

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2017 sampai Januari 2018 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang dan Laboratorium Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.1. Materi

Materi yang digunakan adalah pakan komplit dengan PK 12% dan TDN 60% yang tersusun dari ampas tebu amoniasi, bekatul, onggok, jagung giling, molases, tepung bonggol pisang dan cairan rumen dari kambing Jawarandu betina berfistula umur 2-2,5 tahun. Formulasi pakan tersaji pada Tabel 1 dan kandungan *nutrient* bahan pakan tersaji pada Lampiran 1. Bahan yang digunakan untuk amoniasi adalah ampas tebu, air dan urea. Bahan yang digunakan untuk analisis produksi VFA, NH₃, KcBK dan KcBO yaitu cairan rumen, gas CO₂, larutan penyangga (*McDougall*), asam borat, indikator campuran metil merah dan bromkresol hijau, NaCO₃ jenuh, H₂SO₄ 0,0055N, H₂SO₄ 15%, NaOH 0,5N, indikator PP 1%, larutan pepsin HCL, aquades, air es, dan vaselin.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gunting dan pisau, gelas ukur, *trashbag*, selotip, alat tulis, timbangan, thermometer, blender, tabung fermentor, *waterbath*, sentrifuge, *crucible porselin*, cawan *Conway*, labu suling,

erlenmeyer, *beaker glass*, biuret, pipet ukur 1 ml dan 5 ml, kertas minyak, kertas saring *Whatman 41*, labu destilasi, oven, eksikator, dan tanur, gas kromatografi, termos, *cooling box*, pompa vakum, kompor listrik, botol supernatan, alat titrasi, tabung fermentor dan tutup karet.

Tabel 1. Komposisi Penyusun Pakan dan Kandungan *Nutrient*

Bahan Pakan	Komposisi	
%.....	
	T1	T2
Ampas tebu Amoniasi	55	55
Jagung Giling	5	5
Onggok	17	17
Bekatul	20,35	21
Tepung Bonggol Pisang	2,65	-
Molases	-	2
Total	100	100
<i>Kandungan Nutrient</i>		
Protein Kasar	12,81	12,82
<i>Total Digestible Nutrient (TDN)</i>	60,57	60,72
Serat Kasar	30,79	30,49
Lemak Kasar	3,44	3,52
Abu	6,85	6,74
Bahan Ekstrak Tanpa Nitrogen (BETN)	46,10	46,42
<i>Neutral Detergent Fiber (NDF)</i>	60,26	57,98
<i>Non Fiber Carbohydrate (NFC)</i>	16,63	18,93

3.2. Metode

Pelaksanaan penelitian yang dilakukan meliputi tahap persiapan penelitian, tahap pelaksanaan yang meliputi uji *In vitro* yang meliputi uji fermentabilitas dan pencernaan, serta tahap analisis data.

3.2.1. Persiapan penelitian

Persiapan penelitian yang dilakukan meliputi penyediaan tepung bonggol pisang, pembuatan ampas tebu amoniasi, dan formulasi pakan. Tepung bonggol pisang diperoleh dari akar pohon pisang kemudian dibersihkan, dicacah dan dikeringkan dengan menggunakan sinar matahari, kemudian digrinder sampai dihasilkan bentuk tepung. Amoniasi ampas tebu dilakukan dengan metode Komar (1984) dengan menggunakan kadar amonia 4%. Urea yang digunakan dalam 1 kg ampas tebu sebanyak 7,058% atau 70,58 gram urea, sedangkan jumlah air yang digunakan untuk 1 kg ampas tebu adalah dengan kadar air 40% yaitu 507 ml (Lampiran 2). Ampas tebu dikering udara dan dipotong-potong 5-10 cm. Urea dilarutkan dalam air hingga homogen, kemudian larutan urea tersebut dicampur dengan ampas tebu hingga merata seluruhnya. Ampas tebu tersebut kemudian disimpan dalam kondisi *anaerob* dengan menggunakan *trashbag* dan disimpan selama 21 hari. Ampas tebu amoniasi yang disimpan setelah 21 hari kemudian dibuka dan diangin-anginkan, kemudian dihaluskan dengan menggunakan grinder dan disaring sehingga dihasilkan bentuk tepung. Bahan pakan yang digunakan terdiri dari ampas tebu amoniasi, bekatul, jagung giling, molases (T1) dan tepung bonggol pisang (T2). Perlakuan pakan yang pada penelitian ini yaitu:

T1 : Pakan komplit berbasis ampas tebu amoniasi + molases 2%

T2 : Pakan komplit berbasis ampas tebu amoniasi + tepung bonggol pisang 2,65%

3.2.2. Analisis pencernaan bahan kering dan pencernaan bahan organik

Analisis KcBK dilakukan dengan metode Tilley dan Terry (1963). Langkah pertama yang dilakukan adalah sampel perlakuan ditimbang sebanyak 0,55-0,56 g dan dimasukkan ke dalam tabung fermentor. *Waterbath* diisi dengan aquades dan diatur pada suhu 39°C. Sampel dan larutan *McDaughall* sebagai cairan saliva buatan sebanyak 40 ml dimasukkan ke dalam tabung fermentor dan ditambahkan cairan rumen sebanyak 10 ml kemudian tabung fermentor dialiri dengan gas CO₂ dan di tutup rapat dengan penutup karet dan kemudian digojok hingga homogen. Tabung fermentor diletakkan pada *waterbath* dan diinkubasi selama 48 jam dengan penggojokan setiap 6 jam sekali hingga homogen.

Tabung fermentor yang telah diinkubasi selama 48 jam kemudian dihentikan fermentasinya dengan cara direndam dengan menggunakan air es selama 15 menit, untuk selanjutnya disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm untuk memisahkan endapan dengan supernatan. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan endapan kemudian ditambahkan larutan pepsin HCL sebanyak 50 ml pada tabung fermentor. Tabung dimasukkan kembali ke *waterbath* selama 48 jam dan digojok setiap 6 jam sekali. Endapan sample pada tabung fermentor yang telah diinkubasi kemudian disaring dengan pompa vakum menggunakan kertas saring *Wathman* 41 yang sudah dioven dan ditimbang.

Sampel dan kertas saring dimasukkan ke dalam *crucible porcelain* yang telah dioven dan ditimbang. Sampel tersebut kemudian dioven pada suhu 105°C hingga beratnya konstan, kemudian sampel dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam eksikator selama 15 menit, kemudian ditimbang dan dihitung pencernaan bahan

kering. Sampel yang telah ditimbang, dimasukkan ke dalam tanur dengan suhu 600°C selama 6 jam untuk menghasilkan kecernaan bahan organik. Kecernaan bahan kering dapat dihitung dengan rumus:

$$KcBK = \frac{\text{berat BK sample} - (\text{BK residu} - \text{BK Blangko})}{\text{BK sampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

Berat BK sampel = berat sampel × % BK sampel
 Berat BK residu = berat residu sampel setelah oven - (berat *crucible porcelain* + kertas saring)
 Berat BK blanko = berat blanko setelah dioven 105°C – (bobot *crucible* + kertas saring)

$$KcBO = \frac{\text{Berat BO Sampel} - (\text{Berat BO residu} - \text{Berat BO Blanko})}{\text{Berat BO Sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

Berat BO sampel = berat sampel × % BO sampel
 Berat BO residu = berat residu sampel setelah oven 105°C – berat residu setelah ditanur 600°C – berat kertas saring
 Berat BO blanko = berat residu blanko setelah oven 105°C – berat residu setelah ditanur 600°C – berat kertas saring

3.2.3. Analisis VFA Total, VFA Parsial dan NH₃

Tahap analisis konsentrasi VFA dan NH₃ adalah dengan sampel dimasukkan ke dalam tabung fermentor sebanyak 0,55-0,56 g dan ditambahkan larutan *McDaughall* sebanyak 40 ml dan ditambahkan cairan rumen sebanyak 10 ml, dan dialiri gas CO₂ untuk menjaga suasana agar tetap *anaerob* kemudian ditutup rapat dengan penutup karet. Inkubasi dilakukan selama 3 jam di dalam *waterbath* dengan suhu 39°C, kemudian fermentasi dihentikan perendaman dalam

air es. Sampel kemudian di sentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm, kemudian dilakukan pemisahan supernatan dan endapan. Supernatan yang terbentuk dimasukkan ke dalam botol yang nantinya digunakan untuk analisis NH_3 dan VFA.

Analisis produksi VFA total dilakukan dengan metode destilasi uap, larutan supernatan sebanyak 5 ml dimasukkan ke tabung suling khusus, kemudian ditambahkan 1 ml H_2SO_4 15%. Tabung suling dimasukkan ke dalam alat destilasi yang berisi *aquades* 800 ml yang telah dihubungkan dengan pendingin *liebig* dan dilakukan destilasi. Hasil destilasi ditangkap dalam erlenmeyer yang berisi 5 ml NaOH 0,5 N. Destilasi dihentikan jika volume penangkap mencapai 100 ml, dan ditambahkan 2 tetes indikator PP 1%. Selanjutnya, dititrasi dengan HCl 0,5 N sampai terjadi perubahan warna. Larutan blanko dibuat dengan menggunakan 5 ml NaOH 0,5 N yang telah diberi indikator PP 1 % kemudian dititrasi dengan HCl 0,5 N. Perhitungan produksi VFA total menggunakan rumus :

$$\text{VFA total} = (y - z) \times N \text{ HCl} \times 1000/5 \text{ mM}$$

Keterangan :

N-NaOH = Normalitas larutan NaOH

y = Jumlah titer HCl yang dibutuhkan untuk menitrasi 5 ml NaOH (blanko)

z = Jumlah titer HCl yang dibutuhkan untuk menitrasi hasil destilasi

Analisis VFA parsial menggunakan alat gas kromatografi (GC) dengan merk Shimadzu GC 2010 plus yang dilengkapi dengan detektor Flame Ionisation Detector (FID) suhu 240°C dan injektor dengan suhu 240°C . Kolom yang digunakan adalah jenis kolom RTX-Wax dengan panjang 30 meter dan diameter

0,255 mm dengan suhu kolom 145°C. Gas pembawa yang digunakan adalah gas helium dengan *column flow* 0,80 ml/menit dan split rasio 50. Prosedur yang dilakukan yaitu supernatan sebanyak 1 µl diinjeksikan ke GC. Reduksi dalam kolom akan ditangkap oleh recorder pada komputer sehingga membentuk grafik. Kadar VFA parsial cairan rumen dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{VFA parsial (mM)} = \frac{\text{luas sampel (mm}^2\text{)}}{\text{luas standar (mm}^2\text{)}} \times \text{Konsentrasi standar (mM)}$$

Analisis produksi NH₃ dilakukan dengan menggunakan teknik mikrodifusi *Conway*. Bagian tepi cawan *Conway* dan tutupnya diolesi dengan vaselin. Bagian tengah cawan dimasukkan 1 ml H₃BO₃ dan 1 tetes indikator campuran *methyl red* dan bromkesol hijau. Sisi kiri cawan dimasukkan 1 ml supernatan dan sisi kanan 1 ml larutan sodium karbonat (NaCO₃) jenuh. Cawan ditutup dan sedikit digojok sampai larutan supernatan dan sodium karbonat tercampur secara homogen, kemudian sampel didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang. Cawan yang telah didiamkan setelah 24 jam kemudian dibuka dan dititrasi dengan menggunakan H₂SO₄ 0,0055 N sampai terjadi perubahan warna ungu menjadi merah muda. Perhitungan produksi NH₃ dihitung dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

NH₃ = produksi NH₃ yang diperoleh
 N H₂SO₄ = normalitas larutan H₂SO₄

3.2.4. Analisis Data

Analisis data diuji dengan menggunakan statistik uji banding yaitu *t-test Independent Sample* pada taraf signifikansi 5% dengan menggunakan bantuan program SPSS For Windows Versi 16.

Hipotesis statistik yang digunakan adalah sebagai berikut:

H₀ : Tidak terdapat pengaruh perbedaan fermentabilitas pakan komplit berbasis ampas tebu amoniasi dengan suplementasi karbohidrat non serat berbeda secara *In vitro*.

H₁ : Terdapat pengaruh perbedaan fermentabilitas pakan komplit berbasis ampas tebu amoniasi dengan suplementasi karbohidrat non serat berbeda secara *In vitro*.