

## BAB III

### MATERI DAN METODE

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

#### 3.1. Materi Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi termos penampung cairan rumen sapi, kain untuk memeras isi rumen, timbangan analitik kapasitas 200 g dengan ketelitian 0,0001 g untuk menimbang bahan yang digunakan, gelas ukur untuk mengukur kebutuhan bahan yang digunakan dan pisau untuk memotong limbah. Peralatan analisis bakteri *Coliform* dan *Salmonella* meliputi tabung reaksi, rak tabung, lampu spiritus, batang *triangle*, cawan petri, mikro pipet 1000 µl, mikro pipet 100 µl, *yellow tip*, *blue tip*, inkubator dan kertas label. *Colony counter* digunakan untuk menghitung jumlah *Coliform* pada cairan rumen.

Bahan yang digunakan untuk membuat ELSF mengacu pada Dewi (2007) yang disitasi oleh Utama dan Mulyanto (2009) yaitu 80% limbah kubis dan 20% limbah sawi, molases sebanyak 6,4 % dan garam 8% dari total limbah sayur yang digunakan; selanjutnya cairan rumen 750 ml, pollard sebanyak 200 gr dan aquadest. Bahan yang digunakan untuk analisis sampel adalah NaCl fisiologis steril dan medium agar. Analisis *Coliform* menggunakan medium EMBA (Eosin Methylene

Blue Agar), sedangkan analisis *Salmonella* menggunakan medium MC (MacConkey). Bahan penyusun EMBA dan MC disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Susunan Medium EMBA dan MC

Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)		MacConkey (MC)	
Pepton	10 g	Pepton	17 g
Laktosa	5 g	Protease Pepton	3 g
Sukrosa	5 g	Laktosa	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2g	Bile salts no.3	1,5 g
Agar	13,5 g	NaCl	5 g
Eosin-Y	0,4 g	Agar	13,5 g
Methylene Blue	0,065 g	Neutral red	0,03 g
Air	1 liter	Kristal violet	0,001 g
		Air	1 liter

### 3.2. Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan tiga tahap. Tahap I pembuatan ELSF dan penyiapan cairan rumen; tahap II membuat starter dengan bahan ELSF, cairan rumen dan pollard; tahap III evaluasi produk starter terhadap keberadaan *Coliform* dan *Salmonella*.

Tahap pertama adalah pembuatan ELSF. Skema proses pembuatan ELSF secara lengkap tersaji pada Lampiran 1. Perhitungan penambahan garam dan molasses secara lengkap tersaji pada Lampiran 2. Pembuatan ELSF mengacu pada metode Dewi (2007) yang disitasi oleh Utama dan Mulyanto (2009) yaitu limbah sayur (kubis 80% dan sawi 20%) sebanyak 4 kg. Limbah sayur selanjutnya dipotong-potong berukuran  $\pm 5$  cm. Garam ditambahkan sebanyak 8% dan molasses sebanyak 6,4%. Ketiga bahan tersebut dicampur hingga homogen, selanjutnya

dimasukkan ke dalam silo/fermentor kemudian dipadatkan dan ditutup rapat hingga menciptakan keadaan *anaerob*. Pemeraman dilakukan selama 6 hari kemudian diambil ekstraknya dengan cara diperas di dalam kain tipis. Langkah selanjutnya cairan rumen disiapkan. Termos penampung cairan rumen dikondisikan agar suhu di dalamnya menjadi 39°C. Cairan rumen diambil dengan cara diperas menggunakan kain kemudian ditampung ke dalam termos yang telah dikondisikan.

Tahap II yaitu pembuatan starter. Pollard disiapkan sebanyak 3,5 kg kemudian dioven pada suhu 105°C selama 4 jam, kemudian dihitung kadar airnya. Penambahan air, cairan rumen dan ELSF secara lengkap tersaji pada Lampiran 3. Pollard masing – masing 200 g sebanyak 16 sampel ditambah aquadest, cairan rumen dan ELSF sesuai perlakuan dan dicampur rata, selanjutnya diperam selama 0 dan 48 jam. Tahap pembuatan starter secara lengkap tersaji pada Lampiran 4.

Tahap ketiga adalah evaluasi produk starter. Sampel 0 dan 48 jam dianalisis untuk mengetahui keberadaan *Coliform* dan *Salmonella*. Metode analisis *Coliform* dan *Salmonella* dilakukan secara kualitatif (keberadaan). Metode analisis mengacu pada Fardiaz (1989).

**Analisis bakteri *Coliform*.** Sampel segar (0 jam) dan sampel yang telah diperam (48 jam) diambil 1 gram, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis steril sebanyak 5 ml. Sampel diencerkan, sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$  kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl fisiologis, selanjutnya dihomogenkan sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ . Larutan hasil pengenceran  $10^{-1}$  dan  $10^{-2}$  diambil 0,01 ml kemudian masing-masing dituangkan ke dalam cawan petri yang berisi medium EMBA. Sampel diratakan

menggunakan *triangle* agar merata ke seluruh permukaan medium. Cawan petri ditutup kemudian dimasukkan ke dalam inkubator dengan posisi terbalik selama 48 jam dengan suhu 37°C. Cawan petri diambil dan diamati koloni yang tumbuh. Bakteri *Coliform* pada media akan terlihat seperti titik berwarna merah (Destriyana *et al.*, 2013).

