

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober sampai dengan Desember 2016 di Laboratorium Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang akan digunakan dalam penelitian adalah limbah penetasan (telur gagal tetas, cangkang telur, dan DOC afkir), zeolit serta onggok. Alat yang digunakan adalah ember dan plastik, blender, mesin pengering, *pelleter*, peralatan analisis mikroba (tabung reaksi, cawan petri, pipet ukur, bunsen, spinball, inkubator, *Chromocul Coliform Agar* (CCA) MacConkey Agar).

3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian dibagi menjadi empat, yaitu rancangan percobaan, prosedur penelitian, pengumpulan data, dan parameter yang diamati.

3.2.1. Rancangan percobaan

Rancangan percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan pola faktorial 2x3 dan 3 kali ulangan. Faktor perlakuan yang diterapkan pertama adalah penambahan zeolit, yaitu Z0 berupa penambahan zeolit 0% dan Z1 berupa penambahan zeolit 3%. Faktor perlakuan kedua, yaitu penyimpanan

berturut-turut 4, 8 dan 12 minggu (T1, T2, dan T3). Berikut merupakan kombinasi antara perlakuan zeolit dan lama penyimpanan :

Z0T1 : pellet dengan kadar zeolit 0% dan lama penyimpanan 4 minggu

Z0T2 : pellet dengan kadar zeolit 0% dan lama penyimpanan 8 minggu

Z0T3 : pellet dengan kadar zeolit 0% dan lama penyimpanan 12 minggu

Z1T1 : pellet dengan kadar zeolit 3% dan lama penyimpanan 4 minggu

Z1T2 : pellet dengan kadar zeolit 3% dan lama penyimpanan 8 minggu

Z1T3 : pellet dengan kadar zeolit 3% dan lama penyimpanan 12 minggu

Menurut Steel dan Torrie (1991) model linear yang digunakan berdasar pada rancangan acak lengkap pola faktorial dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad ; \quad i = (1,2) \quad j = (1,2,3,4) \quad k = (1,2,3)$$

Keterangan:

- Y_{ijk} : Kandungan *Coliform* dan *Salmonella* pada pellet limbah penetasan pada petak percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij (taraf ke-i dari penambahan zeolit dari penambahan dan taraf ke-j dari lama penyimpanan)
- μ : Nilai tengah umum kandungan *Coliform* dan *Salmonella* pellet limbah penetasan
- A_i : Pengaruh aditif dari penambahan zeolit ke-i
- β_j : Pengaruh aditif dari lama penyimpanan ke-j
- (αβ)_{ij} : Pengaruh interaksi antara penambahan zeolit ke-i dan lama penyimpanan ke-j
- ε_{ijk} : Pengaruh galat percobaan pada petak percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

3.2.2. Prosedur penelitian

Tahap persiapan dengan survei dan perizinan ke perusahaan Hatchery, persiapan bahan dan pengumpulan bahan. Zeolit yang masih berbentuk batu terlebih dahulu dihaluskan, serta mengayak ongkok. Tahap pengolahan diawali

dengan memisahkan masing-masing komponen yang digunakan, komposisi limbah penetasan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Limbah Penetasan

Jenis Limbah	Persentase limbah -----(%)------
Cangkang telur	30
Telur gagal menetas	60
DOC afkir	10

Pembuatan pellet mengacu pada Sulistiyanto dkk. (2016). Limbah penetasan ayam yang terdiri atas cangkang telur (30%), telur gagal menetas (60%) dan DOC afkir (10%), dihancurkan dengan menggunakan Blender Glass 1,5L Miyako 3 in 1 300W tipe BL152GF. *Filler* (bahan pengisi) berupa onggok 10% (B/B) ditambahkan dan dicampur rata. Bahan yang telah tercampur rata selanjutnya ditambahkan zeolit 3% (B/B), dicampur hingga rata, kemudian dilanjutkan dengan proses *conditioning* (80-90°C selama 15 menit). Pencetakan pellet dilakukan dengan menggunakan ekstruder dengan spesifikasi Gear Box 1:30 ukuran 50, dengan ukuran diameter lubang cetakan 6 mm dan panjang pellet 3 cm. Pengeringan pelet menggunakan mesin pengering aliran udara panas (*air dryer*) dengan suhu 40-45°C, sampai kadar air pellet berkisar antara 10-15% (± 24 jam). Penyimpanan pellet dilakukan dengan cara memasukkannya ke dalam botol jam ukuran 200 ml, menutup botolnya dan menyimpannya pada suhu ruangan antara 20-25°C untuk lama waktu yang berbeda, yaitu penyimpanan selama 4, 8, dan 12 minggu.

3.2.3. Pengumpulan data

Metode perhitungan jumlah koloni mengikuti *Standard Plate Count* (Fardiaz, 1993). Uji bakteri *Coliform* sampel pellet limbah penetasan dimulai dengan menyiapkan 4 tabung reaksi yang telah disterilkan dan memberi tanda pada masing-masing tabung dengan tanda 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} , kemudian masing-masing tabung diisi dengan 9 cc NaCl 0,85 steril secara aseptis, sampel pellet dihaluskan dan menimbang seberat 1 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan label 10^{-1} dan dihomogenkan, setelah homogen ambil 1 cc dari tabung tersebut, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan label 10^{-2} dan homogenkan. Dari tabung tersebut ambil 1 cc, masukan ke dalam tabung reaksi dengan label 10^{-3} dan homogenkan. Tabung terakhir diambil 1 cc terakhir dan masukan pada tabung reaksi dengan label 10^{-4} dan homogenkan. Cawan petri yang telah disterilkan sebanyak 4 buah kemudian diberi label tanda 10^{-2} sampai dengan 10^{-4} dan 1 blangko. Masing-masing pipet sesuai dengan label diambil 0,1 cc dan dituangkan ke dalam cawan petri sesuai dengan label yang telah diberikan, pada blangko dimasukkan 0,1 cc NaCl 0,85 secara steril. *Chromocul Coliform Agar* (CCA) suhu $40-42^{\circ}\text{C}$ sebanyak ± 15 cc ditambahkan dan dihomogenkan, diamkan agar sampai membeku. Inkubasi media dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Penghitungan jumlah koloni *Coliform* yang tumbuh pada setiap pengenceran dengan mengikuti *Standard Plate Count* (SPC).

Uji *Salmonella* menggunakan metode Fardiaz (1993) dimulai dengan menghaluskan sampel kemudian menimbang 1 g sampel yang telah halus serta melarutkannya ke dalam media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*) sampai larut

sempurna. Sampel diinokulasikan menggunakan jarum ose yang sudah dilarutkan pada media MacConkey. Media MacConkey diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dalam inkubator. Koloni yang tumbuh pada media kemudian diamati, koloni *Salmonella* pada media Mac Conkey memiliki ciri-ciri berbentuk bulat, berwarna putih, tepi berlobang, elevas cembung dan konsistensi lunak. Koloni yang memiliki ciri tersebut kemudian diambil dengan jarum ose dan diinokulasikan pada media uji biokimia. Media uji biokimia di inkubasi selama 17-24 jam dalam ikubator. Hasil uji biokimia dapat dibaca dengan menambahkan 5 tetes Kovack's pada media indol, 5 tetes Alfa naphtol 5% dan KOH keratin 40% masing masing 5 tetes pada media *Voges-Proskauer* (VP) dan menambahkan 5 tetes reagen *Methyl Red* (MR) pada media MR.

3.2.4. Parameter penelitian

Parameter penelitian adalah kandungan bakteri *Coliform* dan *Salmonella* pada pellet limbah penetasan dengan aditif zeolit pada lama penyimpanan yang berbeda ditinjau dari segi keamanan pakan ternak, sebagai berikut :

1. Pengujian Kandungan Bakteri Coliform

Perhitungan jumlah koloni bakteri *Coliform* menggunakan metode *Standard Plate Count* (SPC) (Fardiaz, 1993).

2. Pengujian Keberadaan Bakteri *Salmonella*

Pengamatan bentuk koloni *Salmonella* dengan ciri spesial (berbentuk bulat, berwarna putih, tepi berlubang, elevas cembung dan konsistensi lunak) menggunakan metode Fardiaz (1993).

3.3. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis varian (*Analysis of Variance/ANOVA*) taraf signifikansi 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Bila terdapat pengaruh nyata antar perlakuan diuji lebih lanjut dengan uji wilayah ganda Duncan guna mengetahui letak perbedaan antar perlakuan (Steel dan Torie, 1991).

Hipotesis statistika dari penelitian ini adalah:

- a. $H_0 : (\alpha\beta)_{ij} = 0$, berarti tidak ada interaksi antara penambahan zeolit dengan lama penyimpanan terhadap *Coliform* dan *Salmonella* pellet limbah penetasan.

H_1 : minimal ada satu $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$, ada interaksi antara penambahan zeolit dengan lama penyimpanan terhadap kandungan *Coliform* dan *Salmonella* pellet limbah penetasan.
- b. $H_0 : \alpha_i = 0$, berarti tidak ada pengaruh penambahan zeolit terhadap kandungan *Coliform* dan *Salmonella* pellet limbah penetasan.

H_1 : minimal ada satu $\alpha_i \neq 0$, minimal ada satu penambahan zeolit yang dapat mempengaruhi kandungan *Coliform* dan *Salmonella* pellet limbah penetasan.
- c. $H_0 : \beta_j = 0$, berarti tidak ada pengaruh lama penyimpanan terhadap kandungan *Coliform* dan *Salmonella* pellet limbah penetasan.

H_1 : minimal ada satu $\beta_j \neq 0$, minimal ada satu dari lama penyimpanan yang dapat mempengaruhi kandungan *Coliform* dan *Salmonella* pellet limbah penetasan.

Menurut Steel dan Torrie (1991) kaidah keputusan yang harus diambil adalah:

a. Pengaruh interaksi

- Apabila $F_{hitung} \text{ Zeolit (Z) x Waktu penyimpanan (T)} < F_{tabel}$ pada taraf 5% maka tidak terjadi interaksi yang nyata antara faktor Z dengan faktor T (non signifikan).
- Apabila $F_{hitung} \text{ ZxT} \geq F_{tabel}$ pada taraf 5% maka terdapat interaksi yang nyata antara faktor Z dengan faktor T (signifikan).

b. Pengaruh Penambahan Zeolit

- Apabila $F_{hitung} \text{ Z} < F_{tabel}$ pada taraf 5% maka faktor Z tidak berpengaruh nyata (non signifikan).
- Apabila $F_{hitung} \text{ Z} \geq F_{tabel}$ pada taraf 5% maka faktor Z berpengaruh nyata (signifikan).

c. Pengaruh Lama Penyimpanan

- Apabila $F_{hitung} \text{ T} < F_{tabel}$ pada taraf 5% maka faktor T tidak berpengaruh nyata (non signifikan).
- Apabila $F_{hitung} \text{ T} \geq F_{tabel}$ pada taraf 5% maka faktor T berpengaruh nyata (signifikan).