

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian tentang populasi bakteri dan keberadaan bakteri gram pada *pellet calf starter* dengan penambahan bakteri asam laktat dari limbah kubis terfermentasi telah dilaksanakan pada bulan September – Desember 2014 di Laboratorium Teknologi Pakan Universitas Diponegoro, Laboratorium Ilmu Nutrisi Pakan Universitas Diponegoro dan Laboratorium Mikrobiologi Analisis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang.

#### **3.1. Materi**

Materi penelitian yang digunakan meliputi bahan dan peralatan. Bahan yang digunakan jagung, bekatul, bungkil kedelai, molases, *mineral mix*, limbah kubis, garam dan gula, *aquadest*, medium *Nutrient Agar* (NA), pewarna violet kristal, larutan lugol, air, alkohol 95%, larutan safranin, minyak imersi. Peralatan yang digunakan adalah pisau, nampan, plastik dan isolasi, termometer, mesin *pelleter*, kompor dan panci pengukus, *blender*, *grinder*, gelas obyek, mikroskop, kertas label, *autoklaf*, inkubator, oven, tabung reaksi, pipet ukur, cawan petri, gelas beker, tabung erlenmeyer, gelas ukur, aluminium foil, spatula, kapas katun, *qubic colony counter*, pemanas spirtus, *electric stirer*, kertas saring, timbangan elektrik.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan dan masing – masing perlakuan terdiri atas 5 ulangan. Perlakuan dalam penelitian adalah penambahan limbah kubis terfermentasi yang berbeda, yaitu:

T0 : 0 % limbah kubis terfermentasi + 100 % *Calf starter* (w/w)

T1 : 2% limbah kubis terfermentasi + 100 % *Calf starter* (w/w)

T2 : 4% limbah kubis terfermentasi + 100 % *Calf starter* (w/w)

T3 : 6% limbah kubis terfermentasi + 100 % *Calf starter* (w/w)

Model matematik yang digunakan Srigandono (1987) yaitu :

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

$i = (1,2,3,4)$  dan  $j = (1,2,3,4,5)$

Keterangan :

$Y_{ij}$  : Kandungan populasi bakteri, keberadaan bakteri gram positif dan gram negatif ke-j yang memperoleh perlakuan penambahan limbah kubis terfermentasi pada *calf starter* ke-i

$\mu$  : Nilai tengah umum (rata – rata populasi) kandungan populasi bakteri, keberadaan bakteri gram positif dan gram negatif

$\tau_i$  : Pengaruh aditif dari perlakuan penambahan limbah kubis terfermentasi pada *calf starter* ke-i

$\varepsilon_{ij}$  : Pengaruh galat percobaan pada kandungan populasi bakteri, keberadaan bakteri gram positif dan gram negatif ke-j yang memperoleh perlakuan penambahan limbah kubis terfermentasi pada *calf starter* ke-i

### 3.2.2. Tahap penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan membuat limbah kubis fermentasi (LKF) (Sulistiyanto *et al.*, 2009). Metode pembuatan LKF yaitu limbah kubis dipotong – potong menjadi ukuran yang lebih kecil  $\pm 1$  cm. Limbah kubis *diblender* hingga tekstur berubah seperti bubur, agar luas permukaan limbah kubis lebih besar (Oktaviani *et al.*, 2013). Limbah kubis yang telah dihaluskan, ditambahkan garam sesuai dengan perlakuan. Perlakuan yang diberikan yaitu penambahan garam sebanyak 2%, 4%, 6%, 8% dan masing – masing perlakuan ditambahkan gula sebanyak 6,4% dari berat limbah kubis. Campuran limbah kubis, garam dan gula dibungkus dengan menggunakan plastik hingga *anaerob*. Masing – masing perlakuan diperam selama 4 hari dan 6 hari. Hasil analisis total bakteri asam laktat pada masing – masing perlakuan, dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Analisis Total Bakteri Asam Laktat pada Limbah Kubis Fermentasi

| Penambahan Garam | Lama Pemeraman     | Total Bakteri Asam Laktat |
|------------------|--------------------|---------------------------|
|                  | ----- (hari) ----- | ----- (cfu/g) -----       |
| 2%               | 4                  | -                         |
|                  | 6                  | $7,6 \times 10^7$         |
| 4%               | 4                  | $1,0 \times 10^8$         |
|                  | 6                  | $4,8 \times 10^7$         |
| 6%               | 4                  | $1,0 \times 10^7$         |
|                  | 6                  | $1,1 \times 10^8$         |
| 8%               | 4                  | $1,4 \times 10^7$         |
|                  | 6                  | -                         |

### 3.2.3. Tahap perlakuan penelitian

Tahap perlakuan penelitian diawali dengan pembuatan LKF dengan metode sama seperti tahap penelitian pendahuluan. Perlakuan yang diambil untuk pembuatan LKF yaitu garam yang ditambahkan sebanyak 6% dan gula 6,4% dari berat limbah kubis. Pemeraman dilakukan selama 6 hari. Hal ini dikarenakan total BAL pada perlakuan tersebut paling banyak yaitu  $1,1 \times 10^8$  cfu/g.

