

**Pembuatan Pakan Fermentasi untuk
Ternak Ruminansia Berbasis Bahan Eceng
Gondok (*Eichhornia crassipes*)**

Penulis

**Isnawati
Guntur Trimulyono**



**Penelaah
Herlina Fitrihidajati,**

Universitas Negeri Surabaya

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah yang telah memberi kekuatan, petunjuk dan kemudahan kepada kami sehingga Buku Referensi Berbasis Riset : Pembuatan Pakan Fermentasi untuk Ternak Ruminansia Berbasis Bahan Eceng Gondok ini dapat terselesaikan.

Buku Referensi ini dapat digunakan sebagai penunjang teori dan praktikum pada beberapa mata kuliah seperti Mikologi (untuk mempelajari jenis-jenis fungi pendegradasi bahan eceng gondok), Mikrobiologi (untuk mempelajari keragaman mikroorganisme indigenus yang terdapat pada bahan eceng gondok), maupun Bioteknologi (terkait praktik pengelolaan limbah lignosellulolitik menjadi pakan fermentasi).

Buku Referensi ini berisi panduan praktis dan konsep teoritis yang mendukung pembuatan pakan fermentasi mulai dari pemilihan bahan, perlakuan awal bahan baku pakan, pembuatan starter indigenus, aplikasi starter pada pembuatan pakan berbahan eceng gondok dan analisis kandungan gizi pakan hasil fermentasi, yang sebagian besar didasarkan atas riset yang telah dilakukan.

Penulis menyadari Buku Referensi ini masih memerlukan penyempurnaan lebih lanjut, oleh karenanya penulis sangat mengharap saran dan masukan yang bersifat membangun dari para pembaca dan pemerhati.

Surabaya, September 2017

Penulis

DAFTAR ISI

COVER	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
INDEKS	iv
GLOSARIUM	vii
BAB I. PENGANTAR	1
BAB II. BAHAN BAKU PAKAN FERMENTASI	5
A. Keragaman Gulma Air	6
B. Keragaman Limbah Pertanian	18
C. Tongkol Jagung Sebagai Limbah Pertanian	22
BAB III. PERLAKUAN PRA FERMENTASI PADA BAHAN BAKU	25
BAB IV. PROSES FERMENTASI CAMPURAN ECENG GONDOK DAN TONGKOL JAGUNG.....	35
BAB V. ISOLASI MIKROORGANISME INDIGENUS CAMPURAN ECENG GONDOK DAN TONGKOL JAGUNG.....	41
BAB VI. PEMBUATAN KULTUR MURNI MIKROORGANISME INDIGENUS HASIL ISOLASI DARI CAMPURAN ECENG GONDOK DAN TONGKOL JAGUNG	51
A. Cara Pengenceran	51
B. Cara Penuangan	52
C. Cara Penggoresan	54
D. Cara Penyebaran	54
E. Cara Pengucilan 1 Sel	54
BAB VII. UJI AKTIVITAS SELULOLITIK DAN SINERGISME MIKROORGANISME INDIGENUS	62
BAB VIII. SELEKSI MIKROORGANISME INDIGENUS, FORMULASI STARTER DAN APLIKASINYA DALAM PEMBUATAN PAKAN FERMENTASI	71
BAB IX. ANALISIS LAMA WAKTU FERMENTASI DAN KANDUNGAN GIZI PAKAN FERMENTASI	78
DAFTAR PUSTAKA	88

INDEKS

A	
Amilolitik	2, 42, 46,
Analisis proksimat	3, 78
Autoklaf	42, 57, 58, 60, 63
B	
Biogas	12
Biota perairan	12
D	
Degradasi	2, 3, 14, 15, 16, 25, 30, 31, 37, 38, 42, 43, 48, 62, 64, 65, 66, 73
E	
Eceng gondok	1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 35, 36, 40, 41, 44, 48, 51, 55, 62, 67, 68, 72, 73, 77, 78, 79, 83
F	
Fermentasi	1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 17, 21, 23, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 55, 62, 71, 72, 73, 77, 78, 79, 81
fermentor	30, 37
Fitoremediasi	12
Formulasi mikroorganisme indigenus	3
G	
Gulma	5, 6, 7, 12, 13, 55,
H	
Hemiselullolitik	2
Higroskopis	15
I	
Isolasi mikroorganisme	1, 35, 41, 43, 44, 45,

K	
Koloni	3, 42, 43, 48, 52, 53, 54, 55, 56, 65, 70
Kultur murni	2, 44, 51, 52, 54, 55, 56, 62, 65,
L	
Lignolitik	2, 73
Limbah	1, 5, 11, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 32, 33, 38, 55
Lipolitik	2, 43, 47
M	
Mikroorganisme indigenus	1, 2, 3, 35, 41, 43, 45, 48, 51, 54, 62, 71, 78
N	
Nutrient Agar	42
P	
Pakan	1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 55, 56, 62, 70, 71, 72, 73, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 84, 85,
Pirolisis	26, 27,
Proteolitik	2, 42, 47,
R	
Ruminansia	1, 5, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 33, 40
S	
Seleksi mikroorganisme	3, 71, 73,
Sellulase	31
Selulolitik	2, 41, 42, 45, 46, 56, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 71, 72, 73, 76

U

Uji proksimat

3, 78

Uji aktivitas enzim selulase

2, 56, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
68, 71**X**

Xylosa

16, 17

GLOSARIUM

A

- Amilolitik : kemampuan untuk menghidrolisis pati (amilum) menjadi senyawa yang lebih sederhana.
- Autoklaf : alat yang digunakan untuk sterilisasi medium dengan menggunakan suhu tinggi dan uap bertekanan.

B

- Biogas : gas yang dihasilkan oleh mikrobia melalui proses fermentasi
- Biota perairan : semua makhluk hidup yang hidup di suatu perairan

D

- Degradasi : proses penguraian suatu senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana.

E

- Eceng gondok : Salah satu jenis tanaman yang termasuk gulma air.

F

- Fermentasi : proses terjadinya penguraian senyawa-senyawa organik untuk menghasilkan energi serta terjadi perubahan substrat menjadi produk baru oleh mikroba
- Fermentor : Alat yang digunakan dalam proses fermentasi/ untuk melakukan fermentasi.
- Fitoremediasi : proses bioremediasi yang menggunakan berbagai tanaman untuk menghilangkan, memindahkan, dan atau menghancurkan kontaminandalam tanah dan air bawah tanah.
- Formulasi mikroorganisme indigenus : formula yang yang merupakan konsorsium berisi mikroorganisme-mikroorganisme hasil isolasi

G

Gulma

: tumbuhan yang kehadirannya tidak diinginkan pada lahan pertanian atau suatu perairan karena kehadirannya akan mengganggu organisme yang lain.

H

Hemiselullolitik

: kemampuan untuk menguraikan hemiselulosa

Higroskopis

: bersifat mudah menyerap air

I

Isolasi mikroorganisme

: kegiatan untuk mendapatkan isolat mikroorganisme menggunakan teknik aseptik sehingga diperoleh isolat mikroorganisme yang diinginkan.

K

Kultur murni

: isolat bakteri yang hanya terdiri dari satu jenis bakteri, berasal dari satu sel tunggal yang diperoleh dari proses pemurnian bakteri.

Koloni

: kumpulan satu sel tunggal dari suatu bakteri

L

Lignolitik

: kemampuan untuk mendegradasi lignin.

Limbah

: suatu barang/ benda yang merupakan sisa suatu proses yang sudah tidak digunakan lagi dan cenderung dibuang ke alam.

Lipolitik

: kemampuan untuk menghidrolisis lemak menjadi asam-asam lemak dan gliserol

M

Mikroorganisme indigenus

: mikroorganisme lokal yang diperoleh dari hasil isolasi pada habitatnya

N

Nutrient Agar

: merupakan salah satu jenis media untuk pertumbuhan mikrobia.

P

Pakan

: makanan/ asupan yang diberikan kepada

- hewan ternak/ peliharaan.
- P**
- Pirolisis : dekomposisi kimia bahan organik melalui proses pemanasan tanpa atau sedikit oksigen atau reagen lainnya, di mana material mentah akan mengalami pemecahan struktur kimia menjadi fase gas.
- Proteolitik : kemampuan untuk memecah protein menjadi senyawa yang lebih sederhana.
- R**
- Ruminansia : hewan pemakan hijauan atau herbivora yang memiliki lambung dengan beberapa ruangan.
- S**
- Seleksi mikroorganisme : kegiatan memilih mikroorganisme sesuai dengan tujuannya
- Selulase : enzim yang dapat memecah selulase
- Selulolitik : mampu mendegradasi dan memanfaatkan selulosa sebagai sumber karbon dan energinya.
- U**
- Uji proksimat : metoda analisis kimia untuk mengidentifikasi kandungan nutrisi seperti protein, karbohidrat, lemak dan serat pada suatu zat makanan dari bahan pakan atau pangan.
- Uji aktivitas enzim selulase : uji kemampuan enzim selulase dalam mendegradasi selulosa.
- X**
- Xylosa : merupakan salah satu jenis gula yang termasuk gula pentosa, monosakarida dengan lima atom karbon dan memiliki gugus aldehida.

BAB I

PENGANTAR

Buku ini merupakan panduan terkait pembuatan pakan fermentasi untuk hewan kelompok ruminansia utamanya kambing, yang berbahan baku eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) dan tongkol jagung (*Zea mays*) dengan memanfaatkan mikroorganisme indigenus yang terdapat pada campuran kedua bahan tersebut. Dalam proses pembuatan pakan fermentasi tersebut telah dilakukan tahapan-tahapan sebagai berikut.

1. Koleksi bahan baku yang berupa eceng gondok dan tongkol jagung.

Pada bab tentang koleksi bahan baku akan digambarkan sekilas tentang bagaimana koleksi eceng gondok dan tongkol jagung yang diperlukan sebagai bahan baku pembuatan pakan. Lokasi tempat pengambilan, kondisi fisik dan kimianya serta kondisi bahan yang memenuhi syarat untuk digunakan sebagai bahan baku.

2. Perlakuan bahan baku sebelum proses fermentasi.

Pada bab ini dipaparkan berbagai cara yang bisa dilakukan untuk perlakuan bahan pra proses fermentasi secara teritis. Pada bab ini juga dipaparkan cara perlakuan pra fermentasi yang digunakan dalam penelitian yang telah dilakukan, tahapan-tahapannya dan hasil yang diperoleh pada tahapan perlakuan tersebut

3. Proses fermentasi campuran kedua bahan.

Pada bab ini akan dipaparkan berbagai teknik fermentasi dalam pengolahan limbah menjadi pakan berdasarkan literatur yang ada. Selanjutnya prosedur yang digunakan dalam pembuatan pakan yang telah dilakukan dipaparkan lebih rinci dan dikemukakan hasil-hasil yang telah diperoleh.

4. Isolasi mikroorganisme indigenus pada campuran eceng gondok dan tongkol jagung yang telah mengalami fermentasi.

Pada bab ini akan dipaparkan cara-cara isolasi mikroorganisme yang terdapat dalam campuran eceng gondok

dan tongkol jagung yang telah terfermentasi secara alamiah (tanpa penambahan starter). Media-media yang digunakan untuk menyeleksi masing-masing kelompok mikroorganisme juga dipaparkan secara rinci. Kelompok-kelompok mikroorganisme yang diisolasi yang memang diperlukan untuk keperluan pembuatan starter adalah meliputi kelompok amilolitik, sellulolitik, lipolitik, hemiselullolitik, proteolitik, dan lignolitik.

5. Pembuatan kultur murni mikroorganisme indigenus.

Berbagai strategi pembuatan kultur murni dan cara-cara penyimpanannya akan dipaparkan secara rinci dalam bab ini. Kultur murni tersebut dilakukan baik untuk fungi maupun untuk bakteri. Teknik penyimpanan kultur murni supaya dapat lama bertahan hidup juga diuraikan secara rinci. Cara penyimpanan yang dipaparkan utamanya adalah cara penyimpanan pada almari pendingin karena cara ini yang paling *applicable*. Pada bab ini juga dipaparkan bagaimanakah “membangun kembali mikroba dari tidurnya” supaya aktif kembali, melakukan metabolisme dengan pesat dan memperbanyak populasinya.

6. Uji aktivitas sellulolitik mikroorganisme indigenus dan sinergismenya.

Mikroba yang telah diisolasi dan dimurnikan tidak semuanya akan menjadi komponen starter. Mikroba-mikroba ini akan mengalami seleksi berdasarkan kemampuannya dalam mendegradasi sellulosa. Hal ini dilakukan atas dasar pertimbangan bahwa sellulosa adalah komponen terbesar yang terkandung baik di dalam eceng gondok, maupun di dalam tongkol jagung. Prosedur dan media serta kemikalia yang digunakan akan dipaparkan secara rinci pada bab ini.

Mampu mendegradasi sellulosa saja belum cukup bagi mikroorganisme untuk menjadi komponen konsorsium. Sarat lain yang harus dipenuhi adalah mikroorganisme tersebut dapat bekerja selaras atau bersinergi dengan mikroorganisme lainnya. oleh sebab itu cara-cara uji sinergisme juga akan

- dijelaskan secara rinci pada bab ini.
7. Seleksi mikroorganisme indigenus untuk formulasi.
Seleksi mikroorganisme indigenus calon komponen starter dilakukan berdasarkan hasil uji aktivitas degradasi selulosa dan hasil uji sinergismenya dengan mikroorganisme lain dalam konsorsium. Metode seleksi tersebut akan dipaparkan pada bab ini secara rinci.
 8. Formulasi mikroorganisme indigenus terseleksi untuk starter fermentasi.
Setelah terpilih koloni-koloni kandidat starter, maka hal yang dilakukan selanjutnya adalah melakukan formulasi atau mengkonsorsiumkan mikroba-mikroba tersebut supaya menjadi starter. Metodenya akan dipaparkan secara rinci pada bab ini.
 9. Aplikasi starter fermentasi pada pembuatan pakan.
Starter yang telah jadi selanjutnya digunakan untuk mempercepat proses fermentasi pada pembuatan pakan dari bahan baku tongkol jagung dan eceng gondok. Cara aplikasinya akan dipaparkan pada bab ini.
 10. Analisis lama waktu fermentasi dan analisis proksimat kandungan gizi pakan fermentasi.
Pada bab ini akan dipaparkan metode penghitungan lama waktu fermentasi dalam pembuatan pakan dan kandungan gizinya, melalui analisis proksimat. Bahan-bahan yang menjadi parameter dalam uji proksimat ini adalah kadar air bahan pakan, abu, protein kasar, lemak kasar, serat kasar dan karbohidrat. Senyawa-senyawa tersebut adalah zat-zat gizi yang diperlukan oleh ternak. Analisis masing-masing parameter melalui tahapan yang berbeda, demikian pula keperluan atas alat dan bahan yang diperlukan juga sangat berbeda.

Tahapan-tahapan yang dikemukakan ini, sekaligus akan menjadi bab-bab dalam buku ini yang dipaparkan secara rinci sehingga memenuhi syarat sebagai panduan. Paparan rinci setiap tahapan utamanya didasarkan pada penelitian yang telah

dilakukan, dan tidak menutup kemungkinan juga dibandingkan dengan referensi yang lain.

Harapan tim peneliti terhadap disusunnya buku ini adalah untuk memberi panduan kepada pihak-pihak yang memerlukan dan bersemangat tinggi untuk membuat pakan fermentasi untuk berbagai keperluan seperti, memenuhi kebutuhan pakan ternaknya akan pakan bergizi, mudah disiapkan dan murah ataupun memproduksi pakan fermentasi untuk dijual kepada peternak lainnya. Potensi lain adalah dapat diproduksinya starter fermentasi yang dapat mempercepat produksi pakan fermentasi, yang kemungkinan besar sangat diperlukan oleh peternak maupun produsen pakan.

Demikianlah pengantar untuk buku ini, semoga dapat memberikan gambaran isi buku secara keseluruhan.

BAB II

BAHAN BAKU PAKAN FERMENTASI

Bahan baku pakan fermentasi dapat bervariasi, tetapi pada penelitian yang dilakukan bahan baku pakan fermentasi difokuskan pada gulma perairan dan limbah pertanian. Pada penelitian yang telah dilakukan gulma perairan yang digunakan difokuskan pada eceng gondok yang selama ini dianggap menimbulkan banyak masalah. Sedangkan limbah pertanian yang dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan pakan adalah tongkol jagung yang selama ini masih terbengkalai, belum dimanfaatkan secara maksimal. Pada bab ini akan ditambahkan paparan tentang wawasan gulma lebih mendalam, begitu juga dengan limbah pertanian

Gulma merupakan salah satu unsur pengganggu tanaman yang tumbuhnya tidak dikehendaki pada setiap perusahaan tanaman. Gulma perairan merupakan bentuk gulma yang memiliki habitat hidup di perairan. Tumbuhan liar adalah tumbuhan yang beradaptasi terhadap keadaan air kontiu atau paling tidak toleran terhadap kondisi tanah berair untuk periode waktu hidupnya. Tidak mudah mendefinisikan vegetasi secara tepat, mengingat suatu jenis mungkin ditemukan di lingkungan perairan maupun daratan dan terdapat kisaran yang luas terhadap kadar air. Dalam praktek gulma air diklasifikasikan sebagai *marginal* (tepi), *emergent* (gabungan antara tenggelam dan terapung), *submerged* (melayang), *anchored with floating leaves* (tenggelam), *freefloating* (mengapung), dan plankton/alga.

Gulma perairan dapat mengganggu ekosistem karena jika keadaannya melimpah maka dapat menurunkan kadar oksigen. Gulma dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Pemanfaatan gulma sebagai pakan ternak ruminansia tidak hanya dapat mengatasi kurangnya produksi hijauan yang berkualitas namun dapat mengendalikan gulma perkebunan secara biologis. Hijauan merupakan sumber pakan utama bagi ternak ruminansia

sehingga berbagai upaya peningkatan produksi ternak dalam rangka memenuhi kebutuhan sumber protein hewani akan sangat sulit dicapai apabila ketersediaan hijauan pakan tidak sebanding dengan kebutuhan ternak yang ada. Di lain pihak, produksi hijauan pakan dari waktu ke waktu semakin menurun seiring dengan beralihnya fungsi lahan untuk pemukiman, jalan, industri serta produksi tanaman pangan dan perkebunan; sementara produksi hijauan pakan sebagian besar dilakukan pada lahan lahan marjinal.

A. Keragaman Gulma Perairan

Gulma cenderung tumbuh lebih subur di daerah hulu sungai (karena daerah pertanian) dibandingkan daerah hilir (karena daerah industri), hal ini dimungkinkan karena sebagian besar unsur hara yang berasal dari pupuk organik dan anorganik akan terakumulasi di bagian hulu sungai, sehingga dapat merangsang laju pertumbuhan beberapa jenis gulma air seperti *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms, *Azolla pinata* R. Br, *Hydrilla verticillata* (L) serta yang lainnya (Edward, 1981).

Gulma perairan mengapung yang tumbuh di perairan Taman Wisata Wendit Malang dan Sumber Air Ronggojalu Probolinggo dapat dimanfaatkan adalah eceng gondok (*Eichornia crassipes*), kayu apu (*Pistia stratiotes*) dan kiambang (*Salvinia natans*) yang berpotensi mengakumulasi logam berat dan memiliki kemampuan penyerapan logam berat (Kurniadie dkk, 2016)

Adapun contoh gulma untuk daerah perairan adalah sebagai berikut:

1. *Typha Angustifolia*

Typha Angustifolia atau biasa disebut Tipa termasuk tanaman air berbentuk rumpun dari keluarga Thypaceae. Tanaman Tipa merupakan tumbuhan semi akuatik yang mana tidak memerlukan jumlah air yang banyak .

Menurut pengetahuan di landscape *Typha Angustifolia* merupakan salah satu tanaman yang banyak dijumpai pada

daerah bekas tsunami yang tersebar di seluruh daerah Kota Banda Aceh. Pasca tsunami tahun 2004 lalu, tanaman tumbuhan obor (*Typha Latifolia*) ini tumbuh di semua tempat yang tergenangi air tsunami. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman tersebut mampu bertahan hidup pada kondisi daerah yang tercemar.

Tanaman Tipa berkembang biak dengan dua cara yaitu seksual dan aseksual. Pembiakan secara seksual adalah melibatkan organ pembiakan jantan dan betina, pembiakan ini berlaku melalui penyebaran biji. Sedangkan pembiakan aseksual adalah dengan menggunakan rizoma yang terdapat pada pokok dasar batang.

2. *Eichornia crassipes* (Eceng gondok)

Eceng gondok atau enceng gondok (Latin: *Eichhornia crassipes*) adalah salah satu jenis tumbuhan air mengapung. Selain dikenal dengan nama eceng gondok, di beberapa daerah di Indonesia, eceng gondok mempunyai nama lain seperti di daerah Palembang dikenal dengan nama Kelipuk, di Lampung dikenal dengan nama Ringgak, di Dayak dikenal dengan nama Ilung-ilung, di Manado dikenal dengan nama Tumpe. Eceng gondok pertama kali ditemukan secara tidak sengaja oleh seorang ilmuwan bernama Carl Friedrich Philipp von Martius, seorang ahli botani berkebangsaan Jerman pada tahun 1824 ketika sedang melakukan ekspedisi di Sungai Amazon Brasil. Eceng gondok memiliki kecepatan tumbuh yang tinggi sehingga tumbuhan ini dianggap sebagai gulma yang dapat merusak lingkungan perairan. Eceng gondok dengan mudah menyebar melalui saluran air ke badan air lainnya.

Eceng gondok hidup mengapung di air dan kadang-kadang berakar dalam tanah. Tingginya sekitar 0,4 - 0,8 meter. Tidak mempunyai batang. Daunnya tunggal dan berbentuk oval. Ujung dan pangkalnya meruncing, pangkal tangkai daun menggelembung. Permukaan daunnya licin dan

berwarna hijau. Bunganya termasuk bunga majemuk, berbentuk bulir, kelopaknya berbentuk tabung. Bijinya berbentuk bulat dan berwarna hitam. Buahnya kotak beruang tiga dan berwarna hijau. Akarnya merupakan akar serabut.

3. *Salvinia Molesta* (kiyambang)

Salvinia molesta adalah tanaman apung yang bebas di air. Tanaman ini mempunyai rimpang horizontal (yang terletak di bawah permukaan air) dan dua jenis daun palem (apung dan tenggelam). Tanaman dewasa menghasilkan kantung spora berbentuk telur yang mengandung spora subur. Tidak memiliki akar sejati sehingga daun ke permukaan berfungsi sebagai akar. Daunnya adalah bergelung dari tiga (dua mengambang dan satu terendam). Di bagian atas permukaan mereka memiliki baris papila silinder. Masing-masing papilla memiliki empat rambut pada ujung distalnya (masing-masing terdiri dari satu baris sel) yang bergabung bersama-sama di ujung untuk membentuk seperti pemukul-telur terbalik. Struktur kandang-seperti dari ujung rambut merupakan peraangkap udara yang efektif memberikan daya apung tanaman di dalam air. Papila rambut akhir, dan permukaan atas tanaman adalah anti air dibandingkan dengan di bawah permukaan daun, yang menarik air. Ini adalah perbedaan dalam atraksi air yang mempertahankan orientasi yang baik tanaman di permukaan air.

4. *Azolla Pinnata* (azola)

Spesies *Azolla pinnata* memiliki kandungan protein yang baik sehingga dapat dimanfaatkan sebagai pakan hewan ternak, unggas, dan ikan. Spesies *Azolla pinnata* dikenal mampu bersimbiosis dengan bakteri biru (*Anabaena azollae*) dan mengikat nitrogen langsung dari udara. Kemampuan *Azolla pinnata* tersebut memiliki nilai ekologis dan ekonomis yang baik saat diolah maupun dimanfaatkan sebagai pupuk hijau dan pakan hewan ternak.

Azolla pinnata ditemukan di daerah tropis asia (termasuk Asia Tenggara), Cina selatan dan timur, Jepang selatan, Australia utara dan di daerah tropis Afrika selatan (termasuk Madagaskar).

Azolla merupakan satu-satunya genus dari paku air mengapung suku Azollaceae. Terdapat tujuh spesies yang termasuk dalam genus ini. Suku Azollaceae sekarang dianjurkan untuk digabungkan ke dalam suku Salviniaceae, berdasarkan kajian morfologi dan molekular dari Smith *et al.* (2006)

Azolla dikenal mampu bersimbiosis dengan bakteri biru-hijau *Anabaena azollae* dan mengikat nitrogen langsung dari udara. Potensi ini membuat *Azolla* digunakan sebagai pupuk hijau baik di lahan sawah maupun lahan kering. Pada kondisi optimal *Azolla* akan tumbuh baik dengan laju pertumbuhan 35% tiap hari Nilai nutrisi *Azolla* mengandung kadar protein tinggi antara 24-30%. Kandungan asam amino esensialnya, terutama lisin 0,42% lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrat jagung, dedak, dan beras (Arifin, 1996 dalam Akrimin, 2002).

Meskipun demikian, seiring dengan perkembangan pupuk hijau, penggunaan *azolla* ini kini lebih banyak dimanfaatkan untuk budidaya perikanan. Dengan adanya mindazbesi yang menggabungkan mina padi dengan *azolla*, selain menjadikannya sebagai pakan perikanan juga kontribusi dapat digunakan untuk peningkatan produksi padi.

5. *Limnocharis flava* (Genjer)

Berdasarkan susunan tulang daun, tanaman genjer memiliki tulang daun yang melengkung yaitu daun yang susunan tulang daunnya melengkung. Bagian daun terlebar pada genjer terletak pada bagian tengah helaian daun. Ujung distal helai daun (*apex*) meruncing (*acuminatus*). Tunggal, roset akar, bertangkai persegi, lunak, panjang 15-25 cm, helai

daun lonjong, ujung meruncing pangkal tumpul, tepi rata, panjang 5-50 cm, lebar 4-25 cm, pertulangan sejajar, hijau. Berdasarkan sifat batang genjer termasuk pada batang basah (herba), karena batang ini biasanya mengandung air, tidak berkayu dan berwarna hijau.

Batang tanaman genjer berbentuk bundar (*globosus*). Arah batang di atas tanah genjer memiliki batang yang tegak (*erectus*) dengan berarah tegak lurus ke atas. Apabila dilihat tanaman ini mempunyai akar serabut. Akar lembaga dari tanaman ini dalam perkembangan selanjutnya mati atau kemudian disusul oleh sejumlah akar yang kurang lebih sama besar dan semuanya keluar dari pangkal batang. Akar-akar ini karena bukan berasal dari calon akar yang asli yang dinamakan akar liar, bentuknya seperti serabut, oleh karena itu dinamakan akar serabut (*radix adventicia*).

Pemanfaatan tanaman genjer (*Limnocharis flava*) dilakukan terhadap daun muda dengan petiole dan buah yang belum terbuka yang dimakan sebagai sayuran, di Indonesia terutama di Jawa Barat, Malaysia, dan Thailand. Tanaman ini biasanya tidak dimakan mentah tetapi dipanaskan di atas api atau dimasak untuk waktu yang singkat. Pengolahan genjer sebagai penambah nafsu makan adalah dengan pengukusan genjer segar hingga setengah matang yang dikonsumsi sebagai lalapan. Daun dan bunga genjer berkhasiat sebagai penambah nafsu makan.

Bahan baku yang digunakan dalam pembuatan pakan fermentasi yang ditulis pada buku ini adalah eceng gondok seperti dipaparkan pada Gambar 2.1 berikut ini.



Gambar 2.1. Eceng gondok sebagai bahan baku pembuatan pakan fermentasi

Eceng gondok yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari sungai yang tidak tercemar oleh cemaran yang membahayakan seperti logam berat dan limbah beracun. Pengambilan eceng gondok tetap dilakukan pada sungai-sungai yang tercemar bahan organik. Pada sungai dengan kondisi cemaran bahan organik yang tinggi, eceng gondok tumbuh dengan pesat.

Eceng gondok digunakan sebagai bahan pakan karena beberapa alasan seperti (1) kandungan gizinya yang tinggi (2) ketersediaannya yang melimpah sepanjang waktu (3) mudah pengelolaannya sebagai bahan baku pakan. Beberapa kajian literatur terkait kandungan gizi eceng gondok sebagai bahan baku pakan telah dilakukan. Menurut analisis dari Laboratorium Balitnak Bogor *dalam* Marina dan Askar (2001) kandungan gizi eceng gondok adalah seperti Tabel 2.1 berikut ini.

Tabel 2.1 Komposisi kimia daun eceng gondok

Bahan pakan	Komposisi kimia (% bahan kering)							
	BK	SK	LK	Abu	BETN	Ca	P	GE(kal/gr)
Dn. Eceng Gondok ¹⁾	83,34	15,25	3,67	16,46	31,53	1,81	0,52	3384
Dn. Eceng Gondok ²⁾	-	29,30	2,66	9,26	33,45	0,34	0,34	4016
Dn. Eceng Gondok ³⁾	-	22,82	2,87	-	-	2,13	0,58	-

Keterangan : BK = bahan kering ; PK = protein kasar ;SK = serat kasar ; LK = lemak kasar ; BETN= bahan ekstrak tanpa nitrogen ; Ca = kalsium, P = posfor, GE = Energi kasar.

Sumber : 1) Lab. Balitnak Bogor (komunikasi pribadi, 2001)

2) MANIN (1997)

3) INOUNU (1980)

Eceng gondok banyak tumbuh di perairan yang tercemar bahan organik (Ndimele, 2011) Sampai saat ini eceng gondok dianggap sebagai gulma perairan yang merugikan. Pertumbuhannya yang pesat pada badan air dapat mengubah keragaman biota perairan dan membahayakan kehidupan organisme air lainnya (Gichuki, *J et al.*, 2012). Berbagai usaha telah dilakukan untuk menghambat pertumbuhannya. Usaha tersebut meliputi pengurangan nutrien pada badan air (Gichuki, *J et al.*, 2012), dengan menghilangkan tumbuhan secara manual, dengan peralatan mekanik ataupun memberikan herbisida yang ramah terhadap badan air seperti 2,4-D atau glyphosate (Labrada, *et al.* 1994). Beberapa para peneliti di China telah menggunakan paraquat untuk memberantas eceng gondok (Jian-jun *et al.*, 2006). Eceng gondok dapat tumbuh pesat karena cara reproduksinya yang efisien. Tumbuhan ini dapat menghasilkan biji dalam jumlah besar. Biji tersebar dengan berbagai cara seperti terbawa manusia, hewan atau mengikuti aliran air. Apabila biji tidak viabel maka tumbuhan ini akan berkembang biak secara vegetatif menggunakan stolon (Bhattacharya, *et al.*, 2015). Salah satu tindakan yang tepat adalah menggali potensi pemanfaatan eceng gondok. Saat ini eceng gondok banyak digunakan sebagai agen fitoremediasi seperti logam berat, polutan organik dan anorganik (Rezania, *et al.*, 2015), produksi biogas (Njogu, *et al.*, 2015), produksi protein sel

tunggal (Bellamy, 2000). Saat ini sering kita jumpai penggunaan eceng gondok untuk pembuatan barang kerajinan seperti tas, tali atau hiasan lainnya. Pemanfaatan gulma air ini menjadi karya atau bahan yang bernilai ekonomi lainnya sangat menguntungkan karena ketersediannya yang melimpah, mudah dan murah didapatkannya.

Pemanfaatan eceng gondok sebagai pakan ternak sangat memungkinkan karena kandungan gizinya yang tinggi dan memenuhi syarat untuk menjadi bahan pakan. Mako, *et al.*, (2011) telah menganalisis nilai gizi eceng gondok yang diambil dari berbagai tempat dan menyimpulkan bahwa tumbuhan air ini berpotensi menjadi pakan ternak utamanya ruminansia. Eceng gondok mengandung protein yang tinggi antara 11,87% dan 14,28%, mempunyai kandungan kalsium dan fosfor tinggi, dan dapat memicu produksi susu apabila dikombinasikan dengan konsentrat yang sesuai (Kumar, *et al.*, 2011). Komposisi kandungan gizi eceng gondok menurut Hossain *et al.*, (2015) meliputi bahan kering (8,7 - 9,3 G/100g), protein kasar (10,1 - 11,2 G/100g), serat kasar (26,1 - 27,4 G/100G), ekstrak bebas nitrogen (47,2 - 50,2 G/100g), ekstrak eter (1,1 - 1,8 G/100g), dan total abu 12,3 - 12,4 G/100g, dengan energi metabolisme sebesar (1999,7 - 2054,1 Kcal/kg untuk tiap bahan kering. Berdasarkan komposisi kimia tersebut di beberapa tempat banyak eceng gondok digunakan sebagai pakan ternak secara langsung. Beberapa penelitian tentang pemanfaatan eceng gondok untuk pakan ternak telah dilakukan, seperti sebagai pakan itik (Lu, *et al.*, 2008; Mangisah, *et al.*, 2009), untuk pakan ikan jenis *Cyprinus carpio* (Mohapatra, *et al.*, 2015). Menurut Vhanalakar dan Muley (2014), eceng gondok dapat digunakan untuk pakan ikan.

Di Indonesia, terdapat tiga jenis eceng gondok, yakni eceng gondok sungai, eceng ondok rawa, dan eceng gondok kolam. Adapun ciri eceng gondok yang terdapat di Pulau Jawa secara umum adalah (1) Cirebon: pendek, tipis, lebih gelap

warnanya. Jenis ini kurang bagus jika digunakan untuk anyaman keranjang. (2) Jawa Timur: panjang, tipis, lebih terang warnanya. Jenis ini bagus digunakan untuk peralatan yang warnanya terang, juga *handicraft*. (4) Semarang (Ambarawa): agak panjang, tetapi tidak sepanjang dari Jawa Timur, tebal, dan warnanya cukup variatif (tergantung dari cuaca, dimana eceng gondok akan berwarna agak kegelapan pada musim hujan).

Komponen kimia dalam eceng gondok meliputi selulosa, hemiselulosa, lignin selulosa, adalah polimer glukosa yang berbentuk rantai linier dan dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosidik. Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Di alam, biasanya selulosa berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan. Unit penyusun (*building block*) selulosa adalah selobiosa karena unit keterulangan dalam molekul selulosa adalah 2 unit gula (D-glukosa).

Selulosa adalah senyawa yang tidak larut di dalam air dan ditemukan pada dinding sel tumbuhan terutama pada tangkai, batang, dahan, dan semua bagian berkayu dari jaringan tumbuhan. Selulosa merupakan polisakarida struktural yang berfungsi untuk memberikan perlindungan, bentuk, dan penyangga terhadap sel, dan jaringan. Selulosa tidak pernah ditemukan dalam keadaan murni di alam, tetapi selalu berasosiasi dengan polisakarida lain seperti lignin, pektin, hemiselulosa, dan xilan. Kebanyakan selulosa berasosiasi dengan lignin sehingga sering disebut sebagai lignoselulosa. Selulosa, hemiselulosa dan lignin dihasilkan dari proses fotosintesis. Di dalam tumbuhan molekul selulosa tersusun dalam bentuk fibril yang terdiri atas beberapa molekul paralel yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik sehingga sulit diuraikan. Komponen-komponen tersebut dapat diuraikan oleh aktifitas mikroorganisme. Beberapa mikroorganisme

mampu menghidrolisis selulosa untuk digunakan sebagai sumber energi, seperti bakteri dan fungi. Rantai selulosa terdiri dari satuan glukosa anhidrida yang saling berikatan melalui atom karbon pertama dan ke empat. Ikatan yang terjadi adalah ikatan β -1,4-glikosidik. Secara alamiah molekul-molekul selulosa tersusun dalam bentuk fibril-fibril yang terdiri dari beberapa molekul selulosa yang dihubungkan dengan ikatan glikosidik. Fibril-fibril ini membentuk struktur kristal yang dibungkus oleh lignin. Komposisi kimia dan struktur yang demikian membuat kebanyakan bahan yang mengandung selulosa bersifat kuat dan keras. Sifat kuat dan keras yang dimiliki oleh sebagian besar bahan berselulosa membuat bahan tersebut tahan terhadap peruraian secara enzimatis. Secara alamiah peruraian selulosa berlangsung sangat lambat. Selulosa memiliki sifat fisik diantaranya sebagai berikut: (1) berwarna putih, (2) memiliki berat molekul berkisar antara 300.000 – 500.000 g/ml, (3) dapat terdegradasi oleh hidrolisa, oksidasi, fotokimia, maupun secara mekanis sehingga berat molekulnya berkurang, (4) tidak larut dalam pelarut organik, tetapi sebagian larut pada larutan alkali, (5) dalam keadaan kering, selulosa bersifat higroskopis (baik menyerap air), keras, dan rapuh. Jika selulosa mengandung banyak air maka akan bersifat lunak. Jadi fungsi air adalah sebagai pelunak, (6) selulosa dalam kristal memiliki kekuatan lebih baik dibandingkan dengan bentuk amorfnya, (7) Berdasarkan derajat polimerisasi dan kelarutan dalam senyawa natrium hidroksida (NaOH) 17,5%, selulosa dapat dibedakan atas tiga jenis.

Komponen lignin juga terdapat dalam eceng gondok. Lignin adalah molekul kompleks yang tersusun dari unit phenylpropane yang terikat di dalam struktur tiga dimensi. Lignin adalah material yang paling kuat di dalam biomassa. Lignin sangat resisten terhadap degradasi, baik secara biologi, enzimatik maupun kimia. Karena kandungan karbon yang relatif tinggi dibandingkan dengan selulosa dan hemiselulosa,

lignin memiliki kandungan energi yang tinggi. Lignin merupakan polimer alami dan tergolong ke dalam senyawa rekalsitran karena tahan terhadap degradasi atau tidak terdegradasi dengan cepat di lingkungan. Molekul lignin adalah senyawa polimer organik kompleks yang terdapat ada dinding sel tumbuhan dan berfungsi memberikan kekuatan pada tanaman. Lignin tersusun dari tiga jenis senyawa fenilpropanoid, yaitu alkohol kumaril, alkohol koniferil dan alkohol sinapil. Ketiganya tersusun secara random membentuk polimer lignin yang amorfus (tidak beraturan). Ketidakteraturan struktur lignin ini menyebabkan proses degradasi menjadi sangat kompleks. Lignin sangat mudah mengalami oksidasi, bahkan dalam keadaan lemah dapat terurai menjadi asam aromatis seperti asam benzoate dan asam proto chatchecat. Jika oksidasinya terlalu keras akan membentuk asam–asam formiat, asetat, oksalat dan suksinat. Dalam keadaan oksidasi sedang yang banyak terdapat dalam proses pemutihan lignin diubah menjadi produk yang dapat larut air atau alkali.

Komponen selanjutnya adalah hemiselulosa. Hemiselulosa merupakan polisakarida non selulosa yang pokok, terdapat dalam serat dengan berat molekul 4000–15.000 dan tergolong senyawa organik. Molekul hemiselulosa mudah menyerap air, bersifat plastis dan mempunyai permukaan kontak antar molekul yang lebih luas, sehingga dapat memperbaiki ikatan antar serat pada pembuatan kertas. Hemiselulosa mirip dengan selulosa yang merupakan polymer gula. Namum, berbeda dengan selulosa yang hanya tersusun dari glukosa, hemiselulosa tersusun dari bermacam –macam jenis gula. Monomer gula penyusun hemiselulosa terdiri dari monomer gula berkarbon 5 (C-5) dan monomer gula berkarbon 6 (C-6), misalnya: xylosa, manose, glukosa, galaktosa, arabinosa dan sejumlah kecil rhamnosa, asam glukoroat, asam metal glukoroat dan asam galaturonat.

Xylosa adalah salah satu gula C-5 dan merupakan gula terbanyak kedua di biosfer setelah glukosa. kandungan hemiselulosa di dalam biomassa lignoselulosa berkisar antara 11% hingga 37 % (berat kering biomassa). Hemiselulosa lebih mudah dihidrolisis daripada selulosa, tetapi gula C-5 lebih sulit difermentasi. Perbedaan hemiselulosa dengan selulosa yaitu hemiselulosa mudah larut dalam alkali tapi sukar larut dalam asam, sedang selulosa adalah sebaliknya. Hemiselulosa juga bukan merupakan serat-serat panjang seperti selulosa. Hasil hidrolisis selulosa akan menghasilkan D-glukosa, sedangkan hasil hidrolisis hemiselulosa akan menghasilkan D-xylosa dan monosakarida lainnya (Winarno, 1984)

Bahan baku lainnya yang dapat digunakan sebagai bahan pakan fermentasi adalah berbagai jenis limbah pertanian selain tongkol jagung seperti pada Gambar 2.2 berikut ini.



Gambar 2.2 Tongkol jagung sebagai bahan baku pembuatan pakan fermentasi

Pakan merupakan salah satu faktor terpenting, dalam semua usaha peternakan, baik ternak ruminansia maupun ternak unggas. Besarnya pengaruh pakan terhadap produksi menyebabkan biaya yang dikeluarkan untuk pakanpun tidak bisa dianggap ringan. Sekitar 60 – 80 % dari keseluruhan biaya produksi ditentukan oleh faktor biaya pakan (Djanah,

1985). Efisiensi terhadap pengolahan pakan mempunyai arti yang sangat penting guna menekan biaya pakan. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan mengganti bahan pakan yang relatif mahal dengan bahan yang relatif murah namun tetap memperhatikan nilai gizi dan ketersediaan bahan pengganti.

Pakan dalam melakukan usaha budidaya ternak, merupakan salah satu sarana produksi yang amat penting dan sangat strategis, karena kecukupan dan mutunya yang secara langsung berkorelasi dengan performan ternak. Keterbatasan pakan dapat menyebabkan daya tampung ternak pada suatu daerah menurun atau dapat menyebabkan gangguan produksi dan reproduksi. Hal ini dapat diatasi bila potensi pertanian/ industri maupun limbahnya dapat dioptimalkan penggunaannya sebagai bahan pakan ternak. Penggunaan bahan pakan alternatif sebaiknya mempertimbangkan beberapa hal, antara lain bahan pakan tersebut tersedia dalam satu tempat dalam jumlah yang banyak, sehingga untuk memperolehnya tidak membutuhkan biaya yang besar.

B. Keragaman Limbah Pertanian

Limbah adalah sisa atau hasil ikutan dari produk utama limbah. Limbah pertanian adalah bagian tanaman pertanian diatas tanah atau bagian pucuk, batang yang tersisa setelah dipanen atau diambil hasil utamanya dan merupakan pakan alternatif yang digunakan sebagai pakan ternak (Yani, 2011). Berbagai hasil ikutan pertanian dapat dijadikan sebagai sumber bahan pakan baru baik untuk ternak ruminansia maupun ternak unggas. Sumber limbah pertanian diperoleh dari komoditi tanaman pangan, dan ketersediaanya dipengaruhi oleh pola tanam dan luas areal panen dari tanaman pangan di suatu wilayah. Jenis limbah pertanian sebagai sumber pakan antara lain : limbah tanaman padi, tanaman jagung, tanaman kedelai, tanaman kacang tanah, tanaman ubi kayu, tanaman ubi jalar, dan lain-lain.

1. Tanaman Padi

Padi (beras) merupakan salah satu makanan pokok di Indonesia. Pemanfaatan padi sebagai pakan ternak terutama ternak unggas sangat bersaing dengan kebutuhan manusia. Akan tetapi limbah dari tanaman padi sangat berpotensi untuk dijadikan pakan ternak. Limbah tersebut berupa jerami, dedak, dan bekatul.

a. Jerami padi dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak ruminansia. Penggunaan jerami padi sebagai pakan ternak telah umum dilakukan di daerah tropik, terutama sebagai makanan ternak pada musim kemarau. Jumlah jerami yang dihasilkan dalam satu hektar padi sawah adalah sebanyak 1,44 kali dari jumlah hasil panennya. Dengan mengetahui jumlah jerami yang dihasilkan maka dapat diketahui juga daya tampung ternak dalam satu hektar sawah dalam satu tahun. Sebagai contoh perhitungannya adalah sebagai berikut:

- Produksi padi sawah tadah hujan/rawa dengan asumsi panen 1 kali dalam satu tahun dengan hasil rata-rata sebanyak 4 ton/ha, maka jumlah jerami yang dihasilkan sebanyak $= 1,44 \times 4 = 5,76$ ton/ha.
- Jika konsumsi ternak per hari sebanyak 8 kg/ekor/hari maka konsumsi ternak per ekor/tahunnya adalah sebanyak 1 tahun $= 8 \text{ kg} \times 365 \text{ hari} = 2920 \text{ kg/tahun}$
- Maka tiap hektar $= 5760 \text{ kg/ha} : 2920 \text{ kg/tahun} = 1,97$ dibulatkan menjadi 2 ekor ternak/ha/tahun.

Bila dilihat dari daya tampung ternak maka potensi jerami padi sebagai pakan ternak dapat diterapkan di Kabupaten Bangka Barat. Selain potensi ketersediaan bahan bakunya penggunaan jerami padi sebagai makanan ternak mengalami kendala terutama disebabkan adanya faktor pembatas dengan nilai nutrisi yang rendah yaitu kandungan protein rendah, serat kasar tinggi, serta pencernaan rendah. Untuk mengatasi hal tersebut maka pemanfaatan jerami padi sebagai pakan ternak ruminansia

perlu diefektifkan, yaitu dengan dilakukan dengan cara penambahan suplemen atau bahan tambahan lain agar kelengkapan nilai nutrisinya dapat memenuhi kebutuhan hidup ternak secara lengkap sekaligus meningkatkan daya cerna pakan (Rahadi, 2008).

- b. Dedak dan bekatul sebagai limbah dari penggilingan padi, dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak unggas dan ternak ruminansia. Banyaknya dedak yang dihasilkan tergantung pada cara pengolahan. Dedak kasar dapat dihasilkan sebanyak 14,44%, dedak halus sebanyak 26,99%, bekatul sebanyak 3% dan 1-17% menir dari berat gabah kering (Laporan Akhir Pengembangan Teknologi Pakan Ternak di Kabupaten Bangka Barat, 2014). Di Kabupaten Bangka Barat, berdasarkan hasil analisa Laboratorium Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Pakan (2014), kandungan protein kasar dalam dedak padi merah cukup tinggi, yaitu sebesar 11,57%. Sedangkan kandungan serat kasarnya cukup tinggi yaitu sebesar 14,78%. Untuk dedak padi putih kandungan protein kasarnya sebesar 7,41%, sedangkan serat kasarnya sangat tinggi yaitu sebesar 29,86%. Tingginya kandungan serat kasar tersebut merupakan penyebab terbatasnya penggunaan dedak dalam ransum ternak, terutama ternak unggas.

2. Tanaman Jagung

Setelah produk utamanya dipanen hasil ikutan tanaman jagung dapat dijadikan sebagai pakan ternak ruminansia, yaitu berupa jerami, klobot dan tongkol jagung baik sebelum atau sesudah melalui proses pengolahan. Jumlah produk ikutan jagung dapat diperoleh dari satuan luas tanaman jagung antara 2,5-3,4 ton bahan kering per hektar yang mampu menyediakan bahan baku sumber serat/pengganti hijauan untuk 1 satuan ternak (bobot hidup setara 250 kg dengan konsumsi pakan kering 3% bobot hidup) dalam setahun.

