

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus - Desember 2017 di Laboratorium Teknologi Pakan dan Laboratorium Ilmu Nutrisi Ternak, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang.

#### **3.1. Materi**

Materi yang digunakan yaitu limbah penetasan (cangkang telur, telur gagal menetasan DOC afkir), bentonit dan onggok. Alat yang digunakan adalah Mesin tanur, cawan porselin, timbangan digital, ember dan plastik, blender, mesin pengering, pelleter, peralatan analisis mikroba (tabung reaksi, cawan petri, pipet ukur, Bunsen, *spinball*, inkubator, *Chormucul Coliform Agar* (CCA), MacConkey, media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB).

#### **3.2. Metode**

Metode penelitian dibagi menjadi empat yaitu rancangan penelitian, prosedur penelitian, parameter penelitian dan analisis data.

##### **3.2.1. Rancangan percobaan.**

Penelitian dilaksanakan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 2 x 4, faktor pertama A1 yaitu suhu aktivasi bentonit 300°C dan A2 yaitu

600°C. Faktor kedua yaitu B level bentonit, B0 0%, B1 1%, B2 3%, B3 5% dengan masing-masing 3 ulangan.

Berikut merupakan kombinasi antara perlakuan bentonit diaktivasi dan level bentonit :

A1B0 : Pellet dengan bentonit diaktivasi 300°C dan tanpa bentonit (0%)

A1B1 : Pellet dengan bentonit diaktivasi 300°C dan level bentonit 1%.

A1B2 : Pellet dengan bentonit diaktivasi 300°C dan level bentonit 3%.

A1B3 : Pellet dengan bentonit diaktivasi 300°C dan level bentonit 5%.

A2B0 : Pellet dengan bentonit diaktivasi 600°C dan tanpa bentonit (0%)

A2B1 : Pellet dengan bentonit diaktivasi 600°C dan level bentonit 1%.

A2B2 : Pellet dengan bentonit diaktivasi 600°C dan level bentonit 3%.

A2B3 : Pellet dengan bentonit diaktivasi 600°C dan level bentonit 5%.

Model linier yang digunakan berdasarkan Steel dan Torrie (1991) dengan rancangan acak lengkap pola faktorial dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

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

Keterangan :

$Y_{ijk}$  : Nilai pengamatan pada faktor perlakuan A (pemanasan bentonit) ke-dan faktor perlakuan B (kombinasi level bentonit) ke-j dan ulangan ke-k.

$M$  : Nilai tengah umum pengamatan kandungan total bakteri *Coliform* dan *Salmonella*.

$\alpha_i$  : Pengaruh pemanasan bentonit ke-i

$\beta_j$  : Pengaruh kombinasi level bentonit ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$  : Pengaruh interaksi antara pemanasan bentonit ke-i dan kombinasi level bentonit ke-j

$\epsilon_{ijk}$  : Pengaruh galat percobaan ke k memperoleh kombinasi perlakuan ke-ij

### **3.2.2. Prosedur penelitian.**

#### **Aktivasi bentonit**

Metode aktivasi mineral bentonit mengacu pada Kurniasari (2010) dengan cara pemanasan menggunakan alat tanur. Bentonit disiapkan, kemudian dibagi menjadi dua bagian, yaitu bentonit dipanaskan dengan suhu 300°C dan bentonit dipanaskan 600°C. Masing-masing bentonit yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 600g. Proses aktivasi dimulai dari penimbangan bentonit terlebih dahulu dengan menggunakan cawan porselin sebanyak 5 g. Cawan porselin yang sudah terisi bentonit dimasukkan kedalam mesin tanur. Suhu mesin tanur diatur sesuai kebutuhan, yaitu 300°C dan 600°C selama 6 jam. Mesin tanur dimatikan setelah 6 jam, kemudian 6 jam berikutnya bentonit teraktivasi siap dikemas. Proses selanjutnya setelah bentonit dipanaskan yaitu dicampurkan kedalam pelet limbah penetasan.

