

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian Jumlah Bakteri *Staphylococcus aureus* dan Skor *California Mastitis Test* (CMT) Susu Kambing Peranakan Etawa (PE) akibat *Dipping* Ekstrak Daun Babadotan (*Ageratum conyzoides* L.) dilaksanakan pada 7 Desember 2015 sampai 14 Maret 2016. Penelitian dilakukan di Kelompok Tani Ternak Kuncen Farm Bubakan, Mijen, Semarang. Ekstraksi daun Babadotan dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan penghitungan koloni *S. aureus* di Balai Pelayanan Kesehatan Masyarakat Veteriner Jawa Tengah.

3.1. Materi

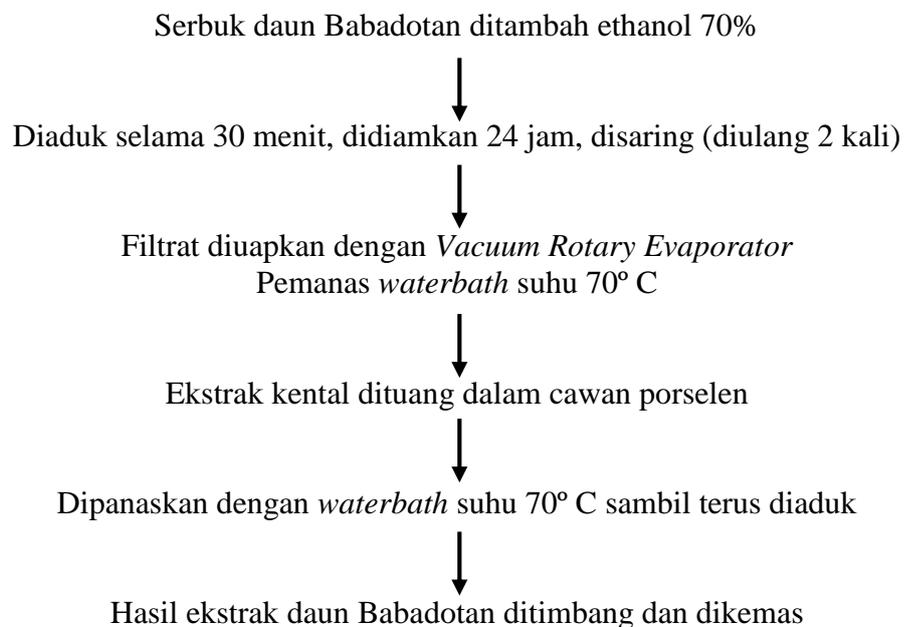
Materi yang digunakan pada penelitian ini adalah 16 ekor kambing PE laktasi dengan umur 2 - 3 tahun dan skor CMT positif 2 - 3. *Teat dipper*, timbangan analitik, kapas, *aluminium foil*, gelas ukur, botol kaca, batang pengaduk, *paddle* CMT, *ice box*. Bahan yang digunakan adalah daun Babadotan, ethanol 70%, *aquadest*, *tween*, susu, antiseptik sintetis (povidone iodine) dan reagen CMT.

3.2. Metode

Metode penelitian meliputi tahapan pembuatan ekstrak daun Babadotan, perlakuan *dipping*, pengujian CMT, penghitungan koloni *S. aureus* dan analisis data.

3.2.1. Pembuatan ekstrak daun Babadotan

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Daun Babadotan yang telah dipisahkan dari batangnya dikeringkan dalam oven dengan suhu 45° C selama 24 jam kemudian dihaluskan sehingga menjadi simplisia dan kemudian ditimbang. Simplisia daun Babadotan diambil sebanyak 300 g dan dimasukkan dalam bejana maserasi. Simplisia daun Babadotan ditambahkan ethanol 70% sebanyak 350 ml dan diaduk selama 30 menit. Simplisia dan ethanol didiamkan 24 jam kemudian disaring menggunakan kain kasa. Proses ekstraksi tersebut diulang sebanyak 2 kali. Filtrat yang dihasilkan diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak kental dituang dalam cawan porselen kemudian dipanaskan dengan *waterbath* dengan suhu 70° C sambil diaduk. Hasil ekstrak daun Babadotan ditimbang dan dikemas. Proses ekstraksi daun Babadotan secara sistematis dijelaskan dalam Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Pembuatan Ekstrak Daun Babadotan

3.2.2. *Dipping* puting

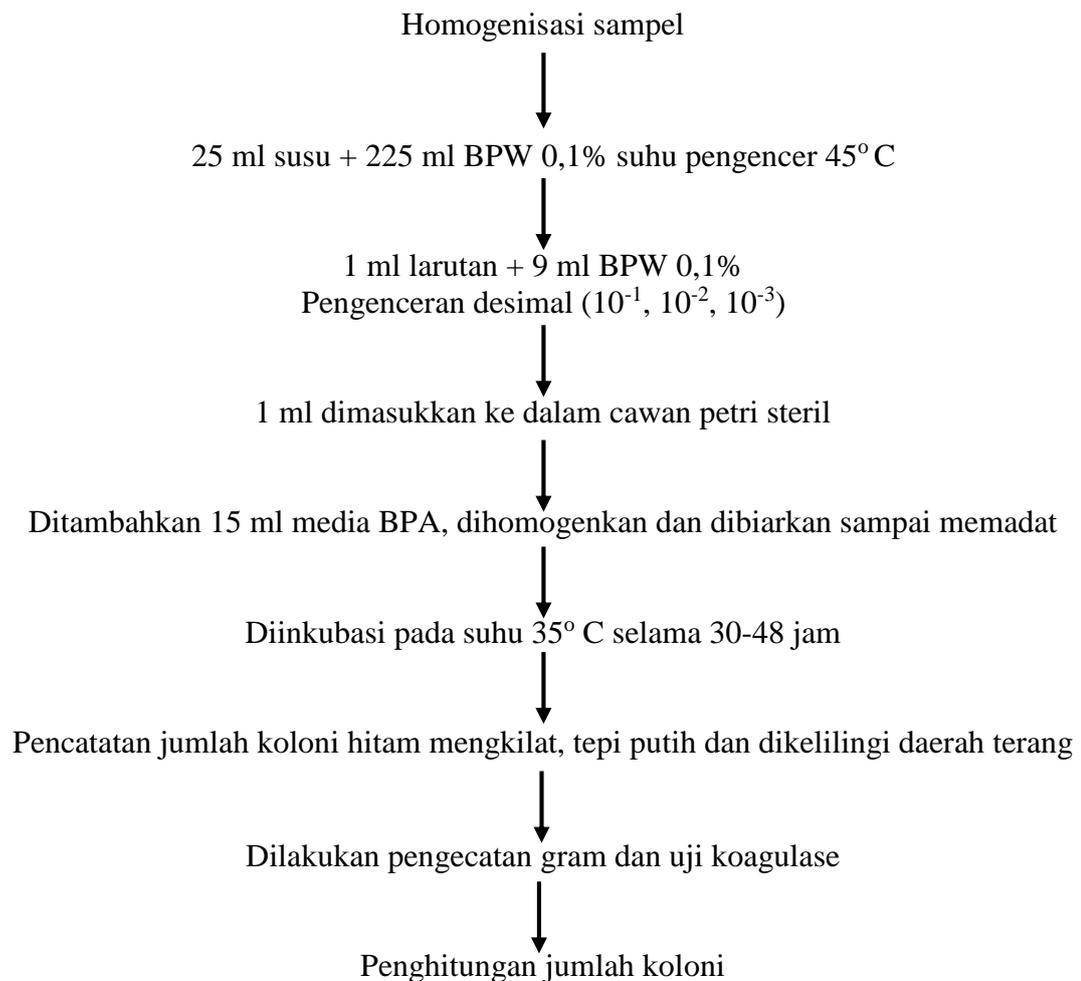
Dipping puting pada kambing dilakukan setelah proses pemerahan selesai. Puting kambing dicelupkan ke dalam cairan *dipping* sesuai masing-masing perlakuan selama 10 detik (Adriani dan Manalu, 2006). Perlakuan yang diberikan adalah antiseptik povidone iodine 5%, ekstrak daun Babadotan 1%, 3% dan 5%.

3.2.3. Peghitungan koloni *Staphylococcus aureus*

Penghitungan koloni *S. aureus* dilakukan sesuai dengan metode pengujian cemaran bakteri dalam SNI 2897:2008. Mengambil 25 ml sampel susu yang telah dihomogenkan dan ditambahkan 225 ml *Buffered Pepton Water* (BPW) 0,1% dengan suhu 45° C dan dihomogenkan. Larutan pertama dengan konsentrasi 10⁻¹ diambil 1 ml dan ditambahkan 9 ml BPW sehingga diperoleh pengenceran 10⁻² kemudian dengan cara yang sama dilakukan berulang sehingga diperoleh pengenceran sampai 10⁻³. Mengambil 1 ml dari masing-masing pengenceran kemudian menambahkan 15 ml *Baird-Parker Agar* (BPA) ke dalam cawan petri dan biarkan memadat. Pipet 1 ml suspensi dari masing-masing pengenceran, diinokulasikan pada cawan petri yang berisi media kemudian diinkubasi selama 45-48 jam dengan suhu 35° C. Pengecatan gram pada cawan petri terduga *S. aureus*, kemudian uji koagulase dan menghitung koloni *S. aureus*.

Uji koagulase positif *S. aureus* ditandai dengan adanya penggumpalan. Penghitungan koloni dilakukan dengan melihat uji koagulase positif dan pengecatan gram yang menunjukkan bakteri kokus berwarna ungu (gram positif), bergerombol seperti anggur atau terlihat hanya satu bakteri. Hasil penghitungan

kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran. Hasil akhir menunjukkan koloni *S. aureus* dalam satuan per mililiter susu (CFU/ml). Proses identifikasi *S. aureus* dijelaskan pada Ilustrasi 2.



Ilustrasi 2. Penghitungan Bakteri *Staphylococcus aureus* dalam SNI 2897:2008 (Badan Standarisasi Nasional, 2008)

3.2.4. Uji CMT (*California Mastitis Test*)

Susu sebanyak 2 - 3 ml diletakkan pada *paddle* dan ditambahkan reagen CMT dengan rasio 1:1. *Paddle* digoyangkan perlahan secara horizontal selama 10-15 detik. Hasil pengujian berupa – (negatif) bila campuran susu dan reagen CMT

tetap homogen, + terbentuk sedikit endapan, ++ (positif 2) endapan terlihat jelas, +++ (positif 3) campuran langsung mengental, dan ++++ (positif 4) banyak terbentuk gel dan membentuk permukaan yang cembung (Adriani, 2010). Hasil – diberi nilai 0, + diberi nilai 1, ++ diberi nilai 2, +++ diberi angka 3 dan ++++ diberi nilai 4 untuk mempermudah analisis data.

3.3. Rancangan Statistik dan Analisis Data

Enam belas kambing PE laktasi dibagi menjadi empat kelompok perlakuan untuk diamati sebagai kontrol positif (povidone-iodine), ekstrak daun Babadotan 1%, 3% dan 5%. Sebelum perlakuan, dilakukan uji CMT dan identifikasi *S. aureus* pada masing-masing ternak untuk mengetahui status awal dan memperoleh materi kambing PE yang terkena mastitis subklinis. Perlakuan dilakukan selama 9 hari dan pengambilan sampel dilakukan setiap 3 hari (H3, H6, H9) untuk mengetahui perubahan skor CMT dan jumlah bakteri *S. aureus*.

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola *Split Plot* dengan konsentrasi ekstrak daun Babadotan sebagai petak utama dan waktu pengamatan sebagai anak petak. Parameter *S. aureus* dianalisis menggunakan Anova dan dilanjutkan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD) jika berpengaruh nyata. Seluruh nilai pengamatan dinyatakan dengan model linear sesuai pendapat Gasperzs (1991).

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + \epsilon_{ij} + B_k + AB_{ik} + \epsilon_{ijk} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan:

- i : Konsentrasi ekstrak daun Babadotan 1%; 3%; 5%.
- j : Ulangan 1, 2, 3, 4.

- k : Waktu pengamatan 0, 3, 6, 9 hari.
 Y_{ijk} : Pengamatan faktor konsentrasi ekstrak daun Babadotan ke-i, ulangan ke-j dan waktu pengamatan ke-k.
 μ : Rataan umum.
 A_i : Pengaruh konsentrasi ekstrak daun Babadotan ke-i.
 ϵ_{ij} : Pengaruh galat I pada konsentrasi ekstrak daun Babadotan ke-i dan ulangan ke-j.
 B_k : Pengaruh waktu pengamatan ke-k.
 AB_{ik} : Interaksi antara konsentrasi ekstrak daun Babadotan dengan waktu pengamatan ke-k.
 ϵ_{ijk} : Pengaruh galat II pada konsentrasi ekstrak daun Babadotan ke-i, ulangan ke-j dan waktu pengamatan ke-k.

Hipotesis:

- a) • $H_0: \alpha\beta_{ij} = 0$; tidak ada pengaruh interaksi antara konsentrasi ekstrak daun Babadotan dengan waktu pengamatan terhadap jumlah bakteri *S. aureus*.
 • H_1 : minimal ada satu $\alpha\beta_{ij} \neq 0$; ada pengaruh interaksi antara konsentrasi ekstrak daun Babadotan dengan waktu pengamatan terhadap jumlah bakteri *S. aureus*.
- b) • $H_0: \alpha_i = 0$; tidak ada pengaruh konsentrasi ekstrak daun Babadotan terhadap jumlah bakteri *S. aureus*.
 • H_1 : minimal ada satu $\alpha_i \neq 0$; ada pengaruh konsentrasi ekstrak daun Babadotan terhadap jumlah bakteri *S. aureus*.
- c) • $H_0: \beta_j = 0$; tidak ada pengaruh waktu pengamatan terhadap jumlah bakteri *S. aureus*.
 • H_1 : minimal ada satu $\beta_j \neq 0$; ada pengaruh waktu pengamatan terhadap jumlah bakteri *S. aureus*.

Parameter skor CMT diuji dengan menggunakan Uji Kruskal-Wallis untuk mengetahui perbedaan peringkat (ranking) skor CMT dari masing-masing perlakuan. Analisis Uji Kruskal-Wallis menggunakan *software* aplikasi IBM SPSS 23 dengan rumus statistik sesuai pendapat Santoso (2004).

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1) \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

- H : nilai Kruskal-Wallis dari hasil penghitungan
 R_j : jumlah ranking dari perlakuan ke-j
 n_j : banyaknya sampel pada perlakuan ke-j
 k : banyaknya perlakuan

N : jumlah seluruh sampel

Hipotesis:

- a. H₀: Tidak ada perbedaan skor CMT akibat perlakuan yang berbeda.
- b. H₁: Ada perbedaan skor CMT akibat perlakuan yang berbeda.