

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dengan judul kelarutan senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan daun kelor (*Moringa oleifera*) di dalam rumen secara *in vitro* dilakukan pada bulan Agustus 2016 sampai Desember 2016 di kandang Fakultas Peternakan dan Pertanian, penelitian secara laboratoris dilakukan di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian yaitu 1.) daun kelor yang berasal dari daerah Jepara serta daun lamtoro (berasal dari daerah Tembalang) sebagai referensi, 2.) kemikalia untuk uji *in vitro*, 3.) kemikalia untuk analisis total fenol dan aktivitas antioksidan, 4.) kambing berfistula 2 ekor untuk pengambilan cairan rumen. Kambing diberi pakan dengan komposisi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Formulasi Ransum Kambing Berfistula.

| Bahan Pakan | Formula | PK bahan | PK pakan | TDN bahan | TDN pakan |
|-----------------|---------|----------|----------|-----------|-----------|
| -----% BK----- | | | | | |
| Gaplek | 1,1 | 5,33 | 0,06 | 74,58 | 0,82 |
| Tetes | 1,0 | 0,66 | 0,01 | 75,01 | 0,75 |
| Bungkil kedelai | 17,0 | 35,97 | 6,11 | 81,10 | 13,79 |
| Bekatul | 10,7 | 9,70 | 1,04 | 67,48 | 7,22 |
| Mineral | 0,2 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Rmput gajah | 70,0 | 7,02 | 4,91 | 54,85 | 38,39 |
| Jumlah | 100 | | 12,13 | | 60,97 |

3.2. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan tahap-tahap yang meliputi uji *in vitro* untuk mengkaji degradabilitas bahan kering, kelarutan fenol dan aktivitas antioksidan pada daun kelor dan lamtoro. Degradabilitas bahan kering dilakukan sesuai dengan metode Tilley dan Terry (1963). Analisis total fenol dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu Vazquez *et al.*, (2008). Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH atau 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (Fitri *et al.*, 2015).

3.2.1. Metode pengujian degradabilitas bahan kering secara *in vitro*

Uji degrababilitas bahan kering secara *in vitro* dilakukan dengan pengambilan cairan rumen pada kambing berfistula yang meliputi persiapan alat dan bahan penelitian. Inkubasi dilakukan menurut metode Tilley dan Terry (1963). Sampel ditimbang $\pm 0,5$ g dimasukkan dalam tabung fermentor yang diletakkan dalam pengangas air bersuhu 39°C. Bahan yang digunakan 40 ml larutan saliva buatan dan 10 ml cairan rumen. Proses fermentasi dilakukan secara anaerob dengan menambahkan gas CO₂ ke dalam tabung kemudian selama 48 jam disetiap 6 jam sekali dilakukan penggojokan. Fermentasi dihentikan dengan merendam tabung fermentor dalam air dingin, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 – 15 menit. Endapan dipisahkan dengan supernatan. Endapan didapatkan dengan cara disaring menggunakan kertas saring *Whatman* 41 dengan pompa vakum. Bahan kering diperoleh dengan cara menguapkan air dengan oven bersuhu 40°C selama ± 2 hari hingga beratnya konstan. Residu dan supernatan selanjutnya digunakan untuk analisis total fenol dan aktivitas antioksidan.

$$\text{Degradabilitas BK} = \frac{\text{Bobot BK sampel} - (\text{BK Residu} - \text{BK Blanko})}{\text{Bobot BK sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

Bobot BK = bobot sampel x % BK

Bobot residu = bobot endapan setelah dioven 40° C

Bobot blanko = bobot endapan cairan rumen setelah dioven 40° C

3.2.2. Metode analisis total fenol

Analisis total fenol menggunakan metode Folin-Ciocalteu Vazquez dkk., (2008) dengan tahap sebagai berikut:

Langkah I

Sampel residu pakan ditimbang sebesar 0,5-1 g kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap. Proses maserasi dilakukan dengan menambahkan metanol sebanyak 5 ml ke dalam sampel lalu didiamkan selama 3 hari. Larutan diaduk satu kali sehari selama 3 hari. Supernatan diperoleh dengan menyaring larutan menggunakan kertas saring (larutan I).

Lima tabung reaksi disiapkan untuk standart dan 3 tabung reaksi untuk sampel. Asam galat digunakan sebagai standart fenol. Asam galat ditimbang sebanyak 1 mg kemudian ditambahkan 5 ml metanol. Campuran larutan dimasukkan ke dalam botol gelap lalu dihomogenkan. Folin ditambahkan ke dalam botol gelap dan ditambah dengan aquades.

Standart asam galat ditunjukkan dengan melihat Tabel 2.

Tabel 2. Standart Asam Galat

| Konsentrasi | Asam Galat | Aquades |
|-------------|-----------------|---------|
| | ------(ml)----- | |
| 0 | 0 | 8,5 |
| 0,02 | 0,1 | 8,4 |
| 0,04 | 0,2 | 8,3 |
| 0,06 | 0,3 | 8,2 |
| 0,08 | 0,4 | 8,1 |

Supernatan sampel ditunjukkan dengan melihat Tabel 3.