Tabel 4. Formula *Calf Starter* berdasarkan Bahan Kering

| Bahan Pakan        | Kadar           |
|--------------------|-----------------|
|                    | ----- (%) ----- |
| Jagung giling      | 43              |
| Bekatul            | 25,5            |
| Bungkil kedelai    | 26              |
| Molases            | 5               |
| <i>Mineral mix</i> | 0,5             |
| Kandungan zat gizi |                 |
| - Protein Kasar    | 19,61           |
| - TDN              | 79,10           |

Sumber : Mukodiningsih *et al.* (2010)

Setiap bahan pakan dalam ransum *calf starter* yang terdiri atas jagung halus, bekatul, bungkil kedelai, *mineral mix* dan *molasses* dianalisis kandungan nutrisinya (Lampiran 1.). Pembuatan *pellet* dilakukan dengan mencampur bahan pakan sesuai formula *calf starter* yang telah ditentukan (Tabel 4.). Selanjutnya campuran bahan *calf starter* ditambahkan *aquadest* sebanyak 50% dari total *aquadest* yang diberikan (70% dari berat ransum *calf starter*). *Conditioning calf starter* dilakukan dengan menggunakan panci pengukus dan kompor hingga suhu mencapai 80°C, kemudian diangin - anginkan hingga dingin. *Calf starter* yang telah dingin dicampurkan dengan LKF sesuai dengan perlakuan yang diberikan.

Hasil campuran ditambahkan *aquadest* sebanyak 50% (sisa *aquadest*), kemudian dicetak dengan menggunakan mesin *pelleter* dengan lubang berdiameter 5 mm. Pengeringan *pellet* dilakukan selama 2 – 3 hari dengan menggunakan inkubator yang dilengkapi *blower in* dan *blower out* sebagai pengatur aliran udara serta sumber pemanas inkubator berasal dari luar kotak inkubator.

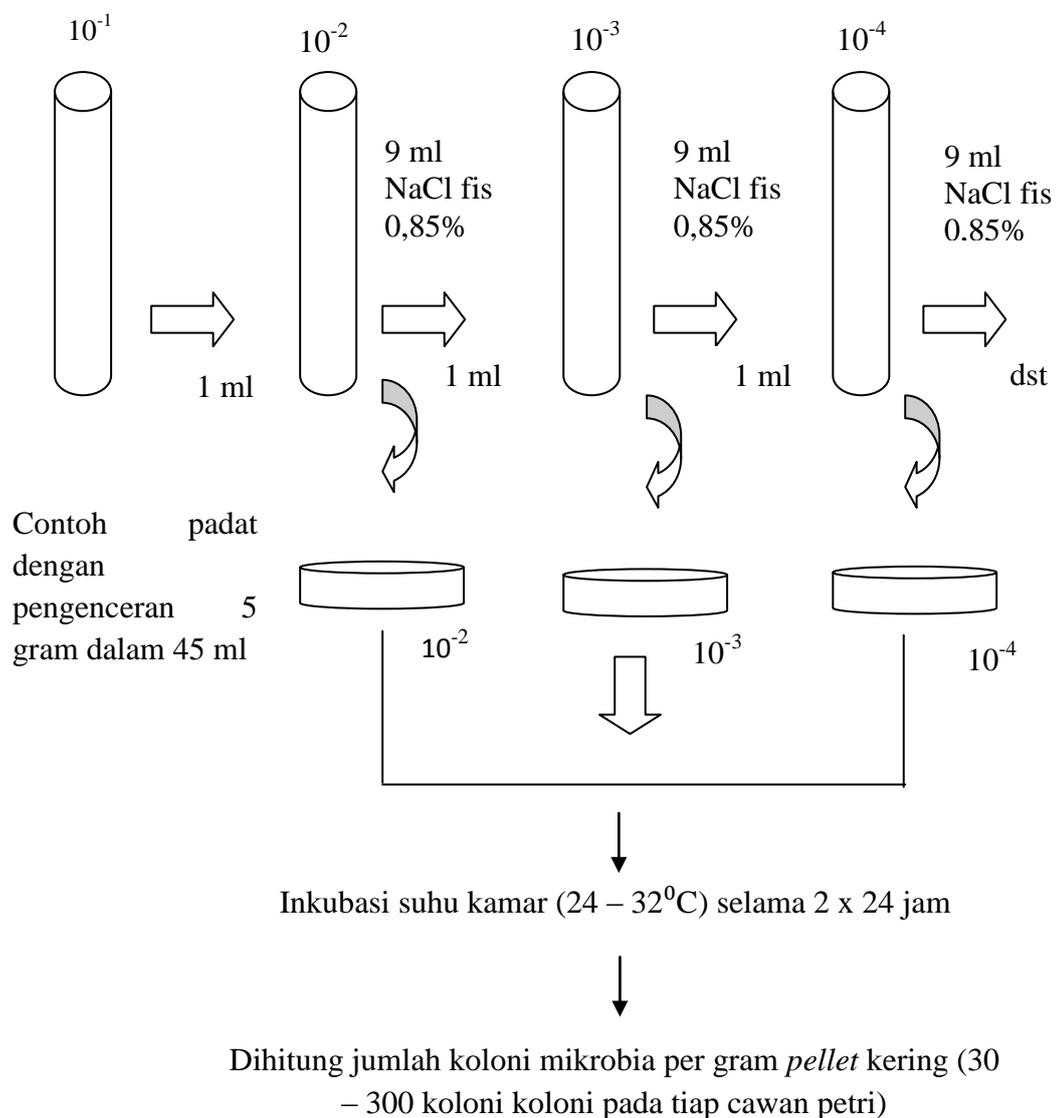
### **3.2.4. Pengambilan data**

**3.2.4.1. Prosedur perhitungan total bakteri**, perhitungan jumlah bakteri menggunakan metode *standart plate count* yaitu perhitungan jumlah mikroba secara tidak langsung (Fardiaz, 1993). *Standart plate count* mempunyai tujuan untuk menghitung jumlah mikroba yang hidup (*viable*).

*Pellet* kering diencerkan beberapa kali mendapat satu seri dengan tingkat pengenceran menurut deret ukur seperti Ilustrasi 1 (Fardiaz, 1993). Hasil pengenceran dituangkan dalam cawan petri sebanyak 1 ml. Cawan petri ditutup dan tidak boleh dibuka terlalu lebar agar terhindar dari kontaminasi dari luar. Medium NA yang merupakan medium untuk menghitung total bakteri disterilkan dan dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 12 – 15 ml dengan suhu 50°C. Cawan petri digerakkan di atas meja secara hati – hati dengan gerakan melingkar seperti angka delapan agar sel – sel mikroba dapat tersebar secara merata. Setelah medium NA padat, cawan petri diinkubasi pada suhu 32°C dengan posisi terbalik selama 2 x 24 jam.

Koloni dihitung dengan menggunakan *qubic colony counter* setelah inkubasi selesai (Fardiaz, 1993). Satu koloni dianggap berasal dari 1 sel atau 1 spora bakteri. Jumlah koloni di hitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah koloni} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}} \quad (\text{Fardiaz, 1993})$$



Ilustrasi 1. Metode Hitung Cawan Tuang

**3.2.4.2. Prosedur penentuan bakteri gram positif dan gram negatif**, bakteri gram positif dan bakteri gram negatif pada *pellet* diamati dengan *loop* kultur cair pada gelas obyek disebar, sehingga mencapai diameter 1 – 1,5 cm<sup>2</sup> dan dikering anginkan lalu difiksasi dengan nyala api kecil. Pewarna violet kristal ditetaskan di atas *film* pada gelas obyek, dan dibiarkan selama 1 menit. Gelas obyek dibilas dengan air kran dengan cara memegang gelas obyek pada posisi miring. Sisa air yang tertinggal pada gelas obyek dibuang. Gelas obyek ditetesi dengan larutan *lugol* sebanyak 2 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Gelas obyek dicuci kembali dengan air, kemudian dihilangkan warnanya dengan menggunakan alkohol 95% selama 10 - 20 detik atau sampai warna biru tidak luntur. Gelas obyek dicuci dengan air, kemudian diwarnai dengan *counterstain* yaitu larutan *safranin* selama 10 – 20 detik. Gelas obyek dibilas dengan air, dan dikeringkan dengan kertas serap. Gelas obyek diamati dibawah mikroskop menggunakan lensa obyektif minyak imersi. Bentuk dan jenis bakteri gram dicatat. (Fardiaz, 1993). Hasil identifikasi bakteri gram positif dan gram negatif dijumlahkan, dirata – rata dan diskoring 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.

### 3.2.5. Analisis data

Data penelitian pada parameter populasi bakteri menggunakan analisis data deskriptif menurut Belanche *et al.* (2011), dengan cara menggambarkan populasi bakteri dengan menggunakan tabel. Data penelitian yang diperoleh pada parameter keberadaan bakteri gram, ditransformasi menggunakan transformasi  $\sqrt{x+0,5}$  dan data hasil transformasi dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (Sukmadinata, 2011). Apabila terdapat pengaruh perlakuan ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji lanjut dengan uji wilayah ganda Duncan (Srigandono, 1987).

### 3.2.6. Hipotesis

Hipotesis penelitian adalah terdapat pengaruh taraf penambahan limbah kubis terfermentasi terhadap kenaikan populasi bakteri, kenaikan keberadaan bakteri gram positif dan penurunan bakteri gram negatif. Hipotesisnya adalah:

H0 : Tidak ada pengaruh pengaruh perlakuan taraf limbah kubis terfermentasi terhadap kenaikan populasi bakteri, kenaikan keberadaan bakteri gram positif dan penurunan bakteri gram negatif.

H1 : Minimal ada satu perlakuan taraf limbah kubis terfermentasi terhadap kenaikan populasi bakteri, kenaikan keberadaan bakteri gram positif dan penurunan bakteri gram negatif.