#### **Pembuatan pellet limbah penetasan**

Pembuatan pellet limbah penetasan mengacu pada Sulistiyanto *et al.*, (2016). Limbah penetasan terdiri atas cangkang telur 30% (1,8 kg), DOC afkir 10% (0,6 kg) dan telur gagal menetas 60% (3,6 kg) total berat ketiga komponen tersebut 6,6 kg untuk satu ulangan. Ketiga komponen tersebut kemudian dicampur ongkok 10% dari berat total campuran limbah penetasan. Bentonit yang sudah diaktivasi ditambahkan kedalam campuran limbah penetasan sebanyak 1%, 3% dan 5% dari berat total limbah yang diolah, kemudian adonan dibagi menjadi 8

bagian dengan berat masing-masing 750 gram. Pencetakan pellet dilakukan menggunakan ekstruder ukuran 32, Gear Box 1:3 ukuran 50, dengan ukuran diameter lubang cetakan 5 mm dan panjang pellet 3 cm. Sampel dimasukkan kedalam mesin pengering aliran udara panas (*Dry Oven*) dengan suhu 40°C sampai kadar air sampel berkisar 12% dengan lama waktu 24 jam. Sampel kering, sampel siap dikemas untuk proses uji total bakteri *Coliform* dan *Salmonella*.

### **Analisis bakteri *Coliform* dan *Salmonella***

Analisis bakteri *Coliform* dilakukan berdasarkan Badan Standard Nasional (2008), dan metode perhitungan jumlah koloni mengikuti *Standard Plate Count* (Fardiaz, 1993). Uji bakteri *Coliform* sampel pellet limbah penetasan dimulai dengan disiapkan 4 tabung reaksi yang telah disterilkan, serta diberi 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 ditimbang 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 dihomogenkan. Tabung tersebut diambil 1 cc, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan label  $10^{-3}$  dan dihomogenkan. Tabung reaksi terakhir di ambil 1 cc dan dimasukkan pada tabung reaksi dengan label  $10^{-4}$  dan dihomogenkan. Cawan petri yang telah disterilkan sebanyak 4 buah, kemudian diberi label tanda  $10^{-2}$  sampai dengan  $10^{-4}$  dan 1 blanko. Masing-masing pipet sesuai dengan label diambil 0,1 cc dan dihitung ke dalam cawan petri sesuai

dengan label yang telah diberikan, pada blanko dimasukan 0,1 cc NaCl 0,85 secara steril. *Choromucul Coliform Agar* (CCA) suhu 40°C - 21°C sebanyak ± 15 cc ditambahkan dan dihomogenkan, selanjutnya didiamkan agar sampai membeku. Inkubasi media dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Koloni *Coliform* yang tumbuh pada Media Agar memiliki ciri – ciri koloni berbentuk batang pendek, warna merah muda, agak keping, smooth dan pinggiran rata. Perhitungan jumlah koloni *Coliform* yang tumbuh pada setiap pengenceran dengan mengikuti *Standard Plate Count* (SPC) yang menjelaskan mengenai cara menghitung koloni pada cawan serta memilih data yang ada untuk menghitung jumlah koloni.

Cara menghitung koloni yaitu, cawan yang dipilih dan dihitung mengandung jumlah koloni antara 30-300. Koloni yang bergabung menjadi satu merupakan koloni yang besar dimana jumlah koloninya dapat dihitung sebagai 1 koloni. Koloni yang terlihat sebagai suatu garis tabel dihitung sebagai 1 koloni.

Data yang dilaporkan sebagai *Standard Plate Count* (SPC) harus mengikuti peraturan, peraturan pertama yaitu hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari 2 angka yaitu angka pertama didepan koma, jika angka yang ketiga sama dengan yang pertama atau lebih besar dari 5 harus dibulatkan angka lebih hingga dari angka ke dua. Peraturan kedua yaitu, jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan menghasilkan angka kurang 30 koloni pada cawan petri hanya jumlah koloni pada pengenceran terendah yang dihitung hasilnya dilaporkan sebagai < 30 dilakukan dengan besarnya pengenceran tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurang. Peraturan ke tiga yaitu, jika semua pengenceran

yang dibuat untuk pemupukan > 300 koloni pada cawan petri hanya jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung, dengan cara menghitung jumlahnya pada  $\frac{1}{4}$  cawan petri kemudian hasilnya dikalikan 4. Hasilnya dilaporkan sebagai >300 dikalikan dengan besarnya pengenceran tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung. Peraturan keempat, jika cawan dari dua tingkat pengenceran menghasilkan koloni dengan jumlah antara 30-300 dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan dua tentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan pengencerannya, jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah >2 yang dilaporkan hasil yang terkecil. Peraturan kelima, jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut tidak boleh diambil salah satu meskipun salah satu cawan duplo tersebut memenuhi syarat antara 30-300. Rumus yang digunakan dalam perhitungan adalah :

