

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dengan judul produksi VFA, NH_3 dan protein total pada *fodder* jagung hidroponik dengan media perendaman dan penggunaan dosis pupuk yang berbeda dilakukan pada tanggal 10 Juni 2016 sampai 30 November 2016 di *green house* Fakultas Peternakan dan Pertanian. Penelitian secara laboratoris dilakukan di laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian meliputi benih jagung sebagai bahan yang akan dikecambahkan sebagai *fodder*, larutan nutrisi AB mix, larutan H_2SO_4 0,001 M dan air untuk media perendaman benih jagung serta pupuk majemuk gandasil D sebagai zat yang ditambahkan sebagai perlakuan. Bahan yang dibutuhkan untuk uji VFA antara lain H_2SO_4 15% NaOH 0,5 N, HCl 0,5 N dan indikator PP 1%. Bahan yang digunakan untuk uji NH_3 antara lain indikator *Methyl Red*, indikator *Brom Cressol Green*, asam borat, H_2SO_4 0,0055 N dan Na_2CO_3 jenuh. Bahan yang dibutuhkan untuk uji Protein Total antara lain campuran TCA 20% dan SSA 2%, H_2SO_4 pekat, selenium, akuades, NaOH, H_3BO_3 , campuran indikator *Methyl Red* dan *Methyl Blue* dan HCl 0,1 N.

Alat yang digunakan antara lain nampan sebagai tempat media tumbuh *fodder* jagung, timbangan untuk mengukur berat tanaman saat panen, sprayer

untuk menyemprotkan air untuk menjaga kelembaban tanaman, alat tulis untuk mencatat hasil pengamatan, dan alat-alat laboratorium yang berupa tabung fermentor, *waterbath*, gelas beker, sentrifus, tabung sentrifus, cawan Cownway, pipet, buret, labu *Erlenmeyer*, seperangkat alat destilasi, kertas saring, timbangan digital, tabung reaksi, oven, tanur dan eksikator untuk melakukan analisis.

3.2. Metode

3.2.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 2 x 3 dengan ulangan sebanyak 3 kali. Faktor pertama adalah media perendaman dengan M0 (tanpa direndam H₂SO₄ 0,001 M) dan M₁ (dengan perendaman H₂SO₄ 0,001 M), faktor kedua adalah dosis pupuk majemuk gandasil D dilambangkan dengan N0 (dosis pupuk gandasil D 0 gram/l air), N1 (dosis pupuk gandasil D 0,5 gram/l air) dan N2 (dosis pupuk gandasil D 1 gram/l air). Kombinasi perlakuan ditulis selengkapnya disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan dengan 3 Ulangan

Perlakuan	Banyak Ulangan			
	U1	U2	U3	
M0	N0	M0N0U1	M0N0U2	M0N0U3
M1		M1N0U1	M1N0U2	M1N0U3
M0	N1	M0N1U1	M0N1U2	M0N1U3
M1		M1N1U1	M1N1U2	M1N1U3
M0	N2	M0N2U1	M0N2U2	M0N2U3
M1		M1N2U1	M1N2U2	M1N2U3

Keterangan :

M₀ (tanpa direndam H₂SO₄ 0,001 M)

M₁ (dengan perendaman H₂SO₄ 0,001 M)

N₀ (dengan dosis pupuk gandasil D 0%)

N₁ (dengan dosis pupuk gandasil D 0,5 gram/l air)

N₂ (dengan dosis pupuk gandasil D 1 gram/l air)

3.2.2. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama yaitu pembuatan fodder jagung hidroponik yang meliputi persiapan lokasi, alat dan bahan penelitian. Benih jagung yang akan ditumbuhkan dipilih dan diseleksi. Media tumbuh berupa nampan yang terbuat dari plastik dengan ukuran 53 x 33 cm dipersiapkan terlebih dahulu. Benih yang telah disortir direndam dalam larutan H₂SO₄ 0,001 M sebanyak 6 ml untuk 1 liter air selama 30 menit dan kemudian ditiriskan untuk direndam ke dalam air selama 24 jam. Benih yang tidak mendapat perlakuan perendaman larutan H₂SO₄ 0,001 M langsung direndam ke dalam air selama 24 jam. Benih ditempatkan kedalam media tumbuh berupa nampan yang telah dilubangi dengan jumlah 700 g/nampan. Pemupukan dilakukan saat tanaman berusia 3 dan 13 hari. Setiap 2 jam sekali dilakukan penyemprotan larutan nutrient AB mix sebagai pensuplai nutrisi dan untuk menjaga kelembaban tanaman. Pemanenan akan dilakukan pada hari ke-15. Kemudian sampel dijemur hingga kering dan kemudian ditepungkan. Tahap kedua adalah mengukur produksi VFA, NH₃, dan protein total pada fodder jagung hidroponik secara *in vitro* di laboratorium.

Pembuatan Supernatan

Pembuatan supernatan dilakukan dengan menimbang sampel sebanyak 0,55 – 0,56 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung fermentor. Cairan rumen sebanyak 10 ml dan larutan McDougall sebanyak 40 ml sebagai *buffer* dimasukkan ke dalam tabung fermentor, kemudian diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 40-42⁰ C selama 3 jam. Hasil inkubasi disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Hasil sentrifugasi dipisahkan larutan supernatan dan endapan.

Metode Pengukuran Produksi VFA

Analisis VFA dilakukan dengan teknik penyulingan (destilasi) uap (General Laboratory Procedure, 1966). Supernatan sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung suling khusus, lalu ditambahkan 1 ml H₂SO₄ 15 %. Tabung suling dimasukkan ke dalam labu suling berisi akuades sebanyak 700 ml yang telah dihubungkan dengan pendingin Leibig dan tabung segera ditutup. Proses destilasi dilakukan dengan cara memanaskan labu suling hingga akuades mendidih. Uap air panas akan mendesak VFA dan akan terkondensasi di dalam pendingin. Destilat ditampung dalam labu Erlenmeyer yang berisi 5 ml NaOH 0,5 N sehingga volumenya mencapai 100 ml. Setelah itu ditambahkan indikator *phenolptalein* 1% sebanyak 2 tetes dan dititrasi dengan HCl 0,5 N sampai warna titrat berubah dari merah jambu menjadi bening. Penentuan blanko dilakukan

dengan cara sama seperti analisis VFA namun tidak menggunakan supernatan dari sampel percobaan. Rumus perhitungan produksi VFA total sebagai berikut.

$$\text{VFA total (mM)} = (\text{Titran blanko} - \text{Titran sampel}) \times \text{N HCl} \times 1000/5 \text{ mM}$$

Keterangan :

N-HCl = Normalitas larutan HCl

Titran blanko = Jumlah titer HCl untuk menitrasi 5 ml NaOH (blanko)

Titran sampel = Jumlah titer HCl untuk menitrasi hasil destilasi

Metode Pengukuran Produksi NH₃

Analisis produksi NH₃ dilakukan dengan metode mikrodifusi Conway (General Laboratory Procedure, 1966). Permukaan cawan Conway dan tutup cawan diolesi dengan vaselin. Supernatan hasil dari sentrifugasi diambil sebanyak 1 ml dan ditempatkan pada salah satu sisi sekat cawan. Larutan Na₂CO₃ jenuh sebanyak 1 ml diletakkan di sisi cawan yang lain (kedua bahan tidak boleh bercampur sebelum tutup cawan ditutup rapat). Asam borat 1 ml dan 1 tetes indikator campuran metal merah dan bromkresol hijau dimasukkan ke cawan kecil yang terletak di tengah cawan Conway. Cawan Conway ditutup rapat dengan tutup cawan dan digerakkan perlahan hingga supernatan dan Na₂CO₃ tercampur rata dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah 24 jam tutup cawan dibuka dan bagian tengah cawan dititrasi dengan menggunakan H₂SO₄ 0,0055 N sampai warnanya berubah dari biru menjadi kemerah-merahan.

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

Keterangan :

ml H_2SO_4 titran = Jumlah ml H_2SO_4 yang digunakan untuk titrasi
N H_2SO_4 = Normalitas larutan H_2SO_4

Metode Pengukuran Protein Total

Analisis protein total dilakukan metode General Laboratory Procedure (1966). Sampel ditimbang sebanyak 0,55 – 0,56 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung fermentor. Cairan rumen sebanyak 10 ml dan larutan McDougall sebanyak 40 ml sebagai buffer dimasukkan ke dalam tabung fermentor, kemudian diinkubasi pada waterbath hingga 3 jam. Hasil sampel yang sudah diinkubasi diambil sebanyak 10 ml ditambah dengan 20 ml larutan campuran trichloroacetic acid (TCA) 20% dan sulphosalicylic acid (SSA) 2%. Sampel didiamkan selama 24 jam, setelah itu disaring pada kertas Whatman 41 yang sudah dioven pada suhu 105°C. Sampel yang sudah disaring dioven pada suhu 105°C sampai berat konstan dan ditimbang. Endapan dan kertas saring dilakukan analisis protein menggunakan metode Kjeldahl. Tiga tahap prinsip menentukan protein yaitu destruksi, destilasi dan titrasi. Tahap destruksi dilakukan dengan memasukkan sampel ke dalam labu destruksi. Sampel ditambahkan selenium dan H_2SO_4 pekat kemudian dilakukan destruksi dengan kompor dalam lemari asam selama ± 1 jam sampai larutan berwarna hijau bening. Hasil destruksi didinginkan kemudian masuk dalam tahap destilasi. Hasil sampel destruksi yang sudah dingin dimasukkan ke dalam tabung destilasi, lalu ditambahkan 90 ml akuades dan 40 ml

NaOH 45% dan tabung segera ditutup. Proses destilasi dilakukan dengan cara menghubungkan tabung dengan labu yang berisi air mendidih. Uap air panas akan mendesak N yang menguap dan akan terkondensasi di dalam pendingin. Destilat ditampung dalam labu Erlenmeyer yang berisi 15 ml asam borat 4% yang sudah ditambahkan 2 tetes indikator MR dan MB sehingga volumenya mencapai 100 ml. Hasil proses destilasi dilakukan titrasi dengan HCl 0,1 N sampai warna titrat berubah dari hijau menjadi ungu kembali. Penentuan blanko dilakukan dengan cara sama seperti analisis Protein total namun tidak menggunakan supernatan dari sampel percobaan. Perhitungan protein total menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Protein total (mg/g)} = \frac{(\text{ml HCl titran} - \text{ml HCl blanko}) \times \text{N HCl} \times 14 \times 6,25}{\text{Bobot sampel endapan (g)}}$$

Keterangan :

Titran sampel = volume HCl yang dibutuhkan untuk titrasi hasil destilasi (ml)

Titran blanko = volume HCl yang dibutuhkan untuk titrasi blanko (ml)

N HCl = normalitas HCl yang digunakan untuk titrasi

6,25 = faktor kelipatan N yang diperoleh dari 100/16

14 = 1 ml larutan alkali ekuivalen dengan 1 ml larutan yang mengandung 14 mg N

3.3. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam (*Analysis of Variance*) dan jika berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji beda Duncan multiple range test (DMRT) berdasarkan pertunjuk Steel dan Torrie (1990).

Model linear aditif yang menunjukkan setiap nilai atau pengaruh berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial adalah sebagai berikut:

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

$$i = (1,2); j = (1,2,3); k = (1,2,3,4)$$

Keterangan :

Y_{ijk} = Produksi VFA, NH_3 , atau protein total *fodder* jagung hidroponik pada nampan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij (taraf ke-i dari media perendaman dan taraf ke-j dari dosis pupuk majemuk gandasil D)

μ = Nilai tengah umum (rata-rata populasi) produksi VFA, NH_3 , atau protein total *fodder* jagung hidroponik.

α_i = Pengaruh aditif dari taraf media perendaman ke-i

β_j = Pengaruh aditif dari taraf dosis pupuk majemuk gandasil D ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh interaksi antara media perendaman ke-i dan taraf dosis pupuk gandasil D ke-j)

ε_{ijk} = Pengaruh galat percobaan

Hipotesis Statistik

a. $H_0 : (\alpha\beta)_{ij} = 0$, (Yang berarti tidak ada pengaruh interaksi antara media perendaman dengan dosis pupuk majemuk gandasil D terhadap produksi VFA, NH_3 , atau protein total *fodder* jagung hidroponik).

H_1 : Minimal ada satu $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$, (Ada pengaruh interaksi antara media perendaman dengan dosis pupuk majemuk gandasil D terhadap produksi VFA, NH_3 , atau protein total *fodder* jagung hidroponik).

b. $H_0 : \alpha_i = 0$, (Yang berarti tidak ada pengaruh media perendaman terhadap produksi VFA, NH_3 , atau protein total *fodder* jagung hidroponik).

H_1 : Minimal ada satu $\alpha_i \neq 0$, (Minimal ada satu pengaruh media perendaman terhadap produksi VFA, NH_3 , atau protein total *fodder* jagung hidroponik).

- c. H0 : $\beta_j = 0$ (Yang berarti tidak ada pengaruh dosis pupuk majemuk gandasil D terhadap produksi VFA, NH₃, atau protein total *fodder* jagung hidroponik).
- H1 : Minimal ada satu $\beta_j \neq 0$, (Minimal ada satu pengaruh dosis pupuk majemuk gandasil D terhadap produksi VFA, NH₃, atau protein total *fodder* jagung hidroponik).