

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian pengaruh penyimpanan dan jenis bahan pengemas terhadap populasi bakteri asam laktat serta keberadaan bakteri gram pada pelet *calf starter* yang ditambah limbah kubis terfermentasi dilaksanakan pada bulan juni – agustus 2016 waktu pelaksanaan selama 8 minggu di Laboratorium Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro dan Laboratorium Mikrobiologi Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang.

3.1. Materi

Materi penelitian yang digunakan meliputi bahan pakan dan peralatan. Bahan pakan yang digunakan untuk pembuatan *calf starter* (CS) antara lain jagung giling, bekatul, bungkil kedelai, molasses, mineral mix, limbah kubis, 6% gula pasir dan 6,4% garam, aquadest, medium MRS agar (*de man rogosa sharpe* agar), 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 yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau untuk mencacah limbah kubis, blender untuk menghaluskan limbah kubis, baskom untuk tempat mencampur kubis dengan garam dan gula, mesin *extruder*, nampan untuk tempat pelet, kompor dan dandang untuk mengukus *calf starter*, plastik untuk tempat limbah kubis fermentasi, mesin pengering (inkubator). Peralatan untuk analisis

meliputi oven, *autoclaf*, pipet hisap, kertas hisap, erlenmeyer, kertas pembungkus, kapas, alkohol, aluminium foil, timbangan elektrik 100 g dengan ketelitian 0,0001, beker glass, gelas ukur, api busen, cawan petri, mikroskop, gelas objek, inkubator, pipet ukur, tabung rekasi dan rak tabung, gelas ukur, mikro pipet, jarum ose, water bath, *elektrik stirer*, jarum inkulum, *qubic colony counter* dan kaca objek.

3.2. Metode

3.2.1. Prosedur Penelitian

Penelitian tahap persiapan meliputi pengadaan bahan pakan, peminjaman peralatan untuk *pelleting*, pengadaan jenis kemasan. Penyeragaman ukuran partikel bahan pakan menjadi bentuk tepung dilakukan untuk mempermudah pencampuran serta didapatkan hasil pencampuran yang homogen.

Penelitian tahap pelaksanaan meliputi pembuatan limbah kubis fermentasi, dan pembuatan pelet *calf starter*. Pembuatan limbah kubis fermentasi yaitu limbah kubis dipotong kecil-kecil, limbah kubis dihaluskan dengan cara di blender. Penambahan garam 6% dan gula 6,4% berdasarkan berat dari kubis yang dibutuhkan. Campuran limbah kubis, garam dan gula dibungkus dengan menggunakan plastik dengan kondisi *anaerob*, kemudian diperam selama 6 hari. Pembuatan pelet meliputi beberapa proses, diantaranya adalah *mixing*, *steaming*, *cooling* dan *pelleting*. Proses pembuatan *calf starter* dilakukan dengan mencampur beberapa bahan baku pakan, yaitu jagung giling, bekatul, bungkil kedelai dan mineral mix. Penyusunan formula *calf starter* disusun berdasarkan

Parakkasi (1999) dengan kebutuhan PK 20%. Formulasi ransum disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Formula *calf starter* berdasarkan Bahan Kering.

Bahan Pakan	Kadar
	------(%)-----
Jagung giling	43
Bekatul	25,5
Bungkil Kedelai	26
Molases	5
Mineral mix	0,5
Kandungan zat gizi	
- Protein Kasar	19,62
- TDN	79,41

Mukodiningsih dkk. (2010).

