

## BAB III

### MATERI DAN METODE

Penelitian mengenai pengaruh penambahan limbah kubis fermentasi dalam pellet terhadap populasi total bakteri dan keberadaan bakteri gram pada feses kelinci periode pertumbuhan dilaksanakan pada bulan April-Agustus 2016, di Kelurahan Meteseh, Kecamatan Tembalang, Semarang. Analisis populasi total bakteri dilaksanakan di Balai Laboratorium Kesehatan Semarang dan analisis pewarnaan gram dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Semarang.

#### 3.1. Materi

Materi yang digunakan penelitian meliputi bahan dan peralatan. Bahan yang digunakan yaitu limbah kubis, garam, gula pasir, akuades, ransum yang terdiri dari jagung kuning, pollard, dedak halus, bungkil kedelai, wheat bran, dedak kasar dan molas serta 16 ekor kelinci *New Zealand White* periode pertumbuhan dengan umur rata-rata 3 bulan. Bahan yang digunakan untuk menghitung populasi total bakteri dan pewarnaan gram terdiri dari medium *nutrient agar* (NA), pewarna violet kristal, larutan lugol, air, alkohol 95%, larutan safranin dan minyak imersi. Peralatan yang digunakan meliputi nampan, timbangan analitik, pisau, plastik steril, isolasi, mesin pembuat pellet (*extruder*), kompor dan panci pengukus, termometer, *blender*, *grinder*, gelas obyek, mikroskop, lemari pengering untuk mengeringkan pellet, autoklaf, inkubator, oven, cawan petri, gelas beker, tabung

erlenmeyer, pipet ukur, gelas ukur, alumunium foil, *electric stirer* dan *quebec colony counter*.

### 3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian dilakukan dengan menggunakan pola rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan masing-masing perlakuan terdiri dari 4 ulangan. Perlakuan dilakukan dengan taraf penambahan limbah kubis fermentasi yang berbeda, yaitu :

T<sub>0</sub> : 100% ransum pakan kelinci + 0% limbah kubis fermentasi(w/w)

T<sub>1</sub> : 100% ransum pakan kelinci+ 2% limbah kubis fermentasi (w/w)

T<sub>2</sub> : 100% ransum pakan kelinci+ 4% limbah kubis fermentasi (w/w)

T<sub>3</sub> : 100% ransum pakan kelinci+ 6% limbah kubis fermentasi (w/w)

Penelitian dibagi dalam 3 tahap meliputi : 1) tahap persiapan; 2) tahap pelaksanaan 3) tahap pengujian.

#### 3.2.1. Tahap persiapan

Tahap pertama penelitian yaitu tahap persiapan meliputi penelitian pendahuluan, analisis kandungan nutrisi bahan pakan penyusun ransum (Lampiran 1), penyusunan formulasi ransum untuk pembuatan pellet pakan kelinci dan persiapan alat dan bahan yang akan digunakan. Formulasi ransum disesuaikan berdasarkan kebutuhan kelinci periode pertumbuhan menurut NRC (1977) yaitu dengan *digestible energy* (DE) 2.500 kkal/kg, serat kasar 10-12%, protein kasar 16% dan lemak 2% (Tabel 2).

Tabel 2. Komposisi dan Zat Gizi Ransum Pakan Kelinci

BahanPakan	Komposisi
	----- (%) -----
Jagung kuning	15,00
Pollard	15,00
Dedak halus	25,00
Bungkil kedelai	20,50
Wheat bran	11,50
Molases*	1,00
<b>Zat gizi ransum</b>	
- Protein Kasar (%)	15,00
- Serat Kasar (%)	10,03
- Lemak Kasar (%)	2,59
- DE (kkal/kg)	2.500,81

\*molases 1% (v/w)

### 3.2.2. Tahap pelaksanaan

Tahap kedua adalah tahap pelaksanaan penelitian yang meliputi pembuatan limbah kubis fermentasi, pembuatan pellet dengan penambahan hasil fermentasi limbah kubis, pemberian produk pellet untuk kelinci periode pertumbuhan dan pengambilan data pengamatan berupa sampel feses kelinci.

**3.2.2.1. Pembuatan limbah kubis fermentasi.** Prosedur pembuatan limbah kubis fermentasi diawali dengan mempersiapkan limbah kubis, garam, gula dan akuades. Limbah kubis yang sudah dibersihkan dipotong kecil-kecil, diblender hingga teksturnya seperti bubur, ditambahkan garam 6% dan gula 6,4% berdasarkan berat dari limbah kubis, kemudian dikemas dengan plastik steril dan ditutup rapat untuk memperoleh suasana anaerob. Masing-masing perlakuan diperam selama 6 hari (Putri, 2015). Penambahan garam dan gula digunakan 6% dan 6,4% dilakukan berdasarkan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh

Sholikhah (2015) karena di dalamnya terkandung total bakteri asam laktat paling banyak pada perlakuan yaitu  $1,1 \times 10^8 cfu/g$ . Langkah-langkah membuat limbah kubis fermentasi dapat dilihat pada Ilustrasi 1.

Limbah kubis yang sudah dibersihkan

Dipotong kecil-kecil

Dihaluskan dengan blender

Penambahan garam 6% dan gula 6,4%

Pemeraman selama 6 hari (anaerob fakultatif)

Limbah kubis fermentasi

Ilustrasi 1. Diagram Alir Pembuatan Limbah Kubis Fermentasi

**3.2.2.2. Pembuatan pellet pakan kelinci periode pertumbuhan.** Prosedur pembuatan pellet pakan kelinci yaitu diawali dengan menggiling semua bahan pakan penyusun ransum pakan kelinci hingga halus. Bahan pakan kemudian ditimbang sesuai dengan komposisi (Tabel 2). Bahan pakan yang telah ditimbang, kemudian dicampur dengan bahan pakan lainnya hingga homogen. Ransum yang telah homogen ditambahkan molases 1% (*v/w*) sebagai *binder* yang diencerkan dalam akuades sebanyak 50% dari total akuades yang diberikan (60% dari berat ransum), kemudian dilakukan *conditioning* dengan suhu 80°C menggunakan panci pengukus dan kompor, kemudian diangin-anginkan hingga suhunya turun menjadi 33°-36°C. Kukusan ransum yang telah turun suhunya ditambahkan dengan hasil

limbah kubis fermentasi sesuai dengan perlakuan yang diberikan (0% ; 2% ; 4% atau 6%) yang dicampurkan ke dalam sisa akuades, kemudian dicetak pada mesin *extruder* dengan lubang berdiameter 2-3 mm dan panjang 1-1,5 cm. Pengeringan pellet dilakukan selama 2-3 hari dengan suhu 35-39°C menggunakan inkubator/lemari pengering yang dilengkapi *blower in* dan *blower out*. Prosedur pembuatan pellet dapat dilihat pada Ilustrasi 2.

Penimbangan bahan pakan sesuai komposisi

Pencampuran semua bahan pakan hingga homogen

Penambahan molases 1% yang diencerkan dalam akuades

*Conditioning* (80°C) ; diangin-anginkan

Suhu ransum turun (33 - 36°C) ; Tambahkan limbah kubis fermentasi sesuai perlakuan (0%, 2%, 4% atau 6%)

Pencetakan

Pengeringan dengan suhu 35 - 39°C)

Ilustrasi 2. Diagram Alir Pembuatan Pellet

**3.2.2.3.Pemberian pellet pada kelinci periode pertumbuhan.** Enam belas ekor kelinci *New Zealand White* periode pertumbuhan dibagi menjadi empat kelompok pemberian pellet perlakuan yaitu T<sub>0</sub> (pellet tanpa penambahan limbah kubis fermentasi); T<sub>1</sub> (pellet dengan penambahan limbah kubis fermentasi 2%); T<sub>2</sub> (pellet dengan penambahan limbah kubis fermentasi 4%) dan T<sub>3</sub> (pellet dengan

penambahan limbah kubis fermentasi 6%). Kelinci di dalam kandang individu diberi pakan pellet dengan perlakuan selama 28 hari. Dua minggu pertama sebelum memulai perlakuan sebagai masa adaptasi pakan (preliminary). Adaptasi pakan dilakukan hingga kelinci mampu mengkonsumsi pellet yang akan diuji biologis hingga 100% (tidak ada sisa pellet). Pemberian pellet dilakukan pada pagi dan sore hari, dengan jumlah pemberian 100 g/ekor/hari. Selama pemberian pellet perlakuan dilakukan penimbangan berat badan setiap seminggu sekali (Lampiran 11).

### **3.2.3. Tahappengujian**

**3.2.3.1. Pemeriksaan total bakteri.** Metode perhitungan populasi total bakteri atau metode hitungan cawan merupakan metode yang digunakan untuk menghitung jumlah populasi mikrobial dalam bahan karena hanya sel yang hidup yang dapat dihitung (Fardiaz, 1989). Cara kerja untuk mengetahui populasi bakteri yaitu feses kelinci dilakukan pengenceran dengan menimbang 1 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dalam 9 ml NaCl fisiologis untuk pengenceran pertama, kemudian 1 ml pengenceran pertama dilarutkan pada tabung reaksi kedua dalam 9 ml NaCl fisiologis untuk pengenceran kedua. Pengenceran dilakukan hingga mencapai pengenceran ke 10, selanjutnya sampel hasil pengenceran diambil 1 ml untuk ditanam pada media NA. Penanaman bakteri pada media, selanjutnya diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C. Perhitungan bakteri menggunakan metode *standart plate count* (SPC) dengan *quebec colony counter* menurut Fardiaz (1989) dengan ketentuan : 1) Perhitungan

dilakukan pada cawan dengan jumlah koloni 30-300; 2) koloni besar diragukan dihitung sebagai satu koloni; 3) koloni yang terlihat satu deret dihitung sebagai satu koloni. Perhitungan populasi bakteri dilakukan dengan rumus :

$$\text{Populasi bakteri} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengencer}}$$

**3.2.3.2. Pemeriksaan pewarnaan gram.** Cara kerja untuk pewarnaan bakteri gram yaitu suspensi sampel yang telah jadi diambil 1 hingga 2 ml dan dibiarkan dalam medium NA, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Satu ose kultur cair dioleskan pada kaca objek dengan diameter kira-kira 1 hingga 1,5 cm, dikeringanginkan kemudian difiksasi dengan bunsen. Pewarna violet kristal ditetaskan pada gelas objek dibiarkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan aquadest dan ditetesi larutan yodium gram atau lugol. Gelas objek dicuci dengan alkohol 95% untuk menghilangkan violet kristal, selanjutnya dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Gelas objek diwarnai dengan larutan safranin, dibilas dengan akuades dan dikeringkan dengan kertas serap. Pengamatan bakteri gram dilakukan dengan mikroskop yang sebelumnya ditetesi minyak imersi, kemudian bentuk dan jenis bakteri dicatat. Bakteri gram positif berwarna ungu dan bakteri gram negatif berwarna merah muda (Fardiaz, 1989). Hasil identifikasi pewarnaan gram diskoring menurut Spiegel (1999) dengan ketentuan sebagai berikut :

- Skor 7, jika terdapat 5 jenis bakteri gram positif dan 0 jenis bakteri gram negatif.
- Skor 6, jika terdapat 4 jenis bakteri gram positif dan 0 jenis bakteri gram negatif.
- Skor 5, jika terdapat 3 jenis bakteri gram positif dan 0 jenis bakteri gram negatif.
- Skor 4, jika terdapat 2 jenis bakteri gram positif dan 0 jenis bakteri gram negatif.

