

KARAKTERISASI MIKROBIOLOGIS SILASE KOMBINASI *Indigofera zollingeriana* DAN *Pennisetum purpureum* cv. Mott BERDASARKAN TOTAL BAKTERI DAN GRAM POSITIF-NEGATIF

SKRIPSI

Oleh

NAURAH JILAN RAMADHAN



**PROGRAM STUDI S-1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
S E M A R A N G
2 0 2 6**

KARAKTERISASI MIKROBIOLOGIS SILASE KOMBINASI *Indigofera zollingeriana* DAN *Pennisetum purpureum* cv. Mott BERDASARKAN
TOTAL BAKTERI DAN GRAM POSITIF-NEGATIF

Oleh

NAURAH JILAN RAMADHAN
NIM : 23010119130232

Salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Peternakan pada Program Studi S-1 Peternakan
Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro

PROGRAM STUDI S-1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
S E M A R A N G
2 0 2 6

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Naurah Jilan Ramadhan
N I M : 23010119130232
Program Studi : S-1 Peternakan

dengan ini menyatakan sebagai berikut:

1. Skripsi yang berjudul **Karakterisasi Mikrobiologis Silase Kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott Berdasarkan Total Bakteri dan Gram Positif-Negatif** dan penelitian yang terkait dengan skripsi ini merupakan karya penulis sendiri.
2. Setiap ide atau kutipan dari karya orang lain berupa publikasi atau bentuk lainnya dalam skripsi ini, telah diakui sesuai dengan standar prosedur disiplin ilmu.
3. Penulis juga mengakui bahwa skripsi ini dihasilkan berkat bimbingan dan dukungan penuh dari Pembimbing yaitu: **Dr. Ir. Cahya Setya Utama, S.Pt., M.Si., IPM.** dan **Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM.**

Apabila di kemudian hari dalam skripsi ini ditemukan hal-hal yang menunjukkan telah dilakukannya kecurangan akademik, maka penulis bersedia gelar sarjana yang telah penulis dapatkan ditarik sesuai dengan ketentuan dari Program Studi S-1 Peternakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

Samarang, Agustus 2026



Naurah Jilan Ramadhan

Mengetahui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

Dr. Ir. Cahya Setya Utama, S.Pt., M.Si., IPM. Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM.

Judul Skripsi : KARAKTERISASI MIKROBIOLOGIS SILASE
KOMBINASI *Indigofera zollingeriana* DAN
Pennisetum purpureum cv. Mott BERDASARKAN
TOTAL BAKTERI DAN GRAM POSITIF-
NEGATIF

Nama Mahasiswa : NAURAH JILAN RAMADHAN

Nomor Induk Mahasiswa : 23010119130232

Program Studi/Departemen : S-1 PETERNAKAN / PETERNAKAN

Fakultas : PETERNAKAN DAN PERTANIAN

Telah disidangkan di hadapan Tim Penguji
dan dinyatakan lulus pada tanggal ... **30 JUN 2026**

Pembimbing Utama



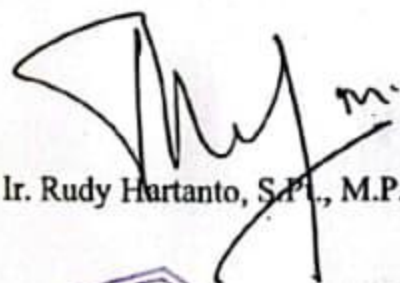
Dr. Ir. Cahya Setya Utama, S.Pt., M.Si., IPM.

Pembimbing Anggota



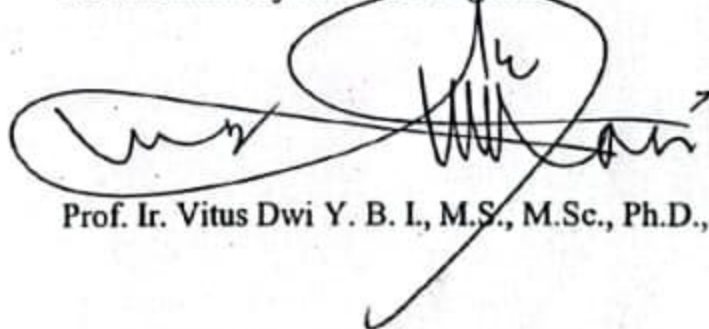
Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM.

Ketua Program Studi



Ir. Rudy Hartanto, S.Pt., M.P., Ph.D., IPM.

Ketua Panitia Ujian Akhir Program



Prof. Ir. Vitus Dwi Y. B. I., M.S., M.Sc., Ph.D., IPU.

Ketua Departemen



Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM.



Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D.

RINGKASAN

NAURAH JILAN RAMADHAN. 23010119130232. 2026. Karakterisasi Mikrobiologis Silase Kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott Berdasarkan Total Bakteri dan Gram Positif-Negatif (Pembimbing: **CAHYA SETYA UTAMA** dan **SRI SUMARSIH**).

Penelitian bertujuan mengkaji karakteristik mikrobiologis silase kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott berdasarkan total bakteri serta karakteristik bakteri Gram positif dan Gram negatif. Penelitian dilaksanakan pada April – Juni 2022 di Padepokan Menda Kencana Seta, Desa Kalisidi, Kecamatan Ungaran Barat, Semarang. Analisis mikrobiologi dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Semarang pada Agustus 2022.

Alat yang digunakan meliputi *chopper*, timbangan gantung, timbangan digital, gelas ukur, terpal, pisau, stoples, *aluminium foil*, dan plastik hitam. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Indigofera* (*Indigofera zollingeriana*), rumput Odot (*Pennisetum purpureum* cv. Mott) berumur 40 hari, starter cairan fermentasi limbah kubis, *pollard*, garam, dan molases. T1: 700 g *Indigofera zollingeriana* + 300 g *Pennisetum purpureum* cv. Mott + 60 ml molases + 30 g *pollard* + 40 ml starter cairan fermentasi limbah kubis, T2: 500 g *Indigofera zollingeriana* + 500 g *Pennisetum purpureum* cv. Mott + 60 ml molases + 30 g *pollard* + 40 ml starter cairan fermentasi limbah kubis, dan T3: 300 g *Indigofera zollingeriana* + 700 g *Pennisetum purpureum* cv. Mott + 60 ml molases + 30 g *pollard* + 40 ml starter cairan fermentasi limbah kubis. Parameter yang diamati meliputi total bakteri dan Gram positif dan negatif. Analisis data menggunakan analisis deskriptif kuantitatif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa silase kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott mengandung total bakteri berkisar 5×10^7 – $4,15 \times 10^9$ cfu/g. Susunan sel pada bakteri Gram positif meliputi soliter pada bakteri berbentuk batang, dan duplo pada bakteri berbentuk *coccus*, sementara susunan sel pada bakteri Gram negatif berupa soliter dengan bakteri berbentuk batang.

Simpulan penelitian adalah silase kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott memiliki total bakteri berkisar antara 5×10^7 hingga $4,15 \times 10^9$ cfu/g. Karakteristik bakteri yang ditemukan didominasi oleh bakteri Gram positif berbentuk batang dan *coccus* dengan susunan sel soliter dan duplo, sedangkan bakteri Gram negatif berbentuk batang dengan susunan sel soliter. Dominasi bakteri Gram positif menunjukkan bahwa proses fermentasi silase berlangsung dengan baik.

KATA PENGANTAR

Pakan merupakan salah satu faktor utama yang menunjang pertumbuhan dan produktivitas ternak. Salah satu jenis pakan yang dapat menunjang hal tersebut adalah silase. Silase memiliki keunggulan memperpanjang masa simpan pakan dan mencegah pertumbuhan bakteri pembusuk. Perbedaan kombinasi hijauan dalam pembuatan silase dapat mempengaruhi kualitas silase dan mikrobiologis pakan. Kelembapan udara, suhu, serta perbandingan komposisi hijauan dapat menjadi faktor pendukung pertumbuhan mikroorganisme, termasuk bakteri Gram positif dan negatif.

