

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Agustus 2016 di Laboratorium Teknologi Pakan serta Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit polong kacang hijau sebagai sampel yang diperoleh dari Kabupaten Grobogan, urea sebagai sumber amonia, air sebagai pelarut, plastik dan lakban sebagai perekat. Materi untuk analisis pencernaan bahan kering dan bahan organik yaitu cairan rumen dari RPH Penggaron, larutan McDougal (9,8 g NaHCO_3 ; 9,3 g $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,47 g NaCl ; 0,57 g KCl ; 0,09 g $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,05 g CaCl_2 ; Aquades 1000 ml), pepsin HCl , dan kertas saring. Peralatan yang digunakan pada pembuatan amoniasi meliputi gunting sebagai alat pemotong, botol kaca sebagai tempat sampel, gelas ukur mengukur volume air, alat pengaduk sebagai pengaduk, alat penyemprot untuk menyemprot larutan, timbangan untuk menimbang, nampan untuk penjemuran, inkubator tempat pemeraman, kertas label untuk menandai sampel. Proses analisis pencernaan bahan kering dan bahan organik yaitu timbangan analitis kapasitas 125 g dengan ketelitian 0,0001 g, tabung fermentor dengan tutupnya, *waterbath*, oven, cawan porselin, eksikator, gelas ukur, gelas beker,

tabung penghisap, *centrifuge*, tanur, termos, saringan dan alat tulis untuk mencatat hasil data.

3.2. Metode Penelitian

Penelitian dibagi menjadi beberapa tahapan, yaitu persiapan, proses amoniasi dan analisis sampel di laboratorium. Tahap persiapan yaitu pengadaan alat dan bahan meliputi pengadaan kulit polong kacang hijau, penyediaan urea sebagai sumber amonia, botol kaca, inkubator untuk tempat amoniasi, nampan untuk mengangin-anginkan, air sebagai pelarut dan alat untuk analisis sampel. Tahap proses amoniasi dilakukan terhadap kulit polong kacang hijau dengan kadar air 50%. Perlakuan menggunakan aras amonia yang berbeda (0, 2, 4 dan 6%) terhadap BK dengan lama peram berbeda (0, 1, 2 dan 3 hari) pada temperatur tinggi 60°C. Sumber amonia diperoleh dari urea yang dilarutkan dalam air sesuai perhitungan. Larutan urea dicampur dengan kulit polong kacang hijau dan diaduk hingga homogen. Sampel dimasukkan ke dalam botol kaca ditutup dengan plastik dan *aluminium foil* dalam kondisi kedap udara serta diperam dalam inkubator dengan temperatur 60°C.

Hasil amoniasi pada sampel kemudian dibuka dan dianalisis kadar air dan bahan keringnya, kemudian diangin-anginkan selama 1 - 2 hari hingga kering pada sinar matahari. Sampel yang sudah kering kemudian digiling atau dihaluskan untuk kemudian dilakukan pengujian sampel di laboratorium untuk mengetahui kandungan pencernaan bahan kering dan bahan organik.

3.3. Rancangan Percobaan

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 4 x 4 dengan 3 ulangan pada masing-masing perlakuan aras amonia dan lama peram (Toutenburg dan Shalab, 2009). Faktor pertama (R) adalah aras amonia (0, 2, 4 dan 6%) dan faktor kedua (T) adalah lama peram (0, 1, 2 dan 3 hari).

Kombinasi perlakuan fermentasi yang dicobakan sebagai berikut :

R₀T₀ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 0 % + lama peram 0 hari

R₀T₁ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 0 % + lama peram 1 hari

R₀T₂ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 0 % + lama peram 2 hari

R₀T₃ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 0 % + lama peram 3 hari

R₁T₀ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 2 % + lama peram 0 hari

R₁T₁ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 2 % + lama peram 1 hari

R₁T₂ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 2 % + lama peram 2 hari

R₁T₃ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 2 % + lama peram 3 hari

R₂T₀ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 4 % + lama peram 0 hari

R₂T₁ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 4 % + lama peram 1 hari

R₂T₂ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 4 % + lama peram 2 hari

R₂T₃ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 4 % + lama peram 3 hari

R₃T₀ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 6 % + lama peram 2 hari

R₃T₁ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 6 % + lama peram 3 hari

R₃T₂ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 6 % + lama peram 2 hari

R₃T₃ = Kulit polong kacang hijau + aras amonia 6 % + lama peram 3 hari

3.4. Analisis Kecernaan Bahan Kering dan Bahan Organik

Hasil amoniasi diangin-anginkan selama 1 - 2 hari untuk menghilangkan bau amonia, digiling untuk memperoleh sampel yang akan dianalisis dan diuji pencernaan bahan kering dan bahan organik secara *in vitro* menggunakan metode Tilley dan Terry (1963), alat yang digunakan dibersihkan, dikeringkan dan dioven pada temperatur 100 - 105⁰C selama 1 jam. Bahan disiapkan yaitu larutan penyangga McDougall dengan komposisi setiap liter terdiri dari 9,8 g NaHCO₃; 9,3 g NaHPO₄.H₂O; 0,47 g NaCl; 0,57 g KCl; 0,09 g MgCl₂.H₂O; 0,05 g CaCl₂; Aquades 1000 ml. Sampel ditimbang dengan berat 0,55-0,56 gram. Cairan rumen sapi diambil dari RPH Penggaron yang ditampung dalam termos yang sebelumnya sudah disaring menggunakan kain saring hingga penuh agar kondisi menjadi anaerob.

Analisis pencernaan bahan kering dan bahan organik terdiri dari 2 tahapan yaitu fermentasi mikrobial dan pencernaan proteolitik. Proses fermentasi mikrobial menggunakan sampel sebanyak 0,55 - 0,56 g dimasukkan ke dalam tabung fermentor ditambah dengan larutan penyangga McDougall 40 ml dan cairan rumen 10 ml dengan kondisi temperatur 39⁰C, setelah itu tabung diberi aliran CO₂. Tabung fermentor diletakkan ke dalam rak penangas air yang bertemperatur 39⁰C dan difermentasi selama 48 jam. Setiap 6 jam sekali dilakukan penggojogan pada tabung fermentor, kemudian proses fermentasi dihentikan dengan disimpan pada air es dan dilakukan *centrifuge* selama 10 - 15 menit pada 3.000 rpm. Proses pencernaan proteolitik dilakukan setelah memisahkan antara sampel berupa residu dengan supernatan. Sampel berupa residu dimasukkan ke dalam tabung fermentor ditambahkan 50 ml larutan pepsin HCl, kemudian dimasukkan kedalam penangas

air dan diinkubasi selama 48 jam. Penggojogan dilakukan setiap 6 jam sekali pada tabung fermentor. Proses penyaringan dilakukan setelah proses proteolitik selesai dengan menggunakan tabung penghisap dan kertas saring tanpa bahan mineral, kemudian dialirkan aquades panas pada sampel kemudian sampel yang tersaring dioven pada temperatur 110⁰C selama 24 jam, setelah itu dihitung bahan kering untuk menghitung kadar bahan kering. Sampel yang sudah dioven selama 24 jam, dimasukan ke dalam tanur selama 6 jam pada temperatur 600⁰C, setelah itu dihitung kadar abu untuk menghitung bahan organik. Rumus KcBK dan KcBO :

$$\text{Rumus KcBK} = \frac{\text{BK sampel} - (\text{BK residu} - \text{BK blangko})}{\text{BK sampel}} \times 100\%$$

$$\text{Rumus KcBO} = \frac{\text{BO sampel} - (\text{BO residu} - \text{BO blangko})}{\text{BO sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

Blangko	: McDougall + cairan rumen (ml)
Sampel	: bahan pakan yang telah diamoniasi (gram)
Residu	: campuran blangko dan sampel (gram)
KcBK	: kecernaan bahan kering (%)
KcBO	: kecernaan bahan organik (%)
BK/BO	: bahan kering/bahan organik (gram)

3.5. Analisis Data

Data yang diperoleh diuji dengan analisis ragam pada taraf uji 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter. Jika terdapat pengaruh pada perlakuan, maka untuk mengetahui perbedaan nilai tengah antar perlakuan dilakukan uji Duncan (Steel and Torrie, 1991). Model linier yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

$$i = (0, 2, 4, 6) \quad j = (0, 1, 2, 3) \quad \text{dan} \quad k = (1, 2, 3)$$

Keterangan :

- Y_{ij} : Nilai hasil pengamatan akibat pengaruh perlakuan aras amonia ke- i
($i = 0, 2, 4, 6$ %), lama peram ke-j ($j = 0, 1, 2, 3$ hari) dan ulangan ke-k
($k = 1, 2, 3$)
- μ : Nilai tngan umum (rata-rata) pengamatan perlakuan
- α_i : Pengaruh aras amonia ke-i
- β_j : Pengaruh lama peram ke-j
- $(\alpha\beta)_{ij}$: Pengaruh interaksi perlakuan aras amonia ke-i dan lama peram ke-j
- ε_{ij} : Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ke-j dan ulangan ke-k

3.6. Hipotesis Statistik

Hipotesis statistik yang digunakan adalah :

$H_0 : (\alpha\beta)_{ij} = 0$: Tidak terdapat interaksi antara perlakuan aras amonia dan lama peram terhadap KcBK dan KcBO kulit polong kacang hijau.

$H_1 : (\alpha\beta)_{ij} \neq 0$: Terdapat interaksi antara perlakuan aras amonia dan lama peram terhadap KcBK dan KcBO kulit polong kacang hijau.

Kriteria pengujian yaitu :

F hitung $<$ F tabel maka H_0 diterima

F hitung \geq F tabel maka H_1 diterima