- Skor 3, jika terdapat 1 jenis bakteri gram positif dan 0 jenis bakteri gram negatif.
- Skor 2, jika terdapat 5/4/3/2/1 jenis bakteri gram positif dan 1 jenis bakteri gram negatif.
- Skor 1, jika terdapat 5/4/3/2/1 jenis bakteri gram positif dan 2/3/4/5 jenis bakteri gram negatif.

### **3.3. Parameter Penelitian**

Parameter yang diamati meliputi total bakteri, keberadaan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif pada feses kelinci periode pertumbuhan yang diberipakan pellet dengan penambahan limbah kubis fermentasi pada level yang berbeda. Pengambilan sampel feses dilakukan pada minggu akhir penelitian. Feses kelinci diambil dengan cara menampung feses bersih atau feses yang baru keluar dari anus kelinci dengan menggunakan penampung steril. Sampel feses masing-masing perlakuan dimasukkan dalam plastik steril kemudian dilakukan pemeriksaan total bakteri dan keberadaan bakteri gram positif dan gram negatif yang ada pada feses.

### **3.4. Analisis Data**

Data hasil penelitian yang diperoleh dengan parameter total bakteri feses dan keberadaan bakteri gram pada feses dianalisis menggunakan analisis ragam. Parameter total bakteri feses, data yang diperoleh ditransformasi menggunakan  $\log$ . Parameter bakteri gram, data yang diperoleh diberikan skor sesuai ketentuan, kemudian ditransformasi menggunakan transformasi  $(\sqrt{x + 10})$ . Data hasil

transformasi dianalisis menggunakan *analysis of varians* (anova) dan jika ada pengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) maka dilakukan uji lanjut dengan uji wilayah ganda Duncan (Srigandono, 1987). Model linier yang digunakan berdasarkan rancangan acak lengkap dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

- $Y_{ij}$  = Total bakteri dan bakteri gram pada feses ke-j yang memperoleh perlakuan pemberian pellet dengan penambahan limbah kubis ke-i.  
 $\mu$  = Nilai tengah umum (rata-rata) total bakteri dan keberadaan bakteri gram feses.  
 $\tau_i$  = Pengaruh penambahan limbah kubis fermentasi dalam pellet dengan penambahan ke-i.  
 $\varepsilon_{ij}$  = Pengaruh galat percobaan pada total bakteri dan keberadaan bakteri gram feses ke-j akibat pengaruh pemberian pellet dengan penambahan limbah kubis fermentasi level ke-i.  
*i* = Perlakuan (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>).  
*j* = Ulangan (U<sub>1</sub>, U<sub>2</sub>, U<sub>3</sub>, U<sub>4</sub>).

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah :

$H_0 = \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = 0$  (Tidak ada pengaruh pemberian pakan pellet dengan penambahan limbah kubis fermentasi berbagai level terhadap total bakteri dan keberadaan bakteri gram pada feses kelinci periode pertumbuhan).

$H_1 = \text{minimal ada satu } \tau_i \neq 0 \text{ (} i : 1, 2, 3, 4 \text{)}$  (Minimal ada satu perlakuan pemberian pakan pellet dengan penambahan limbah kubis fermentasi berbagai level yang mempengaruhi jumlah total bakteri dan keberadaan bakteri gram pada feses kelinci periode pertumbuhan).

Kriteria pengujian :

- a. Bila  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , maka pengaruh perlakuan dikatakan sangat nyata (1%) dengan memberi tanda dua bintang (\*\*), dikatakan nyata (5%) bila  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ .

hitung  $>$  F. tabel, tetapi lebih kecil dari tingkat signifikansi 1%, ditandai dengan satu bintang (\*).

- b. Bila F. hitung  $<$  F. tabel pada tingkat signifikansi 5%, maka dikatakan pengaruh perlakuan tidak nyata. Hasilnya ditandai dengan memberi tanda (<sup>ns</sup>) pada nilai F analisis varians.