Puji syukur kehadiran Allah Swt. yang telah melimpahkan segenap berkah kesehatan dan kesempatan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi dengan judul “Karakterisasi Mikrobiologis Silase Kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott Berdasarkan Total Bakteri dan Gram Positif-Negatif”. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada semua pihak atas doa, dukungan, bantuan, dan bimbingan selama penelitian dan penulisan skripsi ini, yaitu :

1. Dr. Ir. Cahya Setya Utama, S.Pt., M.Si., IPM. selaku pembimbing utama dan Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM. selaku pembimbing anggota yang telah memberikan waktu, arahan, dan saran sehingga penulisan skripsi ini selesai.
2. Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D. sebagai Dekan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro yang sudah menerima penulis untuk menjalani studi di Program Studi S-1 Peternakan.

3. Prof. Ir. Bambang Sulistiyanto, M.Agr.Sc., Ph.D., IPU. selaku koordinator Laboratorium Teknologi Pakan sekaligus dosen wali penulis atas bimbingannya.
4. Ir. Rudy Hartanto, S.Pt., M.P., Ph.D., IPM. selaku Ketua Program Studi S-1 Peternakan dan Ir. Daud Samsudewa, S.Pt., M.Si., IPM. selaku Sekretaris Program Studi S-1 Peternakan atas semangat, dukungan, dan bantuannya di masa akhir perkuliahan penulis.
5. Almh. Dr. Ir. Retno Iswarin Pujaningsih, M.Agr.Sc. selaku pemilik proyek penelitian Padepokan Menda Kencana Seta, Bapak Sri Julianto selaku pembimbing lapangan, dan seluruh pihak yang membantu proses penelitian.
6. Bapak Untung Susanto dan Ibu Santi Wijayanti selaku orang tua penulis, Fairuza Aribah Salsabila, Naufal Farras Zaky, dan Halim Muhammad Ghozy selaku kakak dan adik kandung penulis, serta Almh. Sukarmi selaku nenek penulis atas segala hal yang tidak akan pernah mungkin dapat digantikan oleh penulis.
7. Aliffiana Faradita, Dewi Marliyana Ulfah, Nurul Indriani, Yohana Izha Permata Sari, dan Nila Nur Rohmaniyah selaku sahabat yang senantiasa hadir dalam hari-hari penulis.

Semarang, Agustus 2026

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1. <i>Indigofera sp.</i>	3
2.2. <i>Pennisetum purpureum</i> cv. Mott.....	4
2.3. Silase	5
2.4. Total Bakteri.....	6
2.5. Gram Positif dan Gram Negatif	7
BAB III. MATERI DAN METODE.....	9
3.1. Materi	9
3.2. Metode.....	9
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
4.1. Total Bakteri Silase	14
4.2. Gram Positif dan Gram Negatif Silase	17
BAB V. SIMPULAN DAN SARAN	20
5.1. Simpulan	20
5.2. Saran	20
DAFTAR PUSTAKA	21
RIWAYATHIDUP	27

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Hasil <i>Total Plate Count</i> (TPC)	14
2. Hasil Pengecatan Gram.....	17

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Bahan Silase Sebelum Penyimpanan	25
2. Sampel Silase Sebelum Analisis Laboratorium.....	26

BAB I

PENDAHULUAN

Pakan hijauan merupakan salah satu pilar utama dalam keberhasilan usaha peternakan karena pakan hijauan menjadi sumber serat, energi, dan nutrisi penting terutama pada ternak ruminansia. Pemberian pakan dimaksudkan agar ternak dapat memenuhi kebutuhan hidupnya sekaligus untuk pertumbuhan dan reproduksi (Yulianto *et al.*, 2022). Pada musim penghujan, produksi hijauan sedang pada produksi yang maksimal sehingga ketersediaannya melimpah, sedangkan pada musim kemarau produktivitas hijauan lebih rendah daripada musim penghujan sehingga peternak sering mengalami kekurangan hijauan pakan (Widiastuti dan Wati, 2024). Upaya untuk mengatasi hal tersebut adalah melalui penerapan teknologi pakan berupa pembuatan silase.

