

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2014 sampai dengan Januari 2015 di Laboratorium Teknologi Pakan dan Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis mikrobiologis pelet *calf starter* dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah, Semarang.

#### **3.1. Materi**

Materi penelitian yang digunakan meliputi bahan dan peralatan. Bahan penelitian meliputi jagung giling, bekatul, bungkil kedelai, *molasses*, mineral mix, limbah kubis, gula dan garam, alkohol 70%, NaCl fisiologis, media (*deMan Rogosa Sharpe*) (MRS) untuk medium BAL, pada pengujian *E. coli* digunakan *Tryptic Soy Broth* (TSB) sebagai media cair atau pengencer dan *Eosyn Methylen Blue Agar* (EMBA) sebagai media lempeng selektif. Peralatan dalam penelitian meliputi pisau, timbangan digital, nampan, plastik, selotip, kertas label, mesin peleter, kompor, dandang, pH meter digital, termometer, timbangan analitik, kertas pembungkus, oven, inkubator, autoklaf, gelas ukur, cawan petri steril, pipet 1 ml, tabung reaksi, spatula, *stomacher*, *quebec colony counter*.

### 3.2. Metode

Metode penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan masing – masing perlakuan 5 ulangan. Perlakuan dilakukan dengan taraf penambahan limbah kubis fermentasi yang berbeda, yaitu:

T1: 0 % fermentasi kubis + 100% formula *Calf starter*(w/w)

T2: 2% fermentasi kubis + 100% formula *Calf starter*(w/w)

T3: 4% fermentasi kubis + 100% formula *Calf starter* (w/w)

T4: 6% fermentasi kubis + 100% formula *Calf starter*(w/w)

Prosedur penelitian dibagi menjadi 3 tahap yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, tahap analisis. Diagram alur prosedur penelitian dapat dilihat pada Lampiran 10.

#### 3.2.1. Tahap persiapan

Tahap pertama yaitu tahap persiapan meliputi penelitian pendahuluan, analisis kandungan nutrisi bahan pakan, penyusunan formulasi pelet dan persiapan bahan dan alat yang akan digunakan.

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan membuat fermentasi limbah kubis. Metode pembuatan fermentasi limbah kubis yaitu limbah kubis dipotong – potong menjadi ukuran yang lebih kecil 0,5 - 1 cm. Tahap selanjutnya limbah kubis *diblender* hingga tekstur berubah menjadi seperti bubur, agar memperbesar luas permukaan limbah kubis. Limbah kubis yang telah menjadi bubur ditambahkan garam 6% dan gula sebanyak 6,4% dari berat limbah kubis.

Campuran limbah kubis, garam dan gula kemudian dibungkus dengan menggunakan plastik hingga kondisi *anaerob* fakultatif kemudian diperam selama 6 hari.

Proses selanjutnya, bahan pakan dalam ransum *calf starter* yang terdiri atas jagung halus, bekatul, bungkil kedelai, *mineral mix* dan *molasses* dilakukan analisis proksimat untuk mengetahui kandungan nutrisi masing – masing bahan pakan (Lampiran 3.).

### 3.2.2. Tahap pelaksanaan

Tahap kedua adalah tahap pelaksanaan. Pembuatan *calf starter* dengan formula ransum yang sudah disesuaikan dari penelitian sebelumnya (Mukodiningsih *et al.*, 2010) tercantum pada Tabel 4.

Tabel 4. Formula *Calf Starter*

Bahan Pakan	Komposisi
	-----%-----
Jagung giling	43,00
Bungkil Kedelai	26,00
Bekatul	25,5
Molases	5,0
Mineral Mix	0,5
Kandungan zat gizi	
- Protein Kasar	19,62
- TDN	79,41

Pembuatan pelet diawali dengan proses sterilisasi mesin *pelleter* menggunakan alkohol 70% agar mikrobia kontaminan mati. Proses selanjutnya, formula *calf starter* dicampur, bahan pakan meliputi jagung halus, bekatul,

bungkil kedelai, mineral mix dan molasses sesuai dengan komposisi (Lampiran 3.). Volume air ditambahkan sesuai dengan pengukuran kadar air sebanyak 70%) dan molasses sebanyak 5%. Ransum *calf starter* dikukus pada suhu 80°C selama 20 menit, kemudian di angin-anginkan hingga dingin. *Calf starter* yang telah dingin dicampur dengan limbah fermentasi kubis sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Ransum *calf starter* yang telah dicampur fermentasi limbah kubis dicetak menjadi pelet di mesin *pelleter* dengan lubang berdiameter 5 mm. Pengeringan pelet 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.

### **3.2.3. Tahap Analisis**

**3.2.3.1. Analisis Total Bakteri Asam Laktat.** Sampel pelet *calf starter* yang telah ditambah fermentasi limbah kubis sesuai perlakuan dianalisis untuk diketahui total BAL. Pengujian total BAL dilakukan dengan metode cawan dengan media MRS. Perhitungan total BAL dilakukan melalui tiga tahap, yakni: pengenceran, pencawanan (metode tuang), dan perhitungan jumlah bakteri (Fardiaz, 1993). Perhitungan total BAL diawali pengenceran dengan perbandingan 1:9. Pengenceran pertama, yaitu 5 g sampel diencerkan ke dalam 45ml NaCl fisiologis. Pengenceran kedua, yaitu 1 ml sampel hasil pengenceran pertama dipipet kedalam 9 ml NaCl fisiologis. Pengenceran ketiga dan seterusnya dilakukan dengan cara yang sama pada pengenceran kedua.

Pencawanan dilakukan menggunakan medium MRS agar. Pembuatan 100 ml medium dengan cara 6,6 g MRS agar dilarutkan ke dalam 100 ml aquades, kemudian larutan MRS agar disterilkan dalam autoklaf 121°C selama 15 menit. Pencawanan dilakukan dengan memipet 1 ml larutan hasil pengenceran ke dalam cawan petri, kemudian ke dalam cawan tersebut dituangkan medium MRS agar sebanyak 15 ml. Medium tutup cawan tidak boleh dibuka terlalu lebar selama penuangan untuk menghindari kontaminasi dari luar. Langkah selanjutnya, cawan digerakkan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel mikroorganisme secara merata, yaitu dengan gerakan angka delapan. Selanjutnya, setelah memadat, cawan-cawan diinkubasi dengan posisi terbalik dengan suhu 37°C selama 48 jam.

Cawan - cawan yang telah diinkubasi, dilakukan perhitungan mikroorganisme dengan alat *quebec colony counter*. Perhitungan koloni dengan metode *standart plate count* (SPC). Tahapan perhitungan dilakukan secara duplo, yaitu menggunakan cawan petri untuk setiap pengenceran. Koloni dihitung dengan cara seperti berikut: 1. Perhitungan dilakukan terhadap cawan dengan jumlah koloni 30-300; 2. Beberapa koloni besar dengan jumlah koloni diragukan dengan dihitung sebagai satu koloni; 3. Suatu deretan (rantai) koloni terlihat sebagai satu garis dihitung sebagai satu koloni (Fardiaz, 1993).

**3.2.3.2. Analisis *Escherichia coli*.** Sampel pelet *calf starter* yang telah ditambah fermentasi limbah kubis sesuai perlakuan dianalisis untuk diketahui keberadaan *E. coli*. Analisis *E. coli* menggunakan TSB sebagai media cair atau pengencer dan EMBA sebagai media lempeng selektif. Pengujian diawali dengan menimbang 10

g atau memipet 10 ml cuplikan sampel ke dalam kantong plastik stomacher steril ditambahkan 90ml TSB. Cuplikan sampel dihomogenkan menggunakan stomacher selama 30 detik dan diinkubasi pada suhu  $37\pm 1$  °C selama  $18\pm 2$  jam. Proses selanjutnya, digoreskan satu sengkeli pada media lempeng selektif EMBA dan diinkubasi pada suhu  $35-37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam dengan posisi cawan terbalik. Diamati koloni spesifik yang tumbuh. Koloni berwarna hijau kilap logam dengan bintik biru kehijauan ditengahnya menunjukkan keberadaan *E. coli* (Fardiaz, 1993). Proses selanjutnya dilakukan uji biokimia untuk identifikasi *E. coli* apabila terdeteksi adanya bakteri *E. coli*.

**3.2.3.3. Pengukuran Derajat Keasaman.** Masing-masing sampel pelet *calf starter* yang telah ditambah fermentasi limbah kubis sesuai perlakuan diukur derajat keasamannya. Sampel dalam bentuk kering harus ditambahkan sejumlah air dengan rasio perbandingan nisbah: air adalah 1:1 (Reeuwijk, 1993) agar didapatkan kemasaman aktual. Sampel pelet diambil 10 g lalu ditambahkan dengan *aquadest* sebanyak 10 ml. Selanjutnya sampel tersebut diukur pHnya dengan menggunakan pH meter digital.

### **3.3. Parameter Penelitian**

Parameter yang diamati meliputi total BAL, *E. coli* dan derajat keasaman pada pelet *calf starter* dengan penambahan sumber mikrobia hasil fermentasi limbah kubis.

### 3.4. Analisis Data

Data hasil penelitian dengan parameter total BAL dan *E. coli* diolah menggunakan analisis deskriptif. Analisis deskriptif dilakukan dengan cara menggambarkan populasi bakteri yang ditampilkan dalam tabel (Belanche *et al.*, 2011). Parameter derajat keasaman dianalisis dengan *Analysis of varians* (Anova) dan jika ada pengaruh perlakuan nyata ( $p < 0,05$ ) maka dilakukan uji lanjut dengan uji wilayah ganda Duncan (Srigandono, 1987). Model linear yang digunakan berdasarkan rancangan acak lengkap dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

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

Keterangan :

$Y_{ij}$  : Derajat keasaman ke-j yang memperoleh perlakuan pemberian limbah fermentasi pada *calf starter* ke-i

$\mu$  : Nilai tengah umum derajat keasaman.

$\tau_i$  : Pengaruh aditif dari perlakuan pemberian limbah fermentasi pada *calf starter* ke-i

$\varepsilon_{ij}$  : Pengaruh galat percobaan pada derajat keasaman ke-j yang memperoleh perlakuan pemberian limbah fermentasi pada *calf starter* ke-i

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

$H_0$  :  $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = 0$  ( yang berarti tidak ada pengaruh perlakuan penambahan fermentasi limbah kubis terhadap derajat keasaman pelet *calf starter* )

H1 : minimal ada satu  $\tau_i \neq 0$  (  $I = 1,2,3,4$ ) (yang artinya minimal ada satu perlakuan penambahan fermentasi limbah kubis yang mempengaruhi derajat keasaman pelet *calf starter*).

Kriteria Pengujian:

F hitung < F tabel 5% maka H<sub>0</sub> diterima dan H<sub>1</sub> ditolak

F hitung  $\geq$  F tabel 5% maka H<sub>0</sub> ditolak atau H<sub>1</sub>