

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian tentang Pengaruh Lama Inkubasi dan Level Sumber Urease terhadap Fiksasi N-Urea oleh Zeolit dan Potensinya sebagai Sumber Nitrogen *Slow Release* dilaksanakan pada 18 Desember 2015 – 4 Januari 2016 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

#### **3.1. Materi**

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah serbuk zeolit ukuran 40 - 60 mesh, tepung kedelai (sumber urease). Reagensia yang digunakan yaitu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0055 N, Sodium carbonat jenuh, vaselin, selenium, NaOH 0,5%, akuades, asam borat 4%, HCl, larutan McDougall, indikator campuran metil merah dan metil biru. Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitis, oven, eksikator, *crucible porcelain*, *beaker glass*, pendingin tegak, *water bath*, labu destruksi (labu Kjeldahl), labu erlenmeyer, buret, corong, gelas ukur 25 ml dan 50 ml, seperangkat alat destilasi, tabung fermentor, *centrifuge*, cawan *Conway*, *stirer*, pipet ukur 1 ml, dan mikroburet.

#### **3.2. Metode**

Penelitian dilakukan 2 tahap. Tahap pertama aktivasi zeolit, inkubasi zeolit dan pengukuran tingkat fiksasi N-urea oleh zeolit. Tahap kedua pengukuran pelepasan N.

### 3.2.1. Aktivasi dan inkubasi zeolit

Aktivasi dimulai dengan cara menggiling zeolit yang berukuran besar kemudian diayak dengan ayakan 40 – 60 mesh. Zeolit yang digunakan yaitu zeolit yang lolos 40 mesh dan yang tidak lolos 60 mesh, kemudian aktivasi dengan cara ditanur pada suhu 300 °C selama 4 jam untuk menghilangkan air yang terperangkap di dalam rongga-rongga zeolit dan pengotor lainnya kemudian didinginkan pada eksikator. Zeolit yang sudah diaktivasi selanjutnya dicampur dengan campuran urea dan tepung kedelai sebagai sumber urease dengan perbandingan yang sudah ditentukan. Perbandingan urea (g) : zeolit (g) : air (g) yaitu 1 : 2 : 1 sedangkan penambahan tepung kedelai sebagai sumber urease yang digunakan yaitu 2%, 4%, dan 6% dari berat urea kemudian diinkubasi pada wadah yang tertutup rapat pada suhu ruang dengan lama inkubasi T1 (12 jam), T2 (24 jam), T3 (36 jam), T4 (48 jam). Setelah waktu inkubasi berakhir, zeolit dicuci dengan aquades dan disaring dengan kertas saring sampai bersih untuk menghilangkan tepung kedelai. Pencucian terakhir dilakukan dengan pompa vakum supaya zeolit cepat kering. Zeolit yang sudah kering dianalisis N-nya untuk mengetahui tingkat fiksasinya. Tingkat fiksasi zeolit terhadap N-urea diukur dengan melakukan uji kandungan N dengan menggunakan metode Kjeldahl.

Jumlah N dihitung dengan rumus (General Laboratory Procedures, 1966) :

$$\text{Jumlah N} = (\text{titran sampel} - \text{titran blanko}) \times \text{N HCl} \times 0,014$$

Tingkat fiksasi N diukur dengan rumus :

$$\frac{\sum N_{Z1} (g) - \sum N_{Z0} (g)}{\sum N_{urea} (g)} \times 100\%$$

Keterangan :

$\sum N_{Z1}$  = jumlah N zeolit yang telah diinkubasi dengan urea (g)  
 $\sum N_{Z0}$  = jumlah N zeolit yang tidak direndam dengan urea (g)  
 $\sum N_{urea}$  = jumlah N yang terdapat pada urea (g)

### 3.2.2. Pengukuran kadar amonia (NH<sub>3</sub>)

Pelepasan NH<sub>3</sub> diukur dengan cara mengamati produksi NH<sub>3</sub> pada jam ke-1, 3, 5, dan 7. Kadar amonia dianalisis secara *in vitro*. Tahap pertama dalam analisis NH<sub>3</sub> adalah pembuatan supernatan yaitu setiap tabung fermentor dimasukkan sampel sebanyak 0,55 - 0,56 g. Masing-masing tabung ditambahkan larutan penyangga (McDougall) 40 ml. Inkubasi dilakukan dalam *waterbath* pada suhu 39 °C dan diamati pada jam ke-1, 3, 5, dan 7. Tabung fermentor disentrifuge 10 – 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan diambil dan disimpan ke dalam botol. Supernatan tersebut siap dianalisis konsentrasi NH<sub>3</sub>. Pengukuran konsentrasi NH<sub>3</sub> dengan metode *Conway* (General Laboratory Procedures, 1966). Cawan *Conway* yang diolesi dengan vaselin pada bagian tutup/tepinya. Asam borat diambil 1 ml dengan menggunakan pipet, kemudian dimasukkan ke bagian tengah cawan conway dan ditetesi dengan indikator campuran metil merah dan bromkresol hijau. Larutan sodium karbonat jenuh sebanyak 1 ml terlebih dahulu dimasukkan ke dalam sisi sebelah kanan cawan kemudian ditutup, kemudian larutan supernatan sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam sisi kiri kemudian tutup cawan diputar hingga permukaan cawan tertutup.

Selanjutnya cawan *conway* digoyang – goyang agar supernatan dan sodium karbonat jenuh tercampur, kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 24 jam agar semua amonia dapat diikat oleh asam borat. Proses selanjutnya adalah titrasi dengan menggunakan asam sulfat 0,0055 N hingga terjadi perubahan warna dari ungu menjadi warna merah muda (warna asam borat) kemudian titrasi dihentikan.

Kadar  $\text{NH}_3$  dihitung dengan rumus (Conway, 1962):

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

Keterangan :

$\text{NH}_3$  = Konsentrasi  $\text{NH}_3$  yang diperoleh

$\text{N H}_2\text{SO}_4$  = Normalitas larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$

### 3.3. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap pola faktorial 4 x 3 dengan 3 kali ulangan (Steel dan Torrie, 1993). Faktor pertama yaitu lama inkubasi (12 jam, 24 jam, 36 jam, dan 48 jam) dan faktor kedua yaitu level penambahan tepung kedelai sebagai sumber urease (2%, 4%, dan 6% dari berat urea). Peubah yang diukur adalah jumlah N yang terfiksasi dan pelepasan N.

Perlakuan yang diberikan adalah =

A1B1 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 2% yang diinkubasi selama 12 jam

A1B2 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 4% yang diinkubasi selama 12 jam

A1B3 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 6% yang diinkubasi selama 12 jam

- A2B1 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 2% yang diinkubasi selama 24 jam
- A2B2 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 4% yang diinkubasi selama 24 jam
- A2B3 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 6% yang diinkubasi selama 24 jam
- A3B1 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 2% yang diinkubasi selama 36 jam
- A3B2 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 4% yang diinkubasi selama 36 jam
- A3B3 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 6% yang diinkubasi selama 36 jam
- A4B1 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 2% yang diinkubasi selama 48 jam
- A4B2 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 4% yang diinkubasi selama 48 jam
- A4B3 = perbandingan urea 1 : zeolit 2 : tepung kedelai 6% yang diinkubasi selama 48 jam

Keterangan A = Lama waktu inkubasi

B = Level penambahan tepung kedelai sebagai sumber urease

Metode linear untuk seluruh nilai pengamatan dengan rancangan acak lengkap pola faktorial adalah sebagai berikut (Steel dan Torrie, 1993):

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

Keterangan:

i = lama inkubasi

j = level penambahan tepung kedelai sebagai sumber urease

k = ulangan ke-

$Y_{ijk}$  = hasil pengamatan lama inkubasi ke-i, level penambahan tepung kedelai sebagai sumber urease ke-j dan ulangan ke-k

$\mu$  = rata-rata umum / nilai tengah

$a_i$  = pengaruh lama inkubasi ke-i

$b_j$  = pengaruh penambahan level tepung kedelai sebagai sumber urease ke-j

$(ab)_{ij}$  = interaksi perlakuan ke-i dan perlakuan ke-j

$\varepsilon_{ijk}$  = pengaruh galat perlakuan ke-I dan e-j pada satuan percobaan ke-k

- a. H0 :  $(\alpha\beta)_{ij} = 0$  Tidak ada interaksi antara lama inkubasi dengan level penambahan tepung kedelai sebagai sumber urease terhadap fiksasi N-urea oleh zeolit.  
H1 : Adanya interaksi antara lama inkubasi dengan level penambahan tepung kedelai sebagai sumber urease terhadap fiksasi N-urea oleh zeolit.
- b. H0 :  $\alpha_i = 0$  Tidak ada pengaruh lama inkubasi terhadap tingkat fiksasi N-urea oleh zeolit.  
H1 : Ada pengaruh lama inkubasi terhadap tingkat fiksasi N-urea oleh zeolit.
- c. H0 : Tidak ada pengaruh penambahan level tepung kedelai sebagai sumber urease terhadap tingkat fiksasi N-urea oleh zeolit.  
H1 : Ada pengaruh penambahan level tepung kedelai sebagai sumber urease terhadap tingkat fiksasi N-urea oleh zeolit.

Pengujian data secara statistik mengenai tingkat fiksasi zeolit terhadap N dilakukan dengan analisis varians (Anova) dengan taraf signifikansi 5% kemudian dilakukan uji lanjut menggunakan uji jarak berganda Duncan. Pengujian data statistik mengenai pelepasan  $\text{NH}_3$  dilakukan dengan analisis varians (Anova) dengan taraf signifikansi 5% untuk rancangan perlakuan multifaktor berpola waktu terbagi (*Split plot in time*) dan diuji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan.