

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian tentang kadar protein kasar dan fermentabilitas secara *in vitro* jerami tanaman kedelai yang ditanam dengan penyiraman air laut dan mulsa eceng gondok dilaksanakan pada bulan Agustus 2014 sampai dengan Februari 2015. Pelaksanaan penelitian ini meliputi penanaman kedelai di *green house* dan penelitian secara laboratoris dilakukan di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Laboratorium Fisiologi dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Bahan yang digunakan pada tahap persiapan dan penanaman yaitu benih kedelai, air laut yang diambil dari Pantai Marina Semarang, tanah 11 kg per *polybag*, air, eceng gondok yang diambil dari banyumanik, pupuk (urea, TSP dan KCl). Alat yang digunakan adalah 4 ember ukuran 30 liter, 32 *polybag* ukuran 25 cm x 35 cm, plastik, EC (*Electrical Conductivity*) meter, cangkul, gunting, termohigro, selang, timbangan, pita ukur, timbangan analitis, pisau, pinset, gunting.

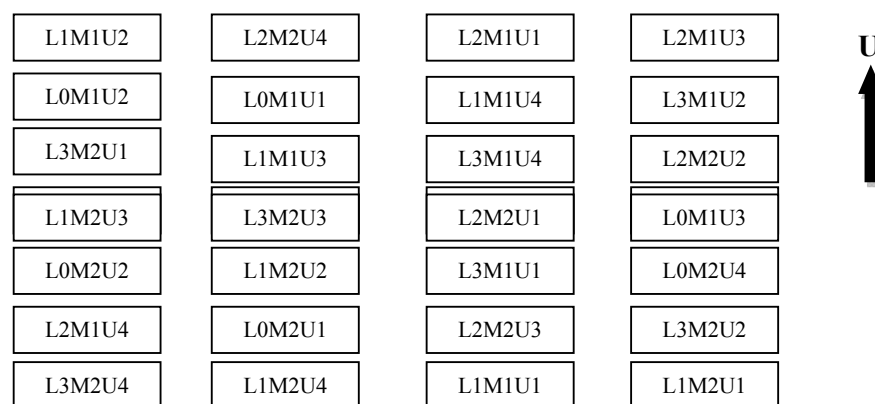
Bahan yang digunakan pada tahap analisis yaitu jerami kedelai. Reagen dan alat yang digunakan yaitu akuades, asam sulfat pekat, selenium, H_3BO_3 4%, NaOH 45%, HCl, larutan McDougall, cairan rumen dari RPH Penggaron, gas CO_2 , H_2SO_4 15%, NaOH 0,5N, indikator PP 1%, indikator campuran metil merah

dan bromkreso hijau, sodium karbonat (NaCO_3), H_2SO_4 0,0055 N. Alat yang digunakan yaitu blander, oven, labu destruksi, labu erlenmeyer, kompor, *beaker glass*, gelas ukur, peralatan titrasi untuk menitrasi, pipet, *stirrer*, kertas label, penangas air, termometer air, tabung fermentor, termos, tabung suling khusus, cawan Conway, titrasi kecil, sentrifus.

3.2. Metode

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 4 x 2 dengan 4 ulangan. Faktor pertama adalah level salinitas air laut L0 (tanpa air laut), L1 (air laut EC 1 mmhos/cm), L2 (air laut EC 1,5 mmhos/cm), L3 (air laut EC 2 mmhos/cm) dan faktor kedua adalah mulsa enceng gondok M1 (tanpa mulsa) dan M2 (mulsa enceng gondok dosis 4 ton/ha).

Hasil pengacakan perlakuan pada masing-masing tanaman kedelai dapat dilihat pada Ilustrasi 3.



Ilustrasi 3. Tata Letak Pot Penelitian

Keterangan :

- L0M1 : perlakuan tanpa penyiraman air laut dan tanpa pemberian mulsa eceng gondok
- L0M2 : perlakuan tanpa penyiraman air laut dan dengan pemberian 4 ton/ha mulsa eceng gondok
- L1M1 : perlakuan dengan penyiraman air laut 1 mmhos/cm dan tanpa pemberian mulsa eceng gondok
- L1M2 : perlakuan dengan penyiraman air laut 1 mmhos/cm dan dengan pemberian 4 ton/ha mulsa eceng gondok
- L2M1 : perlakuan dengan penyiraman air laut 1,5 mmhos/cm dan tanpa pemberian mulsa eceng gondok
- L2M2 : perlakuan dengan penyiraman air laut 1,5 mmhos/cm dan dengan pemberian 4 ton/ha mulsa eceng gondok
- L3M1 : perlakuan dengan penyiraman air laut 2 mmhos/cm dan tanpa pemberian mulsa eceng gondok
- L3M2 : perlakuan dengan penyiraman air laut 2 mmhos/cm dan dengan pemberian 4 ton/ha mulsa eceng gondok

