

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Materi

Pelaksanaan penelitian ini meliputi penanaman kedelai di *Green house* Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro pada 8 Mei - 24 Juli 2015 dan penelitian laboratorium yang dilaksanakan pada bulan September - Januari 2016 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan serta Laboratorium Ekologi dan Produksi Tanaman Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu benih kedelai yang sudah dipilih yang terbaik, 32 polybag ukuran 40 x 20 cm, tanah 12 kg per polybag, air laut, air tawar, inokulan bakteri *Rhizobium* dan pupuk (N, P dan K). Alat yang digunakan adalah cangkul, gunting, termohigrometer, selang, pita ukur, *Electrical Conductivity* (EC) meter, 7 ember ukuran 20 liter, gelas ukur dan gelas plastic.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 4 x 2 dengan 4 ulangan (Sudjana, 1994).

Faktor pertama adalah level pengenceran air laut meliputi :

L0= Tanpa air laut

L1= Air laut EC 1 mmhos/cm dan mulsa eceng gondok 8 ton/ha

L2= Air laut EC 2 mmhos/cm dan mulsa eceng gondok 8 ton/ha

L3= Air laut EC 3 mmhos/cm dan mulsa eceng gondok 8 ton/ha

Faktor kedua adalah inokulasi Bakteri *Rhizobium*

R1= Tanpa bakteri *Rhizobium*

R2= Dengan bakteri *Rhizobium*

3.2. Metode

Hasil pengacakan perlakuan pada masing-masing tanaman kedelai dapat dilihat pada Ilustrasi 2.

L0R1U1	L2R2U3	L3R1U4	L1R1U4
L1R2U2	L3R1U3	L0R1U2	L0R2U3
L1R1U1	L2R2U1	L2R1U1	L1R2U4
L2R2U4	L2R1U4	L0R2U4	L0R1U3
L0R2U1	L1R1U2	L1R2U1	L3R1U1
L2R1U2	L3R2U1	L3R2U2	L1R2U3
L3R2U4	L2R1U3	L3R2U3	L0R1U4
L3R1U2	L0R2U2	L1R1U3	L2R2U2

U
↑

Ilustrasi 2. Tata Letak Pot Penelitian

Keterangan :

- L0R1 : perlakuan tanpa penyiraman air laut dan tanpa inokulasi bakteri *Rhizobium*
- L0R2 : perlakuan tanpa penyiraman air laut dan dengan inokulasi bakteri *Rhizobium*
- L1R1 : perlakuan dengan penyiraman air laut 1 mmhos/cm, pemberian mulsa eceng gondok 8 ton/ha dan tanpa inokulasi bakteri *Rhizobium*
- L1R2 : perlakuan dengan penyiraman air laut 1 mmhos/cm, pemberian mulsa eceng gondok 8 ton/ha dan dengan inokulasi bakteri *Rhizobium*
- L2R1 : perlakuan dengan penyiraman air laut 2 mmhos/cm, pemberian mulsa eceng gondok 8 ton/ha dan tanpa inokulasi bakteri *Rhizobium*
- L2R2 : perlakuan dengan penyiraman air laut 2 mmhos/cm, pemberian mulsa eceng gondok 8 ton/ha dan dengan inokulasi bakteri *Rhizobium*
- L3R1 : perlakuan dengan penyiraman air laut 3 mmhos/cm, pemberian mulsa eceng gondok 8 ton/ha dan tanpa inokulasi bakteri *Rhizobium*
- L3R2 : perlakuan dengan penyiraman air laut 3 mmhos/cm, pemberian mulsa eceng gondok 8 ton/ha dan dengan inokulasi bakteri *Rhizobium*

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap, meliputi tahap persiapan, tahap perlakuan dan tahap analisis laboratorium. Tahap persiapan yang dilakukan antara lain mempersiapkan inokulan bakteri *Rhizobium*, pemilihan benih kedelai, pengisian polybag dengan 12 kg tanah, sterilisasi tanah dengan cara pengukusan 9 polybag yang sudah berisi tanah dalam drum selama 5 jam pada api yang terus menyala, pembelian dan penimbangan pupuk (Urea, TSP dan KCl), pengisian polybag dengan 12 kg tanah, menimbang pupuk dengan dosis 100 kg N/ha, 150 kg P₂O₅/ha, dan 100 kg K₂O/ha (Lampiran 7), dan mengukur level air laut dengan air tawar dengan L0= tanpa air laut (air tawar), L1= air tawar ditambah air laut diukur dengan alat EC meter 1 mmhos/cm, L2= air tawar ditambah air laut sampai EC 2 mmhos/cm, L3= air tawar ditambah air laut sampai EC 3 mmhos/cm. Perbandingan antara air laut : air tawar pada masing-masing perlakuan L1, L2 dan L3 adalah 1 : 1000 ml; 1 : 420 ml dan 1 : 230 ml (Lampiran 6). pembuatan mulsa eceng gondok dengan mengambil eceng gondok dari daerah Rawapening Ambarawa Semarang, kemudian memotong-motong eceng gondok dengan panjang 2 – 3 cm, dikeringkan dengan cara di jemur selama 3 – 4 hari sampai kering, kemudian menimbang dengan dosis 8 ton/ha sesuai luas polybag (Lampiran 7). Pembuatan inokulum *Rhizobium* dengan pengenceran, perbanyak juga peremajaan. Inokulum yang digunakan adalah dari medium agar miring dengan inokulan dari bintil kedelai yang sudah diremajakan dan dibiakkan.

Tahap perlakuan dilakukan kegiatan pemberian inokulum *Rhizobium* pada benih yang di tanam sesuai perlakuan, dengan jumlah bakteri yang diinokulasikan sebanyak $4,7 \times 10^{10}$ sel/ml (Lampiran 8). Penanaman kedelai dilakukan dengan 10

benih per polybag dan disisakan 4 tanaman/polybag pada minggu ke dua. Pemberian pupuk 1/3 dosis urea, TSP dan KCl pada awal tanam, 1/3 dosis urea ke dua diberikan pada minggu ke-5 dan 1/3 dosis urea ke tiga di berikan pada minggu ke-7. Penyiraman setiap hari dengan air tawar dan dengan air laut yang telah diencerkan dengan EC 1, 2 dan 3 mmhos/cm sesuai perlakuan. Penyiraman dilakukan 2x sehari. Setelah 10 minggu penanaman, dilakukan panen jerami kedelai dengan memotong-motong dan di jemur selama 2 - 3 hari, setelah kering jerami di giling sampai halus kemudian dianalisis kadar protein kasar (PK), produksi bahan kering, produksi amonia (NH₃) dan produksi *Volatile Fatty Acid* (VFA).

Tahap analisis laboratorium dilakukan dengan pengamatan parameter yang diamati yang meliputi produksi protein kasar (PK), produksi amonia (NH₃) dan produksi *Volatile Fatty Acid* (VFA). Protein kasar jerami tanaman kedelai diukur dengan metode *Kjeldahl* yaitu melakukan destruksi, destilasi dan titrasi. Hasil titrasi kemudian dimasukkan dalam persamaan berikut :

$$\text{Kadar PK} : \frac{(\text{Hasil titrasi-blanko}) \times N \text{ HCl} \times 0,014 \times 6,25}{\text{Sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

Blanko =	Campuran 50 ml aquadest dan 40 ml NaOH 45%
0,014	= 1 ml alkali equivalen dengan 1 ml larutan N yang mengandung 0,014 g N
6,25	= Protein mengandung 16 % N
N HCl	= Normalitas larutan HCl

Sedangkan, produksi protein kasar dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Produksi protein kasar} = \text{Kadar PK} \times \text{Produksi bahan kering}$$

Metode penelitian NH_3 dan VFA dimulai dengan pengambilan cairan rumen dan air panas di Rumah Potong Hewan (RPH) Penggaron, menimbang sampel sebesar 0,55 - 0,56 g, menyiapkan *waterbath* yang telah diisi air secukupnya dan mengatur pada suhu 39°C , memasukkan larutan Mc Dugall 40 ml, 10 ml cairan rumen dan sampel ke dalam masing-masing tabung fermentor, kemudian mengaliri tabung dengan gas CO_2 ditutup hingga keadaan anaerob, meletakkan tabung fermentor pada *waterbath*. Menggojog secara homogen masing-masing tabung fermentor dan melakukan inkubasi selama 3 jam. Setelah 3 jam lalu menghentikan proses fermentasi dengan memasukkan pada *refrigerator* selama 15 menit. Melakukan *centrifuge* selama 15 menit, kemudian memisahkan dan mengambil bagian cairan (supernatan).

