

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian tentang produksi protein total dan pencernaan protein secara *in vitro* dilaksanakan pada bulan Agustus sampai November 2016. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Departemen Peternakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang.

3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah daun kelor, daun lamtoro dan cairan rumen dari kambing Peranakan Ettawah Betina berfistula berumur 12-18 bulan dengan bobot badan 31,25 kg. Kambing dikandangkan di kandang individu. Pakan basal untuk kambing berfistula yang diberikan berupa rumput gajah dan konsentrat dengan protein kasar 12% dan *total digestible nutrients* 60% dan pemberian air minum secara *ad libitum* formulasi ransum kambing disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Formulasi Ransum Kambing Fistula

Bahan Pakan	Formula	PK bahan	PK ransum	TDN bahan	TDN ransum
		-----%			
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
Rmpud gajah	70,0	7,02	4,91	54,85	38,39
Jumlah	100		12,13		60,97

Reagen yang digunakan dalam penelitian antara lain : *McDougall*, gas CO₂, kertas saring *Whatman* 41, akuades, H₂SO₄ pekat, katalis selenium, NaOH 45%, cairan rumen kambing fistula, indikator MR+MB dan HCl 0,1 N. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung fermentor, timbangan, beaker glass, waterbath, gelas ukur, sentrifuse, pompa vakum, oven, kompor listrik, labu destruksi, tabung erlenmeyer, alat destruksi diantaranya: labu destruksi, elenmeyer, kompor listrik, seperangkat alat destilasi, dan seperangkat alat titrasi.

3.2. Metode

Penelitian dilakukan dalam dua tahap yaitu : 1 tahap persiapan meliputi: mencari dan preparasi daun kelor, membuat kandang kambing dan membuat lubang fistula pada kambing, membuat ransum ternak fistula dengan kadar PK 12% dan TDN 60%. Tahap 2 yaitu tahap pelaksanaan uji *in vitro* meliputi : pengambilan cairan rumen, uji *in vitro* terhadap produksi protein total dan pencernaan protein kasar serta analisis protein.

3.2.1. Metode pengujian produksi protein total Modifikasi 48 Jam

Pengujian produksi protein total dilakukan dengan menggunakan metode Tilley dan Terry (1963) tahap satu. Pengujian produksi protein total dilaksanakan dengan cara :

Menimbang sampel sebanyak 0,55 - 0,56 g dimasukkan ke dalam tabung fermentor. Larutan *McDougall* yang telah di inkubasi pada suhu 39⁰C ditambahkan ke dalam tabung sebanyak 40 ml, kemudian ditambahkan cairan rumen sebanyak

10 ml dan dialirkan CO₂ untuk membuat suasana *an-aerob* dan ditutup rapat. Selanjutnya di inkubasi selama 48 jam di *waterbath* yang bersuhu 39⁰C dan dilakukan penggojokan setiap 6 jam sekali. Setelah 48 jam fermentasi dihentikan dengan mengangkat tabung fermentor dari *waterbath* dan dimasukkan ke dalam air dingin. Hasil fermentasi dilakukan penggojokan sampai homogen, kemudian diambil 10 ml dan dipindahkan ke tabung lain. Kemudian ditambahkan TCA+SSA 10 ml dan digojok sampai homogen serta didiamkan selama 4-5 jam. Setelah 5 jam dilakukan penyaringan residu menggunakan kertas saring *whatman* 41 dengan pompa vacum. Hasil penyaringan residu selanjutnya di oven pada suhu 105⁰C selama 24 jam. Residu selanjutnya ditimbang, kemudian residu dan kertas saring dimasukkan dalam labu destruksi dan ditambahkan 10 ml asam sulfat pekat dan katalis selenium 1 g, dan dilakukan destruksi sampai warna larutan menjadi hijau jernih. Selanjutnya hasil destruksi didinginkan, kemudian dilakukan destilasi dengan memindahkan hasil destruksi ke labu destilasi, ditambahkan 70 ml akuades dan 60 ml NaOH 45%, kemudian dilakukan destilasi dan hasil destilasi ditangkap dengan H₃BO₃ 4% sebanyak 20 ml dengan ditambahkan 2 tetes indikator MR+MB, destilasi dihentikan setelah terjadi perubahan warna penangkap dari warna ungu menjadi hijau. Hasil destilasi kemudian dititrasikan dengan menggunakan HCl 0,1 N sampai terbentuk warna ungu kembali.

Rumus protein total : (Titran sampel–Titran blanko) x N HCl x 14 x 6,25 mg.

$$\begin{aligned} \text{Protein Total} &= \frac{\sum \text{PK Residu}}{\sum \text{Sampel}} \text{ mg/g} \\ \sum \text{PK Residu} &= \text{PK residu dalam 10 ml supernatan} \\ \sum \text{Sampel} &= \text{Berat residu dalam 10 ml supernatan} \end{aligned}$$

3.2.2. Metode pengujian kecernaan protein

Pengujian kecernaan protein dilakukan dengan menggunakan metode Tilley dan Terry (1963) dua tahap. Pengujian kecernaan protein dilaksanakan dengan cara:

Menimbang sampel sebanyak 0,55 - 0,56 g dimasukkan ke dalam tabung fermentor. Larutan *McDougall* yang sudah diinkubasi pada suhu 39⁰C ditambahkan sebanyak 40 ml, kemudian ditambahkan cairan rumen sebanyak 10 ml dan di alirkan CO₂ untuk membuat suasana an-aerob dan ditutup rapat selanjutnya di inkubasi selama 48 jam di *waterbath* yang bersuhu 39⁰C. Selama inkubasi dilakukan penggojokan setiap 6 jam sekali dan setelah 48 jam fermentasi dihentikan dengan mengangkat tabung fermentor dari *waterbath* dan dimasukkan ke dalam air dingin. Kemudian residu di *centrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan bagian residu dan cairan. Cairan dibuang dan residu kemudian ditambahkan larutan pepsin HCl sebanyak 50 ml yang selanjutnya diinkubasi kembali selama 48 jam pada suhu 39⁰C dengan setiap 6 jam sekali dilakukan penggojokan. Setelah 48 jam inkubasi, fermentasi dihentikan dengan cara semua tabung fermentor dipindahkan ke air dingin. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring *whatman* 41 untuk memperoleh residunya. Residu hasil penyaringan di oven pada suhu 105⁰C selama 24 jam untuk menghilangkan kadar air. Selanjutnya residu ditimbang dan dianalisis proteinnya. Residu dimasukkan ke dalam labu destruksi, selanjutnya ditambahkan 10 ml asam sulfat pekat dan katalis selenium 1 g, dan dilakukan destruksi dilakukan sampai warna larutan menjadi hijau jernih, hasil destruksi didinginkan, kemudian dilakukan destilasi dengan cara

hasil destilasi dipindahkan ke labu destilasi serta ditambahkan 70 ml akuades, 60 ml NaOH 45% . Destilasi dilakukan dan hasil destilasi ditangkap dengan 20 ml H₃BO₃ 4% yang ditambahkan dengan 2 tetes indikator MR+MB. Destilasi dihentikan setelah terjadi perubahan warna penangkap ungu menjadi hijau. Hasil destilasi kemudian dititrasi dengan menggunakan HCl 0,1 N sampai terbentuk warna ungu kembali, blanko dibuat dengan mendestilasi 50 ml akuades dan 40 ml NaOH 45 % dengan penangkap 20 ml H₃BO₃ 4% yang sudah ditambahkan dengan 2 tetes indikator MR+MB 1% kemudian titrasi

Kadar protein dihitung dengan rumus :

$$\text{Kecernaan Protein} = \frac{\sum \text{PK Sampel} - (\sum \text{PK Residu} - \sum \text{PK Blanko})}{\sum \text{PK Sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

$$\begin{aligned} \sum \text{PK Residu} &= \sum \text{Protein setelah inkubasi enzimatis} \\ &= (\text{Titran sampel} - \text{Titran blanko}) \times N \text{ HCl} \times 0,014 \times 6,25 \text{ (g)} \\ \sum \text{PK Sampel} &= \sum \text{Protein sebelum inkubasi} \\ &= \sum \text{Sampel} \times \% \text{PK ransum (g)} \\ \sum \text{PK Blanko} &= \sum \text{Protein cairan rumen} \end{aligned}$$

3.3. Analisis Statistik

Teknik pengolahan dan analisis data menggunakan uji statistik *paired T-Test* dengan menggunakan program komputer SPSS versi 16.0, dengan syarat data berdistribusi normal. Normalitas data diuji menggunakan uji *one sample Kolmogorov-Smirnov test*. Nilai signifikasi (*Asymp.sig.*) apabila nilai signifikasi $\geq 0,05$ ($p \geq 0,05$) dan data berdistribusi normal.