**Analisis bakteri *Salmonella*.** Sampel segar (0 jam) dan sampel yang telah diperam (48 jam) diambil 1 gram, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis sebanyak 5 ml. Sampel diencerkan, sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$  kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl fisiologis, selanjutnya dihomogenkan sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ . Larutan hasil pengenceran  $10^{-1}$  dan  $10^{-2}$  diambil 0,01 ml kemudian masing-masing dituangkan ke dalam cawan petri yang berisi medium MC. Sampel diratakan menggunakan *triangle* agar merata ke seluruh permukaan medium. Cawan petri ditutup kemudian dimasukkan ke dalam inkubator dengan posisi terbalik selama 48 jam dengan suhu 37°C. Cawan petri diambil dan diamati koloni yang tumbuh. Pengamatan secara makroskopis dicirikan koloni bakteri bulat transparan dengan titik hitam di tengahnya. Pengamatan secara mikroskopis memiliki morfologi berwarna merah berbentuk batang. Reaksi positif ditunjukkan oleh perubahan warna dari kuning menjadi merah bata setelah diinkubasikan pada temperatur 37°C selama 24 jam (Kunarso, 1987).

### 3.3. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak lengkap (RAL) pola Faktorial (2x4) dengan 4 ulangan. Faktor pertama adalah lama pemeraman yaitu P0 (0 jam) dan P1 (48 jam). Faktor kedua adalah rasio pemberian ELSF : cairan rumen yaitu T0 (0:0), T1 (20:10), T2 (20:20) dan T3 (10:20). Kombinasi perlakuannya sebagai berikut:

P0T0 = Lama peram 0 jam dan ELSF : cairan rumen (0 : 0)

P0T1 = Lama peram 0 jam dan ELSF : cairan rumen (20 : 10)

P0T2 = Lama peram 0 jam dan ELSF : cairan rumen (20 : 20)

P0T3 = Lama peram 0 jam dan ELSF : cairan rumen (10 : 20)

P1T0 = Lama peram 48 jam dan ELSF : cairan rumen (0 : 0)

P1T1 = Lama peram 48 jam dan ELSF : cairan rumen (20 : 10)

P1T2 = Lama peram 48 jam dan ELSF : cairan rumen (20 : 20)

P1T3 = Lama peram 48 jam dan ELSF : cairan rumen (10 : 20)

### 3.4. Analisis Data

Data yang diperoleh ditransformasi menjadi data kuantitatif dengan metode skoring. Data selanjutnya dianalisis menggunakan analisis ragam dan apabila hasil uji F menunjukkan pengaruh nyata ( $p < 0,05$ ), maka untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji jarak ganda Duncan (Steel dan Torrie, 1991). Dasar skoring sebagai berikut: Skor 1 : tidak terdapat bakteri *Coliform* dan *Salmonella*; Skor 2 : tidak terdapat bakteri *Coliform* terdapat *Salmonella*; dan Skor 3 : terdapat bakteri *Coliform* tidak terdapat *Salmonella*.

### 3.5. Hipotesis Statistik

Hipotesis statistik yang digunakan adalah :

a)  $H_0 : (\alpha\beta)_{ij} = 0 \rightarrow$  yang berarti tidak ada pengaruh interaksi antara rasio perbedaan ELSF:cairan rumen dengan lama pemeraman terhadap keberadaan *Coliform* dan *Salmonella*

$H_1$  : minimal ada satu  $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$ , yang berarti ada pengaruh interaksi antara rasio perbedaan ELSF:cairan rumen dengan lama pemeraman terhadap keberadaan *Coliform* dan *Salmonella*

b)  $H_0 : \alpha_i = 0 \rightarrow$  yang berarti tidak ada pengaruh rasio perbedaan ELSF:cairan rumen terhadap keberadaan *Coliform* dan *Salmonella*

$H_1$  : minimal ada satu  $\alpha_i \neq 0$ , yang berarti ada pengaruh rasio perbedaan ELSF:cairan rumen terhadap keberadaan *Coliform* dan *Salmonella*

c)  $H_0 : \beta_j = 0 \rightarrow$  yang berarti tidak ada pengaruh lama pemeraman terhadap keberadaan *Coliform* dan *Salmonella*

$H_1$  : minimal ada satu  $\beta_j \neq 0$ , yang berarti ada pengaruh lama pemeraman terhadap keberadaan *Coliform* dan *Salmonella*

Kriteria pengujian yaitu :

F hitung < F tabel maka  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak

F hitung  $\geq$  F tabel maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima