

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni – November 2019 di Laboratorium Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis aktivitas air dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis total mikroba dilaksanakan di Laboratorium Analisis Kesehatan Theresiana, Semarang.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan meliputi daun sirih segar dan bahan untuk membuat MnB yang meliputi *aquades*, molases, urea, bentonit, tepung cangkang kerang, garam, jerami padi yang difermentasi (bahan untuk fermentasi jerami padi meliputi EM4, dedak padi, molases dan air), larutan NaCl dan medium *nutrient agar* (NA).

Alat yang digunakan yaitu tong, blender, ember, timbangan analitik, nampan, *grinder* tipe *disk mill* dengan ukuran partikel *mesh* 80, kompor, panci, gelas ukur, alat pencampur, cetakan berupa pipa paralon berdiameter 8 cm dengan ketebalan 4 cm, plastik pembungkus, *water activity meter*, wadah sampel, cawan petri, tabung reaksi, pipet ukur 1 ml dan 10 ml, inkubator dan pembakar bunsen.

3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan meliputi rancangan penelitian, prosedur penelitian dan parameter yang diamati.

3.2.1. Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 3 x 2. Masing-masing perlakuan dengan 4 ulangan. Faktor pertama adalah aras jus daun sirih (S) (0%, 3% dan 6%) dan faktor kedua adalah lama penyimpanan (T) (20 hari dan 40 hari). Perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut :

S₀T₁ : Multinutrien blok + jus daun sirih 0% + disimpan 20 hari

S₀T₂ : Multinutrien blok + jus daun sirih 0% + disimpan 40 hari

S₁T₁ : Multinutrien blok + jus daun sirih 3% + disimpan 20 hari

S₁T₂ : Multinutrien blok + jus daun sirih 3% + disimpan 40 hari

S₂T₁ : Multinutrien blok + jus daun sirih 6% + disimpan 20 hari

S₂T₂ : Multinutrien blok + jus daun sirih 6% + disimpan 40 hari

Parameter yang diamati adalah aktivitas air, total kapang dan total bakteri.

3.2.2. Prosedur penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap, meliputi tahap persiapan, tahap pembuatan MnB, tahap perlakuan dan tahap analisis. Tahap persiapan diawali dengan jerami padi difermentasi selama 14 hari secara *anaerob*. Bahan yang digunakan untuk fermentasi meliputi EM4, dedak padi, molases dan air. Seratus ml

EM4, 2,5 kg dedak padi, 500 gram molases disiapkan dan dicampurkan sampai homogen. Campuran tersebut diberi penambahan air sebanyak 10 liter dan disiramkan pada 25 kg jerami padi hingga seluruh jerami padi basah merata. Proses fermentasi dilakukan di tong yang ditutup rapat sampai tidak ada udara yang masuk dan disimpan selama 14 hari. Jerami padi yang sudah difermentasi kemudian diangin-anginkan sampai kering dan digiling menggunakan *grinder* tipe *disk mill* dengan ukuran partikel *mesh* 80. Alat dan bahan untuk membuat MnB disiapkan dan ditimbang sesuai dengan komposisi per bahan pakan (Tabel 2).

Tabel 2. Komposisi Bahan Pakan Pembuatan Multinutrien Blok

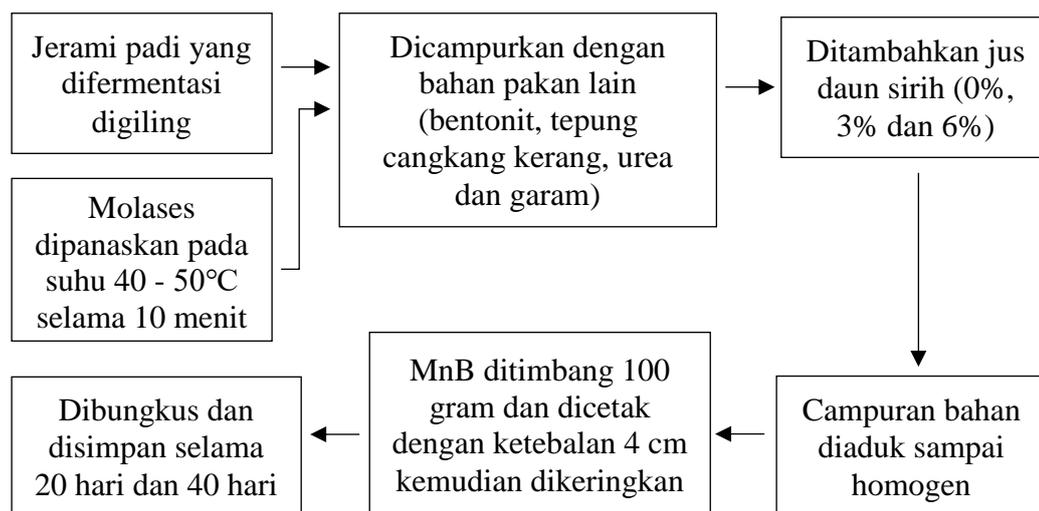
No.	Bahan Pakan	Komposisi
		-----%-----
1.	Molases	50
2.	Jerami padi yang difermentasi	30
3.	Bentonit	7
4.	Tepung cangkang kerang	6
5.	Urea	4
6.	Garam	3
Jumlah		100

Sumber : Pujaningsih *et al.* (2018).

Tahap pembuatan MnB diawali dengan memanaskan molases selama kurang lebih 10 menit pada suhu rendah (40 – 50°C). Bentonit diaktivasi dengan dicampurkan bersama molases yang sudah dipanaskan. Campuran molases dan bentonit dicampurkan dengan bahan pakan lain meliputi jerami padi yang difermentasi yang sudah digiling, tepung cangkang kerang, urea dan garam sampai homogen. Tahap perlakuan diawali dengan penghalusan daun sirih segar dengan tambahan 50 ml *aquades* pada masing – masing aras (0, 3 dan 6%) sampai menjadi jus. Jus daun sirih kemudian dicampurkan bersama dengan bahan lain sampai

homogen. Campuran MnB yang sudah homogen kemudian ditimbang 100 gram dan dicetak menggunakan pipa paralon yang berdiameter 8 cm dengan ketebalan 4 cm. Multinutrien blok dikeringkan selama 3 – 4 hari di ruang terbuka yang diberi naungan kemudian dikemas dengan plastik pembungkus dan disimpan selama 20 hari dan 40 hari. Tahap analisis dilakukan pada hari ke-20 dan hari ke-40 dengan mengamati aktivitas air, total kapang dan total bakteri pada MnB.

Prosedur pembuatan MnB dengan perlakuan aras daun sirih dan lama penyimpanan berbeda dapat dilihat pada diagram alur pada Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Alur Pembuatan Multinutrien Blok yang Ditambahkan Jus Daun Sirih yang Disimpan selama 20 dan 40 Hari.

3.2.3. Parameter yang diamati

Parameter yang diamati yaitu aktivitas air, total kapang dan total bakteri. Tahap analisis dilakukan pada hari ke 20 dan 40 atau setelah MnB disimpan selama 20 dan 40 hari. Analisis yang dilakukan meliputi aktivitas air, total kapang dan total

bakteri. Perhitungan total kapang dan total bakteri menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC).

Analisis aktivitas air dilakukan dengan wadah sampel disiapkan dan diberi tanda kode sampel. Sampel dimasukkan pada wadah sesuai dengan kode sampel. Sampel pada wadah dimasukkan pada *water activity meter* (*aw meter*) dengan pengunci berwarna hitam ditekan dan penutup dibuka. Wadah ditutup dengan penutup *aw meter* kemudian dianalisis dengan menekan tombol *start* dan ditunggu sampai konstan. Aktivitas air yang sudah konstan ditandai dengan adanya bunyi pada *aw meter*. Tombol *stop* yang terdapat pada *aw meter* ditekan untuk menghentikan analisis kemudian hasil aktivitas air dicatat. Pengujian aktivitas air dilakukan duplo pada masing-masing sampel.

Analisis total kapang yang dilakukan yaitu 4 buah tabung reaksi disiapkan dan diberi tanda masing-masing 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} . Tabung reaksi masing-masing diisi NaCl 0,85% 9 ml. Sampel dimasukkan pada masing-masing tabung kemudian digojok sampai homogen. Cawan petri yang sudah steril disiapkan 5 buah dan diberi tanda masing-masing 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} dan blanko. Cawan petri untuk blanko ditambah 1 ml NaCl 0,85%. Masing-masing pengenceran tersebut diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri sesuai dengan tanda masing-masing. *Nutrient agar* cair dituangkan pada masing-masing cawan petri sebanyak ± 20 ml kemudian gojok pada alas datar sampai homogen. *Nutrient agar* yang sudah membeku kemudian diinkubasi pada suhu ruang (37°C) selama 3 – 4 hari. Jumlah koloni dapat dihitung dengan rumus (Jumlah koloni/ml = Jumlah koloni yang ditanam x volume yang ditanam x pengenceran).

Analisis total bakteri yang dilakukan yaitu 4 buah tabung reaksi disiapkan dan diberi tanda masing-masing 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} . Tabung reaksi masing-masing diisi NaCl 0,85% 9 ml. Sampel dimasukkan pada masing-masing tabung kemudian digojok sampai homogen. Cawan petri yang sudah steril disiapkan 5 buah dan diberi tanda masing-masing 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} dan blanko. Cawan petri untuk blanko ditambah 1 ml NaCl 0,85%. Masing-masing pengenceran tersebut diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri sesuai dengan tanda masing-masing. *Nutrient agar* cair dituangkan pada masing-masing cawan petri sebanyak ± 20 ml kemudian gojok pada alas datar sampai homogen. *Nutrient agar* yang sudah membeku kemudian diinkubasi pada suhu ruang (37°C) selama 24 jam. Jumlah koloni dapat dihitung dengan rumus (Jumlah koloni/ml = Jumlah koloni yang ditanam x volume yang ditanam x pengenceran).

3.3. Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan analisis ragam atau *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf signifikansi 5% (Steel dan Torie, 1991) dengan model linier untuk percobaan RAL faktorial adalah sebagai berikut:

$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$, dengan:

$i = 1,2,3$

$j = 1,2$

$k = 1,2,3,4$

Keterangan:

Y_{ijk} : Hasil pengamatan pengaruh perlakuan penambahan daun sirih ke-j dan lama penyimpanan ke-k dalam ulangan ke-i.

- μ : Nilai tengah umum (rata-rata populasi).
- α_i : Pengaruh penambahan daun sirih ke-i.
- β_j : Pengaruh lama penyimpanan ke-j.
- $(\alpha\beta)_{ij}$: Pengaruh kombinasi penambahan daun sirih ke-i dan lama penyimpanan ke-j.
- ϵ_{ijk} : Pengaruh galat percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij.

Hipotesis statistik RAL faktorial yang digunakan sebagai berikut:

- a. H_0 : $(\alpha\beta)_{ij} = 0$; tidak ada pengaruh interaksi antara penambahan daun sirih dengan lama penyimpanan terhadap aktivitas air, total kapang dan total bakteri MnB.
- H_1 : minimal ada satu $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$; ada pengaruh interaksi antara penambahan daun sirih dengan lama penyimpanan terhadap aktivitas air, total kapang dan total bakteri MnB.
- b. H_0 : $\alpha_i = 0$; tidak ada pengaruh penambahan daun sirih terhadap aktivitas air, total kapang dan total bakteri MnB.
- H_1 : minimal ada satu $\alpha_i \neq 0$; minimal ada satu pengaruh penambahan daun sirih terhadap aktivitas air, total kapang dan total bakteri MnB.
- c. H_0 : $\beta_j = 0$; tidak ada pengaruh lama penyimpanan terhadap aktivitas air, total kapang dan total bakteri MnB.
- H_1 : minimal ada satu $\beta_j \neq 0$, minimal ada satu pengaruh lama penyimpanan terhadap aktivitas air, total kapang dan total bakteri MnB.

Kriteria pengujian yang digunakan adalah :

1. Jika $F_{hitung} < F_{tabel}$, maka H_0 diterima dan H_1 ditolak.
2. Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$, maka H_0 ditolak dan H_1 diterima, kemudian dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD) untuk mengetahui adanya perbedaan nilai tengah antar perlakuan (Steel dan Torie, 1991).