

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian tentang Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Kemampuan Zeolit Memfiksasi Nitrogen Urea dan Potensinya sebagai Sumber Nitrogen *Slow Release* secara *In Vitro* dilaksanakan pada bulan Desember 2015 sampai dengan bulan 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*, urea, H₂SO₄ pekat, H₂SO₄ 0,0055 N, sodium karbonat jenuh, vaselin, selenium, NaOH 0,5%, akuades, asam borat 4%, HCl, larutan McDougall, indikator merah metyl dan bromkresol hijau. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitis, eksikator, *crucible porcelaine*, *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, *stirrer*, pipet ukur 1 ml dan tanur.

3.2. Metode

Penelitian dilaksanakan dalam beberapa tahap, tahap pertama yaitu aktivasi zeolit dan inkubasi zeolit dengan urea, tahap kedua yaitu pengukuran

parameter penelitian berupa fiksasi N urea oleh zeolit serta pengukuran pelepasan N dan tahap berikutnya adalah analisis data.

3.2.1. Aktivasi zeolit dan fiksasi N

Tahap pertama yang dilaksanakan yaitu aktivasi zeolit, aktivasi dilakukan dengan cara zeolit yang berukuran 40 - 60 *mesh* dipijarkan di dalam tanur dengan suhu 300°C selama 4 jam kemudian didinginkan (Pangestuti, 2015). Zeolit yang sudah diaktivasi digunakan untuk proses fiksasi NH₃ dari urea dengan cara inkubasi langsung. Inkubasi langsung dilakukan dengan cara urea dilarutkan dalam air kemudian dicampur dengan zeolit. Inkubasi zeolit dengan urea diamati pada jam ke- 24, 48, 72 dan 96. Perbandingan antara zeolit (g), urea (g) dan air (g) yang diinkubasi adalah 2 : 1 : 1.

3.2.2. Fiksasi NH₃ urea

Tahap penelitian selanjutnya adalah pengukuran parameter penelitian berupa fiksasi Nasal urea oleh zeolit. Zeolit yang telah diinkubasi dengan urea dicuci untuk menghilangkan urea yang menempel pada permukaan luar zeolit dan dikeringkan pada suhu ruang, setelah dikeringkan zeolit yang diinkubasi dalam waktu 24, 48, 72 dan 96 jam dianalisis kandungan N-nya untuk mengetahui tingkat fiksasinya pada masing-masing waktu inkubasi. Tingkat fiksasi zeolit terhadap N urea dapat diketahui dengan cara dilakukan uji kandungan N dengan metode Kjeldahl, kemudian dihitung jumlah N-nya.

Jumlah N dihitung dengan rumus :

Jumlah N = (titran sampel – titran blanko) x N HCl x 0,014

Kemampuan fiksasi N diukur dengan rumus (Kamal, 1998) :

$$\frac{\sum N Z_1 (g) - \sum N Z_0 (g)}{\sum N_{urea} (g)} \times 100\%$$

Keterangan :

$\sum N Z_0$ = jumlah N pada zeolit tanpa inkubasi dengan urea (g)
 $\sum N Z_1$ = jumlah N pada zeolit setelah inkubasi 24, 48, 72 dan 96 jam (g)
 $\sum N_{urea}$ = jumlah N yang terdapat pada urea (g)

3.2.3. Pelepasan N

Zeolit yang telah diinkubasi dengan urea selain diukur tingkat fiksasi N-nya juga dilakukan pengukuran pelepasan N-nya. Kadar NH_3 diukur dengan metode mikrodifusi Conway. pelepasan N dilakukan secara *in vitro* yaitu dengan cara melakukan inkubasi 0,55 g zeolit yang telah memfiksasi N dengan 40 ml larutan McDougall pada tabung fermentor dan ditutup, penggunaan larutan McDougall pada penelitian ini untuk dimanfaatkan kandungan kationnya, sehingga dapat digunakan untuk mengukur tingkat pelepasan N dari zeolit yang sudah terikat sebelumnya akibat adanya pertukaran kation dari larutan McDougall. Inkubasi dilakukan dalam *water bath* pada suhu $39^\circ C$ selama 1, 3, 5 dan 7 jam, setelah diinkubasi larutan pada tabung fermentor dipindahkan pada tabung lain kemudian disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3.000 rpm. Supernatan diambil dan disimpan dalam botol. Supernatan tersebut siap dianalisis konsentrasi NH_3 nya.

