

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian mengenai penambahan starter ekstrak nanas dengan level berbeda pada pollard terhadap kandungan total bakteri, Gram positif/negatif dan bakteri asam laktat telah dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Mei 2013. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan untuk penelitian yaitu starter ekstrak nanas yang dipersiapkan dalam 4 level dan pollard sebagai bahan utama yang nantinya akan menjadi bahan pakan fermentasi. Peralatan yang digunakan yaitu autoklaf sebagai alat mensterilisasi pollard, plastik untuk wadah sampel yaitu pollard fermentasi, sendok untuk mengaduk, lemari simpan untuk menginkubasi pollard dengan suhu ruang, timbangan untuk mengukur bahan, lemari pengering untuk mengeringkan sampel dan chopper untuk menghaluskan pollard setelah dikeringkan. MRS agar (*de man rogosa sharpe* agar) untuk medium bakteri asam laktat dan media NB (*Nutrien Broth*) untuk medium bakteri gram positif dan negatif. Pewarna untuk bakteri dalam pewarnaan gram yaitu violet kristal (Gram A), larutan lugol/yodium gram (Gram B), alkohol 95% (Gram C), larutan safranin (Gram D). Peralatan dalam analisis meliputi oven, *autoclaf*, cawan petri, pipet hisap, kertas hisap, erlenmeyer, kertas pembungkus, kapas, alkohol, aluminium foil, timbangan

elektrik 100 g dengan ketelitian 0,0001, beker glass, gelas ukur, api bunsen, cawan petri, mikroskop, gelas obyek, inkubator, *shaker*, pipet ukur, tabung reaksi dan rak tabung reaksi, gelas ukur, mikro pipet, jarum ose, water bath, elektrik stirer, jarum inokulum, kaca obyek.

3.2. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dalam 3 tahap yaitu: 1) tahap persiapan; 2) tahap pelaksanaan penelitian dan 3) tahap pengambilan data. Tahap persiapan meliputi mengumpulkan bahan-bahan yang diperlukan, membersihkan peralatan dan mempersiapkan ruang sebagai tempat penyimpanan sampel. Diawali dengan pembuatan starter ekstrak nanas yaitu pencucian nanas hingga bersih kemudian dihaluskan dicampur dengan air kelapa serta gula dan garam dengan perbandingan yang air kelapa dan ekstrak nanas, 50% : 50% untuk molasses 6,7% dan garam 6% yang nantinya akan digunakan sebagai starter untuk membuat pollard sebagai bahan pakan fermentasi.

Tahap kedua yaitu pelaksanaan penelitian, diawali dengan mensterilisasi pollard menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 atm selama 15 menit, tunggu sampai dingin, menyiapkan plastik sebagai wadah sampel. Campur pollard dan starter sesuai dengan level penambahan starter ekstrak nanas yang telah ditentukan yaitu sebanyak 0%, 20%, 40% dan 60% dengan ditambah aquades untuk mendapatkan kadar air 65%, disimpan di dalam lemari penyimpanan dengan suhu ruang dengan masa pemeraman 4 hari.

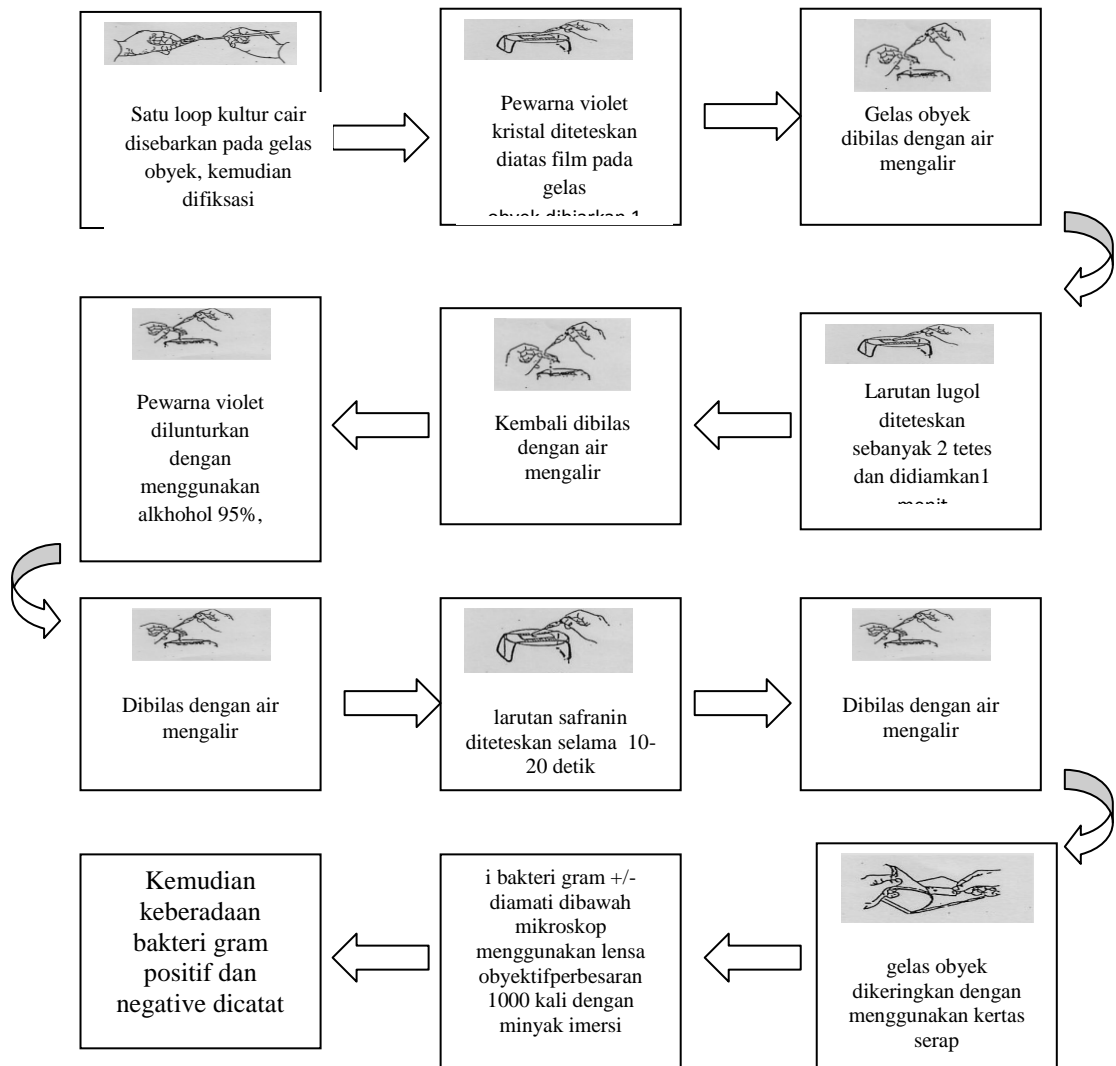
Tahap ketiga yaitu tahap pengambilan data dilakukan sesuai dengan parameter yang diamati. Pengambilan sampel sebanyak 10 g untuk analisis mikrobiologi untuk selanjutnya dibawa ke Laboratorium Analisis Universitas Muhammadiyah Semarang meliputi penghitungan total bakteri, bakteri Gram dan total BAL.

3.2.1. Metode Penghitungan Total Bakteri

Total Mikroba ditentukan dengan metode Hamm (Fardiaz, 1992). Uji mikrobiologis dengan metode analisis kuantitatif *Total Plate Count* (TPC). Sampel sebanyak 10 ml dimasukkan bersama 90 ml larutan pengencer (BPW), kemudian dicampur sampai menjadi homogen. Tahap ini menjadi pengenceran pertama. Sebanyak 1 ml dari larutan pengencer pertama yang sudah homogen dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan pengencer sehingga dapat terbentuk pengenceran 10^{-2} . Larutan tersebut kemudian dikocok sampai homogen. Pengenceran ini dilakukan sampai ke pengenceran 10^{-7} . Setelah melakukan pengenceran, dilakukan pemupukan dengan cara diambil sebanyak 1 ml pengencer dari masing-masing tabung pengenceran (berdasarkan 2 pengenceran terakhir yaitu 10^6 , 10^7) dan dipindahkan ke dalam cawan petri steril secara duplo. Media agar plate count agar (PCA) ditambahkan ke dalam cawan petri tersebut. Pemupukan dilakukan dengan metode tuang sebanyak ± 20 ml dan dihomogenkan membentuk angka 8. Cawan petri (agar yang sudah membeku) diinkubasi dengan posisi terbalik dalam inkubator bersuhu 37°C selama 24 jam.

3.2.2. Metode Penghitungan Bakteri Gram Positif dan Negatif

Cara kerja untuk pewarnaan bakteri gram yaitu sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi cairan pengencer steril dan dikocok. Suspensi sampel yang telah jadi diambil 1 hingga 2 ml dan dibiarkan dalam medium *Nutrien Broth*(NB), 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, dikering anginkan kemudian difiksasi menggunakan nyala api yang kecil. Pewarna violet kristal (gram A) ditetaskan pada gelas objek dan biarkan selama 1 menit. Gelas objek dibilas dengan aquadest, kemudian ditetesi larutan yodium gram/lugol (gram B) dan biarkan selama 1 menit. Gelas objek dicuci kembali dengan aquadest, kemudian dihilangkan warnanya menggunakan alkohol 95% (gram C) selama 10 hingga 20 detik. Gelas objek kemudian dibilas kembali dengan aquadest dan dikeringkan menggunakan kertas hisap secara perlahan-lahan. Gelas objek kemudian dikeringkan dan diwarnai dengan larutan safranin (gram D) selama 10 hingga 20 detik, setelah itu dibilas dengan aquadest dan dikeringkan dengan kertas hisap. Pengamatan bakteri gram dilakukan dengan menggunakan mikroskop serta lensa obyektif yang sebelumnya di tetesi minyak imersi, kemudian mencatat bentuk mikroorganisme tersebut. Bakteri Gram positif berwarna ungu dan Gram negatif berwarna merah muda (Fardiaz, 1989). Gambaran tahapan metode penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Cara Kerja Identifikasi Keberadaan Bakteri Gram (Fardiaz, 1989).

3.2.3. Penghitungan Total BAL (Bakteri Asam Laktat)

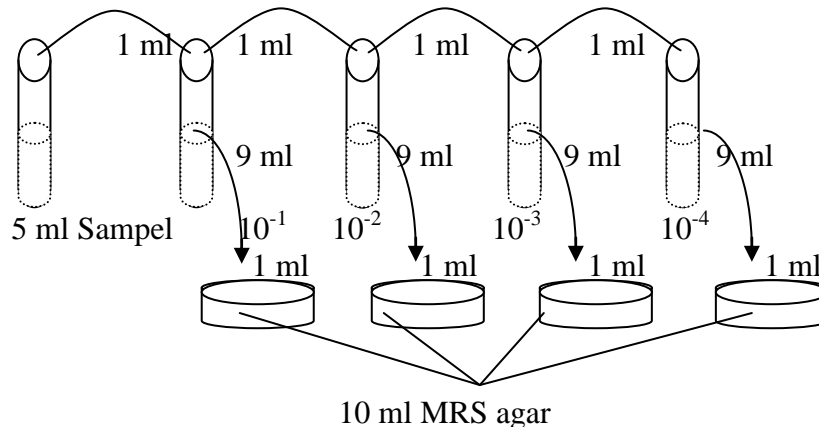
Penghitungan total BAL diawali pengenceran dengan perbandingan 1:9. Pengenceran pertama, yaitu 5 gram sampel diencerkan ke dalam 45 ml aquades. Pengenceran kedua, yaitu 1 ml sampel hasil pengenceran pertama dipipet ke

dalam 9 ml aquades steril. Pengenceran ketiga dan seterusnya dilakukan dengan cara 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 120° C selama 15 menit. Pencawanan dilakukan dengan memipet 1 ml larutan hasil pengenceran ke dalam cawan petri, kemudian kedalam cawan tersebut dituangkan medium MRS agar sebanyak 15 ml. Selama penuangan medium tutup cawan tidak boleh dibuka terlalu lebar untuk menghindari kontaminasi dari luar. Cawan selanjutnya digerakkan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel mikroorganisme secara merata, yaitu dengan gerakan angka delapan. Cawan-cawan diinkubasi dengan posisi terbalik dengan suhu 37° C selama 48 jam setelah memadat.