Faktor pengenceran = Pengenceran x Jumlah yang ditanam

Jumlah koloni = Jumlah yang ditanam x Faktor pengenceran

Uji *Salmonella* dilakukan berdasarkan Badan Standard Nasional (2008) dan Fardiaz (1993) dimulai dengan sampel kemudian dihaluskan ditimbang, serta dilarutkan kedalam media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) sampai larut sempurna. Media *MacConkey* diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator. Koloni yang tumbuh pada media kemudian diamati, koloni *Salmonella* pada media *MacConkey* memiliki ciri-ciri berbentuk bulat, berwarna putih, tepi berlobang, elevas cembung dan konsistensi lunak. Koloni yang memiliki ciri

tersebut kemudian diambil dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasi pada media uji biokimia. Media uji biokimia di inkubasi selama 17-24 jam dalam inkubator. Hasil uji biokimia dapat dibaca dengan menambahkan 5 tetes Kovack's pada media indol. Alfa naphthol 5% dan KOH karelin 40% masing-masing 5 tetes pada media Voges-Proskauer (VP) dan ditambahkan 5 tetes reagen Methyl Red (MR) pada media MR. *Salmonella* dinyatakan positif apabila pada media uji indol tidak terbentuk cincin merah, motil terbentuk pertumbuhan menyebar di sekitar bekas tusukan, glukosa terbentuk warna kuning serta pada tabung durham terbentuk gelembung udara, laktosa tetap merah, maltosa terbentuk warna kuning, manitol terbentuk warna kuning dan pada tabung durham terbentuk gelembung udara, urea berwarna kuning, MR terbentuk warna merah, Simon sitrat tetap hijau.

### **3.2.3. Parameter penelitian**

Parameter yang diamati kandungan bakteri *Coliform* dan *Salmonella* pellet limbah penetasan dengan ditambahkan level bentonit yang sebelumnya sudah diaktivasi 300°C dan 600°C. Metode penelitian mengacu metode Fardiaz (1993).

### **3.2.4. Analisis data**

Data dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter dengan taraf signifikansi 5%. Uji beda nyata terkecil (BNT) dilanjutkan apabila terdapat pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diamati (Yase Mas, 2009).

### 3.2.5. Hipotesis statistik

A.  $H_0$  :  $(\alpha\beta)_{ij} = 0$  (yang berarti tidak ada pengaruh interaksi antara pemanasan bentonit dengan kombinasi level bentonit yang berbeda terhadap kandungan total bakteri *Coliform* dan *Salmonella*).

$H_1$  : Minimal ada satu  $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$ , (ada pengaruh interaksi antara pemanasan bentonit dengan kombinasi level bentonit yang berbeda terhadap kandungan total bakteri *coliform* dan *Salmonella*).

B.  $H_0$  :  $\alpha_i = 0$  (yang berarti tidak ada pengaruh suhu aktivasi terhadap kandungan total bakteri *Coliform* dan *Salmonella*).

$H_1$  : Minimal ada satu  $\alpha_i \neq 0$ , minimal ada satu suhu aktivasi yang mempengaruhi kandungan total bakteri *Coliform* dan *Salmonella*

C.  $H_0$  :  $\beta_j = 0$  (yang berarti tidak ada pengaruh taraf level penambahan level bentonit terhadap kandungan total bakteri *Coliform* dan *Salmonella*).

$H_1$  : Minimal ada satu  $\beta_j \neq 0$ , minimal ada satu taraf taraf level penambahan level bentonit terhadap kandungan total bakteri *Coliform* dan *Salmonella*.

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

#### A. Pengaruh interaksi

1. Apabila  $F$  hitung suhu aktivasi bentonit (A) x level bentonit (B) <  $F$  tabel pada taraf 5% maka tidak terjadi interaksi yang nyata antara faktor A dengan faktor B terhadap parameter (non signifikan).

2. Apabila  $F$  hitung Suhu aktivasi bentonit (A) x level bentonit (B)  $\geq$   $F$  tabel pada taraf 5% maka terdapat interaksi yang nyata antara faktor A dengan faktor B terhadap parameter (signifikan).

B. Pengaruh suhu aktivasi bentonit

1. Apabila  $F$  hitung suhu aktivasi bentonit  $A < F$  tabel pada taraf 5% maka faktor A tidak berpengaruh nyata terhadap parameter (non signifikan).
2. Apabila  $F$  hitung suhu aktivasi bentonit  $A \geq F$  tabel pada taraf 5% maka faktor A berpengaruh nyata terhadap parameter (signifikan).

C. Pengaruh level bentonit

3. Apabila  $F$  hitung level bentonit  $B < F$  tabel pada taraf 5% maka faktor B tidak berpengaruh nyata terhadap parameter (non signifikan).
4. Apabila  $F$  hitung level bentonit  $B \geq F$  tabel pada taraf 5% maka faktor B berpengaruh nyata terhadap parameter (signifikan)