Pengukuran konsentrasi NH_3 yaitu dengan cara mempersiapkan cawan Conway dan tutupnya yang telah diolesi dengan vaselin pada bagian tepinya. Asam borat sebagai larutan penangkap NH_3 diambil 1 ml dengan menggunakan pipet, kemudian dimasukkan ke bagian tengah cawan Conway dan ditetesi dengan indikator merah metyl dan bromkresol hijau. Larutan sodium karbonat jenuh dimasukkan ke dalam sisi yang lain sebanyak 1 ml dan larutan supernatan sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam salah satu sisi cawan. Cawan Conway ditutup secara perlahan-lahan dan digojog secara perlahan agar supernatan dan sodium karbonat jenuh tercampur. Langkah selanjutnya didiamkan pada suhu kamar, dan dihitung kadar NH_3 pada jam ke- 1, 3, 5 dan 7 dengan dilakukan titrasi dengan menggunakan asam sulfat 0,0055 N hingga terjadi perubahan warna dari ungu menjadi merah muda (warna asam borat) kemudian titrasi dihentikan.

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

Keterangan :

Titran = hasil titrasi

NH_3 = konsentrasi NH_3 yang diperoleh

3.3. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan pada parameter kemampuan fiksasi N pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap 4 perlakuan dengan 4 ulangan. Perlakuan yang dilakukan adalah perbedaan lama inkubasi zeolit dengan urea. Peubah yang diukur adalah jumlah N yang terfiksasi.

Perlakuan yang diberikan adalah:

T1 = lama inkubasi zeolit dengan urea selama 24 jam

T2 = lama inkubasi zeolit dengan urea selama 48 jam

T3 = lama inkubasi zeolit dengan urea selama 72 jam

T4 = lama inkubasi zeolit dengan urea selama 96 jam

Model linier untuk parameter kemampuan fiksasi N dengan rancangan acak lengkap menggunakan metode menurut Maghfiroh *et al.* (2014) adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

i = 1, 2, 3, 4 (perlakuan)

j = 1, 2, 3, 4 (ulangan)

Y_{ij} = hasil pengamatan lama inkubasi ke- i dan ulangan ke- j

μ = rata-rata umum/ nilai tengah

t_i = pengaruh perlakuan lama inkubasi ke- i

ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan pada ulangan ke- j yang memperoleh perlakuan ke- i

Hipotesis statistika dari penelitian ini adalah :

H_0 : $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = 0$, tidak ada pengaruh lama inkubasi terhadap kemampuan fiksasi NH_3 oleh zeolit.

H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$, minimal ada satu pengaruh lama inkubasi terhadap kemampuan fiksasi NH_3 oleh zeolit.

Pengujian data secara statistik pada parameter kemampuan zeolit dalam memfiksasi N menggunakan analisis varians (Anova) pada taraf signifikansi 5% dengan uji lanjut berupa uji jarak berganda Duncan kemudian dilanjutkan dengan uji polinomial orthogonal.

Pengujian data secara statistik pada parameter pelepasan NH_3 menggunakan analisis varians (Anova) pada taraf signifikansi 5% untuk rancangan

perlakuan multifaktor berpola petak terbagi (*split plot in time*) dan diuji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan.

Model linier untuk parameter pelepasan N dengan rancangan petak terbagi menggunakan metode menurut adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + K_k + A_i + \delta_{ik} + B_j + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan:

- Y_{ijk} = pelepasan N pada kelompok ke-k yang memperoleh perlakuan ke-i dari faktor lama waktu inkubasi dan taraf ke-j dari produksi jam ke
- μ = nilai tengah umum pelepasan N
- K_k = pengaruh kelompok ke-k
- A_i = pengaruh aditif dari faktor ke-i faktor lama waktu inkubasi
- δ_{ik} = pengaruh galat yang muncul pada taraf ke-i dari lama waktu inkubasi dalam kelompok ke-k
- B_j = pengaruh aditif dari jam ke-j produksi N pada jam ke-
- $(AB)_{ij}$ = pengaruh interaksi taraf ke-i dari lama waktu inkubasi dan taraf ke-j dari produksi N jam ke-
- ϵ_{ijk} = pengaruh galat percobaan pada kelompok ke-k yang memperoleh taraf ke-i faktor lama waktu inkubasi dan taraf ke-j dari produksi N jam ke-

Hipotesis Statistik:

- a. $H_0 : (AB)_{ij} = 0$, tidak ada pengaruh interaksi antara lama waktu inkubasi supernatan dan produksi N pada jam ke- terhadap pelepasan N.

 $H_1 : (AB)_{ij} \neq 0$, minimal ada satu pengaruh interaksi antara lama waktu inkubasi supernatan dengan produksi N pada jam ke- terhadap pelepasan N.
- b. $H_0 : A_i = 0$, tidak ada perbedaan pelepasan N diantara taraf lama waktu inkubasi supernatan.

 $H_1 : A_i \neq 0$, minimal ada satu perlakuan lama waktu inkubasi supernatan yang mempengaruhi pelepasan N.
- c. $H_0 : B_j = 0$, tidak ada perbedaan respon pelepasan N diantara produksi N jam ke-.

 $H_1 : B_j \neq 0$, minimal ada satu produksi N pada jam ke- yang mempengaruhi pelepasan N.