

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan tanggal 4 Juli sampai dengan 21 Agustus 2016 terdiri dari dua tahap. Penelitian tahap pertama penelitian secara *in-vitro* yang dilaksanakan di Laboratorium Nutrisi dan Pakan Ternak, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian tahap kedua yaitu secara *in-vivo* yang dilaksanakan di Balai Pembibitan Ternak Unggul (BPTU) Mulyorejo, Kabupaten Semarang.

Penelitian Tahap I

3.1. Materi *In Vitro*

Materi penelitian yang digunakan yaitu rumput raja, konsentrat dan sumber ALTJG yang dalam penelitian ini menggunakan minyak jagung (MJG) dan urea. Materi yang digunakan berupa alat dan bahan. Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi water bath yang digunakan untuk menjaga suhu pada saat fermentasi, timbangan analitik digunakan untuk menimbang sampel, sentrifus digunakan untuk memisahkan supernatan, oven listrik digunakan untuk mensterilkan alat – alat sebelum digunakan, tanur listrik digunakan untuk memanaskan sampel dalam analisis serat kasar dan kadar abu, *hotplate* digunakan untuk memanaskan serta menghomogenkan larutan dengan cara mengaduk, pompa vacuum digunakan untuk membantu dalam proses penyaringan, pH meter digunakan untuk mengetahui keasaman pada sampel, Willey Cutting Mill dengan

diameter saringan 1 mm digunakan untuk menggiling sampel agar mudah dalam penyaringan, botol timbang, kertas minyak digunakan untuk membungkus sampel, kertas saring bebas abu, cawan porselin, becker glass digunakan untuk wadah menampung bahan kimia, tabung fermentasi 120 ml, rak tabung digunakan untuk wadah tabung, tutup tabung type Bunsen, termometer alkohol digunakan untuk mengukur suhu, eksikator digunakan sebagai pendingin sampel, pipet tetes digunakan untuk mengambil cairan, dan kertas label digunakan untuk memberikan tanda pada sampel.

Bahan-bahan penelitian antara lain gas CO_2 , cairan rumen digunakan untuk membantu proses fermentasi, larutan McDougall sebagai buffer yang meliputi, (NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, aquades), pepsin 1 : 10.000, pepsin 1 : 2.500, KOH digunakan untuk saponifikasi sampel, CaCl_2 digunakan untuk mentransformasikan menjadi garam kalsium, HgCl_2 digunakan untuk menghentikan proses fermentasi dan HCl pekat.

3.2. Metode *In Vitro*

Rancangan percobaan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 faktor, yaitu faktor penambahan ALTJ terproteksi (3 perlakuan) dan suplementasi urea (2 perlakuan) dengan 3 kali ulangan ($2 \times 3 \times 3$). Uji *in vitro* yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui fenomena yang terjadi di dalam rumen. Perlakuan yang diberikan yaitu penambahan minyak jagung 2% dengan proporsi T_0 (2% tidak terproteksi), T_1 (75% minyak jagung terproteksi), T_2 (80% minyak jagung terproteksi). Faktor perlakuan kedua yang diterapkan

yaitu P₁ (kadar PK ransum 12%) dan P₂ (Kadar PK ransum 16%). Variabel yang diukur adalah protein rumen.

3.2.1. Uji *in vitro*

Tahap *in vitro* dilakukan dengan menganalisis kandungan nutrisi minyak jagung menggunakan metode proksimat. Rumput raja dan konsentrat diuji dengan menggunakan metode proksimat untuk melihat kandungan nutrisi. Rumput raja dikeringkan dalam oven, kemudian digiling menggunakan Willey Cutting Mill dengan diameter saringan 1 mm. Sampel ditimbang sebanyak 0,56 gram (hijauan 60%, konsentrat 40% + minyak jagung) untuk setiap tabung (18 tabung), dua tabung yang lain untuk larutan blanko. Minyak jagung disaponifikasi menggunakan KOH berdasarkan bilangan penyabunan, kemudian ditransformasikan menjadi garam kalsium dengan ditambah larutan CaCl₂ yang diperhitungkan secara stokhiometri. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang. Cairan rumen seekor sapi yang diambil dari rumah potong hewan (RPH) diperas menggunakan kain bekas sebagai saringan, kemudian cairan rumen tersebut dimasukkan ke dalam termos air yang sebelumnya telah diatur suhunya pada 39 – 42 °C. Sampel yang berada didalam masing-masing tabung fermentasi ditambahkan 40 ml larutan McDougall dan 10 ml cairan rumen ke masing-masing tabung fermentasi yang telah diisi dan ditambahkan gas CO₂. Sampel kemudian difermentasi pada waterbath selama 48 jam, dan digojog secara berkala setiap 6 jam. Sampel yang telah selesai difermentasi kemudian dihentikan dengan ditambahkan HgCl₂ ke dalam setiap tabung. Sampel disentrifus dengan kecepatan

3.000 rpm selama 8 menit dan diambil endapan yang terbentuk untuk proses fermentasi enzimatik selama 48 jam berikutnya. Sampel yang telah selesai difermentasi enzimatik kemudian dihentikan dengan menambahkan HgCl₂ ke dalam masing-masing tabung dan residu yg terbentuk disaring kemudian dikeringkan menggunakan oven listrik pada suhu 104 °C selama 12 jam untuk kemudian dilakukan analisis.

Penelitian Tahap II

3.3. Materi *In Vivo*

Materi yang digunakan dalam penelitian meliputi :

3.3.1. Ternak

Ternak yang digunakan dalam penelitian sapi perah FH sebanyak 18 ekor yang terdiri dari bulan laktasi 2 dan 3 yang homogen dengan bobot badan rata-rata $411,77 \pm 13,99$ kg (CV=6,27%) (Lampiran 1.) dan produksi susu $10,23 \pm 1,8$ liter (CV=14,66%) (Lampiran 2.). Sapi-sapi tersebut ditempatkan di kandang individual yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum.

3.3.2. Pakan

Sapi diberi pakan hijauan rumput raja segar umur potong kurang lebih 45 hari dan konsentrat yang disusun dari beberapa bahan pakanserta pemberian air minum secara *ad libitum*.

Bahan penyusun ransum dan kandungan nutrisi ransum sapi penelitian disajikan pada Tabel 2, 3 dan 4.

Tabel 2. Kandungan Nutrien Bahan Pakan

Pakan	BK	PK	LK	SK	Abu	TDN
	------(%)-----					
Rumput Raja	13,26	11,56	1,32	43,01	12,12	57,77
Konsentrat	88,52	12,21	6,56	40,29	8,54	56,30
Ransum (40 : 60)	58,42	11,95	4,46	41,38	9,97	56,89

Keterangan : Hasil Analisis Proksimat di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro : BK = Bahan Kering; PK = Protein Kasar; LK = Lemak Kasar; SK = Serat Kasar; TDN = *Total Digestible Nutrients*.

Tabel 3. Komposisi Penambahan ALTJG + Suplementasi Urea

Bahan Pakan	T ₀ P ₁	T ₀ P ₂	T ₁ P ₁	T ₁ P ₂	T ₂ P ₁	T ₂ P ₂
	------(%)-----					
Asam lemak	2% tidak terproteksi	2% tidak terproteksi	2% (75% proteksi + 25% tidak)	2%(75% proteksi + 25% tidak)	2%(80% proteksi + 20% tidak)	2%(80% proteksi +20% tidak)
Urea *	0,16	0,95	0,16	0,95	0,16	0,95

Keterangan : * persen dari BK ransum

Tabel 4. Kandungan Nutrien Ransum T₀P₁, T₀P₂, T₁P₁, T₁P₂, T₂P₁ dan T₂P₂

Kandungan Nutrien	Nutrien Ransum					
	T ₀ P ₁	T ₀ P ₂	T ₁ P ₁	T ₁ P ₂	T ₂ P ₁	T ₂ P ₂
	------(%)-----					
Bahan Kering (BK)	58,42	58,42	58,42	58,42	58,42	58,42
Protein Kasar (PK)	12,00	16,00	12,00	16,00	12,00	16,00
Lemak Kasar (LK)	4,46	4,46	4,46	4,46	4,46	4,46
Serat Kasar (SK)	22,83	22,83	22,83	22,83	22,83	22,83
Abu	9,97	9,97	9,97	9,97	9,97	9,97
Bahan ekstrak Nitrogen (BETN) tanpa	32,24	34,24	32,24	32,24	32,24	32,24
<i>Total digestible nutrients</i> (TDN)	56,89	56,89	63,70	63,70	63,70	63,70