Produksi amonia diukur dengan metode mikrodifusi conway. Langkah pertama yang harus dilakukan dengan menyiapkan cawan conway yang telah dimasukkan di oven, mengolesi bagian tepinya dengan vaselin, mengambil dan memasukkan 1 ml asam borat pada bagian tengah cawan dan meneteskan dengan indikator *metyl red* dan *brom cressol* hijau, memasukkan 1 ml cairan supernatan pada bagian kiri dan natrium karbonat pada sebelah kanan. Menutup rapat cawan conway, menggoyang-goyang secara perlahan hingga supernatan dan natrium karbonat bercampur. Mendinginkan sampel dan cawan conway selama 24 jam agar amonia yang dihasilkan dapat diikat oleh asam borat, kemudian melakukan titrasi pada sampel dengan cairan asam sulfat 0,0055N hingga terjadi perubahan warna menjadi merah muda, lalu menghitung produksi NH_3 yang dihasilkan.

Rumus Perhitungan NH₃

$$\text{Produksi NH}_3 = (\text{ml titran} \times \text{N H}_2\text{SO}_4 \times 1000)$$

Keterangan :

$$\begin{aligned} \text{N-NH}_3 &= \text{Produksi N-NH}_3 \text{ yang diperoleh} \\ \text{N H}_2\text{SO}_4 &= \text{Normalitas larutan H}_2\text{SO}_4 \end{aligned}$$

Produksi VFA di ukur dengan teknik penyulingan uap. Langkah pertama yang dilakukan dengan mengambil dan memasukkan 5 ml cairan supernatan dan 1 ml H₂SO₄ 15% pada tabung suling khusus, menambahkan 5 ml larutan NaOH 0,5N pada labu penangkap dan 700 ml aquades pada labu destilasi, menyalakan api, menunggu hingga volume labu penangkap 100 ml, kemudian mematikan api pemanas, menambahkan 2 tetes *phenolptalein* 1% dan menggojognya, lalu melakukan titrasi dengan larutan HCl 0,5% hingga berwarna bening.

Rumus perhitungan produksi VFA

$$\text{Produksi VFA} = (\text{Titran blanko} - \text{Titran sampel}) \times \text{N HCl} \times 1000/5$$

Model Linear Aditif yang digunakan (Sudjana, 1994) :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}; \quad \begin{aligned} i &= (1,2,3) & j &= (1,2,3,4) \\ & & k &= (1,2,3,4) \end{aligned}$$

Keterangan :

$$\begin{aligned} Y_{ijk} &= \text{Produksi protein kasar dan fermentabilitas pada petak percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij (taraf ke-i dari pemberian air laut dan taraf ke-j dari pemberian bakteri } \textit{Rhizobium}) \\ \mu &= \text{Nilai tengah umum (rata-rata populasi) produksi protein kasar dan fermentabilitas} \\ \alpha_i &= \text{Pengaruh aditif dari pemberian air laut ke-i} \\ \beta_j &= \text{Pengaruh aditif dari pemberian bakteri } \textit{Rhizobium} \text{ ke-j} \\ (\alpha\beta)_{ij} &= \text{Pengaruh interaksi antara air laut ke-i dan pemberian bakteri } \textit{Rhizobium} \text{ ke-j} \end{aligned}$$

ϵ_{ijk} = Pengaruh galat percobaan pada petak percobaan ke-k yang memperoleh perlakuan ke ij

Hipotesis Statistik

- a. H0 : $(\alpha\beta)_{ij} = 0$ (yang berarti tidak ada pengaruh interaksi antara air laut dengan bakteri *Rhizobium* terhadap produksi protein kasar dan fermentabilitas)

H1 : minimal ada satu $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$, ada pengaruh interaksi antara air laut dengan bakteri *Rhizobium* terhadap produksi protein kasar dan fermentabilitas
- b. H0 : $\alpha_i = 0$ (yang berarti tidak ada pengaruh air laut terhadap produksi protein kasar dan fermentabilitas)

H1 : minimal ada satu $\alpha_i \neq 0$, minimal ada satu pengaruh pemberian air laut kadar protein kasar dan fermentabilitas
- c. H0 : $\beta_j = 0$ (yang berarti tidak ada pengaruh pemberian bakteri *Rhizobium* terhadap produksi protein kasar dan fermentabilitas)

H1 : minimal ada satu $\beta_j \neq 0$, minimal ada satu pengaruh pemberian bakteri *Rhizobium* terhadap produksi protein kasar dan fermentabilitas