Perhitungan mikroorganisme dilakukan dengan alat *quebec colony counter* setelah akhir masa inkubasi. Penghitungan koloni dengan metode *standard plate count* (SPC). Koloni dihitung dengan cara sebagai berikut: 1) perhitungan dilakukan terhadap cawan dengan jumlah koloni antara 30-300; 2) beberapa koloni besar dengan jumlah koloni diragukan dihitung sebagai satu koloni; 3) suatu deretan (rantai) koloni terlihat sebagai satu garis dihitung sebagai satu koloni. Pelaporan data sesuai standar SPC mengikuti peraturan-peraturan sebagai berikut: 1) hasil terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama di depan koma dan angka kedua di belakang koma, jika angka ketiga sama dengan atau lebih besar dari lima, dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua; 2) jika semua pengenceran untuk pemupukan menghasilkan kurang dari 30 koloni pada cawan

petri, penghitungan hanya pada jumlah koloni pada pengenceran terendah; 3) jika semua pengenceran untuk pemupukan menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, penghitungan hanya pada jumlah koloni pada pengenceran tertinggi; 4) jika cawan dari dua tingkat pengenceran menghasilkan koloni dengan jumlah antara 30-300 dan perbandingan hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan dua, menentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan membandingkan pengencerannya, jika perbandingan antar hasil tertinggi dan terendah lebih dari 2 yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil; 5) jika menggunakan dua cawan petri (*duplo*) per pengenceran, pengambilan data dari kedua cawan (Fardiaz, 1993). Gambaran tahapan metode penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada Ilustrasi 2.



Ilustrasi 2. Pengenceran dan Pencawan Total Bakteri Asam Laktat (Fardiaz, 1989)

3.3. Rancangan Percobaan dan Analisis Statistik

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan yaitu:

Perlakuan yang diberikan adalah :

T0 : pollard tanpa penambahan starter ekstrak nanas

T1 : pollard + penambahan starter 20%

T2 : pollard + penambahan starter 40%

T3 : pollard + penambahan starter 60%

Variabel yang diamati adalah total bakteri, bakteri Gram positif dan negatif dan total BAL. Model linier yang digunakan untuk seluruh nilai pengamatan yaitu menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) adalah sebagai berikut:

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

Keterangan :

Y_{ij} = angka perlakuan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
 i = perlakuan (0, 1, 2,3)
 j = ulangan (1,2,3,4,5)
 μ = nilai tengah perlakuan
 α_i = pengaruh perlakuan ke-i (T0, T1, T2, T3)
 ε_{ij} = pengaruh galat percobaan yang timbul pada perlakuan ke-i (T0, T1, T2,) dengan ulangan ke-j (U1,U2,U3,U4,U5)

H_0 = tidak ada pengaruh penambahan starter ekstrak nanas dengan level berbeda pada pollard sebagai *carrier* probiotik terhadap kandungan total bakteri, bakteri gram positif/negatif dan bakteri asam laktat

H_1 = ada pengaruh penambahan starter ekstrak nanas dengan level berbeda pada pollard sebagai *carrier* probiotik terhadap kandungan total bakteri, bakteri gram positif/negatif dan bakteri asam laktat

Pengolahan data menggunakan analisis ragam dan dilanjutkan dengan uji wilayah ganda Duncan pada tingkat kepercayaan 1% (Steel dan Torrie, 1991).

Kriteria pengujian yang dilakukan yaitu :

$F_{hitung} \leq F_{tabel}$, maka H_0 diterima atau H_1 ditolak.

$F_{hitung} > F_{tabel}$, maka H_0 ditolak atau H_1 diterima.