

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian Pengaruh Penambahan Urease pada Inkubasi Zeolit dan Urea serta Potensinya sebagai Sumber Nitrogen Lepas Lambat secara *In Vitro* dilaksanakan pada 14 Desember 2015 - 9 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 dan tepung kedelai. Bahan yang digunakan yaitu H₂SO₄ pekat dan 0,0055 N, Na₂CO₃ jenuh, vaselin, selenium, NaOH 0,5%, aquades, H₂BO₃ 4%, HCl, larutan McDougall, indikator metil merah dan bromkesol hijau. Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi timbangan analitis, grinder, saringan 40 mesh dan 60 mesh, tanur, eksikator, cawan porcelain, waterbath, seperangkat alat destruksi, buret, mikroburet, gelas ukur 25 ml dan 50 ml, seperangkat alat destilasi, tabung fermentor, sentrifus, cawan Conway, stirrer dan pipet ukur 1 ml.

3.2. Metode

Penelitian dilaksanakan dalam dua tahap, tahap pertama yaitu aktivasi zeolit dan uji fiksasi nitrogen urea oleh zeolit dengan penambahan urease, serta tahap kedua adalah pengukuran kinetika pelepasan NH₃.

3.2.1. Aktivasi zeolit dan uji fiksasi nitrogen.

Tahap pertama adalah proses aktivasi zeolit. Zeolit ukuran 40-60 mesh dipijarkan pada suhu 300°C selama 4 jam (Said *et al.*, 2008), setelah itu tanur dimatikan hingga suhunya turun menjadi ± 120 °C, lalu zeolit dimasukkan pada eksikator. Aktivasi zeolit berguna untuk membersihkan zeolit dari senyawa lain yang terperangkap di dalamnya. Zeolit dan urea masing-masing ditimbang sebanyak 20 g dan 10 g, kemudian tepung kedelai ditimbang sebesar 0,4 g (4%) dari jumlah urea (Ahmed *et al.*, 2002), 0,8 g (8%) dari jumlah urea dan 1,2 g (12%) dari jumlah urea (Suharyono, 2014), serta aquades diukur sebanyak 10 ml. Selanjutnya urea dan tepung kedelai dicampur pada botol yang terbuat dari plastik, kemudian aquades ditambahkan dan digojog hingga homogen, lalu zeolit dimasukkan dan diaduk hingga tercampur merata. Bagian tutup botol ditutup dengan lakban agar NH₃ yang dihasilkan tidak menguap keluar. Inkubasi pada botol dilakukan selama 24 jam, setelah proses inkubasi selesai kemudian zeolit dicuci secara berulang-ulang agar nitrogen yang terdapat pada zeolit benar-benar nitrogen yang terfiksasi oleh zeolit. Zeolit dikering udarakan selama ± 12 jam. Kemudian dilakukan analisis kandungan nitrogen untuk mengetahui tingkat fiksasi nitrogen oleh zeolit dengan penambahan tepung kedelai. Tingkat fiksasi nitrogen oleh zeolit dapat diketahui dengan Uji kandungan N dengan metode Kjeldahl, lalu dihitung jumlah N-nya.

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

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

Kemampuan fiksasi N diukur dengan rumus:

$$\frac{\sum NZ_1 (g) - \sum NZ_0 (g)}{\sum N_{urea} (g)} \times 100\%$$

Keterangan:

$\sum NZ_0$	=	Jumlah N pada zeolit tanpa inkubasi (g)
$\sum NZ_1$	=	Jumlah N pada zeolit setelah inkubasi 24 jam (g)
$\sum N_{urea}$	=	Jumlah N yang terdapat pada urea (g)

Setelah proses perhitungan kadar fiksasi nitrogen, maka pengujian kinetika pelepasan NH_3 secara *in vitro* dilakukan dengan inkubasi 0,55 g zeolit dan 40 ml larutan McDougall pada tabung fermentor, dan kinetika pelepasan NH_3 diamati pada jam ke-1, 3, 5, dan 7.

3.2.2. Kinetika pelepasan amonia

Proses kinetika pelepasan amonia diukur dengan metode mikrodifusi Conway (General Laboratory Procedures, 1966) yaitu sampel ditimbang sebesar 0,55-0,56 g dan larutan McDougall sebanyak 40 ml ditambahkan ke dalam tabung fermentor, proses inkubasi dilakukan dalam waterbath pada suhu 39°C (Suharyono, 2014), hal ini bertujuan agar tercipta kondisi suhu yang sama dengan kondisi rumen asli. Konsentrasi NH_3 tersebut diamati pada jam ke-1, 3, 5 dan 7 (Jayanegara *et al.*, 2006). Setelah proses inkubasi selesai semua sampel disentrifus selama 8-10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah proses sentrifus selesai maka akan terpisah antara endapan dan supernatan. Selanjutnya supernatan tersebut dimasukkan pada botol, lalu dilakukan analisis konsentrasi NH_3 . Cawan Conway dan tutupnya disiapkan dan diolesi vaselin bagian tepinya.

Asam borat sebanyak 1 ml dan indikator metil merah dan bromkresol hijau sebanyak 2 tetes dimasukkan pada bagian tengah. Kemudian 1 ml larutan supernatan dan 1 ml larutan natrium karbonat jenuh dimasukkan pada masing-masing sisi yang berbeda. Cawan Conway ditutup dan digoyang - goyang secara perlahan hingga supernatan dan natrium karbonat jenuh tercampur. Cawan Conway didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar agar amonia dapat diikat oleh asam borat. Kemudian asam borat pada cawan Conway dititrasi dengan asam sulfat 0,0055 N sampai terjadi perubahan warna dari ungu menjadi merah muda.

Kadar NH_3 dihitung dengan rumus (Conway, 1962):

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

Keterangan:

Titran = Hasil titrasi

NH_3 = Konsentrasi NH_3 yang diperoleh

$\text{N H}_2\text{SO}_4$ = Normalitas larutan H_2SO_4

3.3. Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu rancangan acak lengkap (RAL) 4 perlakuan x 4 ulangan.

T_0 = Inkubasi zeolit dan urea tanpa penambahan tepung kedelai

T_1 = Inkubasi zeolit dan urea dengan penambahan tepung kedelai 4%.

T_2 = Inkubasi zeolit dan urea dengan penambahan tepung kedelai 8%.

T_3 = Inkubasi zeolit dan urea dengan penambahan tepung kedelai 12%.

3.4. Model Linear Aditif

Model linear untuk seluruh nilai pengamatan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

i	=	Perlakuan (1,2,3,4)
j	=	Ulangan (1,2,3,4)
Y_{ij}	=	Hasil pengamatan inkubasi zeolit dan urea ke-j, yang memperoleh perlakuan penambahan tepung kedelai (sumber urease) ke-i
μ	=	Nilai tengah / rata-rata umum
τ_i	=	Pengaruh aditif dari perlakuan penambahan tepung kedelai (sumber urease) ke-i
ϵ_{ij}	=	Perlakuan galat percobaan pada inkubasi zeolit dan urea ke-j yang memperoleh perlakuan penambahan tepung kedelai (sumber urease) ke-i

Kinetika pelepasan NH_3 diukur dengan 4 kali ulangan dan 4 titik jam inkubasi yaitu jam ke-1, 3, 5, dan 7.

Hipotesis statistik:

$H_0 : \mu_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$, Tidak ada pengaruh perlakuan penambahan urease pada inkubasi zeolit dan urea terhadap kemampuan fiksasi nitrogen zeolit.

$H_1 : \mu_0 \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$, Minimal ada satu perlakuan penambahan urease pada inkubasi zeolit dan urea yang berpengaruh terhadap kemampuan fiksasi nitrogen zeolit.