

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian mengenai Fermentabilitas Pakan Komplit dengan Berbagai Sumber Protein secara *In Vitro* dilaksanakan pada bulan September – November 2015 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Materi yang digunakan pada penelitian adalah bahan pakan penyusun pakan komplit yang terdiri dari dedak padi, onggok, tebon, dan sumber protein (bungkil kedelai, tepung ikan, tepung daun lamtoro, dan tepung daun ketela pohon). Cairan rumen domba diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Kampung Bustaman, Semarang. Bahan untuk analisis *in vitro* yaitu larutan McDougall, larutan pepsin HCl 0,5%, akuades, gas CO₂, indikator *methyl red* dan *bromkresol* hijau, indikator *phenolptalein* (PP) 1%, NaOH 0,5 N, Na₂CO₃ jenuh, asam borat, vaselin, H₂SO₄ 0,0055N, H₂SO₄ 15%.

Alat yang digunakan saat penelitian yaitu tabung dan tutup tabung fermentor, penangas air (*waterbath*), cawan Conway, alat destilasi, alat titrasi, *beaker glass*, pipet ukur, pipet tetes, tabung suling khusus, pendingin Leibig, kertas saring, kertas minyak, *crucible porcelain*, termometer, timbangan analitis, termos, *centrifuge* dan oven.

3.2. Metode

Metode penelitian dilakukan dalam dua tahap yaitu tahap persiapan dan tahap pelaksanaan.

3.2.1. Tahap persiapan

Tahap persiapan meliputi persiapan sampel pakan dan melakukan analisis proksimat terhadap masing-masing bahan pakan. Formulasi pakan komplit disusun iso protein dan iso TDN (PK 12% dan TDN 60%). Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan (T1, T2, T3, T4) dan 4 ulangan (U1, U2, U3, U4). Perlakuan yang diberikan adalah :

- T1 : pakan komplit dengan sumber protein bungkil kedelai
- T2 : pakan komplit dengan sumber protein tepung ikan
- T3 : pakan komplit dengan sumber protein tepung daun ketela pohon
- T4 : pakan komplit dengan sumber protein tepung daun lamtoro

Kandungan nutrisi dan komposisi pakan komplit perlakuan T1, T2, T3 dan T4 disajikan pada Tabel 2.

3.2.2. Tahap pelaksanaan

Tahap pelaksanaan meliputi analisis pencernaan bahan kering (KcBK), pencernaan bahan organik (KcBO), produksi *Volatile Fatty Acids* (VFA), dan produksi amonia (NH₃).

Tabel 2. Komposisi dan Kandungan Nutrien Pakan Komplit

Bahan Pakan	Perlakuan			
	T1	T2	T3	T4
	----- (%) -----			
Bungkil Kedelai	19	-	-	-
Tepung Ikan	-	22	-	-
Tepung Daun Ketela Pohon	-	-	32	-
Tepung Daun Lamtoro	-	-	-	31
Dedak Padi	19	16	20	24
Onggok	42	44	31	33
Tebon Jagung	20	18	17	12
Jumlah	100	100	100	100
Kandungan Nutrien				
Protein Kasar	12,49	12,82	12,26	12,00
TDN*	60,97	60,17	60,21	60,46
Serat Kasar	22,63	23,04	24,07	24,34
Lemak Kasar	3,84	6,30	5,27	5,74
Abu	6,00	7,46	6,90	6,79
BETN	55,04	50,37	51,50	51,12

* : Berdasarkan Hasil Perhitungan Sutardi (2001)

Kecernaan bahan kering dan bahan organik diukur dengan menggunakan metode Tilley dan Terry (1963) dalam Tanuwiria *et al.* (2005). Metode tersebut dibagi dalam 2 tahap, yaitu tahap pertama diawali dengan pencernaan fermentatif, dengan cara memasukkan 0,55 - 0,56 g sampel ke dalam tabung fermentor. Larutan McDougall sebanyak 40 ml dan 10 ml cairan rumen ditambahkan ke dalam tabung fermentor yang kemudian dialiri gas CO₂. Tabung fermentor kemudian ditutup dengan sumbat karet berventilator dan dimasukkan ke dalam *waterbath*, kemudian dilakukan inkubasi selama 48 jam. Selama 48 jam dilakukan penggojokan tabung fermentor setiap 6 jam sekali. Setelah 48 jam, mikroba dihentikan aktivitasnya dengan cara memindahkan tabung fermentor dari *waterbath* ke dalam ember yang sudah diberi pecahan es batu dan air selama 30 menit. Tahap kedua, tabung disentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15

menit, filtrat dibuang dan residu yang ada diberi larutan pepsin HCl 0,5% sebanyak 50 ml dan diinkubasi selama 48 jam secara aerob. Sampel disaring menggunakan kertas Whatman No. 41, residu yang didapat kemudian dioven pada suhu 105⁰C sampai beratnya konstan untuk pengukuran kadar KcBK, dilanjutkan pengabuan sampel (setelah oven) tersebut pada tanur selama 6 jam dengan suhu 600⁰C untuk pengukuran kadar KcBO. Rumus perhitungan KcBK dan KcBO yaitu :

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

$$\text{KcBO (\%)} = \frac{\text{BO sampel (g)} - (\text{BO residu (g)} - \text{BO blanko (g)})}{\text{BO sampel (g)}} 100\%$$

Pengukuran produksi VFA dan NH₃ menurut Tilley dan Terry (1963) dalam Tanuwiria *et al.* (2005) adalah sampel ditimbang sebanyak 0,55 – 0,56 g, kemudian dimasukkan ke dalam tabung fermentor. Cairan rumen sebanyak 10 ml dimasukkan kedalam tabung fermentor dan ditambahkan dengan larutan McDougall sebanyak 40 ml. Setelah itu, tabung fermentor dimasukkan ke dalam *waterbath* dan diinkubasi selama 3 jam. Hasil inkubasi di sentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Hasil sentrifus yang didapat berupa supernatan dan larutan, supernatan kemudian diambil untuk dianalisis produksi VFA dan NH₃.

Pengukuran produksi VFA dilakukan dengan metode destilasi uap, caranya adalah sebagai berikut: Supernatan diambil sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung suling yang ditambah 1 ml H₂SO₄ 15% melalui dinding tabung, tabung suling dimasukkan dalam labu suling yang telah berisi

akuades 600 – 800 ml yang telah dihubungkan dengan pendingin Leibig, kemudian dilakukan destilasi. Hasil destilasi ditampung kedalam erlenmeyer yang telah berisi 5 ml NaOH 0,5 N. Proses destilasi dihentikan ketika volume erlenmeyer telah mencapai 100 ml. Hasil destilasi diberi indikator PP 2 tetes, kemudian dititrasi dengan HCl 0,5% hingga terjadi perubahan warna dari merah muda menjadi bening. Rumus perhitungan produksi VFA yaitu :

$$\text{VFA total (mM)} = (y - z) \times N \text{ HCl} \times \frac{1000}{5} \text{ mM}$$

Keterangan :

y : ml HCl yang dibutuhkan untuk titrasi (blanko)

z : ml HCl yang dibutuhkan untuk titrasi hasil destilasi

Pengukuran produksi amonia (NH₃) dilakukan dengan teknik mikrodifusi Conway, pertama bagian tepi cawan Conway dan tutupnya diolesi dengan vaselin. Di bagian tengah cawan dimasukkan 1 ml asam borat dan 2 tetes indikator *methyl red* dan brom kresol hijau. Sampel supernatan sebanyak 1 ml dimasukkan pada bagian sisi kiri cawan bersamaan dengan memasukkan H₂SO₄ 0,0055N pada sisi kanan. Cawan Conway kemudian ditutup dan digoyang perlahan agar sampel dan sodium karbonat bercampur, selanjutnya didiamkan selama 24 jam. Setelah itu, tutup cawan Conway dibuka dan dilakukan titrasi pada bagian tengah cawan Conway sampai berwarna merah muda (warna asam borat kembali). Perhitungan produksi NH₃ yaitu:

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

3.3. Analisis Data

Data dilakukan analisis ragam, apabila hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh nyata ($P < 0,05$) maka untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan Uji Wilayah Ganda Duncan. Model linier untuk seluruh nilai pengamatan dengan rancangan acak lengkap (RAL) adalah sebagai berikut (Steel dan Torrie, 1993) :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij} \quad ; \text{ dimana } i = \text{perlakuan (1, 2, 3, 4)}$$

$$j = \text{ulangan (1, 2, 3, 4)}$$

Keterangan :

Y_{ij} = Fermentabilitas pakan komplit ke-j yang memperoleh perlakuan sumber protein berbeda ke-i

μ = Nilai tengah umum (rata-rata populasi) fermentabilitas pakan komplit

T_i = Pengaruh aditif dari perlakuan sumber protein berbeda ke-i

ϵ_{ij} = perlakuan galat percobaan pada fermentabilitas pakan komplit ke-j yang memperoleh perlakuan sumber protein berbeda ke-i

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

H_0 = Pemberian pakan komplit dengan perlakuan berbagai sumber protein tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap hasil KcBK, KcBO, produksi VFA dan produksi NH_3

H_1 = Minimal ada satu perlakuan pemberian pakan komplit dengan perlakuan berbagai sumber protein yang berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap hasil KcBK, KcBO, produksi VFA dan produksi NH_3