

## BAB III

### MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro. Analisis sampel dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kesehatan dan Keperawatan Universitas Muhammadiyah Semarang bulan Agustus – September 2013.

#### 3.1. MATERI

Alat yang digunakan pada penelitian meliputi termos tempat cairan rumen, kain bersih, timbangan analitik, gelas ukur, pisau dan peralatan analisis bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik yang meliputi : tabung reaksi, rak tabung, bunsen, batang *triangle*, cawan petri, mikro pipet 1000  $\mu$ l, mikro pipet 100  $\mu$ l, inkubator, kertas label.

Bahan yang digunakan adalah limbah sayuran yang terdiri dari 80% limbah kubis dan 20% limbah sawi, molases sebanyak 6,4 % dan garam 8% dari total limbah sayuran yang digunakan, cairan rumen 750 ml, pollard sebanyak 200 g dan aquadest. Bahan yang digunakan untuk analisis sampel adalah NaCl fisiologis steril dan medium agar. Analisis bakteri asam laktat menggunakan medium *Man deRogosa Sharpe* (MRS) dan analisis bakteri selulolitik ditambahkan dengan *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC).

### 3.2. Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan tiga tahap. Pertama pembuatan ELSF dan penyiapan cairan rumen, tahap kedua pembuatan starter dengan bahan ELSF, cairan rumen dan pollard, tahap ketiga analisis starter terhadap kandungan bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik.

Pembuatan ELSF yaitu dengan pengumpulan limbah sayuran sebanyak 4 kg yang terdiri atas kubis 80 dan sawi 20% dicacah menjadi ukuran  $\pm$  5cm, selanjutnya ditambah garam sebanyak 8% dan molases 6,4% dan dicampur hingga merata. Campuran bahan tersebut dipadatkan dalam silo dan ditutup rapat hingga keadaan *anaerob*. Pemeraman dilakukan selama 6 hari, selanjutnya diperas untuk diambil ekstraknya menggunakan kain tipis.

Penyiapan cairan rumen yaitu dengan cara isi rumen diperas menggunakan kain kemudian ditampung ke dalam termos yang telah dikondisikan suhu di dalamnya 39 °C. Pembuatan starter dimulai dari pollard sebanyak 3,5 kg dioven pada suhu 105 °C selama 4 jam, selanjutnya dihitung kadar airnya. Pollard sebanyak 200 g ditambah ELSF, cairan rumen dan aquadest dicampur rata, kemudian diperam selama 48 jam. Pengamatan dilakukan pada 0 dan 48 jam untuk mengetahui kandungan bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik.

Analisis produk starter yaitu pengamatan terhadap kandungan bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik yang diperam selama 0 jam dan 48 jam. Sampel yang digunakan adalah sampel basah. Analisis bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik dilakukan dengan menggunakan metode hitungan cawan dengan metode cawan tuang (*Standard Plate Count*) (Fardiaz, 1989).

**Analisis bakteri Asam laktat.** Sampel basah diambil 1 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis sebanyak 5 ml. Sampel diencerkan sampai pengenceran  $10^{-1}$  kemudian diambil 1 ml dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl fisiologis kemudian dihomogenkan sampai diperoleh pengenceran  $10^{-7}$ . Kemudian larutan pengenceran  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  diambil 0,01 ml kemudian dituangkan pada media agar berisi medium MRS (*Man deRogosa Sharpe*). Sampel diratakan menggunakan *triangle*, kemudian diinkubasi selama 48 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dengan posisi terbalik.

**Analisis bakteri Selulolitik.** Sampel basah diambil 1 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis sebanyak 5 ml. sampel diencerkan sampai pengenceran  $10^{-1}$  kemudian diambil 1 ml dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl fisiologis kemudian dihomogenkan sampai diperoleh pengenceran  $10^{-7}$ . Kemudian larutan pengenceran  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  diambil 0,01 ml kemudian dituangkan pada media agar berisi medium MRS. Sampel diratakan menggunakan *triangle*, kemudian diinkubasi selama 48 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dengan posisi terbalik. Namun pada saat pembuatan agar MRS ditambahkan CMC 1% sedikit demi sedikit hingga merata.

### 3.3. Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial  $2 \times 4$  dengan 4 ulangan. Faktor pertama adalah pemeraman yaitu : A0 (pemeraman 0 jam) dan A1 (pemeraman 48 jam). Faktor kedua adalah persentase pemberian ELSF dan cairan rumen, yaitu B0 (persentase ELSF:cairan

rumen 0:0%), B1 (persentase ELSF:cairan rumen 20:10%), B2 (persentase ELSF:cairan rumen 20:20%), B3 (persentase ELSF:cairan rumen 10:20%).

Kombinasi perlakuannya sebagai berikut:

$A_0B_0$  = pemeraman 0 jam dan persentase ELSF:cairan rumen 0:0%

$A_0B_1$  = pemeraman 0 jam dan persentase ELSF:cairan rumen 20:10%

$A_0B_2$  = pemeraman 0 jam dan persentase ELSF:cairan rumen 20:20%

$A_0B_3$  = pemeraman 0 jam dan persentase ELSF:cairan rumen 10:20%

$A_1B_0$  = pemeraman 48 jam dan persentase ELSF:cairan rumen 0:0%

$A_1B_1$  = pemeraman 48 jam dan persentase ELSF:cairan rumen 20:10%

$A_1B_2$  = pemeraman 48 jam dan persentase ELSF:cairan rumen 20:20%

$A_1B_3$  = pemeraman 48 jam dan persentase ELSF:cairan rumen 10:20%

Parameter penelitian yang diamati adalah kandungan bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik yang diperam 0 dan 48 jam. Data hasil penelitian diolah secara statistik menggunakan analisis ragam yang telah ditransformasikan ke dalam nilai logaritma  $y$  dan apabila menghasilkan pengaruh perlakuan maka dilanjutkan dengan uji jarak ganda Duncan.

### 3.4. Analisis Data

Model linear yang digunakan dalam analisis data adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan:

- $Y_{ijk}$  : Hasil pengamatan pada petak percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij  
 $\mu$  : Nilai tengah umum  
 $\alpha_i$  : Pengaruh aditif dari penambahan ELSF dan cairan rumen ke-i  
 $\beta_j$  : Pengaruh lama pemeraman ke-j  
 $\alpha\beta_{ij}$  : Pengaruh interaksi antara penambahan ELSF dan cairan rumen ke-I dan lama pemeraman ke-j  
 $\varepsilon_{ijk}$  : Pengaruh galat percobaan pada petak percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

### 3.5. Hipotesis statistik yang digunakan adalah:

- $H_0$  :  $(\alpha\beta)_{ij} = 0$ , yang bearti tidak ada pengaruh dari persentase ELSF:cairan rumen terhadap total bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik
- $H_1$  : minimal ada satu perlakuan persentase ELSF : cairan rumen terhadap total bakteri asam laktatdan bakteri selulolitik
- $H_0$  :  $\alpha_i$ , yang bearti tidak ada pengaruh dari lama pemeraman terhadap total bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik
- $H_1$  : minimal ada satu perlakuan dari lama pemeraman terhadap total bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik
- $H_0$  :  $\beta_j$ , yang berarti tidak ada interaksi antara ELSF : cairan rumen dan lama pemeraman terhadap total bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik
- $H_1$  : minimal ada satu interaksi antara ELSF : cairan rumen dan lama pemeraman terhadap total bakteri asam laktat dan bakteri selulolitik

Kriteria pengujian yaitu:

$F_{hitung} < F_{tabel}$  maka  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak

$F_{hitung} > F_{tabel}$  maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima