

BAB IV

METODA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu

Tempat : Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi F.MIPA Universitas
Diponegoro.

Waktu : Agustus 2000 – Januari 2001.

B. Alat dan Bahan

Alat : autoklaf, inkubator, 'rotary shaker', 'Laminar Air Flow', timbangan, mikroskop, jarum ose, tabung reaksi, erlenmeyer 500 ml, erlenmeyer 100 ml, cawan petri, pipet, bunsen, saringan mekanik, 'magnetic hot plate stirrer', blender, spektrofotometer Spectronic-20.

Bahan : kedelai , TPB ('Tryptose Phospate Broth'), NA ('Nutrient Agar'), isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* (Berliner)var *israelensis* (*Bti*), akuades steril , Naphtalen Black , Gurr's Improved R₆₆ Giemsa.

C. Cara Kerja

1. Persiapan Media

1.1. Persiapan media tepung kedelai

- Kedelai dibersihkan, dicuci dengan air bersih kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari selama 1 hari.
- Biji kedelai yang sudah bersih dan kering dihaluskan dengan blender, kemudian diayak dengan ayakan mekanik ukuran 250 “mash” sehingga didapatkan tepung kedelai.

1.2. Pembuatan media NA (Nutrient Agar)

- NA sebanyak 23 g dilarutkan dalam 1000 ml akuades dengan menggunakan erlenmeyer, kemudian dipanaskan di atas “hot plate stirrer” sampai mendidih.
- Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf suhu 121 °C pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

1.3. Pembuatan media Tryptose Phosphate Broth

- TPB sebanyak 29,5 g dilarutkan dalam 1000 ml akuades dengan menggunakan Erlenmeyer, kemudian dipanaskan di atas “hot plate stirrer” sampai mendidih.
- Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf suhu 121°C pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

1.4. Pembuatan media perlakuan

- Membuat media dengan perbandingan sebagai berikut :

Medium A : 100%TPB: 0% tepung kedelai (kontrol).

Medium B : 80% TPB : 20 % tepung kedelai

Medium C : 60% TPB : 40 % tepung kedelai

Medium D : 40 % TPB : 60% tepung kedelai

Medium E: 20 % TPB : 80% tepung kedelai

Medium F: 0 % TPB : 100% tepung kedelai

Media ini masing-masing dilarutkan dalam 125 ml akuades dengan menggunakan erlenmeyer 500 ml, dipanaskan diatas “hot plate stirrer” sampai mendidih.

- Media A dituang sebanyak 100 ml ke dalam erlenmeyer 500 ml. Demikian juga dengan media B,C,D,E dan F. Media ini akan digunakan untuk pengamatan pertumbuhan bakteri.
- Media A dituang juga ke dalam 4 ulangan tabung reaksi, masing-masing sebanyak 3 ml. Hal yang sama juga dilakukan terhadap media B sampai dengan media F.
- Selanjutnya media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf suhu 121°C pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

2. Pemeliharaan Bakteri

- Isolat *Bti* dikulturkan pada beberapa NA miring.
- Sebagian dari kultur disimpan pada suhu 4°C sebagai “stock culture”, sedangkan sisanya diinkubasi terlebih dahulu pada inkubator sebelum digunakan (“working culture “).

3. Persiapan Inokulum

- 1 ose biakan *Bti* dari medium NA miring yang berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam 10 ml media TPB dalam erlenmeyer 100 ml, kemudian digojog dengan kecepatan 200 rpm, pada suhu kamar selama 12 jam (Pembibitan I).
- 0,2 ml (2 % dari 10 ml) kultur dari Pembibitan I digunakan untuk menginokulasi Pembibitan II, yaitu pada 10 ml media TPB. Kemudian digojog pada kecepatan 200 rpm, pada suhu kamar selama 12 jam. Dari hasil penghitungan dengan TPC (Total Plate Count) jumlah bakteri adalah $1,5 \times 10^7$ (Rahayuningsih dkk., 1999; Dulmage *et al.*, 1990b).

4. Inokulasi Bakteri pada Media Perlakuan

- Inokulasi dilakukan pada 4 ulangan tabung reaksi yang masing-masing berisi 3 ml media A. Masing-masing tabung diinokulasi dengan kultur inokulum dari pembibitan II yaitu sebanyak 0,06 ml (2 % dari 3 ml). Hal yang sama juga dilakukan terhadap media B sampai dengan media F.
- Inokulasi dilakukan juga terhadap 100 ml media A dalam erlenmeyer 500 ml, yang nantinya akan digunakan untuk pengamatan pertumbuhan bakteri. Masing-masing media ini juga diinokulasi dengan kultur inokulum pembibitan II, masing-masing sebanyak 2 ml (2 % dari 100 ml). Hal yang sama juga dilakukan terhadap media B sampai dengan media F. (Rahayuningsih dkk., 1999; Dulmage *et al.*, 1990b).

5. Inkubasi

- Setelah diinokulasi, semua media tersebut di gojog dengan kecepatan 250 rpm pada suhu kamar (Rahayuningsih dkk., 1999; Dulmage *et al.* 1990b).

6. Pengamatan Pertumbuhan Bakteri

- Selama masa inkubasi 48 jam dilakukan pengamatan terhadap jumlah bakteri sebanyak 9 kali dengan interval 6 jam (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 dan 48 jam).
- Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur absorbansi dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm.
- Selama inkubasi, dilakukan juga pengamatan terhadap perubahan pH, yaitu dengan cara mengambil kultur sebanyak 1 ml kemudian pH diukur dengan menggunakan “pH stick” (Rahayuningsih dkk., 1999).

7. Penghitungan Jumlah Bakteri

- Penghitungan dilakukan dengan Total Plate Count (Fardiaz, 1992).
- Media perlakuan dalam tabung reaksi yang telah digojog pada suhu kamar selama 48 jam diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml media cair (pengenceran 10^{-1}). Dari pengenceran 10^{-1} diambil 1 ml untuk dipindahkan ke cawan petri (dilakukan secara duplo). Demikian seterusnya sampai pengenceran 10^{-9} .
- Semua cawan petri dituangi dengan NA, kemudian cawan diputar sehingga suspensi tercampur dengan baik. Setelah agar membeku, cawan dibalik dan dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam.

- Setelah 24 jam inkubasi jumlah koloni yang tumbuh dihitung (Lay, 1994).

D. Parameter

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah pH, kurva pertumbuhan bakteri *Bti* yang dihasilkan setelah diinkubasi selama 24 jam pada media NA

E. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan satu faktor yaitu perlakuan media. Masing-masing perlakuan diulang 4 kali. Data yang berupa jumlah bakteri *Bti* yang dihasilkan dianalisis dengan analisa sidik ragam (ANOVA) pada tingkat kesalahan 5% dan 1%. Jika F hitung > F tabel dilanjutkan dengan Uji Wilayah Berganda Duncan untuk mengetahui perlakuan yang terbaik.

