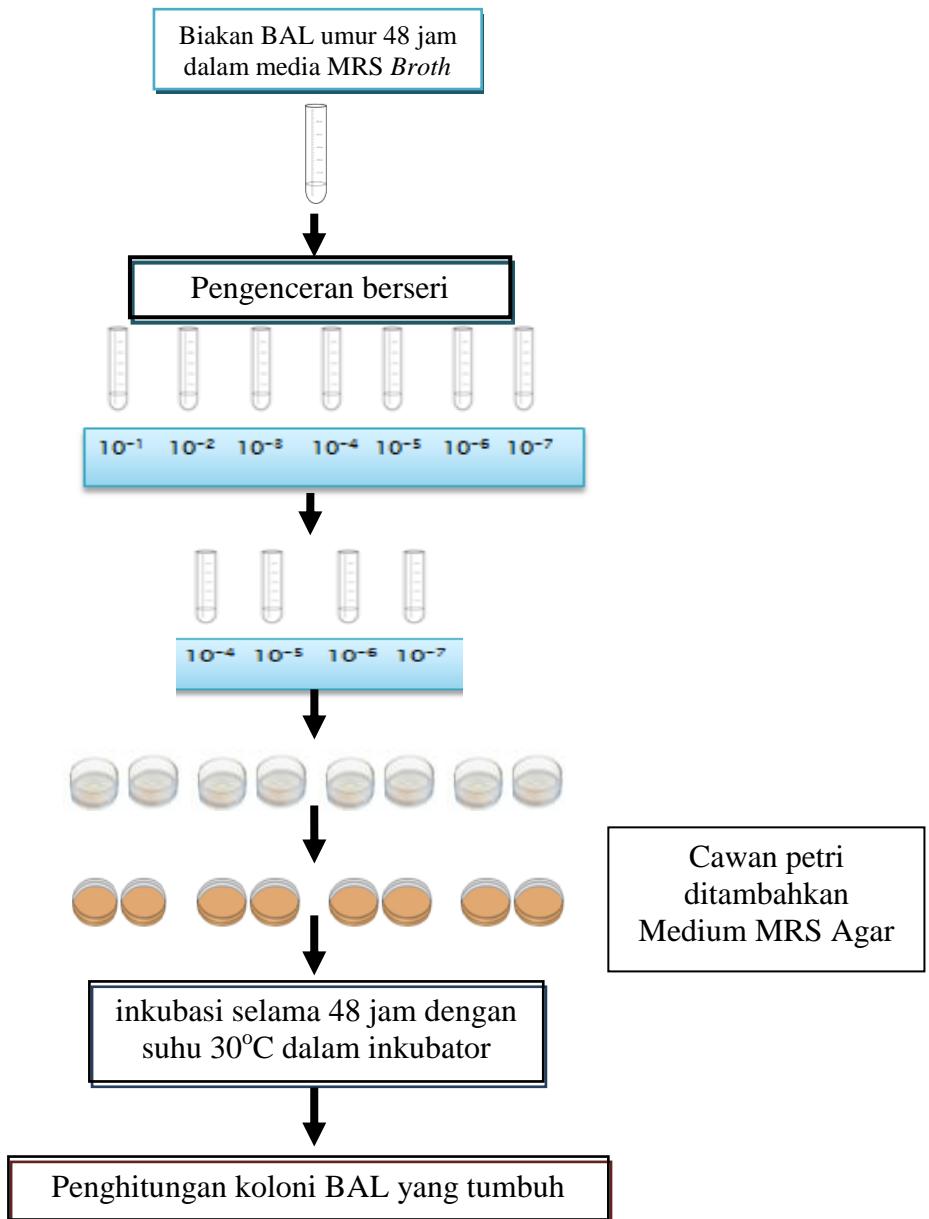
t = Waktu inkubasi (jam)

