

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Mei - September 2010 di Laboratorium Teknologi Makanan Ternak dan Laboratorium Ilmu Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Diponegoro, Semarang.

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

Materi yang digunakan yaitu tongkol jagung yang diperoleh dari Purwodadi, urea sebagai bahan amoniasi, starter mikroba komersial (Biofad) mengandung mikroba rumen dan kolon sapi, diperkaya dengan mikroba "*inner rhizosphere*" akar tanaman *graminae*, produksi Grobogan sebagai bahan fermentasi, akuades dan bahan kimia yang meliputi asam sulfat, asam borat, sodium karbonat, indikator merah metyl dan bromkresol, vaselin, NaOH 0,5N, indikator phenolptalein dan larutan McDougall.

Peralatan yang digunakan pada proses amoniasi meliputi parang/pisau besar untuk mencacah tongkol jagung, stopless, botol kaca, kantong plastik, gelas ukur, alat pengaduk, timbangan kapasitas 2 kg dengan ketelitian 0,002 g, nampan, pH meter untuk mengukur derajat keasaman pada proses fermentasi, termometer, kertas label dan alat tulis. Peralatan yang digunakan dalam analisis VFA dan NH<sub>3</sub> yaitu cawan conway, gelas beaker volume 250 ml, stirer, peralatan titrasi, pipet, labu destilasi, tabung suling, pendingin leibig, erlenmeyer 250 ml, pipet ukur, buret dan kompor.

## **3.2. Metode Penelitian**

### **3.2.1. Prosedur penelitian**

Kegiatan penelitian terbagi dalam empat tahapan, yaitu tahap persiapan, amoniasi, fermentasi dan tahap analisis laboratorium. Tahap persiapan meliputi pengadaan tongkol jagung, penyediaan urea, starter komersial, dan botol kaca. Tahap amoniasi dilakukan dengan cara basah menurut Komar (1984) yang telah dimodifikasi menggunakan suhu pemeraman 60°C dan kadar amonia 5% dengan lama penyimpanan 2 hari. Tahap fermentasi dilakukan terhadap tongkol jagung teramoniasi yang memiliki kadar protein tertinggi dengan menggunakan starter mikroba komersial pada aras 0, 1 dan 2% terhadap bahan kering dan lama peram yang berbeda yaitu 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu. Tahap analisis yaitu mengaiamati produksi VFA dan NH<sub>3</sub>.

### **3.2.2. Rancangan percobaan**

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial : (3 x 5) dengan masing-masing perlakuan memakai 3 ulangan. Faktor pertama (S) adalah aras starter komersial (0, 1 dan 2% terhadap BK), sedangkan faktor ke dua (T) adalah lama pemeraman (0, 1, 2, 3 dan 4 minggu). Perlakuan pendahuluan yang dilakukan yaitu amoniasi tongkol jagung dengan menggunakan amonia 5% terhadap bahan kering tongkol jagung yang dilanjutkan dengan fermentasi terhadap hasil kandungan

protein kasar terbaik dari amoniasi. Proses fermentasi dengan penambahan starter komersial 0, 1 dan 2% terhadap bahan kering. Kemudian dilakukan pemeraman dengan lama peram 0, 1, 2, 3 dan 4 minggu. Parameter yang diamati adalah produksi VFA dan  $\text{NH}_3$ .

Kombinasi perlakuan yang dicobakan sebagai berikut :

$S_0T_0$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 0% + peram 0 minggu

$S_0T_1$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 0% + peram 1 minggu

$S_0T_2$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 0% + peram 2 minggu

$S_0T_3$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 0% + peram 3 minggu

$S_0T_4$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 0% + peram 4 minggu

$S_1T_0$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 1% + peram 0 minggu

$S_1T_1$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 1% + peram 1 minggu

$S_1T_2$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 1% + peram 2 minggu

$S_1T_3$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 1% + peram 3 minggu

$S_1T_4$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 1% + peram 4 minggu

$S_2T_0$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 2% + peram 0 minggu

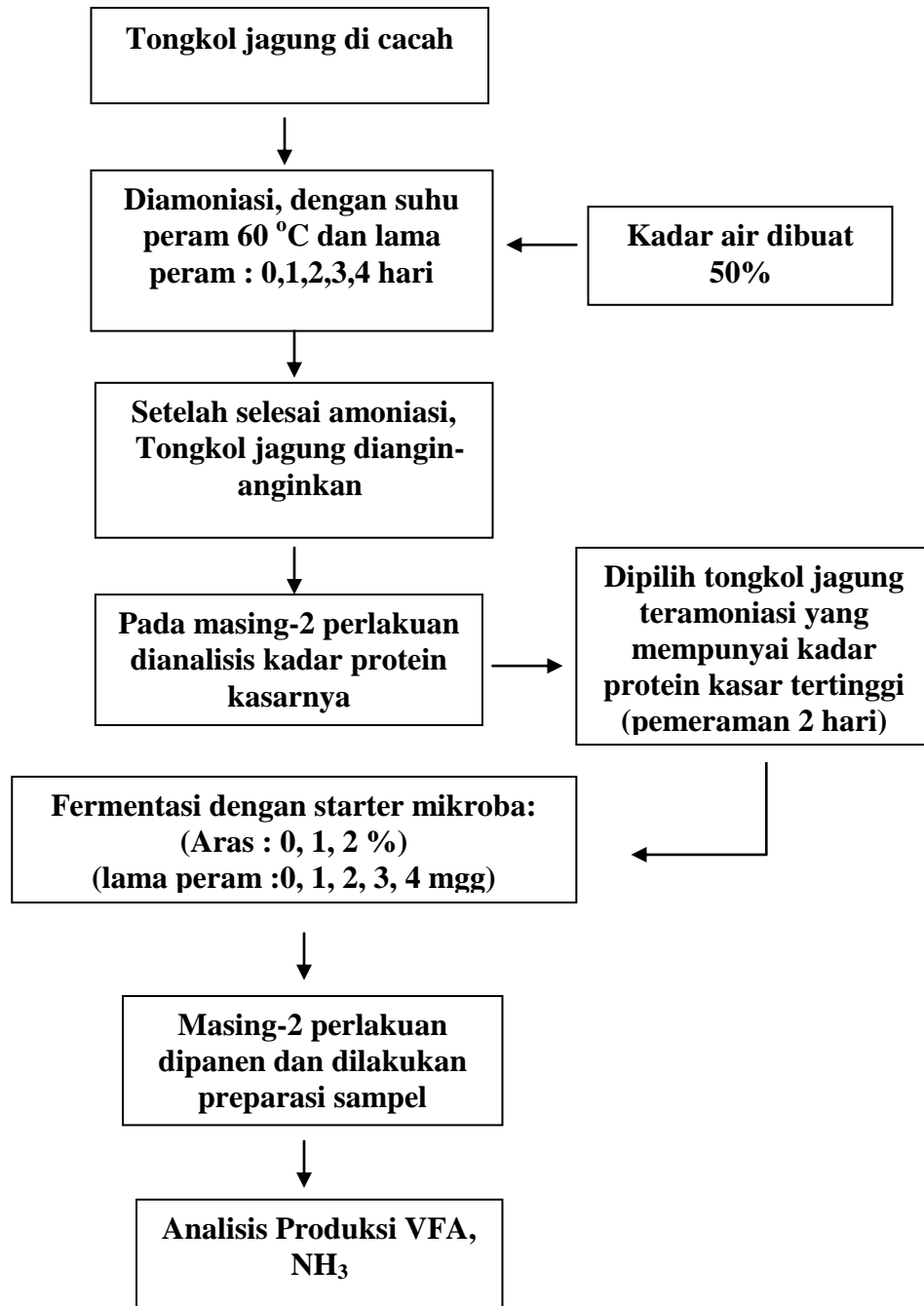
$S_2T_1$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 2% + peram 1 minggu

$S_2T_2$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 2% + peram 2 minggu

$S_2T_3$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 2% + peram 3 minggu

$S_2T_4$  = tongkol jagung teramoniasi + starter komersial 2% + peram 4 minggu

Alur tahapan kegiatan penelitian dapat dilihat pada Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Tahapan Kegiatan Penelitian

### **3.3. Analisis Laboratorium**

#### **3.3.1. Analisis *volatile fatty acids***

Sampel pakan yang akan di analisis VFA ditimbang sebanyak 0,55-0,56 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung fermentor. Menambahkan 10 ml cairan rumen dan 40 ml larutan penyangga McDougall ke dalam tabung fermentor yang telah berisi sampel pakan komplit dan dialiri CO<sub>2</sub> agar suasana menjadi anaerob lalu ditutup rapat. Tabung fermentor tersebut kemudian diinkubasi ke dalam penangas air bersuhu 38-39°C. Sampel di usahakan dapat bercampur secara merata dengan cairan rumen dan larutan penyangga agar pakan dapat difermentasikan seluruhnya oleh mikroba rumen. Keadaan sampel harus setabil sesuai dengan keadaan di dalam rumen sapi agar fermentasi berjalan optimum. Sampel yang telah diinkubasi selama 3 jam, kemudian diangkat dari inkubator untuk dihentikan proses fermentasinya. Penghentian fermentasi dilakukan dengan merendam setengah dari bagian tabung ke air dingin. Sampel kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit agar dapat diambil supernatannya. Supernatan diambil 5 ml dimasukan kedalam tabung suling khusus dengan ditambahkan 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15% dan dimasukkan kedalam labu suling yang berisi air 600 ml, kemudian dihubungkan dengan pendingin leibig untuk didestilasi. Hasil destilasi ditampung dalam erlenmeyer yang berisi 5 ml NaOH 0,5 N. Destilasi dihentikan apabila volume erlenmeyer telah mencapai 100 ml. Erlenmeyer diambil dan diberi indikator

phenolptalein 1% sebanyak 2 tetes, kemudian dilakukan titrasi menggunakan HCl 0,5 N hingga terjadi perubahan warna dari pink menjadi jernih. Blangko dibuat dengan menggunakan 5 ml NaOH 0,5 N yang telah diberi indikator phenolptalein 1%, kemudian dititrasi dengan HCl 0,5 N.

Perhitungan produksi VFA total:

$$\text{VFA} = (Y-Z) \times N \text{ HCl} \times 1000/5 \text{ mM}$$

Keterangan:

Y = ml HCl yang dibutuhkan untuk titrasi blanko.

Z = ml HCl yang dibutuhkan untuk titrasi hasil destilasi.

N = normalitas HCl.

### **3.3.2. Analisis NH<sub>3</sub>**

Pengukuran produksi NH<sub>3</sub> diukur dengan teknik mikrodifusi Conway. Langkah pertama mempersiapkan larutan supernatant terlebih dahulu. Sampel sejumlah 0,55-0,56 g dimasukkan ke dalam tabung fermentor dan di tambah 10 ml cairan rumen serta 40 ml larutan penyangga. Tabung fermentor tersebut dialiri gas CO<sub>2</sub> dan segera ditutup dengan tutup tabung. Tabung fermentor yang telah tertutup rapat kemudian dimasukkan ke dalam waterbart bersuhu 39°C. Sampel di usahakan dapat bercampur secara merata dengan cairan rumen dan larutan penyangga agar pakan dapat difermentasikan seluruhnya oleh mikroba rumen. Keadaan sampel harus setabil sesuai dengan keadaan di dalam rumen sapi agar fermentasi berjalan optimum. Sampel yang telah diinkubasi selama 3 jam, kemudian diangkat dari inkubator untuk dihentikan proses fermentasinya. Penghentian fermentasi dilakukan dengan

merendam setengah dari bagian tabung ke air dingin. Sampel kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit agar dapat diambil supernatnya. Bagian tepi cawan Conway dan tutupnya diolesi dengan vaselin agar cawan Conway tertutup rapat dan mudah terjadi ikatan antara asam borat ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) dengan  $\text{NH}_3$ . Memasukkan 1 ml asam borat ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) dengan indikator metil merah dan bromkresol hijau pada bagian tengah cawan. Bagian tepi cawan dimasukkan 1 ml supernatan dan 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  jenuh dimasukkan ke dalam bagian tepi cawan yang lain melalui sisi yang berbeda. Cawan ditutup rapat kemudian digoyang-goyang secara perlahan agar supernatan dengan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  jenuh dapat bercampur. Cawan didiamkan selama 24 jam agar semua  $\text{NH}_3$  dapat diikat oleh asam borat ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ). Titrasi dilakukan dengan menggunakan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,0055 N hingga terjadi perubahan warna yang semula ungu menjadi merah muda.

Perhitungan kadar  $\text{NH}_3$  :

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

Keterangan:

ml titrasi : ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  yang digunakan untuk menitrasi hasil sulingan sampel  
 ml blanko : ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  digunakan untuk menitrasi hasil sulingan blanko  
 N : normalitas  $\text{H}_2\text{SO}_4$  yang digunakan untuk titrasi

### 3.4. Analisis Data

Data yang diperoleh diuji dengan analisis ragam pada taraf 5%. Apabila ada pengaruh nyata, akan diuji lanjut menggunakan uji wilayah ganda Duncan untuk

mengetahui perbedaan nilai tengah antar perlakuan. Metode linier yang digunakan adalah sebagai berikut (Stell and Torrie, 1991).

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

Keterangan :

- $Y_{ijk}$  = nilai hasil pengamatan akibat pengaruh perlakuan aras “biofad” ke-i, lama ke-j, dan ulangan ke-k  
 $\mu$  = rata-rata umum hasil pengamatan perlakuan  
 $\alpha_i$  = pengaruh perlakuan aras “biofad” ke-i (0, 1, 2%)  
 $\beta_j$  = pengaruh lama ke-j (0, 1, 2, 3, 4 minggu)  
 $(\alpha\beta)_{ij}$  = pengaruh interaksi perlakuan ke-i dan lama ke-j  
 $\varepsilon_{ijk}$  = pengaruh galat perlakuan pada aras “biofad” ke-i dan lama ke-j serta ulangan ke-k  
*i* = aras “biofad” yang akan diberikan (0,1, 2%)  
*j* = lama pemeraman yang dilakukan (0,1, 2, 3, 4 minggu)  
*k* = banyaknya ulangan yang digunakan (1,2 dan 3)

### 3.4.1. Hipotesis statistik

Hipotesis statistik yang digunakan adalah:

- $H_0 : \tau_i = 0$  Perlakuan fermentasi dengan aras starter dan lama peram yang berbeda menggunakan starter komersial “Biofad” tidak berpengaruh terhadap VFA dan  $NH_3$ .  
 $H_1 : \tau_i \neq 0$  Perlakuan fermentasi dengan aras starter dan lama peram yang berbeda menggunakan starter komersial “Biofad” berpengaruh terhadap VFA dan  $NH_3$ .

Kriteria pengujian yaitu :

$F_{hit} < F_{tab}$  maka  $H_0$  diterima

$F_{hit} \geq F_{tab}$  maka  $H_0$  ditolak