

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2014 sampai bulan Maret 2014.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, erlenmeyer, gelas beaker, spatula, jarum ose, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *vortex mixer*, oven, kompor listrik, pembakar bunsen, timbangan, kertas sampul, plastik tahan panas, plastik zipack, aluminium foil, inkubator, *water bath shaker*, *colony counter*, *micropipet*, *tip*, *autoclave*, *laminar air flow*.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Nutrient Broth*, medium *Agar Bacteriological*, tepung tapioka 1%, larutan iodin 0,1 %, *natrium clorida* (NaCl) 1%, alkohol 70%, aquades, ragi tape, air gula, bawang putih, air jeruk nipis, lengkuas, lada putih, cabe jawa, tepung

beras putih, starter ragi tempe komersial, ampas kelapa, isolat *Bacillus* sp. (koleksi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unila).

C. Metode Penelitian

Penelitian ini disusun dengan menggunakan Metode Rancangan Pengacakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dan Rancangan Perlakuan faktorial 2 x 4 x 4, yaitu suhu (suhu ruang dan 37 °C), jenis kemasan (aluminium foil, kertas sampul, plastik tahan panas, plastik zipack) dan lama penyimpanan (0, 1, 2, 3 bulan) dengan tiga kali pengulangan. Hasil penelitian yang diamati adalah jumlah bakteri amilolitik dengan koloni yang dapat menghidrolisa pati ditunjukkan dengan zona jernih. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan Analisis Ragam, jika terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf 5%.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Pembuatan Inokulum Probiotik

Pada pembuatan inokulum probiotik diperlukan beberapa komponen yaitu inokulum khamir sebagai komponen A, inokulum kapang sebagai komponen B, dan bakteri *Bacillus* sp. sebagai komponen C. Cara kerja pembuatan inokulum probiotik yaitu:

1. Pembuatan Komponen A

Proses pembuatan komponen A memerlukan bahan-bahan yaitu bawang putih 3,33 gr, cabe jawa 3,33 gr, lengkuas 0,5 gr, lada putih 3,33 gr, tepung beras 100 gr dan ragi tape yang sudah disiapkan sebagai starter. Bahan-bahan tersebut ditimbang sesuai dengan komposisi yang dibutuhkan, lalu dihaluskan dan dicampurkan menjadi satu, kemudian diadonkan dengan air perasan jeruk nipis dan air gula hingga dapat dibentuk bulatan-bulatan pipih. Bulatan-bulatan yang sudah dibentuk kemudian diletakkan diatas nampan dan ditutup dengan plastic dan disimpan didalam inkubator kapang selama 48 jam hingga mikroorganismenya tumbuh dan berkembang biak. Adonan yang telah ditumbuhi mikroorganismenya dikeringkan dengan cara dijemur di bawah terik matahari selama 2-4 hari.

2. Pembuatan Komponen B

Bahan-bahan yang diperlukan dalam pembuatan komponen B yaitu ampas kelapa 100 gr dan starter ragi tempe komersial. Ampas kelapa direbus dengan air hingga mendidih, lalu diperas hingga kering, lalu ditambahkan ragi komersial secukupnya dan diaduk hingga tercampur rata. Ampas kelapa kemudian dimasukkan ke dalam plastik yang sudah dilubangi dan didiamkan hingga 2-3 hari agar tumbuh jamur. Setelah jamur tumbuh dan ampas kelapa menjadi padat, selanjutnya dipotong kecil-kecil agar masa penjemuran lebih cepat kering.

3. Pembuatan Komponen C

Kultur bakteri *Bacillus* sp yang berumur 24 jam diambil 1 ose, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *Nutrient Broth* steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam di dalam *water bath shaker*.

Komponen A dan komponen B yang sudah dihaluskan dicampurkan dengan komponen C kemudian diaduk sampai seluruhnya merata.

Kemudian dibentuk bulatan pipih dengan diameter 15 cm, inokulum probiotik disimpan dalam inkubator dengan suhu 50 °C selama 5 hari hingga mengering.

2. Uji Viabilitas Bakteri Amilolitik

Pengujian viabilitas bakteri amilolitik dilakukan dengan 3 jenis perlakuan, perlakuan pertama menyimpan inokulum probiotik menggunakan jenis kemasan yang berbeda yaitu aluminium foil, kertas sampul, plastik tahan panas, dan plastik zipack. Perlakuan kedua, inokulum ditimbang sebanyak 5 g, kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing jenis kemasan, dan setiap kemasan dibuat 3 kali pengulangan. Keempat jenis kemasan tersebut masing-masing disimpan pada ruang dan suhu 37 °C selama 3 bulan. Perlakuan ketiga, setiap bulan inokulum probiotik yang disimpan dihitung jumlah bakteri amilolitiknya.

Penentuan jumlah bakteri amilolitik dilakukan dengan menghitung jumlah koloni bakteri yang menghasilkan zona jernih disekitar koloni dengan menggunakan metode *pour plate*. Cara untuk menghitung jumlah bakteri amilolitik dengan metode *pour plate* yaitu:

1. Sebanyak 1 gram ragi probiotik dari berbagai jenis kemasan yang disimpan pada suhu ruang dan suhu 37 °C, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml garam fisiologis steril dan dihomogenkan dengan *vortex mixer* selama 1-2 menit sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} .
2. Satu ml suspensi dari pengenceran 10^{-1} dipindahkan dengan *micropipette* ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml garam fisiologis steril sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} . Satu ml suspensi dari pengenceran 10^{-2} dipindahkan dengan *micropipette* ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml garam fisiologis steril sampai pengenceran 10^{-6} , dengan cara yang sama.
3. Sebanyak 1 ml suspensi dari seri pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} masing-masing dimasukkan ke dalam cawan petri steril kemudian ditambahkan media spesifik amilum 1 % dan dibiarkan hingga padat. Setelah media padat, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah masa inkubasi berakhir, kultur bakteri ditetesi dengan larutan *iodin* 0,1 %. Koloni-koloni yang membentuk zona jernih menunjukkan adanya aktivitas bakteri amilolitik. Untuk menghitung jumlah koloni yang membentuk zona jernih digunakan *colony counter*.