n = Jumlah generasi

F. Diagram Alir

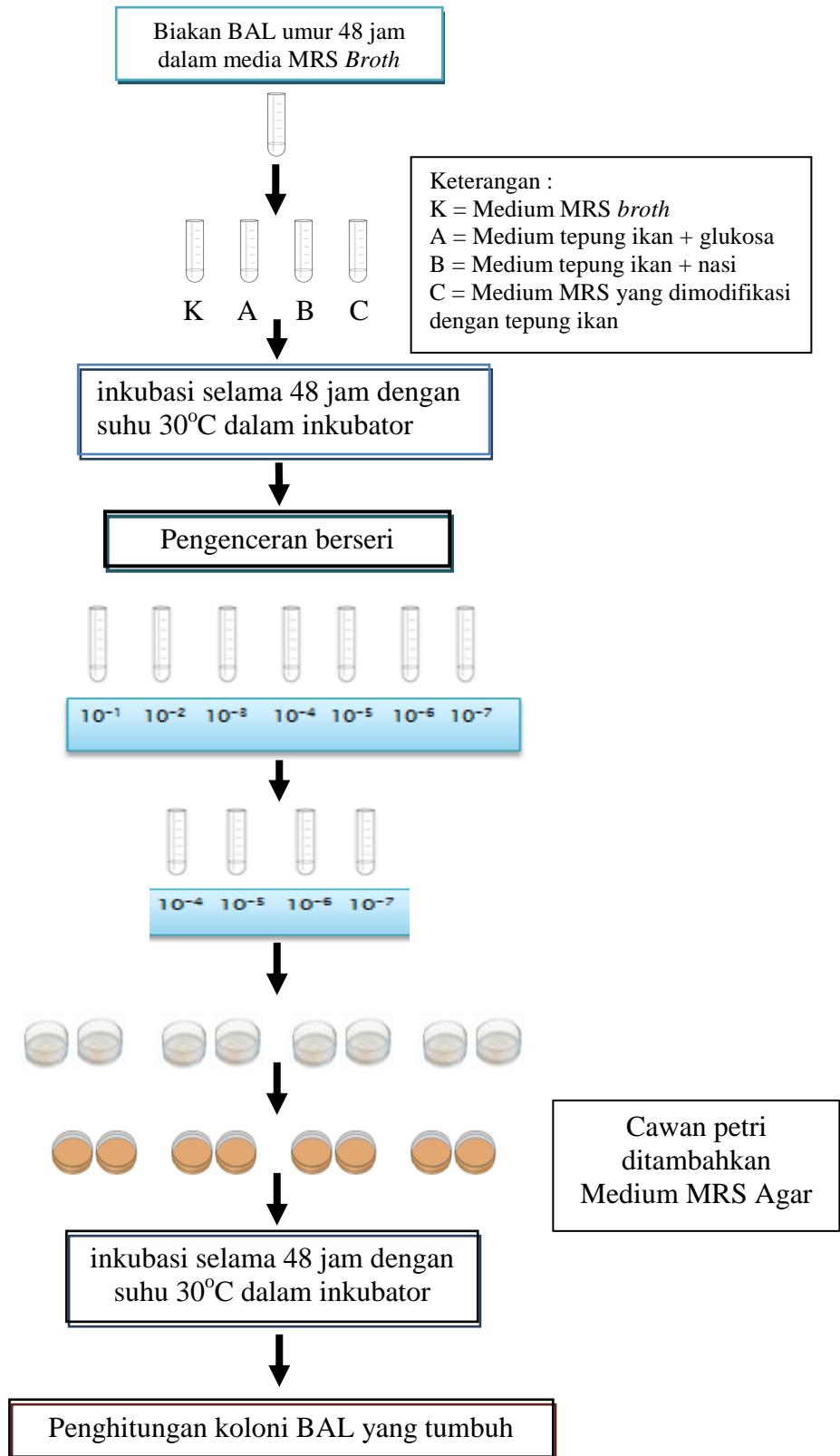
Diagram alir penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penentuan Jumlah Koloni Awal



Gambar 1. Diagram Alir Penentuan Jumlah Koloni Awal

2. Penentuan Jumlah Koloni Akhir



Gambar 2. Diagram Alir Penentuan Jumlah Koloni Akhir