

## BAB III

### MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan Juli 2019 di Laboratorium Teknologi Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang. Pengamatan total bakteri, bakteri gram positif dan bakteri gram negatif dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah, Semarang.

#### 3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah *wheat pollard*, aquades, limbah kubis fermentasi, vitamin mineral mixed yaitu  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , vitamin C, vitamin E, vitamin B Kompleks,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ , Mono Sodium Glutamat (MSG) dengan masing – masing level pemberian 0%, 2,5%, 5%, 7,5% dan 10%. Peralatan yang digunakan yaitu blender untuk penghalusan limbah kubis menjadi jus kubis, alat saring untuk penyaringan *wheat pollard* dengan subalan, nampan dan pengaduk untuk tempat pencampuran sampel dengan vitamin dan mineral, timbangan digital untuk penimbangan sampel, plastik untuk tempat fermentasi, *autoclave* untuk alat sterilisasi sampel, kain *strining* untuk penutup nampan ketika sampel dijemur serta peralatan yang akan digunakan untuk melakukan pengamatan total bakteri, bakteri gram positif dan bakteri gram negatif.

## 3.2. Metode Penelitian

### 3.2.1. Rancangan percobaan

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola searah dengan 5 perlakuan dengan masing-masing perlakuan terdiri dari 3 ulangan. Parameter yang diamati yaitu kandungan total bakteri, bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Data total bakteri diolah menggunakan analisis varians (anova), sedangkan keberadaan bakteri gram positif dan gram negatif diidentifikasi kemudian dilakukan skoring (Sukmadinata, 2011). Cara identifikasi skoring yaitu skor 1: terdapat bakteri gram positif, berbentuk batang, soliter, berspora, *coccus* dan terdapat bakteri gram negatif, skor 2: terdapat bakteri gram positif, berbentuk batang, soliter, berspora, dan *coccus*, skor 4: terdapat bakteri gram positif, berbentuk batang, soliter, dan berspora, skor 5: terdapat bakteri gram positif dan berbentuk batang dan soliter. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

T<sub>0</sub> = *Wheat pollard* terolah + vitamin mineral 0%

T<sub>1</sub> = *Wheat pollard* terolah + vitamin mineral 2,5%

T<sub>2</sub> = *Wheat pollard* terolah + vitamin mineral 5%

T<sub>3</sub> = *Wheat pollard* terolah + vitamin mineral 7,5%

T<sub>4</sub> = *Wheat pollard* terolah + vitamin mineral 10%

### 3.2.2. Prosedur penelitian

Prosedur penelitian dilaksanakan dalam 2 tahap yaitu pembuatan fermentasi limbah kubis menurut Utama *et al.*, (2018) dan pengolahan *wheat pollard* serta penambahan vitamin dan mineral.

Pembuatan limbah kubis fermentasi diawali dengan cara limbah kubis dihaluskan menggunakan blender, ditambahkan 8% garam dan 6,7% molasses dari berat segar limbah kubis, selanjutnya dimasukkan dalam plastik fermentasi dan difermentasi selama 6 hari dalam keadaan *anaerob fakultatif* keadaan tanpa adanya oksigen.

Pengolahan *wheat pollard* diawali dengan *wheat pollard* dicampur dengan aquades kemudian diaduk hingga homogen. *Wheat pollard* yang sudah tercampur rata dengan aquades kemudian dikukus menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. *Wheat pollard* dikeluarkan dari *autoclave* dan diangin-anginkan. *Wheat pollard* dicampurkan dengan vitamin dan mineral serta limbah kubis fermentasi, dengan penambahan limbah kubis fermentasi sebanyak 40% dari penambahan total air hingga ketiganya homogen. Sampel difermentasi secara *anaerob fakultatif* selama 4 hari, lalu dikeringkan selanjutnya dihaluskan menggunakan *blender*.

Pengambilan data dengan parameter total bakteri, dilakukan dengan mengambil sampel *wheat pollard* fermentasi yang telah disimpan selama 4 hari di Laboratorium Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Sampel diuji secara mikrobiologis untuk mengetahui total bakteri, di Universitas Muhammadiyah, Semarang.

Metode yang digunakan untuk perhitungan total bakteri adalah metode *total plate count* (TPC) merupakan perhitungan mikroorganisme yang masih hidup (Nadliroh *et al.*, 2019). Pengenceran dilakukan menggunakan NaCl 0,85% dimulai dari  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  hingga pengenceran yang diinginkan, dengan perbandingan 1 : 9 kemudian dihomogenisasi, setelah itu dimasukkan ke dalam cawan petri. Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri yaitu *Nutrient Agar*, setelah itu diinkubasi selama 3 hari. Perhitungan mikroorganisme dilakukan setelah masa inkubasi dengan bantuan alat *Quebec colony counter*. Adapun cara perhitungan *total plate count* yaitu cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 – 300. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan koloni ukuran besar yang jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai 1 koloni, suatu deretan atau rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai 1 koloni. Perhitungan *total plate count* dapat dihitung dengan cara  $= \sum \text{koloni} \times 1/\text{faktor pengenceran} \times 1/\sum \text{inokulum}$ .

Sampel yang telah diberi perlakuan, dilakukan uji pewarnaan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif menggunakan metode pewarnaan gram (Arsyid *et al.*, 2015). Keberadaan bakteri gram negatif diidentifikasi menggunakan pewarnaan gram (Nadliroh *et al.*, 2019). Prinsip pewarnaan gram yang digunakan yaitu pewarnaan gram *differensial*, disebut sebagai pewarnaan gram *differensial* dikarenakan dibagi menjadi dua golongan yaitu gram negatif dan gram positif berdasarkan reaksi dinding sel bakteri terhadap pewarna kristal violet dan safranin. Metode pewarnaan gram dilakukan dengan sediaan yang sudah difiksasi diletakkan di atas rak pewarnaan. Sediaan digenangi dengan Gram A (kristal

violet) selama 1 menit, kemudian sediaan dicuci. Sediaan setelah itu digenangi dengan Gram B (larutan iodin) selama 1 menit, dicuci dengan air. Sediaan selanjutnya digenangi dengan Gram C (alkohol asam) selama 20 detik, dicuci dengan air. Sediaan kemudian digenangi dengan Gram D (safranin) selama 20 detik, dicuci dengan air. Sediaan dikeringkan dan diperiksa dengan mikroskop dengan lensa 100x menggunakan minyak imersi. Tahap terakhir bentuk, warna dan susunan bakteri diamati. Bakteri gram negatif berwarna merah sedangkan, bakteri gram positif berwarna ungu.

### **3.3. Analisis Data**

Data parameter total bakteri, bakteri gram positif dan bakteri gram negatif yang diperoleh selanjutnya di analisis menggunakan ANOVA dengan uji F taraf signifikansi 5% yang bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan, jika terdapat pengaruh maka untuk mengetahui perbedaan rata-rata nilai tengah perlakuan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan dengan taraf 5% (Steel dan Torrie, 1991).

#### **Hipotesis statistik**

Hipotesis statistik yang digunakan adalah :

$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = 0$  (tidak ada pengaruh perlakuan peningkatan kualitas *wheat pollard* fermentasi dengan penambahan vitamin dan mineral)

$H_1 =$  minimal ada satu  $\tau_1 \neq 0$  (minimal ada satu pengaruh perlakuan peningkatan kualitas *wheat pollard* fermentasi dengan penambahan vitamin dan mineral)