Penambahan aquades 60% dari berat pakan yang dibuat, yaitu 1800 ml aquades dalam 3 kg pembuatan pelet *calf starter*. Pakan yang sudah tercampur homogen ditambahkan molases 5% (v/w) sebagai binder yang sudah diencerkan dalam 900 ml air (50% dari 1800 ml air / 3kg *calf starter*). Selanjutnya dilakukan *conditioning* pada suhu 80 °C selama ± 10 menit kemudian diangin-anginkan hingga suhu turun menjadi 35 °C. Pakan *calf starter* yang sudah turun suhunya ditambahkan dengan LKF 6%. Penambahan LKF 6% (w/w) sebelum dicampur pada pakan diencerkan dahulu dalam 900 ml aquades (50% dari 1800 ml air / 1 kg *calf starter*). Pakan dicetak pada mesin *pelleter* dengan lubang berdiameter 5 mm dan panjang 1-1,5 cm. Pengeringan pelet dilakukan selama 2-3 hari dengan suhu 35°C – 39°C menggunakan mesin pengering. Setelah pelet kering dengan kandungan kadar air >14%, kemudian pelet di kemas sesuai dengan kemasan yang digunakan seperti pengemas plastik berbahan *high density polyethylene* (HDPE)

dengan ketebalan 0,8 mm dan pengemas kertas menggunakan pengemas kertas semen kemudian ditutup rapat dan selanjutnya disimpan sesuai dengan perlakuan.



Ilustrasi 1. Bahan Pengemas B1 (pengemas plastik) dan B2 (pengemas kertas)

3.2.2. Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap pola faktorial 4×2 dengan 3 ulangan, faktor A adalah lama penyimpanan A1 penyimpanan 0 minggu, A2 lama penyimpanan 2 minggu, A3 lama penyimpanan 4 minggu, A4 lama penyimpanan 6 minggu dan faktor B yaitu faktor pengemas yaitu B1 adalah pengemas plastik, B2 pengemas kertas. Masing- masing kemasan diisi dengan *calf starter* sebanyak 250 gram dengan rincian perlakuan sebagai berikut.

A1B1 : 100% *calf starter* + 6% limbah kubis difermentasi (*w/w*) penyimpanan 0 minggu, pengemas plastik

A2B1 : 100% *calf starter* + 6% limbah kubis difermentasi (w/w) penyimpanan 2 minggu, pengemas plastik

A3B1 : 100% *calf starter* + 6% limbah kubis difermentasi (w/w) penyimpanan 4 minggu, pengemas plastik

A4B1 : 100% *calf starter* + 6% limbah kubis difermentasi (w/w) penyimpanan 6 minggu, pengemas plastik

A1B2 : 100% *calf starter* + 6% limbah kubis difermentasi (w/w) penyimpanan 0 minggu, pengemas kertas

A2B2 : 100% *calf starter* + 6% limbah kubis difermentasi (w/w) penyimpanan 2 minggu, pengemas kertas

A3B2 : 100% *calf starter* + 6% limbah kubis difermentasi (w/w) penyimpanan 4 minggu, pengemas kertas

A4B2 : 100% *calf starter* + 6% limbah kubis difermentasi (w/w) penyimpanan 6 minggu, pengemas kertas

3.2.3. Parameter Penelitian

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*). Perhitungan total bakteri asam laktat diawali dengan perbandingan 1:9. Pengenceran pertama, yaitu 5 gram sampel diencerkan ke dalam 45 ml aquades. Pengenceran kedua, yaitu 1 ml sampel hasil pengenceran

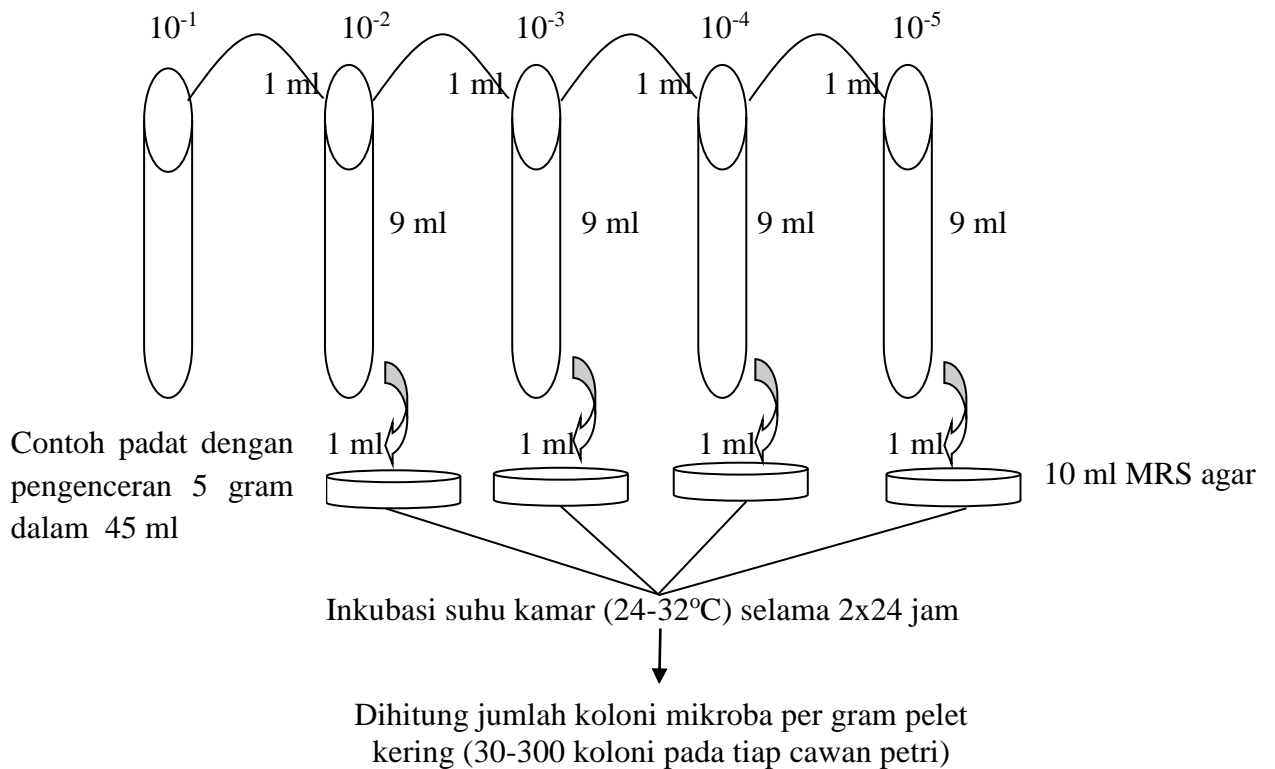
pertama dipipet ke dalam 9 ml aquades steril. Pengenceran ketiga dan seterusnya dilakukan dengan cara sama pada pengenceran kedua.

Medium yang digunakan untuk tumbuh BAL adalah MRS agar. Pembuatan MRS agar meliputi 6,6 gram MRS agar dilarutkan ke dalam 100 ml aquades, kemudian larutan MRS agar yang telah disterilisasikan dalam *autoclave* 121°C selama 15 menit. MRS agar yang telah disterilisasikan dituangkan 10 ml ke cawan petri. Proses penuangan MRS agar ke dalam cawan petri, tutup cawan tidak boleh dibuka terlalu lebar untuk menghindari kontaminasi dari luar. Cawan yang sudah berisi MRS agar digerakkan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel mikroorganisme secara merata, yaitu dengan gerakan angka delapan. MRS agar yang telah memadat dalam cawan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 48 jam.

Perhitungan mikroorganisme dilakukan setelah masa inkubasi dengan alat *quebec colony counter*. Perhitungan koloni dengan metode (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 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 penumpukan menghasilkan kurang dari 30 koloni pada cawan petri, perhitungan hanya pada

jumlah koloni pada pengenceran terendah; 3) jika semua pengenceran untuk penumpukan 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. Gambaran tahapan metode penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada ilustrtasi 1. Perhitungan total bakteri asam laktat sesuai dengan Fardiaz (1993) dengan rumus :

$$\text{Jumlah bakteri} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$



Ilustrasi 2. Metode Hitung Cawan Tuang

Bakteri gram positif dan bakteri gram negatif pada pelet diamati dengan loop kultur cair pada gelas obyek disebar, sehingga mencapai diameter 1 – 1,5 cm² dan dikering anginkan lalu difiksasi dengan nyala api kecil. Pewarna violet kristal diteteskan 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 5 = terdapat 3 gram positif dan 0 gram negatif

Skor 4 = terdapat 2 gram positif dan 0 gram negatif

Skor 3 = terdapat 1 gram positif dan 0 gram negatif

Skor 2 = terdapat 3/2/1 gram positif dan 1 gram negatif

Skor 1 = terdapat 3/2/1 gram positif dan 2/3 gram negatif

Skor 0 = terdapat 0 gram positif dan 0 gram negatif

3.4. Analisis Statistik

Data hasil penelitian yang diperoleh dengan parameter total bakteri asam laktat, dan keberadaan bakteri gram pada pelet *calf starter* dengan lama penyimpanan dan bahan pengemas. Parameter total bakteri asam laktat, data yang diperoleh ditransformasi menggunakan *log*. Parameter keberadaan bakteri gram, data yang diperoleh diberikan skor sesuai ketentuan, kemudian ditransformasi menggunakan transformasi $(\sqrt{x + 0,5})$.

Data hasil transformasi dianalisis menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) jika ada pengaruh ($P < 0,05$) maka dilakukan uji lanjut dengan uji wilayah ganda Duncan (Mattjik dan Sumertajaya, 2000).

Model linier dari Rancangan Acak Lengkap pola faktorial sebagai berikut :

$$Y_{ijn} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \sum_{ijk}$$

Keterangan :

Y_{ijn} = Nilai pengamatan uji total populasi bakteri asam laktat dan keberadaan bakteri gram pada faktor A taraf ke-i faktor B taraf ke-j dan ulangan ke-n.

μ = Rataan umum lama penyimpanan dan bahan pengemas.

α_i = Pengaruh lama penyimpanan (0, 2,4 dan 6 minggu) ke-i.

β_j = Pengaruh bahan pengemas plastik, dan pengemas kertas ke-j.

$\alpha\beta_{ij}$ = Pengaruh interaksi lama penyimpanan ke-i dengan bahan pengemas ke-j.

\sum_{ijk} = Pengaruh komponen galat akibat pengaruh lama penyimpanan ke-i dengan bahan pengemas ke-j dan ulangan ke-n.

Hipotesis Statistik penelitian adalah :

a) $H_0 : (\alpha\beta)_{ij}$, tidak ada interaksi lama penyimpanan dengan jenis bahan pengemas terhadap total populasi bakteri asam laktat dan keberadaan bakteri gram pelet *calf starter* yang ditambah limbah kubis terfermentasi.

H_1 : minimal ada satu $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$, paling tidak ada satu interaksi antara lama penyimpanan dengan jenis bahan pengemas terhadap total populasi bakteri asam laktat dan keberadaan bakteri gram pelet *calf starter* yang ditambah limbah kubis terfermentasi.

b) $H_0 : \alpha_1 = 0$, tidak ada pengaruh lama penyimpanan terhadap total populasi bakteri asam laktat dan keberadaan bakteri gram pelet *calf starter* yang ditambah limbah kubis terfermentasi.

H_1 : minimal ada satu $\alpha_1 \neq 0$, paling tidak ada satu pengaruh lama penyimpanan terhadap terhadap total populasi bakteri asam laktat dan keberadaan bakteri gram pelet *calf starter* yang ditambah limbah kubis terfermentasi.

c) $H_0 : \beta_1 = 0$, tidak ada pengaruh jenis bahan pengemas terhadap total populasi bakteri asam laktat dan keberadaan bakteri gram pelet *calf starter* yang ditambah limbah kubis terfermentasi.

H_1 : minimal ada satu $\beta_1 \neq 0$, paling tidak ada satu pengaruh jenis bahan pengemas terhadap total populasi bakteri asam laktat dan keberadaan bakteri gram pelet *calf starter* yang ditambah limbah kubis fermentasi.

Kriteria pengujian penelitian adalah :

Apabila $F_{hitung} < F_{Tabel}$ dengan $\alpha = 0,05$ maka H_0 diterima dan H_1 ditolak.

Apabila $F_{hitung} \geq F_{Tabel}$ dengan $\alpha = 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima.