

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian mengenai kecernanan dan fermentabilitas tanaman orok-orok secara *in vitro* sebagai bahan pakan yang ditanam secara tumpangsari dengan jagung manis dilaksanakan pada bulan Oktober 2013 sampai Januari 2014. Penanaman tumpangsari orok-orok dan jagung dilakukan di kebun percobaan sedangkan analisis secara *in vitro* dilaksanakan di Laboraturim Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang.

#### **3.1. Materi Penelitian**

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah lahan petak percobaan, tanaman orok-orok sebagai sampel bahan pakan. Bahan yang digunakan untuk analisis *in vitro* meliputi cairan rumen sapi, larutan *McDougall* atau larutan penyangga, larutan pepsin HCl, CO<sub>2</sub>, asam sulfat 0,0055N, sodium karbonat jenuh, vaselin, indikator metyl red dan bromkesol hijau, asam borat, dan indikator phenolptaline 1%. Peralatan yang digunakan timbangan analitis, cangkul, sabit, meteran, ember, gunting, kertas minyak, penggaris/meteran, alat tulis, kertas label, penangas air (*waterbath*), *centrifuge*, oven, tanur, *crussible porcelain*, kertas saring bebas abu (Whatman no.41), gelas beker, thermometer, tabung fermentor, rak tabung, tutup tabung dari karet, gelas ukur, saringan, cawan *Conway*, peralatan titrasi, pipet ukur, mikroburet, botol kecil, tabung suling khusus, labu destilasi, pendingin *leibig*, erlenmeyer, blender dan eksikator.

### 3.2. Metode Penelitian

Kegiatan penelitian kecernanan dan fermentabilitas tanaman orok-orok secara *in vitro* sebagai bahan pakan yang ditanam secara tumpangsari dengan jagung manis terdiri dari tiga tahap yaitu tahap menentukan rancangan percobaan, persiapan media tanam, tahap pelaksanaan penanaman orok-orok dan jagung manis dan tahap pengukuran parameter melalui analisis *in vitro*.

#### 3.2.1. Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian yaitu rancangan acak kelompok (RAK) pola faktorial 3 x 2, dengan 4 kali ulangan yang merupakan blok dalam rancangan percobaan ini. Faktor pertama penelitian ini adalah kepadatan populasi tanaman orok-orok (*Crotalaria juncea L*), yaitu :

- K1 = 6 tanaman/m<sup>2</sup> di antara baris tanaman jagung
- K2 = 12 tanaman/m<sup>2</sup> di antara baris tanaman jagung
- K3 = 16 tanaman/m<sup>2</sup> di antara baris tanaman jagung

Faktor kedua adalah pola tanam tumpangsari, yaitu :

- P1 = 1 baris tanaman orok-orok di antara tanaman jagung (jarak tanam 100 x 25 cm)
- P2 = 2 baris tanaman orok-orok di antara tanaman jagung (jarak tanam 100 x 25 cm)

### **3.2.2. Pelaksanaan penelitian**

Pelaksanaan penelitian dimulai dengan persiapan meliputi persiapan lahan, persiapan bibit jagung manis dan orok-orok. Pengukuran lahan sebesar 312 m<sup>2</sup> yang dibagi menjadi 26 petak perlakuan sebagai media yang akan digunakan, pencabutan rumput dan gulma, pencangkulan untuk menggemburkan tanah, pengukuran petak lahan masing-masing perlakuan, dan pemberian pupuk kandang satu minggu sebelum penanaman.

Tahap penanaman dilakukan satu minggu setelah pemberian pupuk kandang. Pelaksanaan dimulai dari melakukan penanaman tanaman orok-orok yang disesuaikan pada petak lahan masing-masing perlakuan setelah satu bulan kemudian disisipkan tanaman jagung, kemudian dilakukan pemupukan fosfor (P) dan kalium (K) dosis sesuai pada Lampiran 1. Penyulaman dan penjarangan serta pembersihan lahan dari gulma dilakukan setelah penanaman orok-orok selama satu minggu. Pemeliharaan meliputi penyiraman tanaman, penyiangan lahan pada setiap minggunya, serta pemberian pupuk N setelah satu bulan penanaman.

Tahap pemanenan, tanaman orok-orok dipanen terlebih dahulu setelah ditanam selama 2 bulan. Pengambilan sampel pada tanaman dilakukan pada tanaman yang tumbuh pada tengah petak perlakuan. Sampel tanaman dihomogenkan pada masing-masing perlakuan, kemudian diambil dan dikeringkan untuk selanjutnya dibuat menjadi tepung. Selanjutnya dilanjutkan dengan tahap pengukuran kecernaan dan fermentabilitas. Adapun layout penelitian dapat dilihat pada Lampiran 2.

### 3.2.3. Parameter penelitian

Parameter penelitian meliputi pengukuran kecernaan bahan kering (KcBK), bahan organik (KcBO), produksi VFA dan konsentrasi amonia ( $\text{NH}_3$ ) melalui pencernaan *in vitro*. Tahap pencernaan *in vitro* dilakukan dengan simulasi kondisi rumen yang sebenarnya. Pengukuran pencernaan *in vitro* dilakukan berdasarkan metode Tilley dan Terry (1963). Metode tersebut dibagi dalam 2 tahap yaitu tahap fermentasi mikrobial dan pencernaan proteolitik. Sampel sebanyak 0,55 – 0,56 g dimasukkan ke dalam tabung fermentasi kemudian ditambahkan 10 ml cairan rumen dan 40 ml larutan penyangga *McDougall* dan penambahan  $\text{CO}_2$ . Larutan blanko dibuat tanpa penambahan sampel ke dalam tabung. Tabung fermentasi diinkubasi ke dalam *waterbath* bersuhu  $38^\circ - 39^\circ \text{C}$ . Fermentasi mikroorganisme secara anaerob dilakukan selama 48 jam, dan selama inkubasi dilakukan penggojokan setiap 6 jam. Fermentasi dihentikan setelah 48 jam dengan memasukkan tabung ke dalam air es. Tabung fermentasi selanjutnya disentrifuge selama 8 – 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Endapan sampel yang telah dipisahkan dari cairan, kemudian diteruskan dengan pencernaan enzimatik (proteolitik). Tabung fermentasi diisi dengan larutan pepsin HCl sebanyak 50 ml dan dimasukkan ke dalam *waterbath* bersuhu  $39^\circ \text{C}$  untuk dilakukan inkubasi selama 48 jam. Penggojokan dilakukan 6 jam. Setelah inkubasi selama 48 jam, residu diambil dengan cara disaring menggunakan kertas saring whatman no.41. Residu dikeringkan dalam oven bersuhu  $105^\circ \text{C}$  selama 12 jam, dan dimasukkan ke dalam eksikator selama 15 menit, ditimbang untuk mengetahui bobot bahan keringnya.

Kecernaan bahan kering dihitung dengan rumus:

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

BK = bahan kering

Penentuan kecernaan bahan organik dilakukan dengan memasukkan sampel ke dalam tanur pada suhu 400 - 600° C selama 6 jam, kemudian dihitung bobot bahan organiknya, KcBO dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

BO = bahan organik

Pencernaan fermentatif dilakukan dengan cara sampel diambil sebanyak 0,55 - 0,56 gram dan dimasukkan ke dalam tabung fermentor, kemudian ditambahkan larutan *McDougall* 40 ml dan cairan rumen 10 ml. Gas CO<sub>2</sub> ditambahkan ke dalam tabung untuk menciptakan kondisi anaerob kemudian tabung fermentor ditutup dengan tutup karet. Selanjutnya tabung dimasukkan ke dalam *water bath* dan difermentasikan selama 3 jam. Fermentasi dihentikan dengan cara memasukan tabung fermentor ke dalam es. Isi tabung fermentasi selanjutnya disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm dan supernatan diambil untuk dianalisis VFA dan NH<sub>3</sub>.

Produksi VFA total dilakukan dengan teknik destilasi uap. Supernatan diambil 5 ml dimasukkan ke dalam labu suling khusus yang ditambahkan 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15% dan dimasukkan kedalam labu suling yang berisi aquades 600 ml,

kemudian dihubungkan dengan pendingin *Leibig* untuk didestilasi. Destilat ditampung dalam erlenmeyer dan dihentikan jika volume di dalam destilat telah mencapai 100 ml. Erlenmeyer diambil dan ditetesi indikator phenolptalein 2 tetes, kemudian dititrasi dengan asam klorida 0,5 N hingga terjadi perubahan warna merah muda menjadi jernih dan mencatat volume asam klorida yang dibutuhkan. Blangko dibuat dengan menggunakan 5 ml NaOH yang telah diberi indikator PP, kemudian dititrasi dengan HCl 0,5 N dan volume HCl yang dibutuhkan dicatat kemudian dilakukan perhitungan. Produksi VFA dihitung dengan rumus:

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

y = ml HCl yang dibutuhkan untuk titrasi blangko

z = ml HCl yang dibutuhkan untuk titrasi hasil destilat

Konsentrasi  $\text{NH}_3$  diukur dengan metode mikrodifusi *Conway*. Langkah pertama mempersiapkan larutan supernatan dan cawan *Conway*. Bagian tepi cawan *Conway* dan tutupnya diolesi vaselin. Supernatan diambil sebanyak 1 ml dan menempatkan pada salah satu sisi sekat cawan. Pada sisi yang lain ditempatkan 1 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  jenuh. Asam borat ditambahkan sebanyak 1 ml pada bagian tengah cawan dan ditetesi dengan indikator merah metyl dan bromkresol hijau sebanyak 1 tetes. Cawan *Conway* yang sudah diolesi vaselin pada bagian tepi ditutup sehingga kedap udara. Larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  jenuh dicampurkan dengan supernatan dengan cara menggoyangkan dan memiringkan cawan secara perlahan. Selanjutnya cawan dibiarkan selama 24 jam pada suhu

kamar agar semua ammonia dapat terikat oleh asam borat. Setelah 24 jam, cawan dibuka dan dititrasi menggunakan asam sulfat 0,0055 N hingga terjadi perubahan warna ungu menjadi merah muda, maka titrasi dihentikan. Volume asam sulfat 0,0055 N yang digunakan dicatat kemudian dilakukan perhitungan. Konsentrasi amonia dihitung dengan menggunakan rumus:

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

### 3.3. Analisis Data

Parameter penelitian ini adalah KcBK, KcBO, produksi VFA dan produksi NH<sub>3</sub>. Data hasil pengamatan diolah secara statistik dengan analisis ragam (ANOVA) dan apabila terdapat pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji wilayah Duncan untuk mengetahui perlakuan yang memberikan perbedaan nyata.

Model linier untuk tiap nilai pengamatan sesuai dengan rancangan acak kelompok pola faktorial 3 x 2 adalah sebagai berikut:

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

Keterangan :

- $Y_{ijk}$  = KcBK, KcBO, VFA dan NH<sub>3</sub> tanaman orok-orok pada luasan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij (taraf ke-I dari kepadatan populasi dan taraf ke-j dari pola tanam tumpangsari).
- $\mu$  = Nilai tengah umum (rata-rata populasi) KcBK, KcBO, VFA dan NH<sub>3</sub> tanaman orok-orok.
- $\alpha_i$  = Pengaruh aditif dari kepadatan populasi ke-i
- $\beta_j$  = Pengaruh aditif dari pola tanam tumpangsari ke-j
- $(\alpha\beta)_{ij}$  = Pengaruh interaksi antara kepadatan populasi ke-i dan pola tanam tumpangsari ke-j
- $\epsilon_{ijk}$  = Pengaruh galat percobaan pada luasan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

Hipotesis statistik adalah interaksi antara pola tanam dan kepadatan meningkatkan pencernaan dan fermentabilitas. Hipotesis statistiknya adalah:

1. Pengaruh interaksi kepadatan populasi dan pola tumpangsari

H0 :  $\alpha_1\beta_1 = \alpha_1\beta_2 = \dots = \alpha_3\beta_2 = 0$  (yang berarti tidak ada pengaruh interaksi antara kepadatan populasi dan pola tanam tumpangsari terhadap hasil pencernaan bahan kering, bahan organik, kadungan VFA dan  $\text{NH}_3$  tanaman orok-orok).

H1 : Paling sedikit ada satu  $\alpha_1\beta_1 \neq 0$  pengaruh interaksi antara kepadatan populasi dan pola tanam tumpangsari terhadap hasil pencernaan bahan kering, bahan organik, kadungan VFA dan  $\text{NH}_3$  tanaman orok-orok.

2. Pengaruh Kepadatan Populasi

H0 :  $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 0$  (yang berarti tidak ada respon hasil pencernaan bahan kering, bahan organik, kadungan VFA dan  $\text{NH}_3$  tanaman orok-orok akibat perlakuan kepadatan populasi yang berbeda).

H1 : Paling sedikit ada satu  $\alpha_1 \neq 0$  respon hasil pencernaan bahan kering, bahan organik, kadungan VFA dan  $\text{NH}_3$  tanaman orok-orok diantara kepadatan populasi yang berbeda.

3. Pengaruh Pola Tumpangsari

H0 :  $\beta_1 = \beta_2 = 0$  (yang berarti tidak ada respon hasil pencernaan bahan kering, bahan organik, kadungan VFA dan  $\text{NH}_3$  tanaman orok-orok akibat perlakuan pola tanam tumpangsari yang berbeda).

H1 :  $\beta_1 \neq \beta_2 \neq 0$  ada respon hasil pencernaan bahan kering, bahan organik, kadungan VFA dan  $\text{NH}_3$  tanaman orok-orok akibat pola tanam yang berbeda.