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap, meliputi tahap persiapan, penanaman dan analisis. Tahap persiapan diantaranya eceng gondok yang telah didapat dari Banyumanik dipotong-potong sekitar 1-2 cm kemudian dikeringkan selama 2-3 hari sampai berwarna coklat. Kemudian *polybag* diisi dengan 11 kg tanah, kemudian pupuk urea, TSP dan KCl ditimbang dengan dosis 100 kg N/ha, 150 kg P₂O₅/ha, dan 100 kg K₂O/ha, dan mengukur level air laut dengan air tawar dengan L0= tanpa air laut (air tawar), L1= air tawar ditambah air laut lalu diaduk sampai homogen dan ukur dengan alat EC meter 1 mmhos/cm, L2= air laut EC 1,5 mmhos/cm, L3= air laut EC 2 mmhos/cm.

Tahap penanaman dilakukan kegiatan pemberian mulsa eceng gondok pada *polybag* sesuai dengan dosis pada perlakuan kemudian penanaman kedelai dilakukan dengan 7 benih per *polybag* yang nantinya disisakan 3 tanaman per *polybag*. Pemberian pupuk urea, TSP dan KCl yaitu dengan cara pmenabur pupuk tersebut diatas tanah, Pupuk urea diberikan 3 kali pada tanaman kedelai yaitu 1/3

dosis pada saat awal tanam, 1/3 dosis saat tanaman kedelai mulai berbunga umur 5 minggu dan 1/3 dosis pada saat tanaman kedelai mulai tumbuh buah umur 7 minggu. Setelah tanah di *polybag* ditaburi pupuk dan mulsa eceng gondok kemudian dilakukan penyiraman. Penyiraman dilakukan setiap hari (pagi dan sore) dengan air tawar dan dengan air laut yang telah diencerkan sesuai perlakuan 1; 1,5 dan 2 mmhos/cm sebanyak 500 ml/pot Setelah panen jerami potong dan di jemur 2-3 hari, setelah kering jerami digiling sampai halus kemudian dianalisis kadar protein kasar, produksi *volatile fatty acids* dan amonianya secara *in vitro*.

Analisis kadar protein kasar jerami tanaman kedelai diukur dengan metode Kjeldahl yaitu destruksi, destilasi dan titrasi. Menimbang sampel kurang lebih 0,3 g. Sampel, selenium dan asam sulfat pekat 10 ml secara berturut-turut dimasukkan ke dalam labu destruksi kemudian dilakukan destruksi sampai berwarna hijau jernih di dalam almari asam lalu didinginkan. Proses destilasi dilakukan dengan menggunakan penangkap H_3BO_3 4% sebanyak 20 ml dan menambahkan dua tetes indikator MR dan MB. Sampel yang telah didestruksi dimasukkan ke dalam labu destilasi kemudian ditambahkan 90 ml akuades dan 40 ml NaOH 45%. Destilasi dilakukan sampai penangkap berubah warna dari ungu menjadi hijau atau sudah 100 ml. Hasil destilasi kemudian dititrasi dengan menggunakan HCl 0,1 N sampai berubah warna ungu. Hasil titrasi kemudian dimasukan dalam persamaan berikut :

$$\text{Kadar PK} = \frac{(\text{Hasil titrasi sampel} - \text{blanko}) \times N \text{ HCl} \times 0,014 \times 6,25 \times 100\%}{\text{Berat sampel (g)}}$$

Keterangan :

Blanko = Campuran 50 ml aquadest dan 40 ml NaOH 45%
 0,014 = 1 ml alkali equivalen dengan 1 ml larutan N yang mengandung 0,014 g N

6,25 = Protein mengandung 16 % N

N HCl = Normalitas larutan HCl

Produksi protein kasar dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

Produksi protein kasar = Kadar PK x Produksi bahan kering

Metode pengukuran fermentasi secara *in vitro* dimulai dengan sterilisasi alat, dan menimbang sampel dengan berat antara 0,25 - 0,26 g untuk setiap tabung, kemudian penangas air diisi air secukupnya dan mengatur pada temperatur 39°C. Larutan penyangga (McDougall) ditambahkan sebanyak 20 ml dan cairan rumen 5 ml kemudian ditambahkan gas CO₂ untuk menjaga suasana anaerob dan ditutup rapat, tabung fermentor diletakan pada rak penangas air yang bersuhu 39°C, fermentasi dilakukan selama 3 jam kemudian fermentasi dihentikan dengan mendinginkan tabung fermentor lalu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 - 15 menit, larutan supernatan dengan endapan dipisahkan. Larutan supernatan dimasukkan ke dalam botol plastik, selanjutnya dilakukan analisis VFA dan NH₃ rumen.

Analisis produksi *volatile fatty acids* (VFA) dilakukan dengan teknik penyulingan uap. Pertama 5 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung suling khusus, kemudian secara hati-hati ditambahkan 1 ml H₂SO₄ 15%. Tabung suling dimasukkan ke dalam labu suling berisi akuades 700 ml yang telah dihubungkan dengan pendingin Leibig, dimulai destilasi. Hasil destilasi ditangkap dalam erlenmeyer yang telah berisi 5 ml NaOH 0,5N. Destilasi dihentikan bila volume telah mencapai 100 ml, kemudian ditambahkan 2 tetes indikator PP 1% dan dilanjutkan titrasi dengan HCl 0,5 N sampai terjadi perubahan warna. Blanko dibuat dengan destilasi tanpa supernatan.

Perhitungan produksi VFA total :

$$(y - z) \times N \text{ HCl} \times \frac{1000}{5} \text{ mM/l}$$

Keterangan :

- y = ml HCl yang dibutuhkan untuk titrasi 5 ml NaOH (blanko)
 z = ml HCl yang dibutuhkan untuk titrasi hasil destilasi
 N HCl = Normalitas larutan HCl

Analisis produksi NH_3 dilakukan dengan metode mikrodifusi Conway. Cawan Conway dan tutupnya diolesi bagian tepinya dengan vaselin. Bagian tengah cawan dimasukkan 1 ml asam borat dan 1 tetes indikator campuran metil merah dan bromkresol hijau, kemudian 1 ml supernatan dimasukkan ke sisi kiri cawan dan 1 ml larutan sodium karbonat (Na_2CO_3) jenuh dimasukkan pada sisi kanan. Cawan ditutup rapat sehingga tepi cawan tidak ada rongga udara. Secara perlahan cawan digoyang-goyang agar supernatan dan sodium karbonat jenuh bercampur merata kemudian dibiarkan selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah 24 jam cawan dibuka kemudian dilakukan titrasi dengan menggunakan H_2SO_4 0,0055 N hingga terjadi perubahan warna dari ungu menjadi merah muda (asam borat) maka titrasi dihentikan.

Perhitungan produksi amonia rumen :

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

Keterangan :

- $N\text{-NH}_3$ = Produksi $N\text{-NH}_3$ yang diperoleh
 $N \text{ H}_2\text{SO}_4$ = Normalitas larutan H_2SO_4

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 4 x 2 dengan 4 ulangan. Data dianalisis varians (anova) dengan uji F untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kadar protein kasar, produksi *volatile fatty acids* dan produksi amonia.

Model linier aditif sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \square_{ijk}; \quad \begin{array}{l} i = (1,2,3,4) \\ j = (1,2) \\ k = (1,2,3,4) \end{array}$$

Keterangan :

- Y_{ijk} : Hasil pengamatan pada *polybag* percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij
- μ : Nilai tengah umum
- α_i : Pengaruh aditif dari penyiraman air laut ke-i
- β_j : Pengaruh penambahan mulsa Eceng gondok ke-j
- (αβ)_{ij} : Pengaruh interaksi antara penambahan mulsa Eceng gondok ke-i dan penyiraman air laut ke-j
- _{ijk} : Pengaruh galat percobaan pada *polybag* percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

Apabila hasil analisis menunjukkan pengaruh yang nyata maka dilakukan uji beda nilai tengah ganda Duncan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (Steel dan Torrie, 1995).

Hipotesis statistik penelitian adalah sebagai berikut:

- a. H₀ : (αβ)_{ij} = 0 (yang berarti tidak ada pengaruh interaksi antara penyiraman air laut dengan mulsa eceng gondok terhadap hasil kualitas jerami kedelai).
 H₁ : (αβ)_{ij} ≠ 0, minimal ada satu ada pengaruh interaksi antara penyiraman air laut dan mulsa eceng gondok terhadap hasil kualitas jerami kedelai)
- b. H₀ : α_i = 0 (yang berarti tidak ada pengaruh taraf penyiraman air laut terhadap hasil kualitas jerami kedelai)

- H1 : minimal ada satu $\alpha_i \neq 0$, minimal ada satu taraf penyiraman air laut yang mempengaruhi hasil kualitas jerami kedelai
- c. H0 : $\beta_j = 0$ (yang berarti tidak ada pengaruh taraf mulsa eceng gondok terhadap hasil kualitas jerami kedelai)
- H1 : minimal ada satu $\beta_j \neq 0$, minimal ada satu taraf mulsa eceng gondok yang mempengaruhi hasil kualitas jerami kedelai