3. Tanaman Ubi Kayu

Tanaman ubi kayu (*Cassava*) merupakan makanan pokok nomor tiga setelah padi dan jagung di Indonesia. Tanaman ini merupakan tanaman tropis yang potensial dan sangat penting sebagai pakan ternak sumber energi (umbi) dan protein (daun) dalam jumlah besar. Limbah tanaman ubi kayu yang dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak terbagi menjadi 2 bagian, yaitu: 1). Berasal dari lahan pertanian, berupa daun ubi kayu setelah masa panen. Produksi biomassa hijauan ubi kayu terdiri atas daun, tangkai daun dan batang. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Wanapat *et al.* (2002) dalam Sirait dan Simanihuruk (2010), menunjukkan produksi daun merupakan proporsi tertinggi, yakni sebesar 61,6 % pada pemanenan yang dilakukan saat tanaman berumur 4 bulan dengan tinggi pemotongan sekitar 40 cm di atas permukaan tanah dari total produksi bahan kering sebesar 1.434 kg/ha. 2). Berasal dari pabrik pengolahan ubi kayu menjadi tepung tapioka atau industri makanan berupa kulit ubi kayu, potongan-potongan yang tidak bisa masuk ke mesin penggiling dan onggok. Akan tetapi penggunaan umbi dan daun ubi kayu dalam ransum ternak cukup terbatas dikarenakan adanya faktor pembatas berupa racun asam sianida (HCN). Beberapa proses pengolahan yang dapat dilakukan untuk menurunkan kadar HCN dalam ubi kayu adalah pengeringan, perendaman, perebusan, fermentasi dan kombinasi proses-proses ini. Sedangkan untuk daunnya, kandungan HCN dapat diturunkan dengan pengeringan, perebusan atau penambahan metionin atau senyawa lain yang mengandung sulfur. Penggunaan ubi kayu dalam ransum ternak unggas sebesar 5-10% dan untuk ternak ruminansia sebesar 40-90% (Laporan Akhir Kegiatan Pengembangan Teknologi Pakan Ternak, 2014).

Limbah dari tanaman ubi kayu yang merupakan hasil sampingan dari industri tapioka adalah onggok. Onggok memiliki nilai gizi sedikit lebih rendah dari ubi kayu, akan

tetapi mempunyai kandungan BETN yang relatif tinggi sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku pakan sumber energi bagi ternak.

4. Tanaman Lainnya

Menurut Widayati dan Widalestari (1996), limbah pertanian lainnya yang dapat dimanfaatkan sebagai pakan pendukung untuk ternak terutama ternak ruminansia antara lain kulit buah nanas, bungkil kacang tanah, pucuk tebu, jerami kedele, jerami ketela rambat, jerami kacang tanah serta limbah berupa sayur-sayuran yang sudah tidak termanfaatkan untuk manusia.

Limbah-limbah pertanian tersebut rata-rata memiliki kandungan serat kasar yang tinggi, namun ketersediaannya cukup melimpah di alam sehingga perlu adanya pemanfaatan yang lebih lanjut dengan sentuhan teknologi yang dapat mengubah bahan baku tersebut menjadi pakan bergizi dan sumber energi bagi ternak sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan pakan terutama ternak ruminansia.

C. Tongkol Jagung sebagai Limbah Pertanian

Jagung merupakan salah satu komoditas serealia yang mempunyai peran yang strategis dan berpeluang untuk dikembangkan karena perannya sebagai sumber utama karbohidrat dan protein setelah beras. Hampir semua bagian tanaman jagung dapat dimanfaatkan untuk berbagai macam keperluan Batang dan daun tanaman yang masih muda dapat digunakan sebagai pakan ternak, tanaman yang telah dipanen dapat digunakan untuk pembuatan pakan atau pupuk organik. Data BPS (2012) menunjukkan produksi jagung Indonesia mencapai kurang lebih 19 juta ton sementara kebutuhan jagung untuk bahan baku industri pakan terus meningkat seiring meningkatnya tingkat konsumsi daging di Indonesia. Kebutuhan bahan baku pakan di Indonesia sangat besar. Komposisi formula ransum pakan terdiri dari 40-50% jagung dan sisanya dari

bungkil kedelai. Dengan asumsi kebutuhan pakan 15 juta ton maka diperlukan substitusi jagung antara 7-7,5 juta ton. Tingkat konsumsi jagung untuk pakan ternak tertinggi di Indonesia adalah Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Sumatera Utara dan Sulsel. Untuk memenuhi kebutuhan pakan yang terus meningkat maka penggunaan limbah tanaman jagung merupakan salah satu alternative terbaik. Limbah tanaman jagung sangat berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai pakan, tetapi hanya untuk ternak ruminansia karena tingginya kandungan serat. Jerami jagung merupakan bahan pakan penting untuk sapi pada saat rumput sulit diperoleh, terutama pada musim kemarau. Jerami jagung yang diawetkan dengan pengeringan matahari menghasilkan berbagai macam produk sampingan yang dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak.

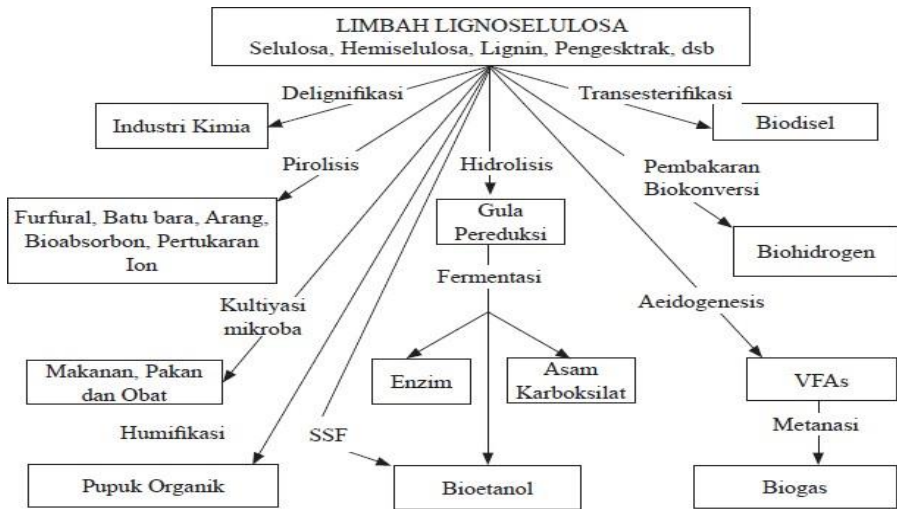
Limbah tanaman jagung sangat berpotensi untuk dimanfaatkan untuk pakan, tetapi hanya untuk ternak ruminansia karena tingginya kandungan serat. Jerami jagung merupakan bahan pakan penting untuk sapi pada saat rumput sulit diperoleh, terutama pada musim kemarau. Jerami jagung yang diawetkan dengan pengeringan matahari menghasilkan berbagai macam produk sampingan yang dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Tulisan ini membahas pemanfaatan limbah jagung untuk bahan baku substitusi pakan ternak khususnya ternak ruminansia serta nilai gizi yang terkandung dalam pakan. Limbah jagung sebagai pakan ternak antara lain : pembuatan hay, pembuatan silase dan fermentasi. Peningkatan produksi jagung akan diikuti oleh peningkatan limbah atau biomas (tongkol, batang, dan daun jagung). Limbah tersebut berpeluang menjadi penggerak peningkatan ekonomi masyarakat yang berbasis pertanian jagung. Besarnya peluang peningkatan ekonomi dikarenakan semua bagian limbah jagung dapat dimanfaatkan seperti biomas tanaman dimanfaatkan menjadi pakan ternak yang bergizi dan dapat disimpan dengan waktu yang lama seperti Hay dan silase. Hasil limbah dari industri pakan berbahan jagung seperti juga dimanfaatkan dari produk samping penggilingan

kering: homini, empok, dan tumpi dan produk samping penggilingan basah: CGM, CGF, dan Corn Germ Meal yang dapat digunakan sebagai bahan baku industri kimia. Limbah jagung juga berpeluang besar sebagai bahan baku industri yang dimanfaatkan untuk membuat furfural, xilitol, glukosa, plastik dan kertas. Besarnya peluang limbah jagung untuk meningkatkan ekonomi masyarakat melalui industri rumah tangga yang memanfaatkan limbah jagung, perlu di dukung dalam mensosialisasikan, peningkatan keterampilan melalui pelatihan praktis, pendanaan dan pasar, sehingga dapat meningkatkan ekonomi masyarakat secara berkelanjutan.

BAB III

PERLAKUAN PRA FERMENTASI PADA BAHAN BAKU

Degradasi limbah yang mengandung selulosa tinggi relatif sulit. Tindakan yang perlu dilakukan adalah melakukan pretreatment terlebih dahulu. Tujuan dari perlakuan awal adalah supaya “terbuka” ikatan pada anyaman selulosa, sehingga memudahkan proses hidrolisis selanjutnya. Secara skematik perlakuan awal untuk bahan selulosa yang akan dijadikan berbagai produk adalah seperti Gambar 3.1 di bawah ini.



Gambar 3.1 Skema proses pendahuluan pada berbagai bahan kaya selulosa

Demikian pula penggunaan bahan baku pakan yang mengandung selulosa tinggi perlu perlakuan awal, agar proses fermentasi berjalan dengan maksimal. Berikut ini akan diuraikan beberapa cara perlakuan awal yang bisa digunakan yang meliputi (1) penggilingan basah, (2) penggilingan kering, (3) hidrolisis asam encer, (4) dilignifikasi (penghancuran lignin “pelindung”

sellulosa/hemisellulosa), (5) pirolisis.

Pada *wet milling pretreatment* atau penggilingan basah tahapan yang dilakukan pertama yaitu dengan melakukan pengecilan ukuran bahan menggunakan blender dan air. Bahan bersellulosa seperti tongkol jagung dan eceng gondok pada awalnya ditimbang sesuai dengan berat yang diinginkan. Selanjutnya bahan tersebut dikeringanginkan selama 12 jam. Bahan lalu dipotong-potong dengan ukuran sekitar 2 mm. Perlakuan dilanjutkan dengan merendam bahan dalam air sampai terendam semuanya dan dibiarkan selama 12 jam. Setelah direndam bahan dihancurkan misalnya dengan memblendernya. Setelah menjadi bubur dipisahkan air dan bagian yang padat dengan cara menyaringnya, dan dibuang airnya. Bahan yang sudah halus kemudian diberi NaOH 0.5 M dan dipanaska dengan waktu pemanasan menggunakan microwave yaitu 40 menit pada daya 950 watt dan frekuensi 2450 MHz. Hasil yang diperoleh adalah bubuk jerami yang siap diproses selanjutnya.

Metode yang kedua adalah penggilingan kering. Pada proses ini awal perlakuan sama dengan penggilingan basah, yaitu bahan dipilih dan dipilah, lalu ditimbang sesuai dengan kebutuhan. Bahan dikeringkan dengan sinar matahari selama 12 jam. Selanjutnya pengeringan diteruskan dengan oven pada suhu 104°C selama 12 jam. Setelah kering dihaluskan lagi dengan mortar dan alu. Bahan yang sudah halus siap digunakan untuk berbagai keperluan.

Hidrolisis dengan asam juga lazim dilakukan pada bahan bersellulosa tinggi. Pada proses hidrolisis ini bahan ditambah dengan H₂SO₄ atau HCl encer. Sebelumnya bahan dikeringkan sampai beratnya konstan dan ukuran partikel diperkecil. Dalam hal ini asam encer yang digunakan karena menghindari mencemari lingkungan dan mencegah bahaya bagi praktikan.

Delignifikasi dilakukan dengan cara bahan dikeringkan dengan oven atau cahaya matahari sampai beratnya konstan. Selanjutnya pada bahan ditambahkan NaOH 5% sampai 15%. Basa kuat ini akan merusak ikatan lignin yang terdapat pada

bahan. Proses dilakukan pada suhu 50°C selama 4 jam dengan perbandingan liquid terhadap solid (SLR) yaitu 100 ml liquid per gram berat kering dari partikel tongkol jagung. Selanjutnya fraksi padat dicuci dengan aquadest hangat, suhu 40°C kemudian fraksi padat tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 90°C sampai beratnya konstan. *Powder* yang terbentuk siap dimanfaatkan untuk berbagai keperluan.

Cara perlakuan awal lainnya pada bahan dengan kandungan selulosa tinggi adalah pirolisis. Pirolisis adalah dekomposisi kimia bahan organik melalui proses pemanasan tanpa atau sedikit oksigen atau reagen lainnya, di mana material mentah akan mengalami pemecahan struktur kimia menjadi fase gas. Pirolisis adalah kasus khusus termolisis. Pirolisis ekstrim, yang hanya meninggalkan karbon sebagai residu, disebut karbonisasi. Pirolisis dilakukan dengan memanaskan bahan sampai fraksi padat berubah membentuk gas. Pada fase gas tersebut dapat ditemukan zat-zat yang diinginkan dan dapat diperoleh kembali dalam bentuk padat.

Sebelum dilakukan proses fermentasi pada eceng gondok dan tongkol jagung untuk dijadikan pakan ternak, kedua bahan baku tersebut diberi perlakuan. Terdapat berbagai macam perlakuan pra fermentasi seperti (1) pengurangan ukuran partikel bahan yang akan difermentasi; (2) pengeringan/pengurangan kadar air bahan yang akan difermentasi; (3) pematangan bahan yang akan difermentasi. Dalam proses pembuatan pakan fermentasi yang telah dibuat oleh tim penulis buku ini, perlakuan pra fermentasi yang dilakukan adalah memperkecil ukuran eceng gondok dan tongkol jagung yang akan difermentasi. Eceng gondok dirajang dengan tangan/mesin perajang sampai berukuran 2-3 cm seperti Gambar 3.1 berikut ini.



Gambar 3.2 Perajangan tongkol jagok untuk memperkecil ukuran bahan

Eceng gondok juga dirajang terlebih dahulu sebelum difermentasi sehingga menjadi potongan – potongan kecil seperti pada Gambar 3.3 berikut ini



Gambar 3.3 Perajangan eceng gondok sebagai perlakuan pra fermentasi

Terdapat beberapa tujuan pada pra perlakuan sebelum proses fermentasi dilakukan. Pada dasarnya perlakuan pra fermentasi bertujuan untuk mempermudah dan mempercepat

proses fermentasi itu sendiri. Pengurangan ukuran partikel bahan yang akan difermentasi dengan cara pemotongan/ perajangan akan memperluas permukaan bidang sentuh bahan dengan organisme (bakteri dan jamur) yang bekerja pada proses fermentasi. Perluasan bidang sentuh ini akan mempercepat proses fermentasi, karena jumlah mikroorganisme yang bekerja pada bahan juga semakin banyak. Sedangkan tujuan penjemuran adalah untuk menghilangkan air yang terdapat pada bahan. Semakin sedikit air yang terkandung dalam bahan, maka massa bahan yang digunakan juga semakin banyak dengan demikian pakan fermentasi yang dihasilkan juga semakin banyak, sehingga tersedia pakan yang cukup untuk ternak yang dipelihara. Perlakuan pra fermentasi dapat juga berupa pengukusan atau perebusan. Hal ini bertujuan untuk melunakkan bahan yang akan difermentasi, memecah sel-selnya sehingga bakteri dan jamur akan mudah memfermentasinya. Kombinasi berbagai perlakuan pra fermentasi kadang-kadang juga dilakukan untuk mempercepat proses tersebut.

Setelah eceng gondok dan tongkol jagung menjadi partikel yang kecil, selanjutnya kedua bahan tersebut dikering-anginkan sampai kering yang ditandai dengan massanya yang tidak berubah. Setelah bahan kering, maka siap untuk difermentasi menjadi pakan ternak. Kelemahan eceng gondok dan tongkol jagung sebagai pakan ternak dapat diatasi dengan berbagai cara, salah satunya adalah dengan memfermentasi bahan tersebut sebelum diberikan kepada ternak. Proses fermentasi pada bahan pakan dapat meningkatkan ketercernaan, meningkatkan tingkat keterserapan gizi oleh ternak, dapat menyeimbangkan mikroflora rumen dan menurunkan populasi mikroorganisme patogen (Missotten, *et al.*, 2015). Keunggulan lain dari bahan pakan fermentasi antara lain adalah dapat menekan pertumbuhan mikroba patogen dalam saluran pencernaan, membantu lambung mencapai pH rendah sehingga dapat mematikan mikroba yang terbawa masuk bersama makanan (Missotten, *et al.*, 2015). Penggunaan pakan fermentasi pada ayam telah meningkatkan

berat badannya, menyebabkan tingkah laku yang lebih agresif, memperkuat cangkang telurnya dan tidak menurunkan produksi telur (Engberg, *et al.*, 2009).

Fermentasi pakan dapat dilakukan dengan berbagai teknik. Berbagai teknik tersebut antara lain meliputi SSF. Teknik fermentasi SSF (*solid state fermentation*) sesuai untuk proses fermentasi eceng gondok dan tongkol jagung. Teknik SSF mempunyai keunggulan seperti kecepatan hidrolisis karbohidrat yang tinggi, memberikan produk yang banyak, tidak menuntut kondisi yang steril, prosesnya singkat, dan perlu ukuran fermentor yang kecil (Pothiraj, *et al.*, 2006). Teknik SSF dapat memfasilitasi fungi untuk berkembang dan membantu proses fermentasi karena bahan baku padat memungkinkan hifa fungi untuk penetrasi, tidak memerlukan banyak air sehingga lebih ekonomis, resiko kontaminasinya kecil dan sangat sesuai digunakan untuk teknik fermentasi pada limbah pertanian (Ho, *et al.*, 2014).

Proses fermentasi/ pengomposan bahan meliputi beberapa tahap yaitu mesofilik, termofilik, *cooling* dan *maturing* (Ishii, *et al.*, 2000; Yu, *et al.*, 2007). Sedangkan kajian yang dilakukan oleh Bhatia, *et al.*, (2015) pada tahapan proses pengomposan menyatakan bahwa sebelum fase mesofilik terdapat fase laten, yang pada fase ini mikroorganisme beradaptasi dengan lingkungan, yang ditandai dengan temperatur yang konstan.

Pada setiap fase fermentasi tersebut terjadi perubahan kondisi fisik dan kimia lingkungan sehingga komunitas mikroorganisme pada setiap fase juga berbeda. pada degradasi aerobik limbah padat, komunitas bakteri mendominasi pada fase mesofilik awal, pada fase termofilik komunitas bakteri, fungi dan Actinomycetes terdapat dalam jumlah melimpah (Bhatia, *et al.*, 2015).

Kondisi fisik utamanya suhu berubah nyata selama proses fermentasi. Proses pengomposan limbah padat berawal pada suhu sekitar 28°C dapat meningkat secara perlahan sampai mencapai suhu 45°C pada akhir fase mesofilik. Suhu akan

meningkat terus sampai sekitar 65°C pada pertengahan fase mesofilik. Selanjutnya mulai terjadi penurunan suhu dan pada akhir fase mesofilik suhu mencapai sekitar 45°C kembali dan pada fase pendinginan dan pemasakan suhu akan stabil sekitar 25°C (Bhatia, *et al.*, 2015). Perubahan suhu pada fase-fase fermentasi merupakan akibat dari aktivitas mikroorganisme pada bahan yang komunitasnya juga berbeda pada setiap fase. Berdasarkan hal tersebut suhu dapat dijadikan salah satu parameter penting untuk menentukan jatuh tempo terjadinya fase fermentasi tertentu pada degradasi bahan tertentu, yang pasti akan berbeda pada fermentasi bahan lain.

Kondisi kimia seperti pH dan kandungan senyawa kimia pada setiap fase fermentasi juga berbeda. Bhatia, *et al.*, (2015) menyatakan bahwa pada tahap mesofilik terjadi pemecahan gula dan asam amino yang akan memicu pertumbuhan bakteri dan khamir mesofilik. Selanjutnya aktivitas bakteri penghasil asam akan menyebabkan terjadinya penurunan pH. Perubahan pH akan mempengaruhi perubahan komunitas mikroorganisme seperti hasil penelitian yang dilakukan oleh Wang, *et al.*, (2011), yang ditunjukkan melalui tampilan profil sidik jari DNA komunitas yang berbeda pada nilai pH yang juga berbeda. Berdasarkan hal ini maka perubahan pH merupakan parameter yang penting untuk menentukan jatuh tempo fase tertentu selama proses fermentasi berlangsung. Keberadaan senyawa kimia juga berbeda pada fase-fase fermentasi, maka diyakini pada proses fermentasi bahan campuran eceng gondok dan tongkol jagung akan terdapat fase yang kandungan senyawa kimianya memenuhi syarat sebagai pakan kambing. Eceng gondok dapat membantu mengembangkan fase mesofilik pada proses fermentasi, sedangkan limbah pertanian seperti tongkol jagung merupakan pasokan substrat dan meningkatkan produksi enzim polisakarida hidrolase seperti selulase dan xylanase, serta mempertahankan suhu untuk menjaga sterilitas (Umsakul, *et al.*, 2010).

Percepatan proses fermentasi dapat juga dilakukan dengan penambahan bahan-bahan yang kaya gizi yang dapat memicu

pertumbuhan populasi mikroorganismenya pelaku fermentasi. Zat-zat seperti ini disebut sebagai prebiotik. Adanya prebiotik dapat meningkatkan gizi yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroorganismenya. Peningkatan populasi mikroorganismenya akan mempercepat proses fermentasi itu sendiri. Prebiotik yang sering ditambahkan untuk meningkatkan kecepatan fermentasi bahan meliputi molase dan bekatul padi halus, bahkan kadang-kadang juga ampas padat tahu.

Molase merupakan limbah pabrik gula yang berupa cairan kental, berwarna coklat kehitaman dengan aroma yang sedikit manis. Tampilan molase ini mirip seperti kecap, hanya saja warnanya lebih coklat dan tidak sehitam kecap. Molase mengandung gizi yang tinggi, didalamnya terdapat sumber energi dan sumber karbon, juga terdapat vitamin dan mineral serta beberapa unsur mikronutrien yang penting untuk pertumbuhan organismenya. Gambar 3.4 berikut ini adalah molase.



Gambar 3.4 Molase yang lazim digunakan untuk prebiotik

Bekatul padi halus merupakan limbah pabrik penggilingan padi yang berupa serbuk halus seperti tepung berwarna kuning kecoklatan. Bekatul padi halus sangat kaya akan vitamin B kompleks. Bahan ini lazim digunakan sebagai pakan ternak khususnya unggas, namun saat ini bekatul padi halus banyak

digunakan untuk pakan kuda dan sapi, yang biasanya dicampurkan dengan bahan untuk minumannya. Gambar 3.5 adalah bekatul padi halus yang lazim digunakan sebagai prebiotik.



Gambar 3.5 Bekatul padi halus

Ampas tahu merupakan limbah padat pabrik tahu. Pada awalnya ampas tahu merupakan limbah yang dibuang begitu saja dan tidak ada nilainya. Namun, saat ini ampas tahu banyak diminati khususnya sebagai pakan ternak ruminansia yang besar seperti sapi, kerbau, kuda dan domba. Ampas tahu merupakan bahan yang kaya protein dan dapat memicu pertumbuhan berat badan yang sangat nyata. Hal lain yang menjadikan ampas tahu unggul sebagai pakan ternak adalah munculnya aroma yang sedap menggugah selera makan dan menjadikan pakan bertekstur halus dan meningkatkan selera makan ternak. Gambar 3.6 adalah ampas tahu sebagai pakan ternak.