3.4. Metode *In Vivo*

3.4.1. Prosedur penelitian

Penelitian *in vivo* dilakukan dalam tiga tahap, yaitu tahap persiapan, adaptasi, serta perlakuan dan pengambilan data. Tahap persiapan dilaksanakan selama 1 minggu untuk memilih sapi berdasarkan bulan laktasi ke-2 dan ke-3, analisis proksimat bahan pakan, penyusunan ransum sesuai dengan perlakuan terhadap berbagai level penambahan asam lemak tidak jenuh ganda terproteksi dan suplementasi urea.

Tahap adaptasi dilakukan selama 7 hari dengan cara memberikan pakan sesuai perlakuan. Pemberian pakan dilakukan pada pukul 06.00 dan 16.00 WIB. Pemberian konsentrat adalah 2 jam sebelum pemberian hijauan. Tahap adaptasi ini dilakukan untuk penyesuaian sapi terhadap ransum yang dicobakan agar pengaruh ransum sebelumnya dapat dihilangkan.

Tahap perlakuan dan pengambilan data dilakukan selama 30 hari dengan memberi pakan perlakuan pada sapi penelitian. Pemberian pakan konsentrat diberikan sebelum dilakukan pemerahan, sedangkan pemberian hijauan diberikan setelah pemerahan. Frekuensi pemerahan dilakukan dua kali yaitu pukul 05.00 WIB dan 16.00 WIB. Pemberian air minum secara *ad libitum*. Pada tahap ini, juga dilakukan pengambilan data yaitu data konsumsi dengan cara menimbang pemberian dan sisa pakan serta mengukur produksi susu perhari. Pada tahap ini, juga dilakukan pengambilan data yaitu data konsumsi dengan cara menimbang pemberian dan sisa pakan serta mengukur produksi susu perhari.

3.4.2. Parameter perlakuan

Parameter penelitian ini adalah konsumsi BK, Protein Rumen dan Protein Susu.

3.4.2.1. Konsumsi Bahan Kering, Mengetahui konsumsi BK per-ekor yaitu menghitung jumlah pemberian pakan yang diberikan dikurangi sisa pakan perhari. Konsumsi BK diukur selama 30 hari.

3.4.2.2. Protein rumen, Cairan rumen seekor sapi yang diambil dari rumah potong hewan (RPH) diperas menggunakan kain bekas sebagai saringan, kemudian cairan rumen tersebut dimasukkan ke dalam termos air yang sebelumnya telah diatur suhunya pada 39 – 42 °C. Sampel yang berada didalam masing-masing tabung fermentasi ditambahkan 40 ml larutan McDougall dan 10 ml cairan rumen ke masing-masing tabung fermentasi yang telah diisi dan ditambahkan gas CO₂. Sampel kemudian difermentasi pada waterbath selama 48 jam, dan digojog secara berkala setiap 6 jam. Sampel yang telah selesai difermentasi kemudian dihentikan dengan ditambahkan HgCl₂ ke dalam setiap tabung. Sampel disentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 8 menit dan diambil endapan yang terbentuk untuk proses fermentasi enzimatik selama 48 jam berikutnya. Sampel yang telah selesai difermentasi enzimatik kemudian dihentikan dengan menambahkan HgCl₂ ke dalam masing-masing tabung dan residu yg terbentuk disaring kemudian dikeringkan menggunakan oven listrik pada suhu 104 °C selama 12 jam untuk kemudian dilakukan analisis. Mengetahui

total protein rumen per perlakuan dengan cara menghitung hasil volume titrasi blanko dan volume titrasi sampel dalam satuan mg/ml menggunakan rumus :

$$\text{Protein Rumen} = \frac{(\text{volume sampel} - \text{volume blanko}) \times \text{NHCl} \times 14 \text{ g}}{\text{Berat sampel (mg)}}$$

3.4.2.3. Protein susu, Mengambil sampel susu pada hari ke – 27 pada pemerahan pagi sampel susu dimasukkan ke dalam kulkas atau refrigerator kira – kira suhu 4⁰C sebelum dicampurkan dengan sampel susu sore, sampel susu pagi dihangatkan terlebih dahulu kira – kira dengan suhu 37⁰C, kemudian dicampurkan dengan sampel susu sore. Jadi, hasil pemerahan yang diambil sebagai sampel susu pagi dan sore hari dengan 10% total produksi harian per ekor. Sampel susu segera dianalisis supaya tidak menggumpal dengan diuji *lactoscan*. Protein susu tersebut dapat dilihat dari hasil *lactoscan* yang tertera pada layar monitor.

3.4.3. Rancangan percobaan

Rancangan Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial. Perlakuan yang diberikan yaitu terdiri dari dua yaitu 3 perlakuan sebagai faktor pertama dan 2 perlakuan sebagai faktor ke dua dengan masing-masing 3 ulangan (Steel dan Torrie, 1991). Perlakuan ransum yang digunakan sebagai berikut:

T₀P₁= Ransum + ALTJG 2% (tanpa terproteksi) + urea 0,16%

T₀P₂= Ransum + ALTJG 2% (tanpa terproteksi) + urea 0,95%

T₁P₁= Ransum + ALTJG 2% (75% terproteksi + 25% tidak terproteksi) + urea
0,16%

T₁P₂= Ransum + ALTJG 2% (75% terproteksi + 25% tidak terproteksi) + urea
0,95%

T₂P₁= Ransum + ALTJG 2% (80% terproteksi + 20% tidak terproteksi) + urea
0,16%

T₂P₂= Ransum + ALTJG 2% (80% terproteksi + 20% tidak terproteksi) + urea
0,95%

Model Linier Statistik

Data yang terkumpul diolah menggunakan analisis ragam dalam rancangan acak lengkap pola faktorial. Model linier yang digunakan adalah :

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

Keterangan:

Y_{ijk} : Nilai percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

μ : Nilai tengah (rata-rata)

α_i : Pengaruh penambahan ALTJG ke-i

β_j : Pengaruh suplementasi urea pada ransum ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$: Pengaruh interaksi antara penambahan ALTJG ke-i dan urea pada
ransum ke-j

ε_{ijk} : Pengaruh galat percobaan petak ke-k yang memperoleh kombinasi
perlakuan ij.

i : Faktor pemberian ALTJG terproteksi (1,2)

j : Faktor suplementasi urea (1,2)

k : Ulangan (1,2,3)

Denah Percobaan

Tabel 5. Denah Percobaan

Penambahan ALTJG dan Suplementasi Urea	U			
		U ₁	T0P1U1	T1P1U1
P1 (0,16)	U ₂	T0P1U2	T1P1U2	T2P1U2
	U ₃	T0P1U3	T1P1U3	T2P1U3
		U ₁	T0P2U1	T1P2U1
P2 (0,95)	U ₂	T0P2U2	T1P2U2	T2P2U2
	U ₃	T0P2U3	T1P2U3	T2P2U3

Hipotesis statistik

- a. H₀ : $(\alpha\beta)_{ij} = 0$ (tidak ada pengaruh interaksi antara perlakuan penambahan sumber ALTJG terproteksi dan suplementasi urea terhadap Protein rumen dan Protein susu)
 H₁ : minimal ada satu $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$ (minimal ada satu interaksi antara perlakuan penambahan sumber ALTJG terproteksi dan suplementasi urea terhadap Protein rumen dan Protein susu)
- b. H₀ : $\alpha_i = 0$ (tidak ada pengaruh penambahan sumber ALTJG terproteksi terhadap Protein rumen dan Protein susu)
 H₁ : minimal ada satu $\alpha_i \neq 0$ (minimal ada satu pengaruh penambahan sumber ALTJG terproteksi terhadap Protein rumen dan Protein susu)
- c. H₀ : $\beta_j = 0$ (tidak ada pengaruh suplementasi urea terhadap Protein rumen dan Protein susu)
 H₁ : minimal ada satu $\beta_j \neq 0$ (minimal ada satu pengaruh suplementasi urea terhadap Protein rumen dan Protein susu)