Tabel 3. Supernatan Sampel

| Sampel | Pengenceran | Aquades | Folin |
|--------|-----------------|---------|-------|
| | ------(ml)----- | | |
| A | 0,5 | 8 | 0,5 |
| B | 0,5 | 8 | 0,5 |
| C | 0,5 | 8 | 0,5 |

Langkah II

Pengenceran I dilakukan dengan mengambil supernatan 0,5 ml dari supernatan larutan I. Supernatan kemudian ditambahkan 10 ml metanol.

Pengenceran II dilakukan dengan memasukkan 0,5 ml supernatan ke dalam tabung A,B,C dan ditambah aquades 8 ml. Larutan folin dimasukkan kedalam tabung A,B,C dan tabung standar 0,1,2,3,4,5 sebanyak 0,5 ml kemudian diamkan selama 10 menit. Menambahkan Na_2CO_3 sebanyak 1 ml ke dalam semua tabung secara urut, diamkan selama 30 menit. Pembacaan fenol dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 750 nm. Kelarutan senyawa fenol di dalam rumen dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

Kelarutan fenol (%) =

$$\frac{\text{berat fenol masuk} - (\text{berat fenol residu} - \text{berat fenol blanko residu})}{\text{berat fenol masuk}} \times 100\%$$

3.2.3. Metode analisis aktivitas antioksidan

Analisis aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH atau 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (Fitri *et al.*, 2015) dengan tahap sebagai berikut:

Langkah 1

Sampel residu pakan ditimbang sebanyak 1 g kemudian dimasukkan dalam botol gelap lalu ditambah dengan metanol sebanyak 10 ml. Sampel diaduk lalu dimaserasi selama 3 hari. Setiap hari sampel diaduk sekali. Pada hari kedua sampel dimasukkan ke dalam lemari es dan didiamkan selama 1 hari. Sampel disaring dengan kertas saring untuk mendapatkan supernatan. Konsentrasi residu 5 mg/ml dengan perbandingan sampel 1 ml indukan dan 9 ml metanol kemudian dihomogenkan.

Enam tabung reaksi disiapkan dengan konsentrasi bertingkat yaitu tabung standart, 40 µl, 80 µl, 120 µl, 160 µl dan 200 µl. Metanol dan DPPH disiapkan. Secara berurutan sampel, metanol dan DPPH dimasukkan kedalam tabung reaksi. Sampel, methanol dan DPPH ditunjukkan dengan melihat Tabel 4.

Tabel 4. Sampel, Methanol dan DPPH

| Konsentrasi | Sampel -----(µl)----- | Metanol | DPPH (ml) |
|-------------|---------------------------|---------|--------------|
| Kontrol | 0 | 200 | 3,8 |
| 40 | 40 | 160 | 3,8 |
| 80 | 80 | 120 | 3,8 |
| 120 | 120 | 80 | 3,8 |
| 160 | 160 | 40 | 3,8 |
| 200 | 200 | 0 | 3,8 |

Tabung reaksi didiamkan selama 30 menit lalu pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 515 nm. Aktivitas penghambatan radikal dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

Aktivitas Antioksidan (IC 50) = 50 ± Rumus Linear ($y = a(x) \pm b$)

3.3. Analisis Data

Data degradabilitas bahan kering, kelarutan senyawa fenol dan aktivitas antioksidan dianalisis statistika. Untuk mengetahui perbedaan kelarutan senyawa fenol dan aktivitas antioksidan pada kelor dan lamtoro dilakukan dengan uji T (T-Test) dengan rumus (Sudjana, 1975) sebagai berikut:

$$T \text{ hitung} : \frac{x_1 - x_2}{Sp \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$Sp : Sp^2 = \frac{n_1 - 1 S^2 X_1 + (n_2 - 1) S^2 X_2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Keterangan:

- X_1 = rata-rata kelompok 1
- X_2 = rata-rata kelompok 2
- Sp = Standar deviasi gabungan
- S_1 = Standar deviasi kelompok 1
- S_2 = Standar deviasi kelompok 2
- n_1 = banyaknya sampel dikelompok 1
- n_2 = banyaknya sampel dikelompok 2
- DF = $n_1 + n_2 - 2$

Hipotesis Statistik

H0 = $\mu_1 - \mu_2 = 0$ (Tidak ada perbedaan degradabilitas BK (bahan kering), kelarutan senyawa fenol dan aktivitas antioksidan pada daun kelor dan lamtoro di dalam rumen kambing).

H1 = $\mu_1 - \mu_2 \neq 0$ (Terdapat perbedaan degradabilitas BK (bahan kering), kelarutan senyawa fenol dan aktivitas antioksidan pada daun kelor dan lamtoro di dalam rumen kambing).

Hipotesis yang akan diuji yaitu :

H0 : $\tau_1 = \tau_2$; Jika T hitung < T tabel maka H0 diterima dan H1 ditolak

H1 : $\tau_1 \neq 0$; Jika T hitung \geq T tabel maka H0 ditolak dan H1 diterima