

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yaitu dengan cara mengujikan *L. plantarum* dan *L. fermentum* terhadap silase rumput Kalanjana. Rancangan percobaan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor perlakuan dan 3 kali ulangan. Faktor pertama adalah jenis inokulum yang terdiri dari 4 taraf perlakuan (K0= tanpa penambahan inokulum, K1= *L. plantarum*, K2= *L. fermentum*, dan K3= kombinasi antara *L. plantarum* dan *L. fermentum*) dan faktor kedua adalah lama fermentasi terdiri dari 3 taraf perlakuan (L1= 14 hari, L2= 21 hari, dan L3= 28 hari). Dengan demikian dalam penelitian ini terdapat 9 kombinasi perlakuan.

Tabel 3.1 Rancangan Percobaan

K \ L	L1	L2	L3
K0	K0L1	K0L2	K0L3
K1	K1L1	K1L2	K1L3
K2	K2L1	K2L2	K2L3
K3	K3L1	K3L2	K3L3

#### 3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi: variabel bebas, variabel terikat, dan variabel kontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penambahan *L. plantarum* dan *L. fermentum* sebagai inokulum tunggal maupun campuran dan lama fermentasi; sedangkan variabel

terikat yang digunakan adalah perubahan warna, tekstur, aroma/bau, tumbuhnya jamur, suhu silase (°C), pH silase, protein kasar (% PK), serat kasar (% SK), dan kadar air (% KA), dan variabel kontrolnya adalah rumput Kalanjana.

### 3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Agustus 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sebagai tempat pelaksanaan fermentasi dan Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang sebagai tempat analisis proksimat.

### 3.4 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi: alat pemotong rumput, silo (plastik/stoples), tabung reaksi, autoklaf, pH meter, jarum ose, inkubator, timbangan analitik, termometer, *hotplate*, *stirer*, tabung Kjeldahl, destilator, erlenmeyer, spatula, desikator, dan oven.

Bahan-bahan yang digunakan adalah rumput Kalanjana, inokulum *L. plantarum* dan *L. fermentum*, media MRSB (55 gr/L), media MRSA (68,2 gr/L), aquades, kertas saring, HCl 0,02 N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HgO, NaOH-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4%, MM atau MB, NaOH 0,313%, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, dan etanol 95%.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua peralatan digunakan, yaitu dengan cara sterilisasi fisik. Sterilisasi ini dilakukan dengan cara pemanasan pada suhu tinggi menggunakan alat berupa autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi (*Per Square Inchi*) selama 15 menit. Alat yang tidak tahan panas tinggi disterilisasi dengan cara kimia, yaitu dengan menggunakan alkohol.

#### 3.5.2 Pembuatan media

##### a. Media MRSB

1. Dimasukkan media MRSB instant dan aquades ke dalam *beaker glass*.
2. Dipanaskan di atas *hotplate*, diaduk hingga homogen.
3. Semua medium ditutup dengan kapas yang telah dibungkus kain kasa.
4. Disterilkan dengan autoklaf.

##### b. Media MRSA

1. Dimasukkan media MRSA instant dan aquades ke dalam *beaker glass*.
2. Dipanaskan di atas *hotplate*, diaduk hingga homogen.
3. Semua medium ditutup dengan kapas yang telah dibungkus kain kasa.
4. Disterilkan dengan autoklaf.

#### 3.5.3 Peremajaan Bakteri *L. plantarum* dan *L. fermentum* (Ratnakomala et al., 2006)

Peremajaan bakteri dilakukan untuk memperpanjang umur biakan *L. plantarum* dan *L. fermentum* dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Disiapkan media MRSB sebagai medium pembiakan bakteri.
- b. Diambil 1 ose isolat *L. plantarum* dan *L. fermentum* dengan menggunakan jarum inokulasi.
- c. Diinokulasikan ke dalam media MRSB.
- d. Diinkubasi biakan bakteri tersebut pada suhu 30°C selama 17-18 jam.

#### **3.5.4 Proses Pembuatan Silase (Ratnakomala *et al.*, 2006)**

Pembuatan silase dilakukan melalui beberapa tahapan berikut:

- a. Silase dibuat dari rumput Kalanjana yang dilayukan hingga kadar air mencapai 60-65%.
- b. Sampel dipotong kecil-kecil dengan ukuran 3-5 cm.
- c. Setiap sampel dibuat sebanyak 0,5 kg.
- d. Silase yang sudah dibuat dimasukkan ke dalam silo (plastik/stoples).
- e. Inokulum bakteri *L. plantarum* dan *L. fermentum* diberikan dengan cara disemprotkan secara berlapis-lapis sedikit demi sedikit pada saat hijauan dimasukkan ke dalam silo.
- f. Untuk mencapai kondisi anaerob dilakukan pemadatan dan silo ditutup rapat
- g. Dilakukan pemeraman selama 14 hari, 21 hari, dan 28 hari.

#### **3.5.5 Pengambilan data**

Parameter yang diukur sebagai kualitas silase yang baik adalah perubahan warna, tekstur, aroma/bau, tumbuhnya jamur, suhu silase (°C), pH silase, protein kasar (% PK), serat kasar (%SK), dan kadar air (% KA). Pengambilan data

dilakukan sebelum rumput Kalanjana difermentasi dan setelah rumput Kalanjana difermentasi selama 14 hari, 21 hari, dan 28 hari dengan berbagai variasi penambahan inokulum.

**a. Perubahan warna, tekstur, aroma/bau, dan tumbuhnya jamur (Kushartono dan Iriani, 2005)**

1. Diambil sampel dari setiap silo yang diamati setelah pemeraman selama 14 hari, 21 hari, dan 28 hari.
2. Dilihat perubahan yang terjadi secara umum seperti perubahan warna, tekstur, dan tumbuhnya jamur.
3. Dicum silase untuk mengetahui aroma/bau dari silase tersebut.

**b. Suhu silase (°C)**

Diukur suhu sampel pada setiap silo dengan menggunakan termometer.

**c. pH Silase (Allaily *et al.*, 2011)**

1. Diambil 10 g sampel dari setiap silo.
2. Ditambahkan aquades 20 mL lalu distirer selama 3 menit.
3. Diukur pH menggunakan pH meter.

**d. Protein Kasar (%PK) (Metode Semi Mikro Kjeldahl) (Lab Kimia UMM, 2013)**

Prinsip metode Kjeldahl adalah analisis jumlah protein secara empiris berdasarkan jumlah N di dalam bahan. Setelah bahan dioksidasi, amonia (hasil konservasi senyawa N) bereaksi dengan asam menjadi amonium sulfat. Dalam kondisi basa, amonia diuapkan dan kemudian ditangkap dengan larutan asam. Jumlah N ditentukan dengan titrasi HCl.

1. Dihaluskan bahan.

2. Ditimbang bahan dengan timbangan analitik sebanyak 5g (a).
3. Diambil 1ml untuk bahan cair atau sesuai dengan kondisi sampel, jika sampel diduga mengandung protein tinggi dapat menggunakan sampel dalam jumlah yang lebih sedikit demikian juga sebaliknya.
4. Dilarutkan bahan dengan aquades dengan volume tertentu (menentukan nilai faktor pengencerannya).
5. Dimasukkan bahan ke dalam tabung Kjeldahl, lalu ditambahkan 2 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan ditambahkan 2g campuran Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – HgO (20:1) untuk katalisator.
6. Dididihkan sampai jernih ( $\pm$  4 jam) dan dilanjutkan pendidihan 30 menit lagi (pengerjaan harus dilakukan di lemari asam / *fume hood*).
7. Setelah dingin ditambahkan 35 ml aquades dan ditambahkan 8,5 ml NaOH-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dan dilakukan destilasi, destilat ditampung dalam 6,5 ml H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4% yang telah diberi tetesan indikator MM atau MB dan tampung 25 ml.
8. Dititrasi destilat yang diperoleh dengan HCl 0,02 N (b) sampai terjadi perubahan warna, jika menggunakan MM dari kuning menjadi merah, jika menggunakan MB dari hijau menjadi ungu.
9. Perhitungan Protein kasar (%PK)

$$\text{Protein kasar (\%)} = \frac{b \times c}{a \times 1000} \times 14.008 \times fp \times 6.25 \times 100\%$$

Keterangan: a: bobot sampel

b: volume titran HCl

c: N titran HCl

fp: faktor pengenceran

**e. Serat Kasar (%SK) (Metode *Acid Alkali Digestion*) (Lab Kimia UMM, 2013)**

Prinsip dari metode *Acid Alkali Digestion* ini adalah sampel dihidrolisis menggunakan asam kuat dan basa kuat sehingga karbohidrat, protein, dan zat-zat lain terhidrolisis dan larut. Kemudian disaring dan dicuci dengan aquades panas yang mengandung asam dan alkohol, selanjutnya dikeringkan dan ditimbang sampai didapatkan bobot yang konstan.

1. Dihaluskan bahan dengan baik.
2. Untuk bahan yang banyak mengandung lemak, timbang 2 g bahan kering (a) dan ekstraksi lemaknya dengan analisis lemak atau rendam dengan 50 ml eter lalu dikeringkan eternya. Untuk bahan yang sedikit mengandung lemak, bahan tidak perlu dikeringkan dan diekstraksi lemaknya.
3. Dipindahkan bahan ke dalam erlenmeyer pendingin balik, ditambahkan 220 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mendidih 0,225 N dan ditutup dengan pendingin balik, dididihkan selama 30 menit dan kadangkala digoyang-goyangkan.
4. Disaring suspensi melalui kertas saring, dan residu tertinggal dalam erlenmeyer dicuci dengan aquades mendidih. Dicuci residu dalam kertas saring sampai air cucian tidak bersifat asam lagi (diuji dengan kertas lakmus atau dapat diuji dengan indikator pH).
5. Dipindahkan kuantitatif residu dari kertas saring ke dalam erlenmeyer kembali dengan spatula dan sisanya dicuci dengan larutan NaOH 0,313 N mendidih sebanyak 200 ml sampai semua residu masuk ke dalam erlenmeyer. Dididihkan dengan pendingin balik.

6. Disaring melalui kertas saring yang telah diketahui (b) sambil dicuci dengan 15 ml  $K_2SO_4$  10% dicuci lagi dengan aquades mendidih dan kemudian dengan 15 ml etanol 95%.
7. Dikeringkan kertas saring pada suhu  $60^{\circ}C$  sampai massa konstan. Dinginkan dalam desikator dan timbang (c).
8. Perhitungan serat kasar (%SK)

$$\text{Serat kasar (\%)} = \frac{c-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan: a: bobot sampel

b: bobot kertas saring kosong (awal)

c: bobot kertas saring akhir (dengan residu)

**f. Kadar air (%KA) (Metode Oven, AOAC) (Lab Kimia UMM, 2013)**

Prinsip metode Oven adalah mengeringkan sampel dalam oven dengan suhu  $100-105^{\circ}C$  sampai bobot konstan dan selisih bobot awal dan bobot akhir dihitung sebagai kadar air.

1. Dicuci botol timbang atau gelas kimia yang hendak digunakan sebagai tempat sampel.
2. Dikeringkan botol timbang dengan memanaskannya dalam oven lalu dinginkan dalam desikator.
3. Ditimbang botol timbang lalu catat (a), jangan lupa untuk diberi label.
4. Ditimbang dengan teliti sampel sebanyak 1-2 g (b) bergantung pada kadar air bahan dan letakkan dalam botol timbang.
5. Dioven sampel beserta botol timbang pada suhu  $100^{\circ}C$  selama 5 jam, lalu dinginkan dalam desikator, kemudian dioven lagi selama 1 jam pada suhu



yang sama, dinginkan dalam desikator lalu timbang, ulangi proses tersebut sampai bobot yang konstan (c).

6. Pemanasan dapat pula dilakukan selama 24 jam dengan suhu 90-100°C, biasanya pada pemanasan dengan cara ini dapat diperoleh bobot yang konstan.

7. Perhitungan kadar air

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{a+b-c}{b} \times 100\%$$

Keterangan: a: Berat botol timbang awal (g)

b: Sampel bahan (g)

c: Berat setelah pengovenan (g)

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan uji *Two-way* ANOVA. Bila hasil uji ANOVA tersebut menunjukkan hasil yang signifikan maka dilakukan pengujian lanjut dengan Uji Jarak Duncan.