Gambar 3.6 Ampas tahu

BAB IV

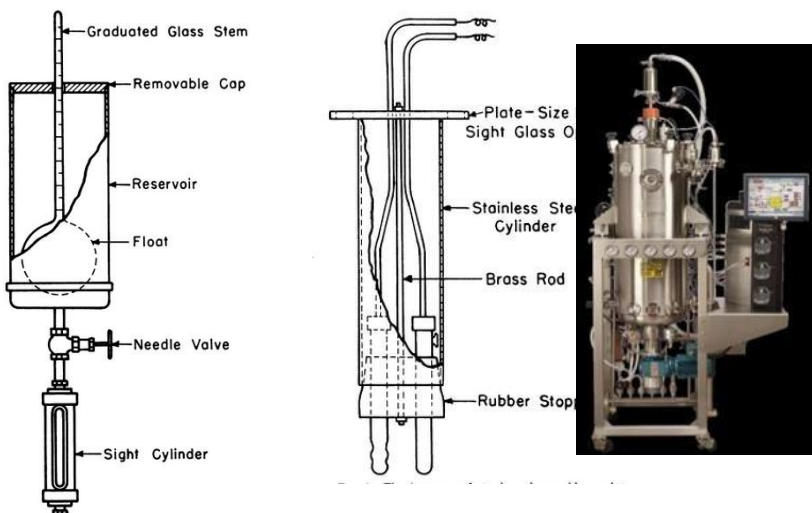
PROSES FERMENTASI CAMPURAN ECENG GONDOK DAN TONGKOL JAGUNG

Setelah bahan baku yang digunakan yaitu eceng gondok dan tongkol jagung mengalami perlakuan pra fermentasi, selanjutnya bahan-bahan tersebut mengalami proses fermentasi. Proses fermentasi campuran eceng gondok dan tongkol jagung dilakukan tanpa penambahan starter mikroorganisme. Hal ini dimaksudkan untuk mendapatkan mikroorganisme indigenus yang terdapat pada campuran kedua bahan tersebut. Campuran kedua bahan difermentasi dalam wadah plastik yang dilubangi, sehingga memfasilitasi kondisi yang mikroaerofilik. Proses fermentasi dilakukan sampai pada keempat fase fermentasi terlampaui. Fase-fase fermentasi yang dimaksud adalah fase mesofilik, fase termofilik, fase pendinginan dan fase pemasakan. Bergulirnya fase-fase fermentasi campuran kedua bahan tersebut ditandai dengan adanya perubahan suhu dan pH pada sepanjang proses fermentasi tersebut. Selama proses fermentasi berlangsung setiap hari dilakukan pengukuran suhu dan pH dan pengambilan sampel bahan yang difermentasi sebagai sumber mikroorganisme indigenus. Wadah-wadah tempat campuran kedua bahan baku pakan tersebut ditempatkan di ruang kumbung jamur yang terkontrol suhu dan kelembabannya. Sampel campuran eceng gondok dan tongkol jagung yang diambil dimasukkan ke dalam kantong plastik dan disimpan di dalam almari es sampai dilakukan isolasi mikroorganisme yang terdapat di dalamnya.

Isolasi mikroorganisme dilakukan pada setiap fase fermentasi, hal ini dimaksudkan untuk mengisolasi semaksimal mungkin mikroorganisme yang terlibat pada sepanjang proses fermentasi campuran bahan eceng gondok dan tongkol jagung.

Terdapat berbagai teknik fermentasi misalnya SSF (*solid state fermentation*). Teknik yang lain adalah *submerged fermentation*, yang menggunakan kondisi fermentasi, yang

bahan-bahannya berwujud cair. Pada *submerged fermentation*, sangat menonjol terjadi pertambahan biomassa mikroba pelaku fermentasi secara mencolok. Lazimnya, populasi mikroba ini dipanen dengan berbagai teknik, yang selanjutnya disimpan untuk digunakan sebagai starter. Biomassa bahan yang terfermentasi selanjutnya dikumpulkan dengan cara disentrifugasi dan selanjutnya dikeringkan. Terdapat beberapa kelemahan dalam *submerged fermentation* ini yaitu biaya operasionalnya mahal, karena menggunakan reaktor khusus, memerlukan pasokan energi untuk melakukan pengadukan dan hasil akhir tidak dapat langsung digunakan, karena kondisinya sangat basah. Oleh sebab itu pada pembuatan pakan yang dilakukan digunakan SSF. Gambar 5.1 berikut ini adalah berbagai jenis reaktor yang lazim digunakan untuk *submerged fermentation*.



Gambar 5.1 Berbagai model instalasi *submerged fermentation*

Fermentasi pakan dapat dilakukan dengan berbagai teknik. Teknik fermentasi SSF (*solid state fermentation*) sesuai untuk proses fermentasi eceng gondok dan tongkol jagung. Teknik SSF

mempunyai keunggulan seperti kecepatan hidrolisis karbohidrat yang tinggi, memberikan produk yang banyak, tidak menuntut kondisi yang steril, prosesnya singkat, dan perlu ukuran fermentor yang kecil (Pothiraj, *et al.*, 2006). Teknik SSF dapat memfasilitasi fungsi untuk berkembang dan membantu proses fermentasi karena bahan baku padat memungkinkan hifa fungi untuk penetrasi, tidak memerlukan banyak air sehingga lebih ekonomis, resiko kontaminasinya kecil dan sangat sesuai digunakan untuk teknik fermentasi pada limbah pertanian (Ho, *et al.*, 2014).

Proses fermentasi/ pengomposan bahan meliputi beberapa tahap yaitu mesofilik, termofilik, *cooling* dan *maturing* (Ishii, *et al.*, 2000; Yu, *et al.*, 2007). Sedangkan kajian yang dilakukan oleh Bhatia, *et al.*, (2015) pada tahapan proses pengomposan menyatakan bahwa sebelum fase mesofilik terdapat fase laten, yang pada fase ini mikroorganisme beradaptasi dengan lingkungan, yang ditandai dengan temperatur yang konstan.

Pada setiap fase fermentasi tersebut terjadi perubahan kondisi fisik dan kimia lingkungan sehingga komunitas mikroorganisme pada setiap fase juga berbeda. pada degradasi aerobik limbah padat, komunitas bakteri mendominasi pada fase mesofilik awal, pada fase termofilik komunitas bakteri, fungi dan Actinomycetes terdapat dalam jumlah melimpah (Bhatia, *et al.*, 2015).

Kondisi fisik utamanya suhu berubah nyata selama proses fermentasi. Proses pengomposan limbah padat berawal pada suhu sekitar 28°C dapat meningkat secara perlahan sampai mencapai suhu 45°C pada akhir fase mesofilik. Suhu akan meningkat terus sampai sekitar 65°C pada pertengahan fase mesofilik. Selanjutnya mulai terjadi penurunan suhu dan pada akhir fase mesofilik suhu mencapai sekitar 45°C kembali dan pada fase pendinginan dan pemasakan suhu akan stabil sekitar 25°C (Bhatia, *et al.*, 2015). Perubahan suhu pada fase-fase fermentasi merupakan akibat dari aktivitas mikroorganisme pada bahan yang komunitasnya juga berbeda pada setiap fase.

Berdasarkan hal tersebut suhu dapat dijadikan salah satu parameter penting untuk menentukan jatuh tempo terjadinya fase fermentasi tertentu pada degradasi bahan tertentu.

Solid state fermentation dapat dilakukan dengan berbagai wadah. Wadah plastik seperti kantong plastik atau tong-tong dapat digunakan sebagai wadah selama proses fermentasi berlangsung Gambar 5.2 adalah contoh fermentasi pembuatan pakan dari berbagai bahan dan pada berbagai jenis wadah.

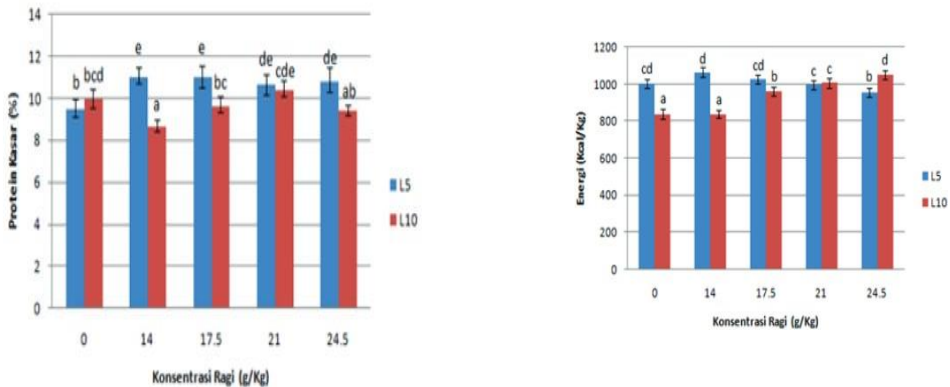


Gambar 5.2 Berbagai teknik fermentasi limbah untuk bahan pakan ternak

Terdapat berbagai jenis wadah untuk proses fermentasi pembuatan pakan ternak dengan sistem SSF. Kantong plastik transparan (atau yang gelap), tong-tong dan wadah plastik lainnya pada umumnya dapat digunakan. Bahkan bahan baku yang dipadatkan dan diletakkan dalam ruang terbuka, juga dapat terjadi proses fermentasi. Pada proses pembuatan pakan fermentasi yang dilakukan digunakan wadah plastik yang diberi lubang kecil (seukuran diameter paku kecil) sebanyak 10 buah yang disusun dalam dua deret berselang.

Cara lain yang dilakukan untuk pembuatan pakan fermentasi skala besar adalah menggunakan keranjang plastik berkapasitas 25 kg yang bagian dalamnya dilapisi dengan daun pisang secara merata. Bahan-bahan yang difermentasi dimasukkan ke dalam keranjang tersebut sampai pada permukaan mulut keranjang. Selanjutnya bagian atas keranjang juga ditutup dengan daun pisang. Wadah ini diletakkan dalam ruang terbuka yang kondisinya (suhu dan kelembabannya) relatif stabil. Proses fermentasi dibiarkan berlangsung selama 5 sampai 10 hari. Setting fermentasi bahan untuk pembuatan pakan dalam skala besar.

Setelah 5 hari dan 10 hari dilakukan pemanenan dan dilakukan analisis proksimat pada kandungan protein kasar, serat kasar dan energi total, dengan hasil seperti ditunjukkan pada Gambar 5.3 berikut ini.



Gambar 5.3 Kadar protein kasar, serat kasar dan energi total pakan hasil fermentasi campuran bahan eceng gondok dan tongkol jagung

Tiga parameter yang diukur meliputi kadar protein kasar, serat kasar dan energi total adalah merupakan sarat utama gizi pakan ternak khususnya ruminansia. Berdasarkan hasil tersebut

dapat dinyatakan bahwa pakan fermentasi yang dihasilkan dapat digunakan sebagai pakan ternak dengan kecukupan gizi yang memadai dan memenuhi syarat.

BAB V

ISOLASI MIKROORGANISME INDIGENUS CAMPURAN ECENG GONDOK DAN TONGKOL JAGUNG

Terdapat beberapa cara untuk mengisolasi mikroorganisme indigenus, salah satu cara yang lazim digunakan adalah prosedur yang akan diuraikan berikut ini. Penangkapan isolat indigenus mengikuti modifikasi prosedur Ryckeboer, *et al.*, (2002). Kompos sebanyak 10g (berat basah) disuspensikan dengan 90 ml larutan 0,85% NaCl. Suspensi digojog dengan kecepatan 200 rpm selama 30 menit pada suhu 20°C. Selanjutnya dilakukan pengenceran berseri sampai 10^{-12} . Sebanyak 0,1 ml setiap seri pengenceran ditebar ke media yang sesuai, ulangan dilakukan sebanyak 6 kali.

Penghitungan total keseluruhan bakteri dilakukan pada medium minimal Delafieid (Delafieid *et al.*, 1965) yang diperkaya dengan 0,1 g glukosa, 0,3 g asam asetat, 0,2 g asam suksinat, 0,1 g ekstrak ragi dan 0,1 g hidrolisat kasein untuk per liter media, dan ditambahkan 0,2 g sikloheksimida untuk mencegah pertumbuhan fungi.

Medium penumbuhan untuk *Streptomyces* menggunakan ISP dengan komposisi 1 g K_2HPO_4 , 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g NaCl, 2 g $(NH_4)_2SO_4$, 2 g $CaCO_3$, 10 g amilum terlarut, 0,2 g sikloheksimida, 1 ml larutan elemen mikro, and 20 g agar dalam 1 liter akuades. Adapun komposisi larutan elemen mikro adalah 0,1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ and 0,1 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ dalam 100 ml air distilasi (pH medium 7,2).

Fungi dan khamir ditumbuhkan pada medium *Rose Bengal Chloramphenicol agar* (Oxoid Ltd, Hampshire, UK). Sedangkan bakteri sellulolitik ditumbuhkan pada medium dengan komposisi 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g $MgSO_4$, 0,001 g NaCl, 15 g agar, 10 g *carboxymethylcellulose* (CMC) dan 0,2 g sikloheksamida per liter akuades.

Medium untuk isolasi fungi sellulolitik terdiri dari dua larutan. Larutan pertama tersusun atas 15 g agar, 10 g CMC (medium viscosity, sodium salt; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), 0,1 g chloramphenicol dan 900 ml distilled water. Komponen tersebut diaduk sampai terlarut sempurna dan disterilkan. Larutan kedua tersusun atas 6,7 g *yeast nitrogen base* (Difco, Becton Dickinson, Sparks, USA) yang dilarutkan dalam 100 ml air distilasi. Larutan ini disterilkan dengan filterisasi dengan filter berpori 0,2 μm . Larutan 1 dan 2 dicampur dan diaduk pada suhu 60°C.

Bakteri amilolitik ditumbuhkan pada medium yang tersusun atas dua lapisan. Lapisan bawah adalah Delafielt medium dengan volume 15 ml per cawan petri, sedangkan lapisan atas bervolume 5ml yang terdiri dari 1% pati dan 2% agar dalam air distilasi. Penghitungan dilakukan setelah diberi larutan lugol (0,5% I_2 dan 1%KI dalam air distilasi). Pati yang tidak terdegradasi akan berwarna gelap setelah pemberian lugol. Koloni yang menghasilkan zona jernih pada medium ini adalah bakteri yang mempunyai aktivitas amilolitik.

Bakteri proteolitik menghasilkan enzim kasease sehingga dapat ditumbuhkan pada medium agar susu. Medium agar susu dibuat dengan cara melarutkan 23 g serbuk *nutrient agar* (Oxoid Ltd) dalam 700 ml air distilasi yang ditambah 0,2 g sikloheksamida. Larutan susu dibuat dengan mencampur 30 g serbuk susu (Oxoid Ltd) dan 300 ml air distilasi. Keduanya disterilisasi dengan autoklaf dan dicampur. Bakteri kaseolitik akan menghasilkan zona terang (spot), sedangkan medium yang tetap keruh artinya bukan bakteri proteolitik. Sterilisasi semua media dilakukan dengan autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C pada tekanan 103 kPa. Cawan petri yang digunakan adalah yang menghasilkan jumlah koloni antara 30 sampai 300 koloni.

Setelah 48 jam inkubasi semua organisme termofilik, fungi mesofilik dan bakteri proteolitik juga amilolitik dapat tubuh dan dihitung. Kelompok mesofilik *Streptomyces* dan bakteri sellulolitik dapat diamati setelah 7 hari inkubasi. Medium ISP-4

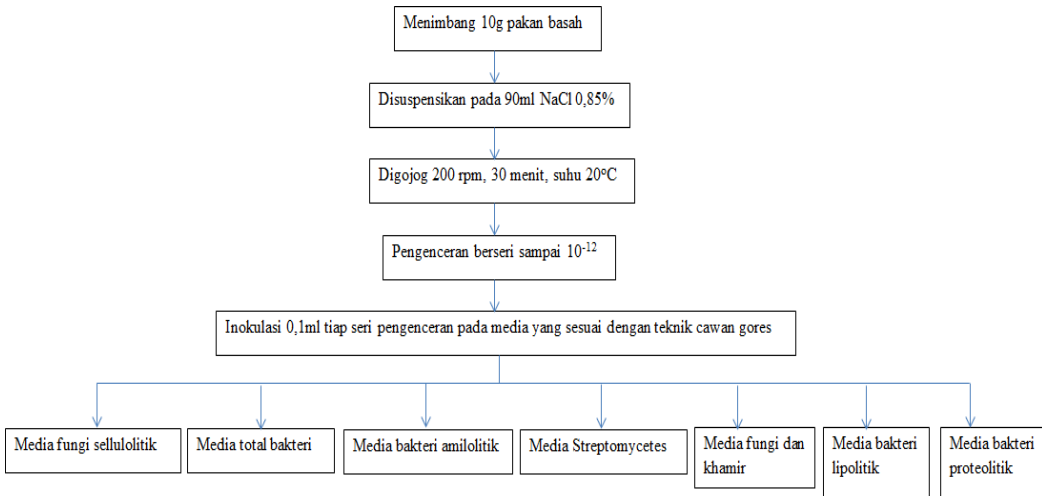
adalah selektif kuat untuk Streptomycetes, sehingga hanya koloni dengan miselium aerial (seperti *powder*, kerutan atau pasta) yang akan tampak. Apabila koloni ini diisolasi, maka akan membentuk tampilan seperti telinga sebagaimana Aktinomycetes. Perbedaan antara khamir dan fungi didasarkan pada karakteristik morfologinya. Dari cawan yang diinokulasi dengan pengenceran tertinggi dan menunjukkan koloni yang terpisah, masing-masing koloni diisolasi sendiri-sendiri sehingga menjadi biakan murni. Setelah pemurnian masing-masing isolat ditumbuhkan pada medium pengaya yaitu nutrisi agar untuk bakteri, medium *inorganic salt starch 3* medium (ISP-3; Difco, Becton Dickinson) untuk streptomycetes dan *potato dextrose agar* untuk fungi. Kultur bakteri dan streptomycetes disimpan pada suhu 2°C dan fungi pada suhu 20°C.

Bakteri yang mempunyai aktivitas lipolitik diidentifikasi dengan modifikasi prosedur yang dikembangkan oleh Bestari dan Suharjono (2015). Isolat murni diinokulasikan ke media cair dengan komposisi NaCl 1 %, ekstrak khamir 1 %, pepton 2 %, Tween-80 1 %, dan minyak zaitun steril 2 %. Dilakukan inkubasi selama 24 jam jika inokulan awal jumlahnya sedikit, jika inokulan awal banyak, misalnya 1 ose, maka inkubasi tidak perlu dilakukan. Ke dalam suspensi bakteri itu dimasukkan kertas cakram berdiameter ±5 mm dicelupkan ke media cair selama 10-15 menit. Selanjutnya kertas cakram diletakkan media padat cawan petri dengan komposisi (perliter) pepton 10 g, NaCl 5 g, CaCl₂·2H₂O 0,1 g, Agar 20 g, Tween-80 2,5 %, dan minyak zaitun steril 5 %. Media ditambah dengan metil merah 0,01 %. Cawan diinkubasi selama 7 x 24 jam. Setelah 7 hari inkubasi dihitung diameter zona beningnya, yang mencerminkan kemampuan bakteri dalam mendegradasi lemak. Medium selektif seperti yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme yang diisolasi sekaligus menjadi uji aktivitas enzimnya, dengan cara mengamati luas zona/ holo yang dibentuk. Semakin luas zona/ holonya berarti semakin kuat aktivitas enzimnya.

Isolasi mikroorganisme indigenus pada campuran bahan

eceng gondok dan tongkol jagung dilakukan melalui beberapa tahap proses. Tahap pertama adalah mensuspensikan sampel bahan yang difermentasi dengan akuades steril pada wadah steril dan dilakukan dengan teknik aseptik. Sebanyak 1 g sampel bahan disuspensikan pada 10 ml akuades steril. Suspensi tersebut dihomogenasi dengan *vortex* selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan filtrasi untuk memisahkan debris dan suspensi mikroorganisme. Suspensi mikroorganisme yang terdapat pada filtrat diinokulasikan pada general media dengan teknik cawan gores. Media yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu yang sesuai dengan suhu pengambilan sampel bahan, dengan demikian diharapkan mikroorganisme pada sampel bahan akan tumbuh maksimal. Semua mikroorganisme yang terdapat pada sampel yang diambil dari setiap fase dikultur dengan cara yang sama, dengan demikian akan diperoleh mikroorganisme pada setiap fase fermentasi. Mikroorganisme yang tumbuh pada media tersebut adalah kultur campuran berbagai jenis bakteri dan fungi. Kultur campuran tersebut selanjutnya dimurnikan, sehingga diperoleh kultur murni masing-masing jenis bakteri dan masing-masing jenis fungi.

Prinsip isolasi bakteri dan fungi pada dasarnya sama, tetapi berbeda dalam media yang digunakan. Pada penelitian pembuatan pakan yang telah dilakukan metode isolasi yang digunakan akan dipaparkan pada uraian berikut ini. Secara skematis prosedur isolasi mikroorganisme pada campuran eceng gondok dan tongkol jagung fermentasi seperti Gambar 5.1 berikut ini.



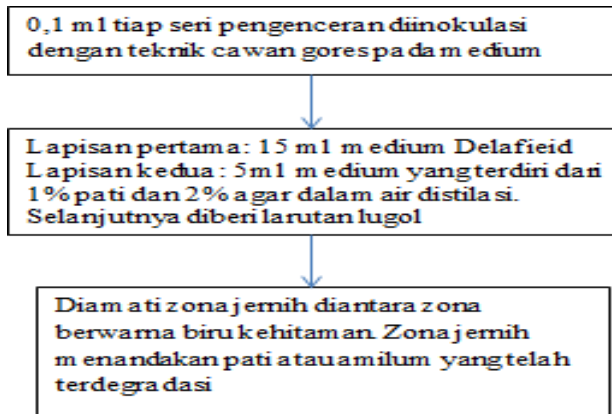
Gambar 5.1 Skema prosedur umum isolasi mikroorganismen indigenus

Setelah masing-masing kelompok mikroorganismen ditumbuhkan pada media yang sesuai maka dilakukan observasi parameter sesuai dengan tujuan semula. Secara rinci dan satu per satu akan diuraikan prosedur observasi parameter yang ditentukan. Gambar 5.2 berikut ini adalah skema prosedur observasi kelompok fungi sellulolitik.

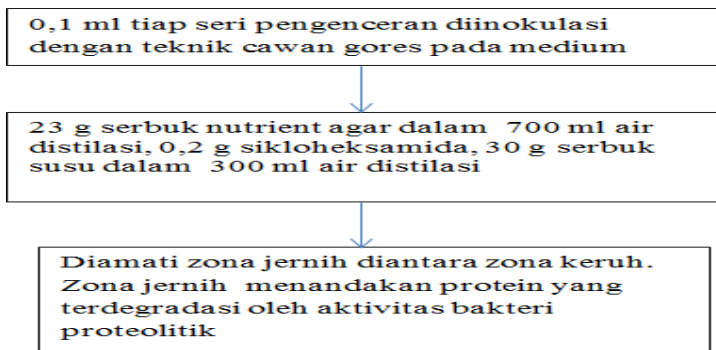


Gambar 5.2 Skema prosedur observasi aktivitas fungi sellulolitik

Selanjutnya pada Gambar 5.3 akan dipaparkan skema observasi bakteri amilolitik.

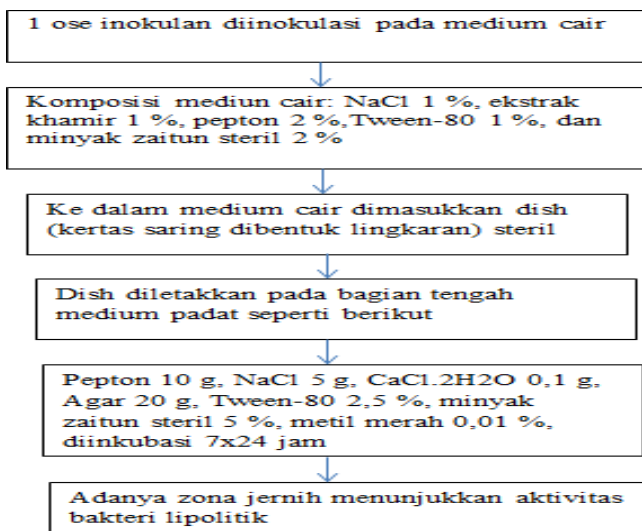


Gambar 5.3 Observasi aktivitas bakteri amilolitik



Gambar 5.4 Skema prosedur observasi aktivitas bakteri proteolitik

Pada Gambar 5.4 dipaparkan skema prosedur observasi aktivitas bakteri proteolitik. Pada gambar 5.5 akan dipaparkan prosedur observasi aktivitas bakteri lipolitik.



Gambar 5.5 Skema prosedur observasi aktivitas bakteri lipolitik

Selain kemampuan mikroorganisme indigenus dalam mendegradasi senyawa-senyawa yang terdapat dalam eceng gondok dan tongkol jagung, dalam formula starter mikroorganisme tersebut harus bekerja secara sinergis atau bekerjasama. Oleh sebab itu perlu dilakukan uji sinergisme dan antagonisme pada mikroorganisme indigenus tersebut.

Terdapat beberapa cara untuk melakukan uji antagonisme secara *in vitro* antar mikroorganisme. Saputra (2015) menggunakan cara uji antagonis dengan menitikkan isolat bakteri pada titik tertentu di media penumbuhan. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Setelah 48 jam cawan petri dibalik dan ditetesi 1 ml kloroform dan dibiarkan dalam 2 jam dan setelah uap kloroform hilang cawan petri dikembalikan ke posisi semula dan dituangi antagonis. Selanjutnya diinkubasi lagi selama 24 jam dan diamati zona hambatan yang terbentuk.

Cara lain untuk uji antagonis antar mikroorganisme adalah dengan menggunakan rumus Fokkema (1976) yaitu dengan cara mengukur jari-jari koloni isolat patogen yang menjauhi isolat antagonis (P₁) dan jari-jari koloni patogen yang mendekati agens antagonis (P₂) dan persen penghambatan dihitung dengan selisih kedua jari-jari itu dibagi dengan P₁ kali 100%.

Mikroorganisme yang menunjukkan aktivitas antagonis, sebaiknya tidak dicampur jadi satu dalam formula starter. Sebaiknya dipilih salah satu yang aktivitas degradasi senyawa-senyawa yang terdapat pada eceng gondok dan tongkol jagung lebih besar.

Uji antagonisme antar mikroorganisme dilakukan sesuai metode Saputra (2015). Isolat yang akan diantagoniskan masing-masing ditumbuhkan sebagai suspensi. Isolat 1 diinokulasikan ke media agar pada posisi tertentu. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Setelah 48 jam cawan petri dibalik dan ditetesi 1 ml kloroform dan dibiarkan dalam 2 jam dan setelah uap kloroform hilang cawan petri dikembalikan ke posisi semula. Selanjutnya dilakukan inokulasi isolat yang diantagoniskan dengan teknik lempeng tuang. Diinkubasi lagi selama 24 jam dan diamati zona

hambatan yang terbentuk. Apabila kedua isolat itu menampakkan adanya zona hambat, maka keduanya antagonis (Maria, 2015).

Uji sinergisme antar mikroorganisme ada beberapa metode. Metode yang lazim digunakan adalah metode yang digunakan oleh Asri dan Zulaika (2016). Masing-masing isolat yang diuji sinergismenya digoreskan bersinggungan satu sama lain menggunakan metode gores sehingga antar isolat akan bertemu. Selanjutnya diinkubasi 24 jam dan diamati apakah terdapat zona bening atau zona hambat diantara dua isolat yang bersinggungan. Isolat dikatakan sinergis apabila tidak terdapat zona penghambatan pada daerah pertemuan kedua isolat, dan dikatakan tidak kompatibel atau antagonis apabila terdapat zona penghambatan pada daerah pertemuan kedua isolat tersebut.

Cara lain untuk mengetahui efek sinergistik adalah dengan mengukur aspek-aspek yang menjadi produk dari sinergisme tersebut. Kajian sinergisme antara probiotik berupa isolat bakteri asam laktat dengan berbagai macam prebiotik tertentu yang ditambahkan pada media, sehingga dihasilkan 4 variasi komposisi media seperti berikut ini BHI, BHI + prebiotik (Maltodextrin 2 % dan FOS 2%), BHI + oxgall 0,3%; BHI + kolesterol telah dilakukan. Setelah dilakukan inkubasi parameter yang diukur adalah toleransi terhadap keasaman dan garam empedu, pH media dan kadar kolesterol. Antara BAL dan jenis prebiotik dikatakan sinergis jika memberikan parameter positif tinggi, dan sebaliknya probiotik dan prebiotik tidak sinergis apabila menghasilkan kadar parameter positif rendah, dan malah mengeluarkan parameter negatif yang tinggi.

Secara kuantitatif sinergisme dapat juga dihitung dengan menghitung Nisbah sinergistik (NS). Nilai NS lebih besar dari 1 berarti ada sinergisme, apabila nilai NS sama dengan 1 berarti netral atau tidak ada sinergisme (Hamilton and Attia, 1977).

Uji sinergisme antar mikroorganisme dilakukan dengan teknik modifikasi Asri dan Zulaika (2016). Isolat-isolat yang akan diuji sinerginya dibuat dalam bentuk suspensi terlebih dahulu. Selanjutnya isolat-isolat ini digoreskan saling bersinggungan

pada media agar. Diinkubasi minimal selama 24 jam dan dilihat ada atau tidak adanya zona hambata pada daerah perlingan dua isolat. Apabila tidak terdapat zona hambatan maka dapat dipastikan bahwa kedua isolat yang bersinggungan tersebut sinergis.

BAB VI

PEMBUATAN KULTUR MURNI

MIKROORGANISME INDIGENUS HASIL

ISOLASI DARI CAMPURAN ECENG GONDOK

DAN TONGKOL JAGUNG

Sebelum membahas cara-cara membuat kultur murni, tidak ada salahnya jika kita menyegarkan kembali ingatan kita tentang biakan atau kultur murni. Di alam bebas tidak ada mikroba yang hidup tersendiri terlepas dari spesies yang lain. Seringkali mikroba patogen kedapatan secara bersama-sama dengan mikroba saproba (saprobakteri). Dalam teknik biakan murni tidak saja diperlukan bagaimana memperoleh suatu biakan murni, tetapi juga bagaimana memeliharanya supaya tetap bertahan hidup dalam waktu yang lama, menyimpannya supaya dapat digunakan untuk keperluan pada waktu mendatang dan “membangun kembali biakan murni dari tidurnya” supaya mempunyai viabilitas dan aktivitas seperti kondisi awalnya.

Medium untuk membiakan mikroba haruslah steril sebelum digunakan pencermaran (kontaminasi) dari luar terutama berasal dari udara yang mengandung banyak mikroorganisme. Terdapat beberapa teknik biakan murni untuk spesies yang diuraikan seperti berikut ini.

A. Cara pengenceran

Metode pengenceran pada prinsipnya adalah cara memperoleh kultur/ sel bakteri tunggal dengan melakukan pengenceran berseri. Cara ini pertama kali dilakukan oleh Lister pada tahun 1865. Lister berhasil mendapatkan *Streptococcus lactis* murni yang diisolasi dari susu yang sudah masam. Caranya adalah dengan mengencerkan suatu suspensi kemudian diencerkan dalam suatu tabung tersendiri. Dari pengenceran ini kemudian diambil 1 ml untuk diencerkan lagi, kalau perlu dari enceran yang kedua ini diambil 1 ml untuk diencerkan lebih

lanjut. Cara ini memerlukan kesabaran yang tinggi, memerlukan banyak peralatan dan medium pengencer dan hasil yang diperoleh tidak dapat dipastikan tingkat kemurniannya. Saat ini cara mendapatkan kultur murni dengan teknik pengenceran sudah jarang digunakan lagi.

B. Cara penuangan

Prinsip pemurnian dengan cara penuangan pada dasarnya sama dengan teknik pengenceran. Pembuatan kultur murni dengan menggunakan medium cair dengan cara pengenceran, seperti dijelaskan di atas prinsipnya adalah melakukan pengenceran adalah menurunkan jumlah/ kepadatan mikroorganisme sehingga suatu saat hanya ditemukan suatu sel dalam satu tabung. Demikian juga dengan prinsip cara penuangan.

Metode ini pertama kali digunakan oleh Robert Koch (1843-1905). Caranya adalah dengan mengambil sedikit sampel campuran bakteri yang sudah diencerkan, dan sampel itu kemudian disebarkan dalam suatu medium dari kaldu dan gelatin encer. Tentu saja pengenceran dilakukan dengan banyak seri dan pada beberapa seri pengenceran akhir, dituangkan ke medium untuk mendapatkan tampilan koloninya. Apabila pada medium tampak masih berupa kultur campuran, maka diulangi lagi pekerjaan pengenceran dan penuangan sampai akhirnya diperoleh kultur yang murni atau sel tunggal yang akan tumbuh menjadi koloni tunggal. Koloni ini adalah kultur murni yang dimaksud. Cara ini juga mempunyai kelemahan dan kerumitan seperti teknik pengenceran, oleh sebab itu saat ini jarang digunakan.

C. Cara penggoresan

Cara penggoresan lebih praktis dan memberikan hasil yang lebih pasti. Cara ini lebih baik digunakan bila ditinjau dari sudut ekonomi dan waktu tetapi memerlukan keterampilan yang diperoleh dari latihan penggoresan yang sempurna supaya

menghasilkan koloni yang terpisah. Tetapi kelemahan cara ini adalah bakteri-bakteri anaerob tidak dapat tumbuh. Ada beberapa teknik penggoresan, yakni:

a. Goresan T

Cara goresan T dilakukan dengan tahapan prosedur seperti berikut ini.

1. Media padat dalam cawan petri dibagi menjadi 3 bagian dengan huruf T pada bagian luar dasar cawan petri.
2. Daerah 1 diinokulasi sebanyak mungkin dengan gerakan menggores yang saling sinambung dengan menggunakan ose yang sudah mengandung kultur campuran yang akan dimurnikan.
3. Ose disterilkan lagi dengan cara dipanaskan dan dibiarkan dingin kembali.
4. Daerah 1 digores lagi sebanyak 3-4 kali dan diteruskan menggores di daerah 2
5. Ose disterilkan lagi dengan cara dipanaskan dan dibiarkan dingin kembali.
6. Prosedur di atas diulangi untuk daerah 2.

b. Goresan kuadran

Teknik pemurnian bakteri dengan teknik kuadran pada dasarnya adalah sama dengan teknik goresan T hanya saja media agar dalam cawan petri dibagi menjadi 4 daerah.

c. Goresan radian

Teknik goresan radian dilakukan dengan tahapan seperti paparan berikut ini.

1. Ose steril dan dingin dicelupkan ke dalam kultur campuran yang akan dimurnikan. Selanjutnya ose digoreskan ke medium padat dalam wadah cawan petri. Cara menggoreskan dimulai dari bagian pinggir media dalam cawan petri.
2. Ose disterilkan lagi dengan cara dipanaskan dan dibiarkan dingin kembali.
3. Putar cawan petri yang berisi media agar 90°C dan buat

goresan terputus diatas goresan sebelumnya.

4. Ose disterilkan lagi dengan cara dipanaskan dan dibiarkan dingin kembali.

d. Cara sinambung

Cara sinambung dilakukan dengan prosedur seperti berikut ini.

1. Mengambil satu mata ose suspensi dan menggoreskannya ke setengah permukaan medium agar dalam cawan petri.
2. Masih tetap menggunakan ose yang sama (tidak perlu disterilkan), media agar diputar 180°C , lalu dengan menggunakan sisi mata ose yang sama, menggores ose tersebut pada sisa permukaan media agar.

D. Cara penyebaran

Pengenceran sampel sama seperti pada cara-cara penuangan, prosedur cara penyebaran dilakukan dengan mengambil suspensi bakteri kultur campuran sebanyak 0,1 ml cairan dari botol pengencer terakhir dan membiarkan cairan tersebut mengalir ke atas permukaan agar.

E. Cara pengucilan 1 sel

Cara ini dilakukan dengan menggunakan suatu alat yang dapat memungut satu bakteri dari sekian banyak bakteri, dengan tanpa ikut sertanya bakteri yang lain. Alat semacam ini tidak mudah untuk menggunakannya, memerlukan keterampilan khusus, seringkali pengambilan sel tunggal seperti ini memerlukan bantuan mikroskop yang dapat memvisualisasi sel-sel bakteri dengan baik. Alat itu berupa mikropipet yang ditempatkan pada suatu micromanipulator.

Pembuatan kultur murni mikroorganisme indigenus dilakukan dengan cara memindahkan satu per satu isolat yang tumbuh pada kultur campuran. Isolat yang satu dengan isolat lainnya pada kultur campuran dibedakan dari pengamatan ciri-ciri koloni yang berbeda. Ciri-ciri tersebut meliputi bentuk koloni,

warna, tekstur, dan elevasi. Koloni mikroorganismenya yang menampilkan ciri-ciri yang berbeda dianggap sebagai jenis/spesies yang berbeda, dan disubkultur pada wadah yang berbeda. Wadah untuk kultur murni adalah tabung reaksi dengan kondisi media miring. Koloni bakteri dibedakan dari koloni fungi dari tampilan teksturnya. Koloni bakteri berupa koloni dengan permukaan yang licin cenderung mengkilat, sedangkan koloni fungi cenderung menampilkan permukaan yang kasar berbenang. Gambar 6.1 berikut ini merupakan tampilan koloni bakteri dan koloni fungi.



Gambar 6.1 Kultur tunggal fungi dan bakteri terpilih untuk formulasi starter

Semua koloni yang berhasil diisolasi dari sampel bahan campuran eceng gondok dan tongkol jagung akan digunakan untuk formulasi starter yang selanjutnya akan ditambahkan pada saat pembuatan pakan fermentasi selanjutnya menggunakan bahan baku yang sama. Hal yang diharapkan dari penambahan starter ini utamanya untuk mempercepat proses fermentasi dan menghasilkan pakan fermentasi yang kandungannya memenuhi syarat pakan ternak. Dengan demikian dapat dimanfaatkan limbah pertanian yang saat ini kurang potensial dan dikurangnya jumlah gulma perairan yang selama ini sangat dirasakan mengganggu.

Setelah proses inkubasi dan koloni biakan murni bakteri dan fungi tumbuh, selanjutnya dilakukan penyimpanan kultur murni di suhu dingin (suhu almari es) sampai dilakukan uji-uji yang diperlukan, dan formulasi untuk pembuatan starter. Sebelum dilakukan formulasi isolat-isolat itu akan diuji aktivitas sellulolitiknya, sinergismenya dan antagonismenya. Isolat-isolat yang mempunyai aktivitas sellulolitik tinggi dan menunjukkan sinergisme adalah isolat yang potensial yang akan diformulasikan untuk membuat starter yang efektif.

F. Cara penyimpanan starter

Penyimpanan biakan murni mikroba dapat dilakukan dengan berbagai cara. Cara-cara tersebut akan diuraikan pada poin ini. Adapun cara-cara penyimpanan yang dipaparkan dan sering digunakan untuk berbagai keperluan meliputi (1) peremajaan berkala (2) penyimpanan dalam minyak mineral (3) penyimpanan dalam tanah steril (4) penyimpanan dalam air steril (5) penyimpanan dalam manik-manik porselin. Hal ini karena teknik tersebut memerlukan peralatan yang sederhana dan mudah diperoleh, sehingga dapat dilaksanakan di laboratorium yang belum memiliki peralatan canggih.

Metode penyimpanan jangka panjang yang paling efektif dan banyak dilakukan ialah metode liofilisasi atau kering beku (*liophylization* atau *freeze drying*) dan kriopreservasi (*cryopreservation* atau *cryogenic preservation*). Kedua teknik tersebut dilaporkan paling berhasil untuk penyimpanan jangka panjang berbagai mikroba. Kendala utamanya adalah tidak semua laboratorium mempunyai peralatan untuk pelaksanaannya.

Teknik peremajaan berkala dilakukan dengan cara memindahkan atau memperbarui biakan mikroba dari biakan lama ke medium tumbuh yang baru secara berkala, misalnya sebulan atau dua bulan sekali. Teknik ini merupakan cara paling tradisional yang digunakan peneliti untuk memelihara koleksi isolat mikroba di laboratorium. Cara ini juga digunakan untuk penyimpanan dan pemeliharaan isolat mikroba yang belum

diketahui cara penyimpanan jangka panjangnya. Peremajaan berkala tidak dianjurkan untuk penyimpanan jangka panjang. Teknik ini mempunyai berbagai kendala, di antaranya (1) kemungkinan terjadi perubahan genetik melalui seleksi varian, (2) peluang terjadinya kontaminasi, dan (3) terjadinya kesalahan dalam pemberian label.

Cara lain untuk menyimpan mikroba adalah penyimpanan dalam minyak mineral. Cara ini dilakukan dengan menyimpan bakteri atau fungi dalam tabung agar miring dan menutup dengan minyak mineral atau parafin cair. Dasar teknik penyimpanan ini adalah mempertahankan viabilitas mikroba dengan mencegah pengeringan medium, sehingga waktu peremajaan dapat diperpanjang hingga beberapa tahun. Beberapa jenis jamur dapat bertahan hidup sampai 20 tahun. Daya tahan hidup mikroba lebih baik apabila biakan disimpan pada suhu kulkas (4°C). Mikroba yang akan dipelihara ditumbuhkan pada tabung berisi medium agar miring atau medium cair (*broth*) yang sesuai, kemudian permukaan biakan ditutup dengan minyak mineral steril setinggi 10-20 mm dari permukaan atas medium. Teknik ini sederhana, tetapi kurang praktis untuk ditransportasi. Di samping itu, keberadaan minyak mineral mengakibatkan peremajaan menjadi kotor.

Urutan prosedur penyimpanan mikroba dalam minyak mineral adalah seperti paparan berikut ini (a) Penyediaan tabung reaksi dengan tutup berdrat atau botol McCartney berisi medium agar miring yang sesuai untuk mikroba yang akan dipelihara (b) Penyediaan minyak mineral atau parafin cair steril, diautoklaf pada suhu 121°C selama 60 (c) Menumbuhkan mikroba yang akan disimpan dalam tabung agar miring selama 24-48 jam dan memeriksa kemurnian biakan untuk menghindari kontaminasi (d) Setelah mikroba tumbuh baik, parafin cair steril dimasukkan ke dalam botol secukupnya, sehingga permukaan parafin atas berada 10-20 mm di atas permukaan medium agar (e) Botol biakan yang telah diberi parafin cair disimpan pada suhu ruang

atau di kulkas (f) Uji viabilitas mikroba dan pemeliharaan isolat dilakukan secara periodik dan rutin, paling tidak setiap tahun.

Banyak bakteri dan jamur yang dapat bertahan hidup dengan baik pada tanah kering yang disimpan pada suhu ruang untuk waktu yang lama, hingga 20 tahun atau lebih. Teknik penyimpanan mikroba pada tanah kering terutama berguna untuk fungi, *Streptomyces* spp., dan bakteri yang membentuk spora seperti *Bacillus* spp. dan *Clostridium* spp. *Rhizobium* spp. juga dapat disimpan dengan baik dengan cara ini. Teknik ini mempunyai beberapa keuntungan, yaitu biaya murah, penyimpanan pada suhu ruang, dan stabilitas genetik mikroba dapat dipertahankan. Cara penyimpanan dalam tanah steril adalah sebagai berikut (a) Diambil tanah yang agak liat, dikeringanginkan dan diayak untuk memisahkan partikel tanah yang agak besar dan membuang sisa-sisa tanaman (b) Tanah yang sudah kering dan diayak dimasukkan ke dalam tabung atau botol dengan tutup berdrat ukuran 25 ml hingga 1 cm dari permukaan tutup (c) Tabung atau botol yang berisi tanah diberi akuades steril hingga kebasahan 50% kapasitas lapang, kemudian diautoklaf pada suhu 121°C tiga kali berturut-turut selama tiga hari masing-masing selama satu jam (d) Bilamana diperlukan, sterilitas tanah diuji dengan menumbuhkan contoh tanah pada medium agar (e) Selanjutnya, botol dioven kering pada suhu 105°C selama satu jam dan setelah dingin disimpan di dalam desikator hingga digunakan (f) Suspensi mikroba yang akan disimpan (sel, spora atau konidia, miselia) dibuat dalam larutan steril pepton 2% dalam akuades (g) Suspensi mikroba (0,1 ml) diambil dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tiap botol yang telah disiapkan (h) Botol dikembalikan ke desikator untuk disimpan di dalamnya atau setelah kering diambil dan disimpan di ruangan (i) Mikroba yang disimpan diuji viabilitasnya setiap tahun dengan menumbuhkan pada medium agar (j) Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik sebagian contoh tanah dari botol penyimpanan, memindahkan ke medium cair diikuti dengan menggoreskan suspensi medium cair.

Cara lain untuk menyimpan biakan murni adalah penyimpanan mikroorganisme dalam akuades steril. Beberapa jenis bakteri, terutama yang berbentuk batang dan bereaksi Gram negatif seperti *Pseudomonas* dapat disimpan cukup lama dalam akuades steril pada suhu ruang atau suhu 10-15°C. Tidak semua bakteri dapat disimpan dengan baik menggunakan cara ini, misalnya pada anggota genus *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, dan *Curtobacterium*. Pada kondisi penyimpanan ini bakteri yang disimpan masih berpeluang tumbuh dengan lambat, sehingga tidak dapat dijamin stabilitas genetiknya untuk jangka panjang. Penyimpanan dengan cara ini juga memungkinkan terjadinya kontaminasi. Oleh karena itu, cara ini lebih dianjurkan sebagai alternatif penyimpanan jangka sedang atau sebagai pendamping penyimpanan jangka panjang. Tahap penyimpanan mikroba dalam akuades steril adalah sebagai berikut (a) Akuades steril disiapkan dalam botol dengan tutup berdrat ukuran 25 ml, 5-10 ml/botol atau dalam tabung ependorf (b) Mikroba yang akan disimpan ditumbuhkan dalam bentuk biakan murni pada medium agar miring yang sesuai (c) Biakan bakteri berumur 24-48 jam disimpan dengan beberapa cara seperti (i) menambahkan 3-5 ml akuades steril ke dalam biakan miring, mengocok tabung hingga diperoleh suspensi pekat bakteri (10⁸-10⁹ sel/ml), dan memindahkan 1 ml suspensi ke dalam tiap botol yang berisi air steril (ii) memindahkan satu ose biakan miring bakteri ke dalam tabung reaksi berisi 3-5 ml akuades steril, tabung dikocok hingga suspensi merata, dan memindahkan 1 ml suspensi ke dalam tiap botol yang berisi air steril (iii) memindahkan satu ose biakan miring bakteri langsung ke dalam tiap botol yang berisi air steril dan mengocok hingga merata (d) Botol ditutup rapat dan disimpan pada suhu ruang atau suhu 10-15°C (e) Uji viabilitas mikroba dan pemeliharaan stok isolat dilakukan secara rutin. Penumbuhan kembali biakan dilakukan dengan mengambil botol dari tempat penyimpanan, mengocok, dan mengambil satu ose suspensi dan menumbuhkan pada medium cair atau langsung pada medium agar yang sesuai.

Penyimpanan biakan murni juga dapat dilakukan dengan cara penyimpanan dalam manik-manik porselin. Cara sederhana lain untuk pemeliharaan berbagai jenis mikroba adalah mengeringkan suspensi sel pada manik-manik porselin (*porcelain beads*) atau gelas (*glass beads*) menggunakan gel silika sebagai pengering. Selapis gel silika diletakkan di alas botol dengan tutup berdrat, kemudian di atasnya ditutup dengan lapisan ka-pas atau *slag wool* dan di atasnya diletakkan manik-manik porselin atau kaca yang diimpregnasi dan telah dicelupkan dalam suspensi mikroba yang akan disimpan. Kelembaban yang ada pada manik-manik diserap oleh gel silika yang ada di bawahnya. Kelebihan gel silika juga berfungsi menjaga kekeringan udara di dalam botol. Prosedur penyimpanan dan pemeliharaan dengan manik-manik porselin adalah sebagai berikut (a) Gel silika (berwarna biru bila kering dan ungu bila lembab) sebanyak 3-4 g dimasukkan ke dalam botol tutup berdrat ukuran 25 ml (b) Di atas gel silika dilapisi kapas atau *slag wool* setebal 1 cm agar tidak bergerak tetapi tetap berpori (c) Di atas lapisan kapas diletakkan 20-50 manik-manik porselin atau gelas yang diimpregnasi (d) Botol dibuka tutupnya dan disterilkan dengan oven kering suhu 160°C selama 1-2 jam. Tutup botol karena berlapis karet disterilkan dengan autoklaf, suhu 121°C selama 15 menit, kemudian di oven kering dengan suhu 100°C selama 1 jam, dan setelah dingin ditutupkan ke botolnya secara (e) Mikroba yang akan disimpan dibiakkan 24-48 jam dalam tabung reaksi yang berisi 1 ml medium cair yang sesuai (f) Manik-manik porselin dituangkan ke dalam tabung reaksi yang berisi biakan mikroba dan kelebihan suspensi bakteri dibuang (g) Manik-manik yang basah oleh suspensi bakteri dikembalikan ke dalam botol dan ditutup rapat. Sebagian gel silika di dalam botol akan berubah warna menjadi merah jambu, sedangkan sisanya tetap berwarna biru. Apabila seluruh gel silika berubah warna menjadi merah jambu, hendaknya botol tidak digunakan (h) Botol yang berisi mikroba disimpan pada suhu ruang atau di kulkas (i) Uji viabilitas bakteri dilakukan secara periodik dan

rutin, paling tidak setiap tahun (j) Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik satu manik-manik botol penyimpanan, memindahkannya ke medium cair atau dengan menggosokkan suspensi medium cair pada medium agar yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu optimal. Penyimpanan dengan manik-manik porselin dapat diganti dengan butiran gel silika.

BAB VII

UJI AKTIVITAS SELULOLITIK DAN SINERGISME MIKROORGANISME INDIGENUS

Salah satu kriteria pemilihan mikroba untuk menjadi kandidat starter dalam pembuatan pakan fermentasi adalah kemampuannya untuk mendegradasi selulosa. Kemampuan mendegradasi selulosa menjadi sarat terpilihnya mikroba untuk starter karena eceng gondok dan tongkol jagung adalah bahan yang kaya selulosa. Oleh sebab itu pembuatan starter diawali dengan uji aktivitas selulolitik pada tiap-tiap kultur murni yang telah diisolasi dari bahan eceng gondok dan tongkol jagung.

Terdapat beberapa uji untuk mengetahui aktivitas selulolitik dari mikroba. Uji kualitatif mikroba selulolitik dilakukan dengan cara melihat adanya zona bening pada media padat selektif CMC 1% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 24 jam. Uji kualitatif pada media padat selulase yang mengandung 1% CMC (1 g CMC; 0,02g MgSO₄.7H₂O; 0,075 g KNO₃; 0,002 gK₂HPO₄; 0,004 g CaCl₂.2H₂O; 1,5 g agar batang) (Meryandini et al., 2009). dalam larutan buffer fosfat 100 mL. Isolat yang terlihat atau tumbuh pada media selektif kemudian ditambahkan 5 mL congo red 0,1% dengan cara dituang secara merata keseluruh permukaan media selektif dan dibiarkan selama 1 hari, setelah 1 hari warna dicuci dengan NaCl 1M dan dilakukan pengamatan. Pembuatan stok inokulum bakteri selulolitik. Bakteri hasil peremajaan 1 tabung agar miring diambil dan dimasukkan ke dalam 50 mL media (NB), kemudian diinkubasi di dalam shaking incubator dengan kecepatan agitasi 150 rpm pada suhu 37°C selama 18 jam. Suspensi dari bakteri ini kemudian digunakan sebagai starter dan selanjutnya dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm untuk menghitung jumlah pertumbuhan sel dari masing masing bakteri. Inokulum dengan OD sebesar 0,5 dimasukkan masing-masing ke

dalam media produksi cair enzim selulase dan diinkubasi berdasarkan variasi waktu yang telah ditentukan. Produksi enzim selulase Komposisi media cair untuk produksi enzim selulase yang mengandung 1% CMC (1 g CMC; 0,02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,075 g KNO_3 ; ,002 g K_2HPO_4 ; 0,004 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; *yeast extract* 0,2 G; 1,5 g agar batang). Semua bahan dilarutkan dengan bufer fosfat 0,05 M pH 7 sebanyak 100 mL dan kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121°C selama 20 menit. Media siap digunakan apabila tidak ada tanda-tanda kontaminasi setelah diinkubasi satu malam pada suhu kamar. Produksi enzim selulase dilakukan dengan cara menginokulasikan inokulum isolat bakteri *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, dan *Bacillus* sp. B3 sebanyak 10% ke media cair produksi enzim selulase. Kultur cair ini diinkubasi pada *shaking incubator* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37°C dengan variasi waktu inkubasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, 24 jam, 30 jam, dan 36 jam. Masing-masing kultur yang mengandung enzim dipisahkan dari bakteri menggunakan sentrifugasi dalam keadaan dingin 9500 rpm selama 10 menit. Sebelum disentrifugasi, media kultur berisi enzim tersebut didinginkan selama 1 jam. Supernatan disaring dengan filter glass fiber (whatman GF/C) dan disterilisasi dengan Corning syringe filter 0,45µm, kemudian ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasi 0,0065 % (b/v) ke dalam setiap larutan supernatan jika enzim tidak langsung digunakan.

Secara kuantitatif uji aktivitas sellulolitik mikroba dilakukan dengan uji kuantitatif dengan mengukur aktivitas enzim selulase yang dihasilkannya. Uji aktivitas enzim selulase ekstraselular dilakukan dengan menghitung kadar glukosa hasil dari hidrolisis selulosa menggunakan enzim selulase dengan metode Nelson Somogyi. Tabung untuk sampel diisi dengan 0,5 mL larutan substrat Carboxymethyl cellulose (CMC) 2% yang dilarutkan pada larutan buffer fosfat pH 7. Kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam *waterbath* suhu 40°C. Tabung sampel tersebut kemudian diisi dengan larutan enzim 0,5 mL dan diinkubasi selama 30 menit sambil sekali-sekali diaduk pelan -

pelan. Tabung kontrol dimasukkan kedalam *waterbath* dalam keadaan kosong, kemudian diinkubasi selama 5 menit. Setelah 5 menit, tabung tersebut diisi dengan larutan substrat CMC 0,5 mL dari larutan substrat CMC 2% yang dilarutkan menggunakan larutan buffer posfat pH 7 kemudian diinkubasi selama 30 menit. Tabung sampel dan tabung kontrol dikeluarkan dari dalam *waterbath* setelah 30 menit waktu inkubasi. Masing-masing tabung ditambahkan 0,5 mL reagen Nelson-Somogyi lalu larutan dihomogenisasi dan pada tabung kontrol selanjutnya ditambahkan larutan enzim sebanyak 0,5 mL. Semua tabung dipanaskan selama 20 menit dalam air mendidih dan kemudian didinginkan pada suhu kamar, lalu ditambahkan 0,5 mL reagen arsenomolibdat dan dihomogenisasikan kembali. Setelah itu didiamkan 5 menit. Setiap tabung diberi 3 mL akuades dan didiamkan selama 30 menit. Larutan disentrifugasi jika terdapat endapan pada 9500 rpm selama 10 menit. Sebagai blanko digunakan 0,5 mL larutan buffer fosfat pH 7 (0,05 M) yang diperlukan sama dengan sampel, tetapi tidak diinkubasi. Sebagai standar dibuat larutan glukosa pada berbagai konsentrasi dengan metode Nelson-Somogyi. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 540.

Uji aktivitas sellulolitik isolat indigenus dilakukan dengan cara menumbuhkan masing-masing isolat pada medium selektif. Medium selektif yang digunakan untuk uji aktivitas sellulolitik mengandung sumber karbon sekaligus sumber energi tunggal yaitu CMC. Isolat yang mempunyai aktivitas sellulolitik akan dapat mendegradasi CMC tersebut untuk memenuhi kebutuhan karbon dan energinya. Hal ini ditandai dengan adanya zona jernih pada bagian media yang terdegradasi CMC-nya. Dengan demikian sangat mudah diseleksi, isolat mana yang mempunyai aktivitas sellulolitik tinggi, yang tentu saja isolat yang menampilkan zona jernih yang luas.







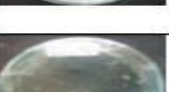







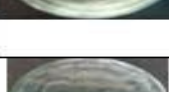

Teknik yang ditempuh untuk uji aktivitas sellulolitik isolat indigenus sedikit berbeda antara uji aktivitas sellulolitik pada

bakteri dan fungi. Uji aktivitas sellulolitik pada bakteri dilakukan dengan membuat suspensi dari kultur murni masing-masing isolat bakteri dengan akuades steril. Ke dalam suspensi tersebut dimasukkan kertas saring steril yang dibentuk lingkaran kecil. Pada kertas saring akan melekat sel-sel bakteri yang selanjutnya kertas akan diletakkan pada bagian tengah medium padat yang terdapat pada cawan petri. Bakteri akan tumbuh dan menggunakan bahan-bahan yang terdapat pada medium tersebut termasuk CMC yang akan didegradasi untuk memenuhi kebutuhan energi dan kebutuhan karbonnya. Degradasi CMC ditandai dengan menjernihnya media yang semula berwarna putih keruh. Zona jernih akan tampak di sekitar kertas saring tempat bakteri terkumpul dan memulai pertumbuhannya. Semakin luas zona jernih yang terbentuk menandakan semakin tingginya aktivitas sellulolitik isolat tersebut.

Uji aktivitas sellulolitik pada fungi dilakukan dengan cara yang sedikit berbeda. Berbeda dengan bakteri yang lazimnya uniselluler, fungi kebanyakan mempunyai tallus yang berupa benang-benang yang disebut hifa, bahkan hifa seringkali membentuk anyaman kompleks yang disebut miselium. Oleh sebab itu sangat sedikit kemungkinannya untuk membuat suspensi hifa dan melekatkan hifa tersebut pada kertas saring, seperti sel bakteri. Hal yang tepat dilakukan pada uji aktivitas sellulolitik fungi adalah menumbuhkan terlebih dahulu fungi pada media padat dan menginkubasinya sampai seluruh permukaan medium tertutupi oleh koloni fungi. Selanjutnya pada media yang ditutupi hifa tersebut dibuat potongan-potongan inokulan yang berbentuk lingkaran. Potongan inokulan yang berbentuk lingkaran itu selanjutnya diletakkan pada bagian tengah media selektif yang mengandung CMC. Fungi akan tumbuh pada medium selektif tersebut dan menggunakan CMC untuk memenuhi kebutuhannya akan energi dan karbon seperti halnya bakteri. Degradasi CMC akan menyebabkan jernihnya media yang tadinya putih keruh. Zona jernih akan terbentuk di sekeliling potongan inokulan yang berbentuk lingkaran. Dengan









demikian sangat mudah dilakukan pengukuran zona jernih yang terbentuk. Fungi dengan aktivitas sellulolitik tinggi akan menghasilkan zona jernih yang lebih luas juga.

Tampilan media yang CMC-nya telah terdegradasi dapat diperjelas dengan memberikan pewarna media. *Congo red* lazim dilakukan untuk mewarnai media selektif untuk uji aktivitas sellulolitik. Penambahan pewarna ini akan menjadikan media berwarna merah. Pada saat CMC terdegradasi, pewarna ini juga akan mengalami degradasi, sehingga warnanya menjadi hilang, dengan demikian akan terdapat zona jernih pada medium yang berwarna merah. Ini akan memudahkan penghitungan zona jernih yang terbentuk. Hasil uji aktivitas sellulolitik pada bakteri dan fungi dapat dilihat pada Gambar 7.1 berikut ini.

1	P1 <i>Bacillus bacillus</i>			2,00
2	P2 <i>B. subtilis</i>			4,29
3	P3 <i>B. brevis</i> strain A			8,55
4	P4 <i>B. pumilus</i>			3,23
5	P5 <i>B. brevis</i> strain B			3,93
6	P6 <i>Xenorhaphus luminescens</i>			4,59
7	P7 <i>Pseudomonas stutzeri</i>			4,84
8	P8 <i>P. diminuta</i>			5,88

Gambar 7.1 Hasil uji aktivitas sellulolitik bakteri indigenus dari campuran eceng gondok dan tongkol jagung

Pada Gambar 7.2 berikut ini adalah hasil uji aktivitas sellulolitik pada fungi indigenus yang diisolasi dari campuran eceng gondok dan tongkol jagung.

No.	Kode isolat dan spesies	Tampak depan	Tampak belakang	Ukuran (diperoleh dari rata-rata hasil pengukuran 3 sampel) (mm)
1	J1			2,26
2	J2			1,97
3	J3			0,33
4	J4			2,26

Gambar 7.2 Hasil uji aktivitas sellulolitik fungi indigenus campuran eceng gondok dan tongkol jagung.

Persaratan berikutnya bagi mikroba yang menjadi kandidat starter adalah kemampuannya bekerja sinergi dengan mikroba lain dalam konsorsium. Oleh sebab itu perlu dilakukan uji sinergisme dan uji antagonisme antar mikroba indigenus itu.

Uji sinergime antar mikroorganisme ada beberapa metode. Metode yang lazim digunakan adalah metode yang digunakan oleh Asri dan Zulaika (2016). Masing-masing isolat yang diuji sinergismenya digoreskan bersinggungan satu sama lain menggunakan metode gores sehingga antar isolat akan bertemu.

Selanjutnya diinkubasi 24 jam dan diamati apakah terdapat zona bening atau zona hambat diantara dua isolat yang bersinggungan. Isolat dikatakan sinergis apabila tidak terdapat zona penghambatan pada daerah pertemuan kedua isolat, dan dikatakan tidak kompatibel atau antagonis apabila terdapat zona penghambatan pada daerah pertemuan kedua isolat tersebut.

Cara lain untuk mengetahui efek sinergistik adalah dengan mengukur aspek-aspek yang menjadi produk dari sinergisme tersebut. Kajian sinergisme antara probiotik berupa isolat bakteri asam laktat dengan berbagai macam prebiotik tertentu yang ditambahkan pada media, sehingga dihasilkan 4 variasi komposisi media seperti berikut ini BHI, BHI + prebiotik (Maltodextrin 2 % dan FOS 2%), BHI + oxgall 0,3%; BHI + kolesterol telah dilakukan. Setelah dilakukan inkubasi parameter yang diukur adalah toleransi terhadap keasaman dan garam empedu, pH media dan kadar kolesterol. Antara BAL dan jenis prebiotik dikatakan sinergis jika memberikan parameter positif tinggi, dan sebaliknya probiotik dan prebiotik tidak sinergis apabila menghasilkan kadar parameter positif rendah, dan malah mengeluarkan parameter negatif yang tinggi.

Secara kuantitatif sinergisme dapat juga dihitung dengan menghitung Nisbah sinergistik (NS). Nilai NS lebih besar dari 1 berarti ada sinergisme, apabila nilai NS sama dengan 1 berarti netral atau tidak ada sinergisme (Hamilton and Attia, 1977).

Terdapat beberapa cara untuk melakukan uji antagonisme secara *in vitro* antar mikroorganisme. Saputra (2015)

menggunakan cara uji antagonis dengan menitikkan isolat bakteri pada titik tertentu di media penumbuhan. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Setelah 48 jam cawan petri dibalik dan ditetesi 1 ml kloroform dan dibiarkan dalam 2 jam dan setelah uap kloroform hilang cawan petri dikembalikan ke posisi semula dan dituangi antagonis. Selanjutnya diinkubasi lagi selama 24 jam dan diamati zona hambatan yang terbentuk.

Cara lain untuk uji antagonis antar mikroorganisme adalah dengan menggunakan rumus Fokkema (1976) yaitu dengan cara mengukur jari-jari koloni isolat patogen yang menjauhi isolat antagonis (P1) dan jari-jari koloni patogen yang mendekati agens antagonis (P2) dan persen penghambatan dihitung dengan selisih kedua jari-jari itu dibagi dengan P1 kali 100%.

Pada pembuatan pakan yang dilakukan uji antagonisme dan uji sinergisme dilakukan dengan metode seperti uraian berikut ini. Uji antagonisme antar mikroorganisme dilakukan sesuai metode Saputra (2015). Isolat yang akan diantagoniskan masing-masing ditumbuhkan sebagai suspensi. Isolat 1 diinokulasikan ke media agar pada posisi tertentu. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Setelah 48 jam cawan petri dibalik dan ditetesi 1 ml kloroform dan dibiarkan dalam 2 jam dan setelah uap kloroform hilang cawan petri dikembalikan ke posisi semula. Selanjutnya dilakukan inokulasi isolat yang diantagoniskan dengan teknik lempeng tuang. Diinkubasi lagi selama 24 jam dan diamati zona hambatan yang terbentuk. Apabila kedua isolat itu menampakkan adanya zona hambat, maka keduanya antagonis (Maria, 2015).

BAB VIII

SELEKSI MIKROORGANISME INDIGENUS, FORMULASI STARTER DAN APLIKASINYA DALAM PEMBUATAN PAKAN FERMENTASI

Formula starter yang efektif dapat diperoleh jika konsorsium mikroorganisme di dalamnya mempunyai aktivitas enzim yang sesuai dengan senyawa-senyawa yang terdapat pada bahan baku yang akan difermentasi dan diantara mikroba dalam konsorsium itu bekerja sinergis. Oleh sebab itu tahapan selanjutnya setelah dilakukan uji aktivitas sellulolitik pada semua mikroba indigenus yang berhasil diisolasi dan uji sinergisme, maka yang harus dilakukan adalah menyeleksi mikroba kandidat komponen konsorsium. Hal ini dilakukan dengan melihat data hasil uji aktivitas sellulolitik yang diperoleh. Pada hasil penelitian yang telah dilakukan, telah ditemukan 8 isolat bakteri dan 4 isolat kapang. Adapun hasil pengukuran zona hambat semua mikroba indigenus adalah seperti Tabel 8.1 dan Tabel 8.2 berikut ini. Hal ini perlu dipaparkan supaya memperjelas penjelasan cara melakukan seleksi mikroba untuk suatu konsorsium.

Tabel 8.1 Hasil pengukuran zona hambat bakteri yang menggambarkan aktivitas sellulolitiknya

Pada Tabel 8.1 dapat dilihat bahwa aktivitas sellulolitik tertinggi adalah bakteri P3, dan bakteri ini adalah kandidat yang terbaik untuk menjadi komponen starter. Namun, tidak berarti bahwa bakteri yang lain tidak dapat menjadi kandidat. Dalam hal ini bisa dipilih juga bakteri P5 dan P8, sehingga terpilih tiga bakteri yang akan digunakan untuk membuat formula starter.

Pada Tabel 8.2 akan dipaparkan hasil pengukuran zona jernih yang menunjukkan aktivitas sellulolitik fungi indigenus.

Tabel 8.2 Hasil pengukuran zona jernih yang menunjukkan aktivitas sellulolitik fungi indigenus

JENIS JAMUR	DIAMETER (MM)							Rata- rata
	PENGAMATAN HARI KE-							
	1	2	3	4	5	6	7	
J1	1,17	2	2	2,5	2,58	2,83	2,75	2,26
J2	1	1,67	2,17	2,17	2,25	2,25	2,25	1,97
J3	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0,83	0,33
J4	1,58	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,58	2,26

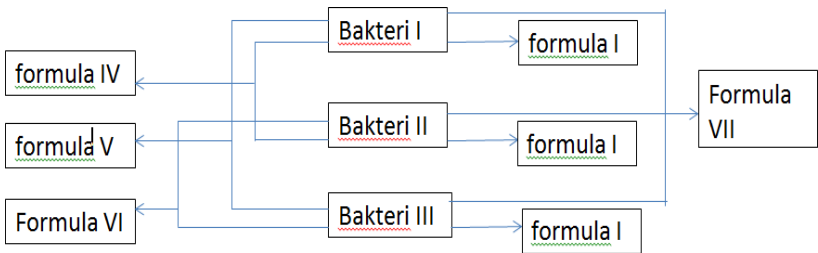
Pada Tabel 8.2 dapat dilihat bahwa J1 dan J4 adalah kandidat terbaik untuk konsorsium, maka dalam hal ini akan digunakan 2 spesies fungi ini yaitu J1 dan J4 sebagai anggota konsorsium. Dengan demikian dalam formulasi starter ini akan digunakan 5 macam mikroba, yaitu 3 bakteri dan 2 fungi.

Pembuatan formula konsorsium indigenus perlu memperhatikan beberapa aspek. Dalam hal pembuatan formula konsorsium indigenus yang dapat bermanfaat sebagai starter pada proses pembuatan pakan fermentasi berbahan baku eceng gondok dan tongkol jagung dasar pertimbangannya adalah diperolehnya isolat dengan aktivitas enzim yang sesuai. Eceng gondok dan tongkol jagung adalah bahan yang bersifat lignosellulolitik, yang berarti bahwa eceng gondok dan tongkol jagung mempunyai kandungan lignin dan selulosa yang tinggi.

Formula konsorsium indigenus yang berfungsi sebagai starter untuk fermentasi kedua bahan tersebut haruslah isolat dengan aktivitas pendegradasi selulosa dan lignin yang tinggi. Maka sangat diperlukan dilakukan seleksi mikroorganisme yang mempunyai aktivitas selulolitik dan lignolitik tinggi. Seleksi mikroorganisme ini dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada media selektif yang memfasilitasi mikroorganisme-mikroorganisme pendegradasi selulosa dan lignin untuk tumbuh, sedangkan yang bukan pendegradasi tidak mampu tumbuh.

Berdasarkan hasil uji sinergisme dan antagonisme diantara mikroba indigenus menunjukkan bahwa semua mikroba indigenus menunjukkan adanya sinergisme antara yang satu dengan yang lain.

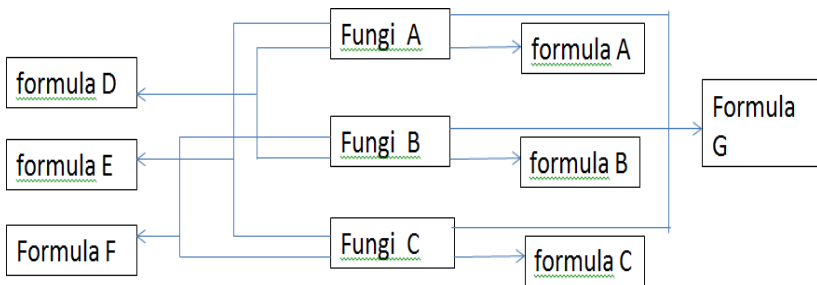
Pembuatan formula konsorsium indigenus perlu memperhatikan beberapa aspek. Dalam hal pembuatan formula konsorsium indigenus yang dapat bermanfaat sebagai starter pada proses pembuatan pakan fermentasi berbahan baku eceng gondok dan tongkol jagung dasar pertimbangannya adalah diperolehnya isolat dengan aktivitas enzim yang sesuai. Eceng gondok dan tongkol jagung adalah bahan yang bersifat lignoselulolitik, yang berarti bahwa eceng gondok dan tongkol jagung mempunyai kandungan lignin dan selulosa yang tinggi. Formula konsorsium indigenus yang berfungsi sebagai starter untuk fermentasi kedua bahan tersebut haruslah isolat dengan aktivitas pendegradasi selulosa dan lignin yang tinggi. Maka sangat diperlukan dilakukan seleksi mikroorganisme yang mempunyai aktivitas selulolitik dan lignolitik tinggi. Seleksi mikroorganisme ini dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada media selektif yang memfasilitasi mikroorganisme-mikroorganisme pendegradasi selulosa dan lignin untuk tumbuh, sedangkan yang bukan pendegradasi tidak mampu tumbuh. Sehingga formulasi starter dapat dilakukan dengan kombinasi bertingkat seperti dipaparkan berikut ini.



Gambar 8.1 Contoh cara pembuatan konsorsium atau formulasi starter bakteri

Pada Gambar 8.1 dipaparkan cara mengkonsorsiumkan tiga isolat bakteri. Apabila prosedur dilakukan secara lengkap, maka dari ditemukannya tiga jenis bakteri saja, akan dihasilkan 7 formula

Selanjutnya isolat fungi yang ditemukan juga akan dikonsorsiumkan seperti halnya bakteri, sehingga dihasilkan cara kombinasi seperti dipaparkan pada Gambar 8.2 berikut ini.



Gambar 8.2 Contoh cara pembuatan konsorsium atau formulasi starter fungi

Seperti halnya bakteri, tiga isolat fungi juga akan dihasilkan 7 formula starter fungi. Kita ketahui bahwa antara

bakteri dan fungi kemungkinan besar juga dapat bekerja sinergis, maka untuk mendapatkan formula starter yang efektif dapat dilakukan pengkombinasian bakteri dan fungi seperti dipaparkan pada Tabel 8.1 berikut ini.

Tabel 8.1 Kombinasi secara faktorial formula bakteri dan formula fungi

FB FF	FB I	FB II	FB III	FB IV	FB V	FB VI	FB VII
FF A	FBF IA	FBF IIA	FBF IIIA	FBF IVA	FBF VA	FBF VIA	FBF VIIA
FF B	FBF IB	FBF IIB	FBF IIIB	FBF IVB	FBF VB	FBF VIB	FBF VIIB
FF C	FBF IC	FBF IIC	FBF IIIC	FBF IVC	FBF VC	FBF VIC	FBF VIIC
FF D	FBF ID	FBF IID	FBF IIID	FBF IVD	FBF VD	FBF VID	FBF VIID
FF E	FBF IE	FBF IIE	FBF IIIE	FBF IVE	FBF VE	FBF VIE	FBF VIIE
FF F	FBF IF	FBF IIF	FBF IIIF	FBF IVF	FBF VF	FBF VIF	FBF VIIF
FF G	FBF IG	FBF IIG	FBF IIIG	FBF IVG	FBF VG	FBF VIG	FBF VIIG

Keterangan:

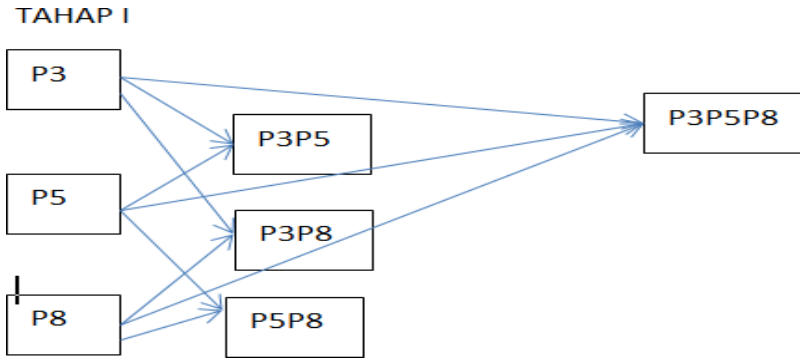
FB = Formula bakteri

FF = Formula fungi

FBF = Formula bakteri-fungi

Cara formulasi seperti dipaparkan di atas, hanya memungkinkan jika jumlah isolat indigenus yang berhasil diisolasi hanya sedikit. Seperti contoh di atas, andaikan pada bahan ditemukan 6 isolat (3 bakteri dan 3 fungi) saja sudah menghasilkan 49 macam formula. Oleh sebab itu dapat ditempuh cara lain yang lebih efisien seperti yang dilakukan pada penelitian yang dilakukan. Adapun tahapan yang ditempuh adalah, pada

awalnya dilakukan seleksi terlebih dahulu berdasarkan aktivitas sellulolitiknya. Dari 8 isolat bakteri indigenus yang diperoleh hanya dipilih 3 macam bakteri saja, yang aktivitas sellulolitiknya. Demikian juga dengan fungi, telah ditemukan 4 spesies fungi, tetapi hanya dipilih 2 spesies saja. Formulasi dilakukan secara bertingkat seperti dipaparkan berikut ini. Tiga spesies bakteri yang dipilih berdasarkan aktivitas sellulolitiknya adalah P3, P5 dan P8. Dalam hal ini tidak digunakan formula tunggal, maka formula yang mungkin dihasilkan adalah P3P5, P3P8, P5P8 dan P3P5P8.



Gambar 8.3 Formulasi tiga isolat bakteri indigenus terpilih

Dengan cara yang sama fungi yang dipilih adalah J1 dan J4, maka hanya dihasilkan satu formula saja yaitu J1J4 (karena tidak digunakan formula tunggal). Tahap selanjutnya adalah memformulasi keempat formula bakteri dan satu formula fungi, sehingga dihasilkan empat macam formula seperti pada Gambar 8.4 berikut ini.

Gambar 8.4. Formulasi bakteri dan fungi indigenus dari fermege
Formula I: P₃P₅J₁J₄
Formula II: P₃P₈J₁J₄
Formula III: P₅P₈J₁J₄
Formula IV: P₃P₅P₈J₁J₄

Selanjutnya keempat formula yang dihasilkan tersebut diuji efektivitasnya dalam mempercepat proses fermentasi dan meningkatkan kandungan gizi pakan fermentasi, sehingga dapat dihasilkan pakan fermentasi dalam jumlah banyak dengan waktu yang cepat dan kandungan gizinya memenuhi sarat pakan yang ideal.

Aplikasi formula starter yang telah dibuat dilakukan dengan cara menambahkan starter dalam bentuk cair/suspensi pada campuran bahan yang difermentasi, khususnya bahan baku dari eceng gondok dan tongkol jagung. Sebenarnya aplikasi formula starter ini tidak terbatas pada bahan baku eceng gondok dan tongkol jagung saja sebagai sumber mikroba indigenus, tetapi bahan lain yang kandungan senyawanya mirip eceng gondok dan tongkol jagung juga efektif jika starter ini diaplikasikan. Pada dasarnya formula starter ini dapat digunakan untuk mempercepat proses fermentasi bahan-bahan yang berlignin dan bersellulosa tinggi.

BAB IX

ANALISIS LAMA WAKTU FERMENTASI DAN KANDUNGAN GIZI PAKAN FERMENTASI

A. Analisis Lama Waktu Fermentasi

Lama waktu fermentasi pada pembuatan pakan berbahan baku eceng gondok dan tongkol jagung ditentukan dengan cara menghitung jumlah hari sejak hari pertama inkubasi bahan pakan untuk proses fermentasi sampai hari pengambilan sampel pakan dan uji proksimat menunjukkan hasil bahwa pakan telah memenuhi syarat kecukupan gizi untuk ternak kambing. Dalam hal ini penentuan lama waktu fermentasi selalu berkaitan dengan hasil uji proksimat pakan. Penentuan lama waktu fermentasi yang tepat akan diperoleh dengan melakukan pengambilan sampel setiap hari dan melakukan uji proksimat pada sampel harian yang diambil. Pada pengambilan sampel hari tertentu yang hasil uji proksimatnya telah menunjukkan kecukupan gizi, maka proses fermentasi dapat diakhiri dan pakan dapat diberikan kepada ternak.

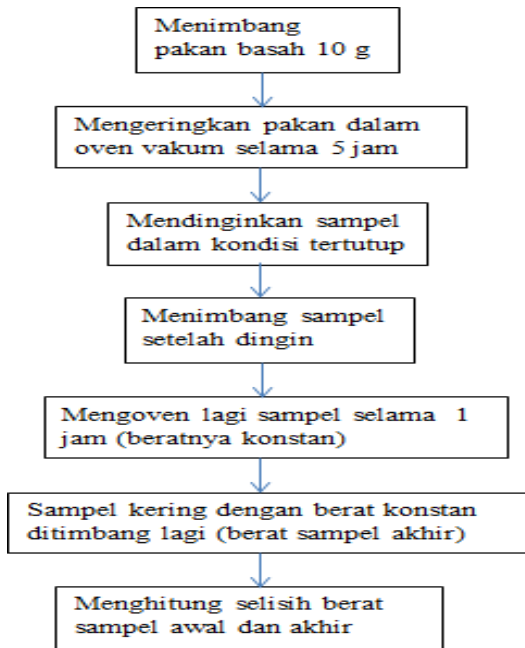
B. Analisis Kandungan Gizi Pakan Fermentasi

Pakan fermentasi yang telah dibuat dengan mengaplikasikan starter mikroorganisme indigenus harus memenuhi standar kandungan gizi. Analisis kandungan gizi pada pakan fermentasi dilakukan dengan analisis proksimat. Parameter dan senyawa-senyawa yang diukur kadarnya meliputi kelembaban, abu, protein kasar, lemak kasar, ekstrak bebas nitrogen, dan pengukuran kadar karbohidrat. Analisis kandungan gizi merujuk pada (Asibbey-Berko, 1999). Terdapat beberapa metode pengukuran kelembaban atau kadar air sampel uji seperti cara pengeringan (termogravimetri), yang pada prinsipnya adalah mengeringkan sampel dengan memanaskannya sampai mendapatkan berat yang konstan (hal ini berarti kandungan air pada sampel telah hilang). Kadar air pada sampel dihitung melalui selisih berat sampel sebelum dan sesudah dikeringkan. Metode termogravimetri ini telah digunakan dalam penelitian pembuatan pakan fermentasi karena mudah dan murah, serta sesuai dengan karakteristik sampel. Metode lain adalah penentuan kadar air secara destilasi (thermovolumetri) dengan memanfaatkan senyawa kimia pembawa air seperti toluene,

xylem, benzene, tetrakloroetilen dan xylol yang mempunyai karakteristik titik didihnya lebih tinggi dari air, berat jenis lebih rendah dari air dan tidak bercampur dengan air, sehingga air hasil destilasi mudah ditentukan kadarnya. Kadar air dapat ditentukan secara kimia yaitu dengan titrasi Karl Fisher. Sampel ditirasi dengan larutan iodin dalam methanol atau dengan kalsium karbid yang didasarkan pada reaksi antara kalsium karbid dan air yang menghasilkan gas asetilen. Cara berikutnya adalah penentuan kadar air secara fisika, yaitu kadar air ditentukan berdasarkan tetapan dielektrikum, konduktivitas listrik (daya hantar listrik) dan resonansi nuklir magnetik (NMR).

Pada penelitian pembuatan pakan yang telah dilakukan metode penentuan kadar air/kelembaban pakan diukur dengan tahapan prosedur sebagai berikut. Kelembaban akan diketahui dengan cara mengukur selisih antara berat basah sampel dan berat kering sampel dikalikan 100, dibagi berat basah sampel. Hasilnya dikalikan 100%. Prosedur yang ditempuh adalah 10g sampel ditimbang beratnya (berat basah sampel), lalu dikeringkan dalam oven vakum selama 5 jam, sampel didinginkan dalam kondisi tertutup dan ditimbang lagi setelah dingin. Selanjutnya dioven lagi selama 1 jam sampai mendapatkan berat yang konstan (berat tidak boleh berubah lebih dari 5mg setelah pengeringan kembali selama 1 jam). Sampel ditimbang kembali untuk mendapatkan berat kering sampel.

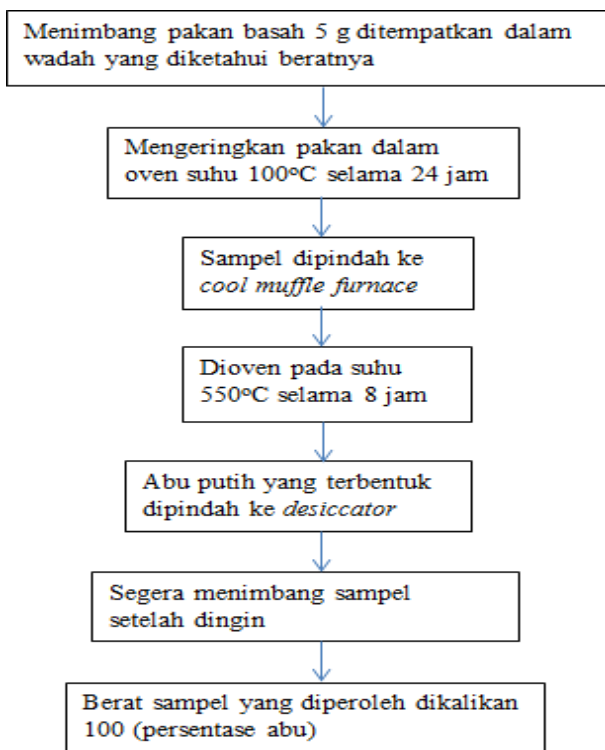
Pengukuran kadar air atau kelembaban pakan hasil fermentasi eceng gondok dan tongkol jagung secara skematis seperti pada Gambar 9.1 berikut ini.



Gambar 9.1 Skema prosedur pengukuran kelembaban/kadar air pakan

Analisis abu mencerminkan kandungan mineral suatu bahan yang terdiri dari garam organik dan garam anorganik. Kadar abu dapat dilakukan dengan cara kering dan cara basah. Analisis abu juga dapat dilakukan untuk mengetahui kadar abu total atau kadar abu per komponen. Cara kering memerlukan suhu yang tinggi dan cara basah dilakukan pada suhu yang relatif rendah, sampel berjumlah sedikit dan bahan-bahan yang memerlukan pereaksi kimia sedikit berbahaya. Pada penelitian pembuatan pakan yang telah dilakukan analisa abu dilakukan dengan cara kering karena sampel berjumlah banyak dan tidak memerlukan pereaksi kimia yang berbahaya. Adapun tahapan prosedurnya adalah seperti uraian berikut ini. Kadar abu diukur dengan prosedur 5 g sampel ditempatkan dalam wadah (yang beratnya juga diketahui), sampel dikeringkan dalam oven

pengering pada suhu 100°C selama 24 jam. Setelah pengovenan selama 24 jam sampel dipindah ke *cool muffle furnace* untuk ditingkatkan suhunya sampai 550°C selama 8 jam sampai terbentuk abu putih. Setelah terbentuk abu putih dipindah ke *desiccator* dan segera ditimbang setelah dingin. Persentase abu diperoleh dengan menghitung berat abu/berat sampel dikalikan 100. Berikut ini adalah penghitungan kadar abu pada pakan fermentasi.



Gambar 9.2 Skema prosedur pengukuran kadar abu

Analisa protein bertujuan menghitung jumlah protein dalam bahan makanan. Pada dasarnya terdapat dua cara menghitung kandungan protein suatu bahan yaitu secara empiris

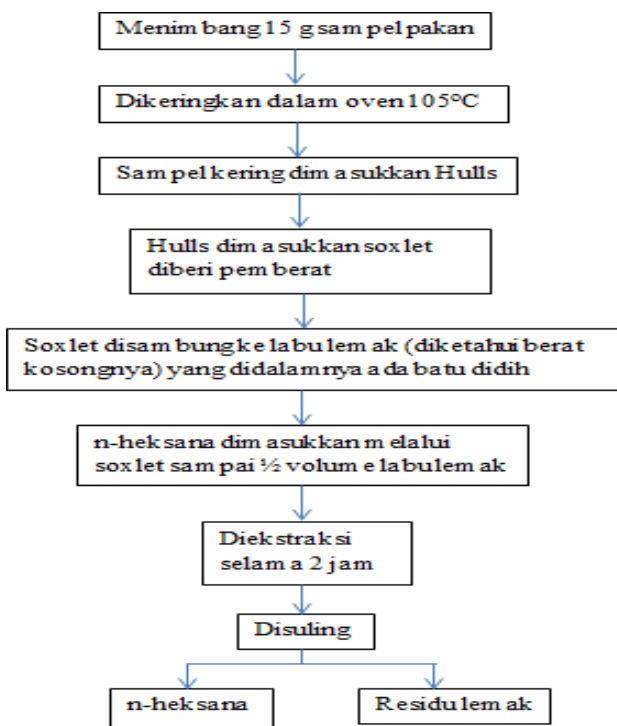
(tidak langsung) dan secara absolut (langsung). Metode penentuan kadar protein secara tidak langsung adalah melalui kandungan N yang ada dalam bahan, yang lazim menggunakan metode Kjeldahl ilmuwan Denmark yang telah mengembangkan metode ini tahun 1883 (Asibbey-Berko, 1999). Penentuan kadar protein secara langsung dilakukan dengan pemisahan, pemurnian atau penimbangan protein. Metode ini membutuhkan waktu yang lama, keterampilan tinggi dan mahal biayanya, sehingga pada penelitian dilakukan analisa protein dengan metode Kjeldahl. Sedangkan langkah yang digunakan untuk mengukur kadar protein pada pakan yang telah dibuat seperti uraian berikut ini.

Kadar protein kasar dihitung dengan cara menghaluskan sampel dan menimbang 1g sampel yang telah halus untuk selanjutnya dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl dan ditambahkan 1,9 g K_2SO_4 , 40 mg HgO , dan 12,0 ml H_2SO_4 , serta 20 ml H_2O . Selanjutnya beberapa butir batu didih ditambahkan dan memanaskan campuran sampai mendidih selama 15 menit, sampai larutan menjadi jernih dan kehijau-hijauan. Selanjutnya adalah destruksi yang dilakukan di almari asam yang mempunyai sarana penghisapan uap. Larutan didinginkan dan ditambah air 30 ml. Isi tabung dipindahkan ke alat destilasi, labu Kjeldahl dibilas berkali-kali dengan 1-2ml air lalu dipindahkan ke labu destilasi. Lalu menyiapkan erlenmeyer dan diisi dengan 5ml larutan H_3BO_3 dan 2 tetes indikator di bawah kondensor dengan kondisi ujung tabung kondensor terendam dalam larutan H_3BO_3 . Lalu menambahkan 8-10ml larutan $NaOH-Na_2S_2O_3$, dan didistilasi sampai tertampung kira-kira 15ml distilat dalam Erlenmeyer. Tabung kondensor dibilas dengan air dan bilasannya ditampung dalam erlenmeyer yang sama. Isi erlenmeyer diencerkan sampai 50ml, dan dititrasi dengan HCl 0,02N sampai terjadi perubahan warna menjadi abu-abu. Langkah yang sama juga dilakukan untuk larutan blangko. Selanjutnya dapat dilakukan perhitungan persentase N dan persentase protein tiap g berat sampel. Faktor konversi kadar protein yang digunakan adalah kategori makanan ternak yaitu 6,25. Secara skematis tahapan pelaksanaannya seperti Gambar 9.3 berikut ini.

Gambar 9.3 Skema prosedur pengukuran kadar protein

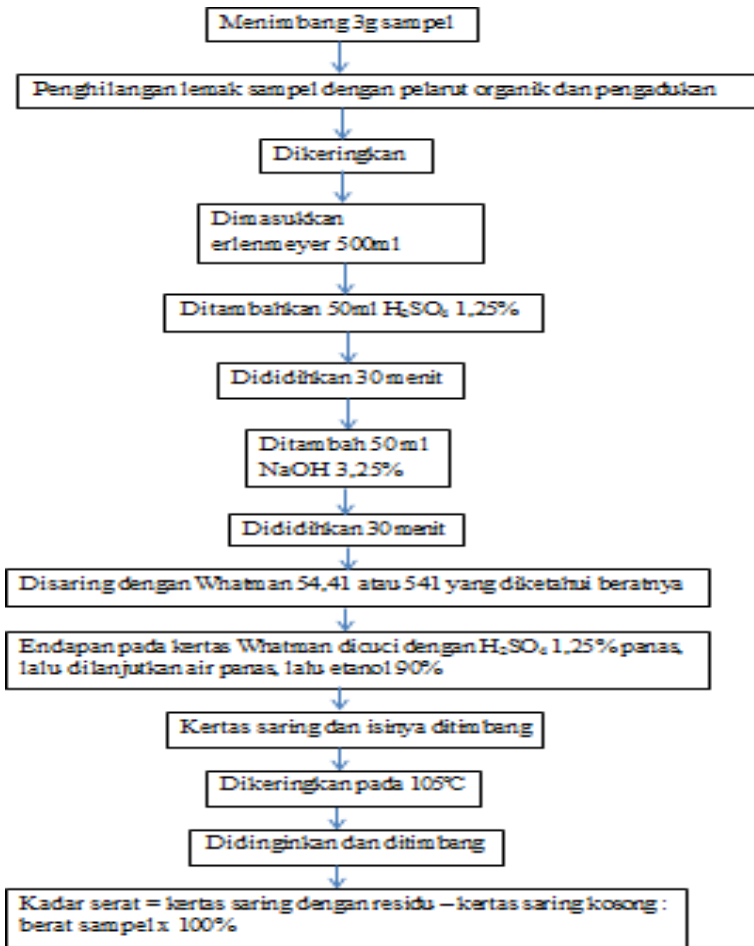
Analisa lemak kasar lazim dilakukan dengan cara ekstraksi. Sifat lemak yang tidak larut dalam air menjadikan analisisnya lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan analisa karbohidrat dan protein. Ekstraksi lemak dilakukan dengan pelarut organik seperti ether, benzene, kloroform. Pada penelitian ini metode analisa lemak yang digunakan adalah ekstraksi lemak dengan pelarut n-heksana karena relatif mudah dilakukan. Tahapan pekerjaan yang dilakukan seperti berikut ini. Kadar lemak kasar dihitung dengan metode soxlet. Sampel campuran bahan eceng gondok dan tongkol jagung ditimbang sebanyak 15 g dan dihaluskan, selanjutnya dikeringkan dengan oven sampai 105°C. Sampel kering dimasukkan ke dalam hulls, yang selanjutnya dimasukkan ke dalam soxlet dan diberi pemberat. Soxlet

disambungkan ke labu lemak yang di dalamnya terdapat batu didih yang telah diketahui berat kosongnya. Pelarut lemak seperti n-heksana dimasukkan melalui soxlet sampai setengah volume labu dan disambungkan ke pendingin tegak, untuk diekstraksi selama 2 jam. Setelah proses ekstraksi selesai pelarut disulingkan kembali, hasilnya dimasukkan kembali ke botol n-heksana. Sisa lemak dalam labu disimpan dan dioven untuk menghilangkan sisa n-heksana dan didinginkan untuk ditimbang beratnya. Berat lemak dalam g pada sampel dapat dihitung dengan menghitung selisih antara berat labu didih yang berisi lemak dan berat labu didih kosong. Gambar 9.4 merupakan skema tahapan pengukuran kadar lemak.



Gambar 11.4 Skema tahapan pengukuran kadar lemak

Analisa serat kasar ditujukan untuk mengukur kadar serat kasar yang terdapat dalam bahan pangan (ternak). Senyawa yang digunakan untuk analisa adalah asam sulfat (H_2SO_4 1,25 %) dan natrium hidroksida (NaOH 3.25%). Metode yang digunakan untuk analisis serat kasar dalam penelitian ini mengikuti metode yang sesuai dengan SNI 01-2891 – 1992 butir 7.1, yang merupakan cara uji untuk makanan dan minum, yang akan diterapkan untuk uji pakan ternak. Berikut ini adalah tahapan yang ditempuh. Kadar serat kasar dihitung dengan metode sesuai dengan SNI 01-2891 – 1992 butir 7.1 sampel ditimbang sebanyak 3 g, lemak dihilangkan dengan mengaduk dan mengendapkannya dalam pelarut organik berkali-kali supaya sampel benar-benar bebas dari lemak. Sampel dikeringkan dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500ml, dan kedalamnya ditambahkan 50 mL larutan H_2SO_4 1,25 %, lalu dididihkan selama 30 menit menggunakan pendingin tegak. Selanjutnya ditambahkan 50 mL NaOH 3,25 % dan dididihkan lagi selama 30 menit. Dalam kondisi panas disaring dengan corong Buchner yang berisi kertas saring Whatman 54, 41, atau 541 kering yang diketahui beratnya. Endapan yang melekat pada kertas saring dicuci secara berturut-turut dengan H_2SO_4 1,25 % panas, selanjutnya dengan air panas dan terakhir dengan etanol 96 %. Kertas saring dan isinya dimasukkan ke dalam kotak timbang yang beratnya diketahui. Selanjutnya dikeringkan pada suhu $105^{\circ}C$, lalu didinginkan dan ditimbang. Persentase serat kasar dapat diperoleh dengan menghitung selisih berat kertas saring yang berisi residu dan berat kertas saring tanpa residu, dibagi berat sampel dikalikan 100%. Berikut ini adalah skema prosedur pengukuran kadar serat yang dipaparkan pada Gambar 9.5.



Gambar 9.5 Skema prosedur pengukuran kadar serat

Analisa karbohidrat dapat dilakukan dengan berbagai cara kimia, cara fisika, dengan enzimatik dan kromatografi. Penentuan karbohidrat yang paling mudah adalah dengan cara perhitungan kasar (*proximat analysis*) atau disebut juga *Carbohydrate by Difference*, yang menghitung kandungan karbohidrat termasuk serat kasar bukan melalui analisis tetapi melalui perhitungan dengan rumus % karbohidrat = $100\% - (\text{protein} + \text{lemak} +$

abu + air), dengan catatan % protein, lemak , abu dan air telah dihitung sebelumnya. Cara ini yang digunakan untuk menghitung karbohidrat dalam penelitian ini karena dalam penelitian ini kadar protein, lemak, abu dan air telah dihitung terlebih dahulu. Kadar karbohidrat diukur dengan *Carbohydrate by Difference* yaitu menggunakan rumus % karbohidrat = $100\% - \% (\text{protein} + \text{lemak} + \text{abu} + \text{air})$, yang kadarnya telah dihitung terlebih dahulu.

DAFTAR PUSTAKA

- Alamsyah, R. 2005. *Pengolahan Pakan Ayam dan Ikan Secara Modern*. Penebar Swadaya. Bogor.
- Auli, Rizqi. 2016. Potensi Substrat Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) sebagai Bahan Baku Tambahan untuk Peningkatan Produksi Biogas. Universitas Mulawarman.
- Asibbey-Berko, E. 1999. Proximate Analysis of Some Under-Utilized Ghanaian Vegetables. *Ghana Journal of Science*. ISSN 0016-9544.
- Asri, A. C., & Zulaika, E. 2016. Sinergisme Antar Isolat *Azotobacter* yang Dikonsorsiumkan. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 5(2):E.57-E.59.
- Alrumman, S. A. 2016. Enzymatic Saccharification and Fermentation of Cellulosic Date Palm Waste to Glukose and Lactic Acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47: 110-119.
- Anyanwu, C.F., Ngohayon, S. L., Ildefonso, R. L., & Ngohayon, J. L. 2015. Isolation and Characterization of Indigenous Microorganism (Imo) from Ifugao Bamboo (*Phyllostachys Aurea*) Forest. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 4(2): 1319-1324.
- Barton, H. A., Taylor, N. M., Lubbers, B. R., & Pemberton, A.C. 2006. DNA Extraction from Low-Biomass Carbonate Rock: An Improved Method with Reduced Contamination and the Low-Biomass Contaminant Database. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1): 21-31.
- Belal, E. B. 2014. Bioethanol Production from Rice Straw Residu. *Biotechnol Biofuels*, 7: 139-142.
- Bellamy, D. 2000. Production of Single-Cell Protein for Animal Feed from Lignocellulose Wastes. *Animal Production and Health Division*. ISSN 0254-6019.
- Bhatia, A., Rajpal, A., Madan, S., & Kazmi, A.A. 2015. Techniques to Analyze Diversity during Composting—A Mini Review. *Indian Journal of Biotechnology*, 14: 19-25.
- Bhattacharya, A., Haldar, S., & Chatterjee, P.K. 2015. Geographical Distribution and Physiology of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) – The Invasive Hydrophyte and A Biomass for Producing Xylitol. *International Journal of ChemTech Research*, 7(4): 1849-1861.

- Boboescu, I. Z., Ilie, [M.](#), [Gherman](#), V. D., [Mirel](#), I., Pap, B., Negra, A., Kondorosi, E., Biro, T., & Maroti, G. [2014](#). Revealing the Factors Influencing A Fermentative Biohydrogen Production Process Using Industrial Wastewater as Fermentation Substrate. *Biotechnology for Biofuels*, 7: 139-154.
- Boundless. 2016. 'Environmental Diversity of Microbes' Version: 2 Januari 2017. <https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundless-microbiology-textbook/introduction-to-microbiology-1/microbes-and-the-world-19/environmental-diversity-of-microbes-210-4286/>'.
- Bunyamin, Z, Roy Efendi dan N.N. Andayani. 2013. Pemanfaatan Limbah Jagung Untuk Industri Pakan Ternak. Balai Penelitian Tanaman Serealia Maros. Seminar Nasional Inovasi Teknologi Pertanian 2013 153.
- Burtscher, C., & Wuertz, S. 2003. Evaluation of the Use of PCR and Reverse Transcriptase PCR for Detection of Pathogenic Bacteria in Biosolids from Anaerobic Digestors and Aerobic Composters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 4618–4627.
- Cao, Y., Zhang, Z., Yuan, Y., Zheng, X., & Shen, Q. 2011. *Bacillus subtilis* SQR 9 can Control *Fusarium* Wilt in Cucumber by Colonizing Plant Roots. *Biology and Fertility of Soils*, 47(5): 495-506.
- Carmona, M., Iveda, D. S., Ca´rdenas, C., Nilo, L., & Marshall, S. H., Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) as a Powerful Novel Alternative for Differentiation of Epizootic ISA Virus Variants. *PLoS ONE*, 7(5): e37353.
- Charudattan, R., Labrada, R., Center, T.D., & Bagazo, C.K. 1995. International Expert Consultation on Strategies for Water Hyacinth Control: Background and Justification. *Report of a Panel of Experts Meeting*. Fort Lauderdale, Florida, USA.
- Devi, S. G., Fathima, A. A., Radha, S., Arunraj, R., Curtis, W. R., & Ramya, M. 2015. A Rapid and Economical Method for Efficient DNA Extraction from Diverse Soils Suitable for Metagenomic Applications. *PLoS ONE* 10(7): E0132441
- Dong, W., Xu, C., Cheng, T., & Zhou, S. 2013. Complete Chloroplast Genome of *Sedum sarmentosum* and Chloroplast Genome Evolution in Saxifragales. *PLoS ONE* 8(10): e77965.

- Engberg, R.M., Hammersh, M., Johansen, [N.F.](#), Abousekken, [M. S.](#), Steinfeldt, [S.](#) & [Jensen, B. B.](#) 2009. Fermented Feed for Laying Hens: Effects on Egg Production, Egg Quality, Plumage Condition and Composition and Activity of The Intestinal Microflora. *Journal British Poultry Science*, Volume 50(2): 228-239.
- Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G., & Coppola, S. 2004. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 263-270.
- Farnleitner, A. H., Kreuzinger, N., Kavka, G. G., Grillenberger, S., Rath, J., & Mach, R. L. 2000. Comparative analysis of denaturing gradient gel electrophoresis and temporal temperature gradient gel electrophoresis in separating *Escherichia coli uidA* amplicons differing in single base substitutions. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 427-431
- Fakruddin, Md., Mannan, K. S., Chowdhury, A., Mazumdar, R. M., Hossain, Md. N., Islam, S., & Chowdhury, Md. A. 2013. Nucleic Acid Amplification: Alternative Methods of Polymerase Chain Reaction. *J Pharm Bioallied Sci.*,5(4): 245-252.
- Fitrihidajati, H., Isnawati, & Suparno, G. 2013. Pemanfaatan Eceng Gondok (*Eichornia crassipes*) untuk Pakan Ternak Ruminansia sebagai Salah Satu Cara Mengatasi Gulma Perairan. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing*. Penelitian Hibah Bersaing. Universitas Negeri Surabaya. Surabaya. (Disimpan di LPPM Universitas Negeri Surabaya. Surabaya).
- Fitrihidajati, H., Isnawati, & Suparno, G. 2014. Pemanfaatan Eceng Gondok (*Eichornia crassipes*) untuk Pakan Ternak Ruminansia sebagai Salah Satu Cara Mengatasi Gulma Perairan. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing Lanjutan*. Penelitian Hibah Bersaing. Universitas Negeri Surabaya. Surabaya. (Disimpan di LPPM Universitas Negeri Surabaya. Surabaya).
- Fitrihidajati, H., *Ratnasari, E., Isnawati, & Soeparno, G.* 2015. Kualitas Hasil Fermentasi Pada Pembuatan Pakan Ternak Ruminansia Berbahan Baku Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*), *Journal of Biosaintifika*, 7 (1): 62-67.
- Gichuki, J., Omondi, R., Boera, P., Okorut, T., Matano, A.S., Jembe, T., & Ofulla, A. 2012. Water Hyacinth *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms-Laubach Dynamics and Succession in the Nyanza Gulf of Lake Victoria (East Africa):

- Implications for Water Quality and Biodiversity Conservation. *The Scientific World Journal*, 10: 11-20.
- González, A. R. C., Burrola-Barraza, M. E., Domínguez-Viveros, J., & Chávez-Martínez, A. 2014. Rumen Microorganisms and Fermentation. *Arch Med Vet*, 46: 349-361.
- Hall, B. G. 2013. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Mol Biol Evol*, 30 (5): 1229-1235.
- Hamilton, J. T., & Attia, F. I. 1977. Effect of Mixtures of *Bacillus thuringiensis* and Pesticide Xylostella and The Parasite *Thyraeella collaris*, *J. Econ. Entomol.*, 70 (1):146-148.
- Harwi Kusnadi, Aulia Evi dan Zul Efendi. 2016. Identifikasi Gulma Dan Potensinya Untuk Pakan Ternak Pada Lahan Kering Dataran Tinggi Di Kabupaten Kepahiang Provinsi Bengkulu. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP) Bengkulu. (http://purplso.unsri.ac.id/userfiles/49_HAL%20478%20-486%20Harwi%20Kusnadi.pdf, 31 Agustus 2017).
- Ho, H. L., & Lau, L. Y., 2014. Bioprocessing of Agricultural Waste as Optimised Carbon Source and Optimisation of Growth Condition for Xylanase Production by *Aspergillus brasiliensis* in Agitated Solid State Fermentation (SsF). *J Biodivers Biopros Dev.*, 1(3):1-12.
- Hossain, Md. E., Sikder, H., Kabir, Md. H., & Sarma, S. M. 2015. Nutritive Value of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Journal of Animal and Feed Research*, 5(2): 40-44.
- Huffstetler, E. 2015. 'Uses for Corn Cobs.' Version: 3 Desember 2016. <http://www.myfrugalhome.com/uses-for-corn-cobs/>
- Iheukwumere, F., Ndubuisi, E., & Mazi, E. 2009. Effect of Feeding Corn Cob Meal on The Growth, Nutrient Digestibility and Organ Characteristics of Finisher Broilers. *International Journal of Natural and Applied Sciences*, 5: 11-15.
- Ishii, K., Fukui, M., & Takii, S. 2000. Microbial Succession during A Composting Process as Evaluated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 768-777.
- Jian-jun, C., Yi, D., & Qi-jia, Z. 2006. Invasion and Control of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in China. *J Zhejiang Univ SCIENCE B*, 7(8):623-626.

- Kanengoni, A. T., Chimonyo, M., Ndimba, B. K., & Dzama, K. 2015. Potential of Using Maize Cobs in Pig Diets — A Review. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 28(12): 1669-1679.
- Kumar, A., Sharma, P.C., Kumar, A., & Negi, V. 2011. A Study on Phenotypic Traits of *Candida* Species Isolated from Blood Stream Infections and Their *In Vitro* Susceptibility to Fluconazole. *Al Am een J Med Sci*, 7(1):83-91.
- Kurniadie, D, V. Putri dan U. Umiyati. 2016. The relationship between contaminated water quality and weed diversity in Cikeruh and Cikapundung rivers. Department of Crop Science, Padjadjaran University.
- Labrada, R., Caseley, J. C., & Parker, C. 1994. Weed Management for Developing Countries. FAO. New York. USA.
- Lardy, G. & Vern Anderson. 2009. *Alternative Feeds for Ruminant*. NDSU. Dakota.
- Lee, Se H., Jung, Ji Y., & Jeon, C. Ok. 2014. Microbial Successions and Metabolite Changes during Fermentation of Salted Shrimp (Saeu-Jeot) with different Salt Concentrations. *PloS ONE*, 9(2): E90115.
- Lu, J., Fu, Z., & Yin, Z. 2008. Performance of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) System in the Treatment of Wastewater from a Duck Farm and the Effects of Using Water Hyacinth as Duck Feed. *Journal of Environmental Sciences*, 20(5):513-519.
- Mahmoud, A. G. Y., & Zaher, E. H. F. 2015. Why Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) has been Selected as the DNA Barcode for Fungi? *Adv Genet Eng*, 4(2): 1-2.
- Mako, A. A., Babayemi, O. J., & Akinsoyinu, A. O. 2011. An Evaluation of Nutritive Value of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart. Solms-Laubach) Harvested from Different Water Sources as Animal Feed. *Livestock Research for Rural Development [Internet][sitasi 23 April 2017]*; 23:106-110. Didapat dari: <http://www.lrrd.org/lrrd23/5/mako23106.htm>.
- Mangisah, I., Sukanto, B., & Nasution, M. H. 2009. Implementation of Fermented Eceng Gondok In Duck Ration. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 34 (2): 127-133.

- Maria PD. 2002. Eksplorasi dan Uji Antagonisme Bakteri Rhizosfer Tanah dan Endofit Akar untuk Pengendalian Penyakit Layu (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*) pada Pisang (*Musa paradisiaca*). *Skripsi*. HPT. Fakultas Pertanian. IPB.
- Marzuki, F.S. 2016. 'Ternak Pertama, Cara Beternak Kambing Bagi Pemula.' Version: 30 Oktober 2016. <http://www.ternakpertama.com/2016/07/cara-beternak-kambing-bagi-pemula.html>'.
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. 1977. A New Method for Sequencing DNA. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 74(2): 560-564.
- Missotten, A. M., Michiels, J., Degroote, J., & De Sme S. 2015. Fermented liquid feed for pigs: an ancient technique for the future. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6: 4-13.
- Mohapatra, S. B. 2015. Utilization of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Meal as Partial Fish Protein Replacement in The Diet of *Cyprinus carpio* Fry. *European Journal of Experimental Biology*, 5(5): 31-36.
- Morris, B. E. L., Henneberger, R., Huber, H., & Eichinger, C. M., 2013. Microbial Syntrophy: Interaction for The Common Good. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3): 284-406.
- Mullen, C. A., Boateng, A. A., Goldberg, N. M., Lima, I. M., Laird, D. A., & Hicks, K.B. 2010. Bio-Oil and Bio-Char Production from Corn Cobs and Stover by Fast Pyrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 34: 67-74.
- Ndimele, P. & Jimoh, A. 2011. Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* [Mart.] Solms.) in Phytoremediation of Heavy Metal Polluted Water of Ologe Lagoon, Lagos, Nigeria. *Research journal of Environmental Sciences*, 5(5), 424-433.
- Njogu, K., Kinyua, R., Muthoni, P., & Nemoto, Y. 2015. Biogas Production Using Water Hyacinth (*Eicchornia crassipes*) for Electricity Generation in Kenya. *Energy and Power Engineering*, 7: 209-216.
- Okoye, F.C., Daddy, F. and Ilesanmi, B.D., 2002. The nutritive value of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and its utilisation in fish feed.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An Application to Display Phylogenetic Trees on Personal Computers. *Computer Application in The Bioscience*, 12: 357-358.

- Parlina, Dessy. 2004. Pemanfaatan Limbah Pertanian Sebagai Pakan Ternak. Pengawas Mutu Pakan Pertama. Dinas Pertanian, Perkebunan dan Peternakan Kabupaten Bangka Barat.
- Phioneer, H. R., Yurmiati, H., & Sinaga, S. 2016. 'Tingkat Penggunaan Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) dalam Silase Ransum Komplit terhadap Pertambahan Bobot Badan dan Efisiensi Ransum Kelinci Peranakan New Zealand White' Version: 2 November 2016. <http://download.portalgaruda.org/article.php>.'
- Phua, C. K. H., Wahid, A. A. N., & Rahim, A. K. 2012. Development of Multifunctional Biofertilizer Formulation from Indigenous Microorganisms and Evaluation of Their N₂-Fixing Capabilities on Chinese Cabbage Using ¹⁵N Tracer Technique. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 35 (3): 673 – 679.
- Piterina, A. V., & Pembroke, J. T. 2013. Use of PCR-DGGE Based Molecular Methods to Analyse Microbial Community Diversity and Stability during the Thermophilic Stages of an ATAD Wastewater Sludge Treatment Process as an Aid to Performance Monitoring. *ISRN Biotechnology*, 2013, Article ID 162645, 13 pages.
- Pothiraj, C., Kanmani, P., & Balaji, P. 2006 . Bioconversion of Lignocellulose Materials. *Mycobiology* 34(4): 159-165.
- Qiu, S., Chen, J., Lin, S., & Lin, A. Comparison of Silver Staining Protocols for Detecting DNA in Polyester-Backed Polyacrylamide Gel. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012: 649-652.
- Ramos, C. L., de Almeida, E. G., Freire, A. L., & Schwan, R. F., 2011. Diversity of Bacteria and Yeast in The Naturally Fermented Cotton Seed and Rice Beverage Produced. *Food Microbiology*, 28(7): 1380–1386.
- Rezania, S., Ponraj, M., Talaiekhosani, A., Mohamad, S. E., Din, M.F. Md., Taib, S. M., Sabbagh, F., & Sairan, F. Md. 2015. Perspectives of Phytoremediation Using Water Hyacinth for Removal of Heavy Metals, Organic and Inorganic Pollutants in Wastewater. *Journal of Environmental Management*, 163: 125-133.
- Rohaeni, E. S., Amali, N., Subhan, A., Darmawan, A., & Sumanto. 2009. Utilization of Corn cob as Feed for Beef Cattle in Tanah Laut District, South Kalimantan. Version: 3 Desember 2016.

- http://bbp2tp.litbang.pertanian.go.id/eng/index.php?option=com_content&view=article&id=171&Itemid=27.
- Rostika, R. & Safitri, R. 2012. Influence of Fish Feed Corn-Cob Was Fermented By *Trichoderma sp.*, *Aspegillus sp.*, *Rhizopus oligosporus* To The Rate of Growth of Java Barb (*Puntius Gonionitus*). *APCBEE Procedia* 2:148-152.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., & Swings, J. 2003. Microbiological Aspects of Biowaste during Composting in A Monitored Compost Bin. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 127-137.
- Sadhana, B., Nikhitha, T., Vani, S. S., & Padal, S. B. 2015. Methods Of Isolation Of Indigenous Saprophytic Fungi And Screening Of Their Cellulolytic Activity –A Review. *BMR Biotechnology*, 2(1): 1-4.
- Sajib, A. A., Bhuiya, M. S. I., & Huque, R. 2017. A Simple, Efficient and Rapid Method for Good Quality DNA Extraction From Rice Grains. *Rice Science*, 24(2): 119-122
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. 1977. Biochemistry DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors (DNA Polymerase/Nucleotide Sequences/Bacteriophage 4X174). *Proc.Nati.Acad.Sci.USA*, 74(12): 5463-5467.
- Saputra, R., Arwiyanto, T., & Wibowo, A. 2015. Uji Aktivitas Antagonistik Beberapa Isolat *Bacillus* spp. Terhadap Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada Beberapa Varietas Tomat dan Identifikasinya. *PROS SEM NAS MASYBIODIV INDON* 1(5): 1116-1122.
- Saputro, T. 2015. 'Pakan untuk Ternak Domba. *Ilmu Ternak.*'
Version: 30 Oktober 2016.
<http://www.ilmuternak.com/2015/03/pakan-untuk-ternak-domba.html>'.
- Sarian, Z. B. 2016. 'Corn Cobs Converted Into Nutritious Animal Feed'
Version: 30 Oktober 2016.
<http://www.zacsarian.com/category/agri-ideas>'.
- Satiou, N., & Nei, M., 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biological Evolution*, 4: 406-425.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen, W. Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as A Universal DNA

- Barcode Marker for Fungi. *Biodiversity (Mycology and Microbiology), Agriculture and Agri-Food*, Ottawa, Canada.
- Shendure, J., & Ji, H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10): 1135-1145.
- Seo, J., Jung, J. K., & Seo, S. 2015. Evaluation of Nutritional and Economic Feed Values of Spent Coffee Grounds and Artemisia Princeps Residues as a Ruminant Feed Using in Vitro Ruminal Fermentation. *PeerJ*, 3:E1343.
- Shajan, T. 2016. 'Uses of Water Hyacinth.' Version: 3 Desember 2016.
https://www.academia.edu/5263684/USES_OF_WATER_HYACINTH
- Shariff, A., Aziz, N. S. M., Ismail, N. I., & Abdullah, N. 2016. Corn Cob as a Potential Feedstock for Slow Pyrolysis of Biomass. *Journal of Physical Science*, 27(2): 123-137.
- Strasburg, J. M. 2015. 'Waste Water Treatment With Corn Cobs: A Google Science Fair Winner.' Version: 3 Desember 2016.
<http://sustainablog.org/2015/09/waste-water-treatment-with-corn-cobs-a-google-science-fair-winner/>
- Suparno G., Fitrihidajati, H., & Isnawati. 2015. Pemanfaatan Eceng Gondok (*Eichornia crassipes*) untuk Pakan Ternak Ruminansia sebagai Salah Satu Cara Mengatasi Gulma Perairan. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing*. Penelitian Hibah Bersaing. Universitas Negeri Surabaya. Surabaya. (Disimpan di LPPM Universitas Negeri Surabaya).
- Suwannasai, N., Marti, P., Phosri, C., Sihanonth, P., Whalley, A. J. S., & Spouge, J. L. Fungi in Thailand: A Case Study of the Efficacy of an ITS Barcode for Automatically Identifying Species within the Annulohyphoxylon and Hyphoxylon Genera. *PLOS ONE*.
- Tham, H. T. 2012. Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*)-Biomass Production, Ensilability and Feeding Value to Growing Cattle. *Disertasi*. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. Thailand.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acid Research*, 22(22): 4673-4680.

- Triastuti, Jovita dan Holia Onggo. 2003. Potensi dan Karakterisasi Eceng Gondok (*Eichhornia Crassipes*) sebagai Sumber Bahan Pakan Alternatif.
- Umsakul, K., Dissara, Y., & Srimuang, N. 2010. Chemical, Physical and Microbiological Changed during Composting of the Water Hyacinth. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(20): 985-992.
- Vora, G.J., Meador, C. E., Anderson, G. P., & Taitt, C. R. 2008. Comparison of Detection and Signal Amplification Methods for DNA Microarrays. [*Molecular and Cellular Probes*, 22\(5-6\): 294-300.](#)
- Wachirapakorn, C., Pilachai, K., Wanapat, M., Pakdee, P., & Cherdthong, A. 2016. Effect of Ground Corn Cobs as A Fiber Source in Total Mixed Ration on Feed Intake, Milk Yield and Milk Composition in Tropical Lactating Crossbred Holstein Cows. *Animal Nutrition*, 2: 334-338.
- Wanapat *et al.* 2002 Dalam Sirait J dan K. Simanihuruk. 2010. *Potensi dan Pemanfaatan Daun Ubikayu dan Ubi jalar sebagai Sumber Pakan Ternak Ruminansia Kecil*. Loka Penelitian Kambing Potong. Sumatera Utara.
- Wanapat, M., Pilajun, R., Kang, S., Setyaningsih, K. & Setyawan, A. R. 2012. Effect of Ground Corn Cob Replacement for Cassava Chip on Fermentation and Urinary Derivatives in Swamp Buffaloes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 25(8): 1124-1131.
- Wang, J., Liu, G., & Merkoci, A. 2003. Electrochemical Coding Technology for Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (11): 3214-3215.
- Widayati E dan Widalestari Y. 1996. *Limbah untuk Pakan Ternak*. Trubus Agrisarana. Surabaya.
- Yu, H., Zeng, G., Huang, H., Xi, X., Wang, R., Huang, D., Huang, G., & Li, J. 2007. Microbial Community Succession and Lignocellulose Degradation during Agricultural Waste Composting. *Biodegradation*, 18: 793-802.
- Yusuf, D. 2010. 'Pembuatan Silase Rumpun dan tebon Jagung.' Version: 5 April 2017. www.lembahgogoniti.com.
- Zielinska, S., Radkowski, L., Blendowska, A., Ludwig-Galezowska, A., Losi, J. M., & Losi, M. 2016. The Choice of the DNA Extraction Method May Influence the Outcome of the Soil

Microbial Community Structure Analysis. *Wiley
Microbiology Open*, e00453: 1-11.



Universitas Negeri Surabaya
UNIVERSITY PRESS

Anggota IKAPI & APPTI
Kampus Unesa Ketintang
Gedung C-15 Surabaya
Telp. 031-8288598; 8280009 ext. 109
Fax. 031-8288598
Email. unipress@unesa.ac.id
unipressunesa@yahoo.com

ISBN : 978-602-449-088-1



978-602-449-088-1