

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Mei 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sebagai tempat pelaksanaan fermentasi kemudian BBIB sebagai tempat pencacahan jagung, dan Laboratorium Nutrisi dan Pakan Ternak Universitas Muhammadiyah Malang sebagai tempat analisis proksimat.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi: *Chopper*, silo (plastik/stoples), tabung reaksi, oven, autoklaf, pH meter, alat titrasi, jarum ose, inkubator, timbangan analitik, termometer, *hot plate*, dan *beaker glass*, kapas, kain kasa, timbangan analitik, kertas saring, mortal-martil, pemanas, gelas ukur, spatula, gelas kimia, erlenmeyer, pendingin balik, corong kaca, pipet ukur, karet gisap, labu kjehdahl, destruktur, lemari asam, set destilasi, buret, statif, klem, pipet tetes, labu takar, botol timbang.

Bahan-bahan yang digunakan adalah tebon jagung, inokulum *L. plantarum* dan *L. fermentum*, media MRSB, media MRSA, aquades, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,255 N, NaOH 0.313 N, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, HgO, NaOH-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, HCl 0,02 N, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4%, silika gel.

### 3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yaitu dengan cara mengujikan *L. plantarum* dan *L. fermentum* terhadap silase tebon jagung. 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 (L0 = silase tanpa penambahan inokulum, L1= *L. plantarum*, L2= *L. fermentum*, dan L3= kombinasi antara *L. plantarum* dan *L. fermentum*) dan faktor kedua adalah lama fermentasi terdiri dari 3 taraf perlakuan (J1= 21 hari, J2= 28 hari, dan J3= 35 hari). Dengan demikian dalam penelitian ini terdapat 12 kombinasi perlakuan.

#### 3.3.1 Pembagian kelompok sampel

Penelitian ini menggunakan 12 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 3 ulangan. Kelompok perlakuan dibagi sebagai berikut:

- a. Kelompok I: silase tanpa penambahan inokulum bakteri asam laktat dan lama fermentasi 21 hari.
- b. Kelompok II: silase tanpa penambahan inokulum bakteri asam laktat dan lama fermentasi 28 hari.
- c. Kelompok III: silase tanpa penambahan inokulum bakteri asam laktat dan lama fermentasi 35 hari.
- d. Kelompok IV: silase dengan penambahan inokulum *L. plantarum* 1% dan lama fermentasi 21 hari.

- e. Kelompok V: silase dengan penambahan inokulum *L. plantarum* 1% dan lama fermentasi 28 hari.
- f. Kelompok VI: silase dengan penambahan inokulum *L. plantarum* 1% dan lama fermentasi 35 hari.
- g. Kelompok VII: silase dengan penambahan inokulum *L. fermentum* 1% dan lama fermentasi 21 hari.
- h. Kelompok VIII: silase dengan penambahan inokulum *L. fermentum* 1% dan lama fermentasi 28 hari.
- i. Kelompok IX: silase dengan penambahan inokulum *L. fermentum* 1% dan lama fermentasi 35 hari.
- j. Kelompok X: silase dengan penambahan inokulum *L. plantarum* 0,5% dan *L. fermentum* 0,5% dan lama fermentasi 21 hari.
- k. Kelompok XI: silase dengan penambahan inokulum *L. plantarum* 0,5% dan *L. fermentum* 0,5% dan lama fermentasi 28 hari.
- l. Kelompok XII: silase dengan penambahan inokulum *L. plantarum* 0,5% dan *L. fermentum* 0,5% dan lama fermentasi 35 hari.

### 3.3.2 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 inokulum *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* dengan beberapa jumlah inokulum yang berbeda, yaitu: 0,5% dan 1%; sedangkan variabel terikat yang digunakan adalah perubahan warna, tekstur, aroma/bau,

tumbuhnya jamur, suhu silase ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH silase ( $^{\circ}\text{C}$ ), protein kasar (% PK), serat kasar (% SK) dan kadar air (%KA), dan variabel kontrolnya adalah tebon jagung tanpa penambahan inokulum bakteri asam laktat.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 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  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 15 Psi (*Per Square Inchi*) selama 15 menit. Alat yang tidak tahan panas tinggi disterilisasi dengan cara kimia, yaitu dengan menggunakan alkohol.

#### **3.4.2 Pembuatan media**

##### **a. Media MRSB**

1. Dimasukkan media MRSB instant dan aquades ke dalam beaker glass.
2. Dipanaskan di atas *hot plate*, diaduk hingga homogen.
3. Dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 mL.
4. Semua medium ditutup dengan kapas yang telah dibungkus kain kasa.
5. Disterilkan dengan autoklaf.

##### **b. Media MRSA**

1. Dimasukkan media MRSA instant dan aquades ke dalam beaker glass.
2. Dipanaskan di atas *hot plate*, diaduk hingga homogen.

3. Semua medium ditutup dengan kapas yang telah dibungkus kain kasa.
4. Disterilkan dengan autoklaf.

#### **3.4.3 Peremajaan Bakteri *L. plantarum* dan *L. fermentum* (Ratnakomala, 2006)**

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

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

#### **3.4.4 Proses Pembuatan Silase (Ratnakomala, 2006)**

Pembuatan silase dilakukan melalui beberapa tahapan berikut:

- a. Silase dibuat dari tebon jagung yang dicacah menggunakan copper dengan ukuran 3-5 cm kemudian dilayukan selama 20 jam.
- b. Setiap sampel dibuat sebanyak 0.5 kg.
- c. Silase yang sudah dibuat dimasukkan ke dalam silo (plastik/stoples).
- d. Inokulum bakteri *L. plantarum* dan *L. fermentum* diberikan dengan cara disemprotkan secara berlapis-lapis sedikit demi sedikit pada saat hijauan dimasukkan ke dalam silo (plastik/stoples).
- e. Untuk mencapai kondisi anaerob dilakukan pemadatan dan silo ditutup rapat.
- f. Dilakukan pemeraman selama 21 hari, 28 hari, dan 35 hari.

### 3.4.5 Pengambilan data

Parameter yang diukur sebagai kualitas silase yang baik adalah: perubahan warna, tekstur, aroma/bau, tumbuhnya jamur, suhu silase ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH silase, protein kasar (% PK), serat kasar (% SK), dan kadar air (% KA). Pengambilan data dilakukan setelah 21 hari, 28 hari, dan 35 hari masa pemeraman.

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

1. Diambil sampel dari setiap silo yang diamati setelah pemeraman 21 hari, 28 hari dan 35 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 ( $^{\circ}\text{C}$ )

Diukur suhu sampel pada setiap silo dengan menggunakan termometer.

#### c. pH Silase (Allaily, 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. Kadar air (%KA) (Metode: Oven AOAC)(Lab kimia Unmuh, 2014)

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 botoltimbang pada suhu 100<sup>0</sup>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 24 jam dengan suhu 90-100<sup>0</sup>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. Bobot timbang awal (g)
- b. Sampel bahan (g)
- c. Bobot akhir setelah pengovenan (g)

**e. Protein Kasar (%PK) (Metode: Semi mikro kjedahl) (Lab kimia Unmuh, 2014)**

1. Dihaluskan bahan.
2. Ditimbang bahan dengan timbangan analitik sebanyak 5g (a).
3. Diambil 1-ml 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 kedalam tabung kjeldahl, lalu ditambahkan 2 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan tambahkan 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 tambahkan 8,5 ml NAOH-NA<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dan lakukan 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)

$$\text{Protein kasar (\%)} = \frac{bxc}{ax1000} \times 14.008 \times fp \times 6.25 \times 100\%$$

Keterangan :

a: bobot sampel

b: volume titran HCl

c: N titran HCl

fp: faktor pengenceran

**f. Serat Kasar (%SK) (Metode Acid alkali digestion) (Lab kimia Unmuh, 2014)**

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  $H_2SO_4$  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 kedalam 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)

### 3.5 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.