

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian tentang efek pemanasan pada molases yang ditambahkan urea terhadap ketersediaan NH_3 , *volatile fatty acids* dan protein total secara *in vitro* dilaksanakan pada tanggal 28 Maret - 4 Mei 2016 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.3. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah urea yang dihaluskan dan molases. Bahan analisis yang digunakan adalah cairan rumen sapi yang berasal dari RPH Ungaran, H_2SO_4 0,0055 N, H_2SO_4 15%, H_2SO_4 0,3 N, NaOH 0,5 N, 33%, Na_2CO_3 jenuh, vaselin, selenium, filtrat enzim, larutan TCA 20% dan SSA 2%, NaOH katalisator selenium dan CuSO_4 , indikator *phenophtalein* (PP), indikator campuran *Methyl Red* (MR) dan *Methyl Blue* (MB), NaOH 0,5%, aquades, asam borat 4%, HCl 0,5 N, larutan McDougall, campuran indikator MR dan Bromkresol hijau. Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tabung reaksi, termometer, penangas air, *stirrer*, timbangan analitik, eksikator, *crucible porcelain*, *beaker glass*, buret, corong, pendingin tegak, *waterbath*, labu destruksi (labu Kjeldahl), labu erlenmeyer, gelas ukur 25 ml dan 50 ml, seperangkatalat destilasi, tabung fermentor, *centrifuge*, cawan Conway, pipet ukur 1 ml, tanur, oven, *incubator* dan mikroburet.

3.2. Metode

Penelitian dilaksanakan dalam 2 tahap, tahap pertama yaitu pembuatan urea lepas lambat serta tahap kedua yaitu analisis NH_3 , VFA dan protein mikroba rumen.

3.2.1. Pembuatan urea lepas lambat

Tahap pertama yaitu pembuatan urea lepas lambat dilakukan dengan cara 2 beaker gelas disiapkan dan masing-masing diisi dengan 50 g molases. Urea ditimbang sebanyak 0,5 g sebanyak 2 kali. *Beaker glass* berisi molases pertama ditambahkan dengan urea sebanyak 0,5 g, lalu diaduk hingga homogen. Beaker gelas berisi molases lainnya dipanaskan pada suhu 110°C sampai mendidih, kemudian ditambahkan dengan urea sebanyak 0,5 g, lalu diaduk hingga homogen dan ditunggu selama 15 menit. Campuran molases urea yang dipanaskan tersebut kemudian didinginkan lalu digunakan sebagai sampel untuk analisis selanjutnya.

3.2.2. Produksi amonia (NH_3) rumen

Tahap awal dari analisis ini adalah dengan membuat supernatan. Sebanyak 0,55 - 0,56 g sampel dimasukkan ke dalam tabung fermentor dan ditambahkan larutan penyangga McDougall (saliva buatan) 40 ml kemudian diinkubasi di *waterbath* pada suhu 39°C dan pH 6,5 - 6,9. Cairan rumen sebanyak 10 ml ditambahkan kedalamnya kemudian diberi gas CO_2 agar tercipta suasana seperti di dalam rumen. Tabung fermentor diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 39°C selama 1, 3 dan 5 jam. Setelah diinkubasi tabung fermentor direndam dalam air es

untuk menghentikan fermentasi. Sampel yang ada di tabung fermentor dipindahkan pada tabung lain kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan disimpan ke dalam botol plastik. Pengukuran kadar amonia (NH_3) dilakukan dengan metode mikrodifusi Conway (General Laboratory Procedures, 1966).

Cawan Conway dan tutupnya diolesi vaselin pada bagian tepinya. Asam borat sebanyak 1 ml diambil dengan pipet, kemudian dimasukkan ke bagian tengah cawan Conway dan ditetesi dengan indikator MR dan Bromkresol hijau. Larutan supernatan sebanyak 1 ml dimasukan ke dalam salah satu sisi cawan Conway dan 1 ml larutan sodium karbonat jenuh dimasukkan ke dalam sisi lainnya. Cawan Conway ditutup dan digoyang-goyangkan secara perlahan agar supernatan dan sodium karbonat jenuh tercampur. Selanjutnya, didiamkan selama 24 jam pada suhu ruangan agar semua amonia dapat ditangkap oleh asam borat. Setelah 24 jam, dilakukan titrasi dengan menggunakan asam sulfat 0,0055 N hingga terjadi perubahan warna dari ungu menjadi merah muda (warna asam borat), kemudian titrasi dihentikan.

Kadar NH_3 total dihitung dengan rumus :

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

3.2.3. Produksi *volatile fatty acids* (VFA) rumen

Tahap awal dari analisis ini adalah dengan membuat supernatan. Sebanyak 0,55 - 0,56 g sampel dimasukkan kedalam tabung fermentor dan ditambahkan larutan penyangga McDougall (saliva buatan) 40 ml kemudian diinkubasi di

waterbath pada suhu 39°C dan pH 6,5 - 6,9. Cairan rumen sebanyak 10 ml ditambahkan ke dalamnya kemudian diberi gas CO₂ agar tercipta suasana seperti di dalam rumen. Tabung fermentor diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 39°C selama 1, 3 dan 5 jam. Setelah diinkubasi tabung fermentor direndam dalam air es untuk menghentikan fermentasi. Sampel yang ada di tabung fermentor dipindahkan pada tabung lain kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan disimpan kedalam botol plastik. Pengukuran kadar *volatile fatty acids* (VFA) dilakukan dengan teknik destilasi uap (*steam distillation*) (AOAC, 1995).

Tabung suling khusus analisis VFA disiapkan, kemudian diisi dengan 5 ml supernatan (berasal dari tabung yang sama dengan supernatan untuk analisa NH₃) dan 1 ml H₂SO₄ 15%. Tabung suling tersebut dimasukkan ke dalam labu destilasi yang telah berisi air sebanyak 700 ml. Tabung ditutup dengan sumbat yang terhubung ke pendingin Leinbig dan dilakukan destilasi. Hasil destilasi ditampung dengan labu erlenmeyer 500 ml yang telah diisi 5 ml NaOH 0,5 N. Destilasi dihentikan apabila volume penangkap mencapai 100 ml. Destilat yang tertampung ditambah indikator *phenophtalein* (PP) sebanyak 2 - 3 tetes, lalu dititrasi dengan HCl 0,5 N sampai terjadi perubahan dari warna merah muda menjadi tidak berwarna (bening). Larutan blanko dibuat dengan menggunakan 5 ml NaOH 0,5 N yang telah diberi indikator PP 1 % kemudian dilakukan titrasi dengan HCl 0,5 N.

Produksi VFA total dihitung dengan rumus :

$$\text{VFA total} = (\text{ml titran blanko} - \text{ml titran sampel}) \times \text{N HCl} \times 1000/5 \text{ mM}$$

3.2.4. Produksi protein total

Protein total diukur menggunakan metode Kjeldahl (AOAC, 1999). Sebanyak 0,55 - 0,56 g molases dimasukkan kedalam tabung fermentor dan ditambahkan larutan penyangga McDougall (saliva buatan) 40 ml kemudian diinkubasi di *waterbath* pada suhu 39°C dan pH 6,5 - 6,9. Cairan rumen sebanyak 10 ml ditambahkan kedalamnya kemudian beri gas CO₂ agar tercipta suasana seperti di dalam rumen. Tabung fermentor diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 39°C selama 1, 3 dan 5 jam. Setelah diinkubasi tabung fermentor direndam dalam air es untuk menghentikan fermentasi. Sampel yang ada di tabung fermentor digojok hingga homogen, kemudian 10 ml hasil fermentasi diambil dan ditambahkan 20 ml campuran TCA 20% dan SSA 2%. Setelah itu dilakukan sentrifius dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit agar endapan dapat terpisah. Endapan yang dihasilkan kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 45 yang telah dioven pada suhu 105°C selama 1 jam. Hasil penyaringan dioven pada suhu 105°C sampai beratnya konstan kemudian ditimbang.

Endapan dari kertas saring dimasukkan kedalam labu destruksi (labu Kjeldahl) ditambahkan katalisator selenium 1 g dan asam sulfat pekat 15 ml, kemudian dilakukan destruksi dalam lemari asam sampai berwarna hijau jernih. Sampel hasil destruksi dimasukkan kedalam labu destilasi dan ditambahkan 50 ml aquades dan 40 ml NaOH 45%. Dilakukan destilasi dengan menggunakan penangkap yang terdiri dari 20 ml H₃BO₃ 4% dan 2 tetes indikator campuran (MR+MB). Destilasi dilakukan sampai penangkap berubah warna dari ungu

menjadi hijau. Hasil destilasi dititrasi dengan HCl 0,1 N sampai berwarna ungu.

Produksi protein total dihitung dengan rumus :

$$\text{Protein total} = \frac{\{(\text{ml HCl titran} - \text{ml HCl blanko}) \times \text{N HCl} \times 14 \times 6,25\} \text{mg/g}}{\text{berat sampel}}$$

3.3. Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rancangan acak lengkap (RAL) pola *split plot in time* yang terdiri dari petak utama dan anak petak. Petak utama dalam penelitian ialah waktu inkubasi *in vitro* dengan 3 waktu pengamatan, sedangkan anak petak berupa perlakuan pada molases dengan 2 perlakuan (dipanaskan dan tidak), dengan 3 ulangan.

Perlakuan yang diberikan adalah :

P0 1jam = molases-urea tidak dipanaskan selama 1 jam inkubasi *in vitro*

P1 1jam = molases-urea dipanaskan selama 1 jam inkubasi *in vitro*

P0 3jam = molases-urea tidak dipanaskan selama 3 jam inkubasi *in vitro*

P1 3jam = molases-urea dipanaskan selama 3 jam inkubasi *in vitro*

P0 5jam = molases-urea tidak dipanaskan selama 5 jam inkubasi *in vitro*

P1 5jam = molases-urea dipanaskan selama 5 jam inkubasi *in vitro*

3.4. Analisis Data

Model Linier aditif untuk rancangan acak lengkap (RAL) pola *split plot in time* adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + Y_{ik} + (ab)_{ij} + e_{ijk}$$

Keterangan :

- Y_{ijk} = pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B
 μ = nilai rata-rata yang sesungguhnya (rata-rata populasi)
 a_i = pengaruh aditif taraf ke-i dari faktor A
 b_j = pengaruh aditif taraf ke-j dari faktor B
 $(ab)_{ij}$ = pengaruh aditif taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B
 Y_{ik} = pengamatan acak dari petak utama, yang muncul pada taraf ke-i dari faktor A dalam ulangan ke-k. $Y_{ik} \sim N(0, \sigma_y^2)$
 e_{ijk} = pengaruh acak dari satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij. $e_{ijk} \sim N(0, \sigma_e^2)$

Variabel yang diamati yaitu produksi NH_3 , VFA dan protein total secara *in vitro*. Data hasil pengamatan diolah secara statistik dengan analisis ragam (Anova), dan jika hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh nyata ($P < 0,05$) akibat perlakuan maka untuk mengetahui perbedaan antar nilai tengah perlakuan dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (Sudjana, 1986).

Hipotesis statistik dari penelitian ini adalah :

- a. H_0 : $(ab)_{ij} = 0$; tidak ada pengaruh interaksi antara pemanasan molases-urea dan waktu inkubasi *in vitro* terhadap produksi amonia (NH_3), *volatile fatty acids* (VFA) dan protein total.
- H_1 : $(ab)_{ij} \neq 0$; minimal ada satu pengaruh interaksi antara pemanasan molases-urea dan waktu inkubasi *in vitro* terhadap produksi amonia (NH_3), *volatile fatty acids* (VFA) dan protein total.
- b. H_0 : $a_i = 0$; tidak ada pengaruh pemanasan molases-urea terhadap produksi amonia (NH_3), *volatile fatty acids* (VFA) dan protein total pada jam inkubasi *in vitro* berbeda.
- H_1 : $a_i \neq 0$; minimal ada satu pengaruh pemanasan molases-urea

terhadap produksi amonia (NH_3), *volatile fatty acids* (VFA) dan protein total pada jam inkubasi *in vitro* berbeda.

c. H_0 : $b_j = 0$; tidak ada pengaruh pemanasan molases-urea terhadap produksi amonia (NH_3), *volatile fatty acids* (VFA) dan protein total pada tiap ulangan yang dicobakan.

H_1 : $b_j \neq 0$; minimal ada satu pengaruh pemanasan molases-urea terhadap produksi amonia (NH_3), *volatile fatty acids* (VFA) dan protein total pada tiap ulangan yang dicobakan.

Kriteria pengujian adalah sebagai berikut :

- a. Jika $F_{\text{hit}} < F_{\text{tabel}}$, maka H_0 diterima
- b. Jika $F_{\text{hit}} \geq F_{\text{tabel}}$, maka H_1 diterima