Silase adalah hasil fermentasi hijauan dalam kondisi anaerob yang memanfaatkan aktivitas mikroorganisme, terutama bakteri asam laktat (BAL). Kondisi anaerob akan mempercepat pertumbuhan BAL dalam memecah karbohidrat menjadi asam laktat tanpa memerlukan oksigen (Aglazziyah *et al.*, 2020). Kualitas silase sangat ditentukan oleh populasi dan jenis bakteri yang berperan selama proses fermentasi. Populasi BAL adalah salah satu faktor yang dapat mempengaruhi proses silase (Septian *et al.*, 2024). Oleh karena itu, penting untuk mengetahui dinamika bakteri pada silase melalui studi mengenai total bakteri dan karakterisasi Gram positif dan Gram negatif.

Indigofera zollingeriana merupakan leguminosa dengan kandungan protein yang tinggi, sedangkan *Pennisetum purpureum* cv. Mott atau yang biasa disebut

dengan rumput Odot dikenal sebagai hijauan dengan produksi biomassa tertinggi. Kombinasi keduanya berpotensi menghasilkan silase dengan kondisi fermentasi yang lebih baik. *Indigofera* memiliki nilai protein kasar tinggi yaitu 27,60 – 31,20%, sehingga nilai protein yang tinggi ini menyebabkan BAL leluasa memanfaatkan substrat yang tersedia untuk menghasilkan berbagai produk fermentasi (Rodiallah *et al.*, 2023). Rumput Odot mempunyai kemampuan produksi yaitu 49,39 – 57,71 ton/ha (Fangidae *et al.*, 2024). Proses fermentasi dipengaruhi oleh populasi bakteri yang berkembang di dalam silase, karena aktivitas bakteri tersebut menentukan keberhasilan proses pengawetan serta mutu akhir silase yang dihasilkan.

Tujuan penelitian adalah untuk mengkaji karakteristik mikrobiologis silase kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott berdasarkan total bakteri serta karakteristik bakteri Gram positif dan Gram negatif. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian mengenai total bakteri dan bakteri Gram positif-negatif pada silase kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott. Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi dari pengujian total bakteri dan karakteristik bakteri Gram positif-negatif pada silase kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott. Hipotesis penelitian ini adalah silase kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott diduga memiliki karakteristik mikrobiologis yang ditandai dengan total bakteri serta didominasi oleh bakteri Gram positif dibandingkan Gram negatif.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Indigofera sp.*

Tanaman nila (*Indigofera sp.*) merupakan tanaman yang masuk dalam sistematika dengan klasifikasi meliputi Kingdom Plantae, Divisi Magnoliophyta, Kelas Magnoliopsida, Ordo Fabales, Familia Fabaceae, Genus Indigofereae, dan Spesies *Indigofera sp.* (Bari *et al.*, 2022). *Indigofera* adalah tanaman leguminosa dari family *Fabaceae* yang banyak dimanfaatkan sebagai hijauan pakan karena memiliki kandungan protein yang tergolong tinggi yaitu 27,88%. Tingginya kadar protein pada *Indigofera* dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme sebagai makanan untuk menyokong pertumbuhan dan perkembangannya selama fermentasi (Barokah *et al.*, 2017). Rahmi *et al.* (2025) menyatakan bahwa semakin tinggi substitusi *Indigofera* dalam pembuatan silase maka akan semakin tinggi kandungan PK.

Indigofera memiliki karakteristik fisik yang mempengaruhi proses fermentasi, seperti kadar bahan kering dan komposisi serat. Infitria *et al.* (2026) menyatakan bahwa *Indigofera* kaya akan protein dan serat yang mudah dicerna sehingga membantu proses fermentasi yang lebih efisien dan menghasilkan tekstur silase yang lebih lembut. Tingginya nilai protein kasar berakibat pada stimulasi mikroba semakin efektif dalam mencerna komponen-komponen bahan kering, selain itu *Indigofera* memiliki dinding sel yang lebih lunak (Harahap *et al.*, 2025). Perbedaan karakteristik tersebut dapat mempengaruhi ketersediaan substrat yang

digunakan oleh mikroorganisme selama ensilase berlangsung sehingga penggunaan Indigofera dalam berbagai proporsi dapat menghasilkan karakteristik fermentasi yang berbeda.

2.2. *Pennisetum purpureum* cv. Mott

Klasifikasi rumput Odot (*Pennisetum purpureum* cv. Mott) merupakan tanaman yang masuk dalam sistematika dengan klasifikasi meliputi Kingdom Plantae, Divisi Magnoliophyta, Kelas Liliopsida, Ordo Poales, Familia Poaceae, Genus *Pennisetum*, Spesies *P. purpureum* cv. Mott (Sirait, 2017). Rumput Odot merupakan jenis rumput unggul dari segi produksi sebagai hijauan segar dan mempunyai kandungan nutrisi yang cukup tinggi bagi ternak ruminansia. Kadar nutrisi rumput Odot (% BK) yaitu protein kasar 13,5%, lemak kasar 3,4%, abu 15,3%, Ca 0,315, dan fosfor 0,37% (Fransiska *et al.*, 2024). Sirait (2017) menyatakan bahwa kandungan protein Odot segar sebesar 12,88% meningkat masing-masing menjadi 13,25 dan 15,38% melalui fermentasi aerob dan anaerob.

Kualitas rumput Odot dipengaruhi oleh umur panen dan kondisi pertumbuhannya. Semakin tua umur panen, kandungan serat umumnya meningkat, sedangkan kandungan nutrisi yang mudah difermentasi cenderung menurun. Tingginya serat kasar pada rerumputan karena umur tanaman pada saat pemotongan dan dominasi pertumbuhan vegetatif yang terdapat pada batang dan daun sehingga komponen serat terutama selulosa dan hemiselulosa juga semakin meningkat (Rodiallah *et al.*, 2023). Sirait (2017) menyatakan bahwa nilai nutrisi rumput gajah mini atau rumput Odot mulai menurun pada umur panen yang semakin panjang

terutama pada interval panen 70 hari. Perbedaan komposisi tersebut dapat mempengaruhi proses fermentasi dan aktivitas mikroorganisme selama penyimpanan silase.

2.3. Silase

Salah satu usaha dalam mengatasi kekurangan pakan hijauan pada musim kemarau adalah dengan melakukan pengawetan bahan pakan hijauan dalam bentuk silase. Silase merupakan pakan ruminansia yang dapat dibuat dari berbagai macam jenis hijauan pakan dan juga limbah pertanian (Landupari *et al.*, 2020). Prinsip pembuatan silase adalah fermentasi hijauan oleh mikroba yang banyak menghasilkan asam laktat pada silo. Proses fermentasi mikrobial oleh BAL yang berlangsung di dalam silo disebut ensilase (Kurniawan *et al.*, 2019). Pemadatan dan penutupan silo yang baik, serta penggunaan bahan pengawet yang tepat dapat menciptakan kondisi anaerob dan lingkungan asam di dalam silo tercapai, proses fermentasi optimal, serta kualitas silase meningkat (Amaniyah *et al.*, 2025). Lama proses ensilase meningkatkan kandungan bahan kering, bahan organik, dan protein kasar silase pakan ruminansia. Meningkatnya kandungan protein kasar dikarenakan BAL sebenarnya merupakan sumber protein (Balo *et al.*, 2022).

Mikroorganisme memanfaatkan karbohidrat larut sebagai sumber energi sehingga menghasilkan senyawa metabolit selama proses fermentasi. Senyawa metabolit (asam) yang dihasilkan adalah asam laktat, asam asetat, dan asam butirat yang dilarutkan melalui fermentasi karbohidrat oleh mikroorganisme (Marlina dan Afni, 2023). Baga *et al.* (2023) menyatakan bahwa penggunaan karbohidrat mudah

larut dalam pembuatan silase akan menyediakan nutrisi yang baik bagi aktivitas fermentasi mikroorganisme untuk pencapaian hasil silase yang diinginkan. Terbentuknya asam organik secara bertahap menyebabkan lingkungan silase menjadi semakin asam dan mampu mempertahankan kestabilan bahan selama penyimpanan. Kondisi tersebut menjadi salah satu indikator bahwa proses ensilase berlangsung dengan baik.

2.4. Total Bakteri

Total bakteri merupakan berbagai bakteri yang tumbuh di dalam silase. Total bakteri asam laktat (BAL) menjadi indikator keberhasilan dari pembuatan silase karena populasi BAL mempengaruhi kadar asam laktat dan kecepatan proses fermentasi. Pengukuran koloni BAL menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) (Adelina *et al.*, 2024). Hasil perhitungan kemudian ditransformasikan ke perhitungan log (cfu/g). Lama waktu fermentasi berpengaruh terhadap pertumbuhan BAL, karena semakin lama fermentasi maka semakin banyak waktu yang diperlukan oleh BAL untuk berkembang di dalam substrat, sehingga populasi BAL semakin meningkat (Iskandar *et al.*, 2024).

Populasi bakteri di dalam silase bersifat dinamis dan dapat berubah sesuai dengan tahapan fermentasi. Pada fase awal, berbagai jenis bakteri masih dapat tumbuh, sedangkan pada fase berikutnya mikroorganisme yang mampu beradaptasi dengan kondisi asam akan lebih mendominasi sehingga pengamatan total bakteri dapat memberikan gambaran mengenai perkembangan aktivitas mikroba selama proses penyimpanan. Menurut Riyanti dan Febriza (2023), selama proses ensilase,

proses respirasi sel hijauan perlahan akan berhenti saat oksigen dalam silo habis terpakai sehingga kondisi dalam silo menjadi anaerob. Kondisi demikian menyebabkan bakteri pembentuk asam laktat seperti *Lactobacillus* aktif mengubah glukosa menjadi asam laktat yang berakibat pada penurunan pH silase dan menghambat bakteri pembusuk.

2.5. Gram Positif dan Gram Negatif

Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang terdiri dari dua lapisan yaitu peptidoglikan yang tebal dan membran dalam, sementara bakteri Gram negatif memiliki lapisan dinding sel peptidoglikan yang lebih tipis. Bakteri Gram positif ditandai dengan warna ungu dan bakteri Gram negatif ditandai dengan warna merah pada saat uji pewarnaan gram (Hamidah *et al.*, 2019). Bakteri Gram positif yang banyak ditemukan dalam silase antara lain *Lactobacillus*, *Streptococcus*, dan *Pediococcus*, yang berperan sebagai BAL dalam proses fermentasi, sementara bakteri Gram negatif yang dapat ditemukan dalam silase antara lain *Enterobacter*, *E. coli*, dan *Pseudomonas*, terutama jika kondisi fermentasi kurang optimal. Bakteri Asam Laktat dari genus *Lactobacillus* merupakan golongan bakteri menguntungkan yang berperan dalam proses fermentasi (Tulasi *et al.*, 2024).

Pewarnaan Gram selain membedakan struktur dinding sel juga membantu mengamati karakter morfologi bakteri, seperti bentuk batang (*bacillus*), bulat (*coccus*), serta susunan selnya, misalnya soliter, duplo, strepto, atau stafilo. Hal ini sesuai dengan pendapat Sari *et al.* (2024) bahwa pengamatan morfologi sel bakteri dilakukan dengan pewarnaan Gram dengan indikasi pewarnaannya yaitu bakteri

Gram positif akan berwarna violet dan bakteri Gram negatif akan berwarna merah, serta bentuk dari sel bakteri berbentuk bulat atau batang. Informasi morfologi tersebut sering digunakan sebagai dasar karakterisasi awal sebelum dilakukan identifikasi bakteri menggunakan metode yang lebih spesifik

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dengan judul “Karakterisasi Mikrobiologis Silase Kombinasi *Indigofera zollingeriana* dan *Pennisetum purpureum* cv. Mott Berdasarkan Total Bakteri dan Gram Positif-Negatif” dilaksanakan pada April – Juni 2022 di Padepokan Menda Kencana Seta, Desa Kalisidi, Kecamatan Ungaran Barat, Kabupaten Semarang. Analisis mikrobiologi meliputi pengamatan total bakteri dan bakteri Gram positif-negatif dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Semarang.

3.1. Materi

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Indigofera* (*Indigofera zollingeriana*), rumput Odot (*Pennisetum purpureum* cv. Mott) berumur 40 hari, starter cairan fermentasi limbah kubis, *pollard*, garam, dan molases. Alat yang digunakan meliputi *chopper*, timbangan gantung, timbangan digital, gelas ukur, terpal, pisau, stoples, *aluminium foil*, dan plastik hitam.

3.2. Metode

Kegiatan penelitian dilakukan melalui 3 tahap. Tahap pertama yaitu tahap persiapan pembuatan cairan fermentasi limbah kubis sebagai starter dan persiapan bahan silase. Tahap kedua yaitu tahap perlakuan dengan pembuatan silase. Tahap ketiga yaitu tahap pengambilan data di laboratorium dan pengolahan data.

3.2.1. Rancangan Percobaan

Penelitian menggunakan rancangan percobaan dengan tiga perlakuan perbandingan hijauan, yaitu:

- T1 : 700 g *Indigofera zollingeriana* + 300 g *Pennisetum purpureum* cv. Mott + 60 ml molases + 30 g *pollard* + 40 ml starter cairan fermentasi limbah kubis
- T2 : 500 g *Indigofera zollingeriana* + 500 g *Pennisetum purpureum* cv. Mott + 60 ml molases + 30 g *pollard* + 40 ml starter cairan fermentasi limbah kubis
- T3 : 300 g *Indigofera zollingeriana* + 700 g *Pennisetum purpureum* cv. Mott + 60 ml molases + 30 g *pollard* + 40 ml starter cairan fermentasi limbah kubis

3.2.2. Tahap Persiapan

Silase dibuat dengan menggunakan *Indigofera zollingeriana*, *Pennisetum purpureum* cv. Mott, dan starter yang terbuat dari limbah kubis. Limbah kubis yang telah diperoleh dari pasar dicacah menggunakan pisau kemudian ditimbang dan ditambahkan garam sebanyak 2,5% dari limbah kubis. Penambahan garam digunakan untuk menghambat pertumbuhan mikroba pembusuk dan menjaga kestabilan proses fermentasi (Fristanto *et al.*, 2025). Limbah kubis dan garam dihomogenkan kemudian diperam selama 5 hari dalam keadaan anaerob karena proses fermentasi awal oleh BAL sudah berlangsung, kemudian disaring untuk

diambil cairan hasil fermentasinya (Lampiran 1). Cairan fermentasi limbah kubis mengandung senyawa antimikroba yang secara langsung mencegah atau mematikan bakteri pembusuk (Maulina *et al.*, 2024). Kandungan utama selama proses fermentasi starter meliputi BAL, asam asetat, CO₂, dan H₂O. Bahan untuk pembuatan silase berupa rumput Odot dan legum *Indigofera* yang dipotong menggunakan *chopper* sampai berukuran 5 cm dan diangin-anginkan selama 1 hari di tempat teduh hingga kadar airnya tersisa 60% untuk mengurangi peluang terjadinya pembusukan.

3.2.3. Tahap Perlakuan

Tahap perlakuan meliputi pembuatan tiga perlakuan kombinasi, yaitu T1: 700 g *Indigofera zollingeriana* + 300 g *Pennisetum purpureum* cv. Mott + 60 ml molases + 30 g *pollard* + 40 ml starter cairan fermentasi limbah kubis, T2: 500 g *Indigofera zollingeriana* + 500 g *Pennisetum purpureum* cv. Mott + 60 ml molases + 30 g *pollard* + 40 ml starter cairan fermentasi limbah kubis, dan T3: 300 g *Indigofera zollingeriana* + 700 g *Pennisetum purpureum* cv. Mott + 60 ml molases + 30 g *pollard* + 40 ml starter cairan fermentasi limbah kubis. Tahap pertama yang dilakukan yaitu *Indigofera* dan rumput Odot dicacah menjadi potongan yang lebih kecil berukuran 5 cm, kemudian dilayukan selama 24 jam untuk mengurangi kadar air hingga hanya tersisa 60%, selanjutnya ditimbang sesuai perlakuan yang telah ditentukan yaitu 1000 g setiap perlakuan, dicampur sampai homogen dengan molases sebanyak 5% (59 ml), *pollard* 3% (30 g), starter limbah kubis fermentasi ditambahkan sedikit demi sedikit sebanyak 4% (40 ml) dari berat bahan kering

udara Indigofera dan rumput Odot. Bahan silase yang telah tercampur rata dimasukkan ke dalam stoples ukuran 1 liter sehingga memiliki kepadatan 1 kg/L dalam kondisi anaerob dan disimpan selama 14 hari hingga pH mencapai 4 (Ilustrasi 2).

3.2.4. Total Bakteri

Sampel silase diambil 1 ml dan ditambahkan larutan NaCl fisiologis 9 ml dalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan untuk memperoleh pengenceran 10^{-1} . Pengujian total bakteri dilakukan dengan metode *total plate count* (TPC). Prinsip metode ini adalah bakteri dalam sampel ditumbuhkan pada medium *Plate Count Agar* (PCA) dan diinkubasi selama 48 jam hingga bakteri sudah berkembang optimal, kemudian bakteri akan tumbuh dan membentuk koloni yang dapat dilihat secara visual, sehingga dapat langsung dihitung (Karmila *et al.*, 2020). Hasil pengenceran 10^{-1} diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi larutan NaCl fisiologis 9 ml untuk memperoleh pengenceran 10^{-2} . Pengenceran dilakukan dengan cara yang sama hingga jumlah pengenceran yang diinginkan (10^{-n}). Sebanyak 1 ml suspensi sampel diinokulasikan pada permukaan media PCA yang sebelumnya telah dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat, kemudian diratakan menggunakan *spreader* steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Perhitungan total bakteri menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total Bakteri} = \sum \text{Koloni Bakteri} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

3.2.5. Pewarnaan Gram Positif dan Gram Negatif

Pewarnaan Gram dilakukan dengan menggunakan dua zat warna utama yaitu kristal violet dan safranin, serta lugol sebagai larutan *mordant*, serta aseton alkohol dan aquades sebagai pembilas. Sampel sebanyak 1 ml diinokulasi pada objek *glass*, kemudian ditetesi dengan kristal violet dan dibilas dengan air mengalir. Tahap selanjutnya adalah penambahan lugol dan dibilas dengan alkohol untuk menghilangkan kristal violet. Proses dilanjutkan dengan penetesan safranin. Sampel kemudian diamati di bawah mikroskop. Bakteri Gram positif ditunjukkan dengan warna biru-ungu, sedangkan bakteri Gram negatif ditunjukkan dengan warna kemerahan (Pradana *et al.*, 2022).

3.2.6. Analisis Data

Parameter yang diamati meliputi total bakteri, dan Gram positif dan Gram negatif diolah menggunakan metode deskriptif kuantitatif. Analisis data deskriptif merupakan teknik analisis data dengan cara mengklasifikasikan data berdasarkan pengukuran variabel dengan tujuan untuk menyederhanakan kumpulan data menjadi lebih kecil dan mudah dikelola, serta memudahkan penarikan kesimpulan yang lebih akurat dari data statistik (Jailani dan Saksitha, 2024).