

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan bulan Desember 2017, dilakukan secara *in vitro* yang di Laboratorium Teknologi Pakan serta Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Departemen Peternakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian yaitu kelobot jagung segar setelah proses pengambilan buah jagung sebagai pakan ternak yang diperoleh dari kota Kudus, urea sebagai sumber amonia untuk amoniasi, starter berupa kapang *A. niger*, akuades, alkohol 90% dan bahan yang digunakan saat analisis *in vitro* yaitu cairan rumen sapi yang diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Penggaron, cairan McDougall, cairan pepsin HCl, akuades, gas CO₂ serta analisis protein kasar dan serat kasar meliputi H₂SO₄ 0,3 N, NaOH 1,5 N, aseton, H₂SO₄ pekat, H₃BO₄ 4%, KHSO₄, CuSO₄, indikator (metil merah dan metil biru), NaOH 45% dan HCl 0,1 N.

Peralatan yang digunakan pada proses amoniasi dan fermentasi meliputi alat pemotong, timbangan digital, nampan, stoples kaca ukuran 350 ml, inkubator, bunsen, spuit, blender, panci, kompor, plastic wrap, plastik klip, kertas label dan alat tulis. Peralatan yang digunakan dalam analisis *in vitro* serta analisis protein kasar dan serat kasar yaitu tabung fermentor beserta tutupnya, tabung reaksi,

beaker glass, water bath, corong, sentrifus, timbangan merek Ohaus dengan ketelitian 0,0001 g, cawan petri, desikator, penjepit cawan, oven, tanur pengabuan, Erlenmeyer 600 ml, pendingin balik, kertas saring, kapas, alat destilasi, buret, pipet ukur, Erlenmeyer 100 ml, pipet tetes.

3.2. Metode Penelitian

Kegiatan penelitian terbagi dalam empat tahapan, yaitu tahap amoniasi, pembiakan (enrichment) *A. niger*, perlakuan fermentasi, dan analisis laboratorium (uji pencernaan in vitro serta uji protein kasar dan serat kasar). Tahapannya dijelaskan sebagai berikut:

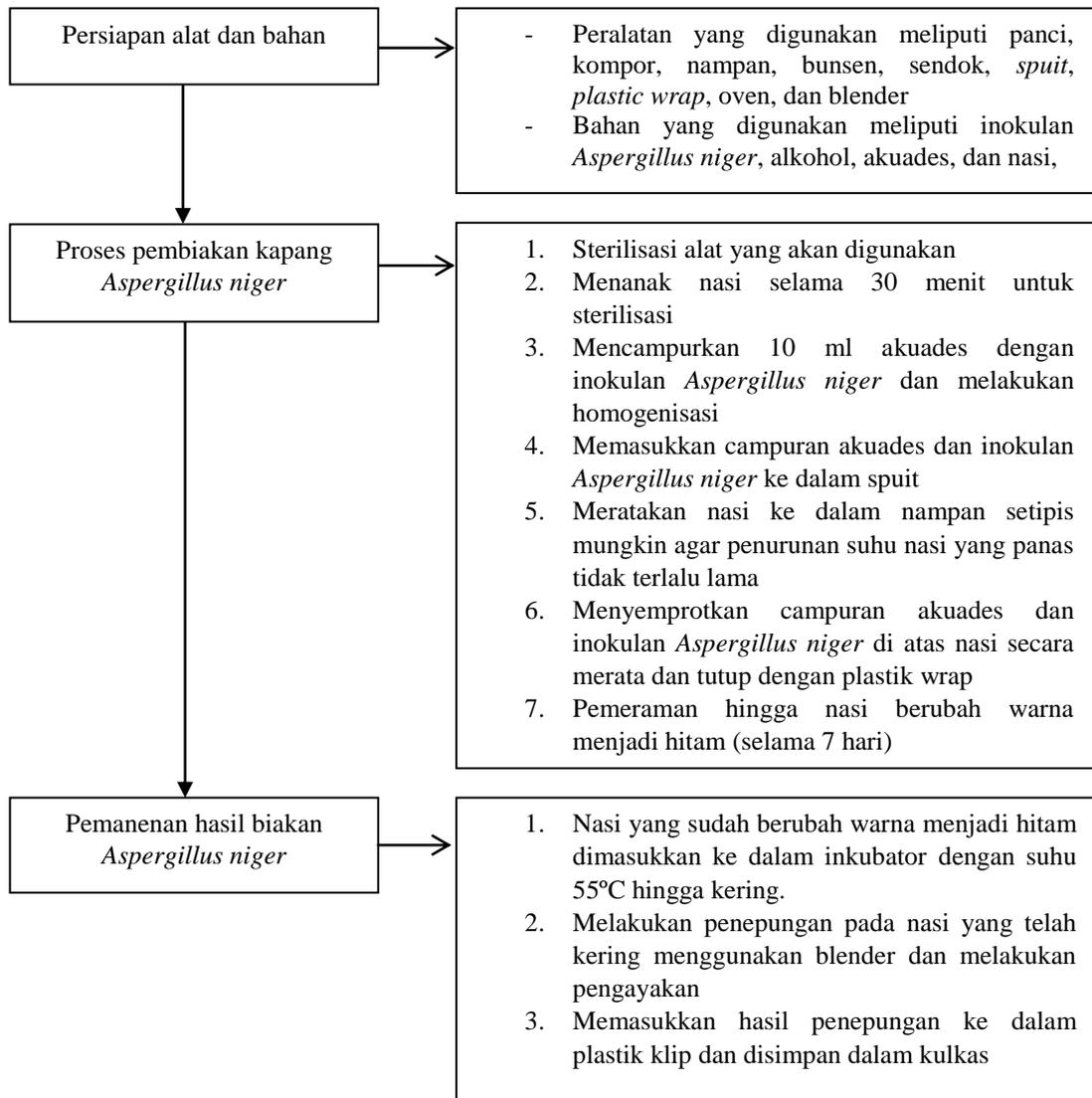
3.2.1. Amoniasi kelobot jagung

Tahap pembuatan amoniasi kelobot jagung dilakukan menurut metode Komar (1984) yang dimodifikasi menurut Utomo (2015), dilakukan dengan cara basah menggunakan suhu peram 60°C dengan kadar amonia 6% dan lama peram 4 hari. Suhu peram 60°C mengakibatkan kerja enzim urease optimum sehingga proses amoniasi dapat terjadi lebih cepat.

3.2.2. Pembiakan (enrichment) *Aspergillus niger*

Pembiakan (enrichment) kapang *A. niger* menggunakan nasi yang telah disterilisasi, dilakukan secara aerob dengan memberi lubang kecil pada plastic wrap sehingga oksigen bisa masuk dan konidia spora pada *A. niger* dapat tumbuh dengan optimal. Pembiakan yang berhasil ditandai dengan munculnya konidia

spora berwarna hitam yang menandakan *A. niger* telah tumbuh. Tahap pembiakan *A. niger* dapat dilihat pada ilustrasi 1.

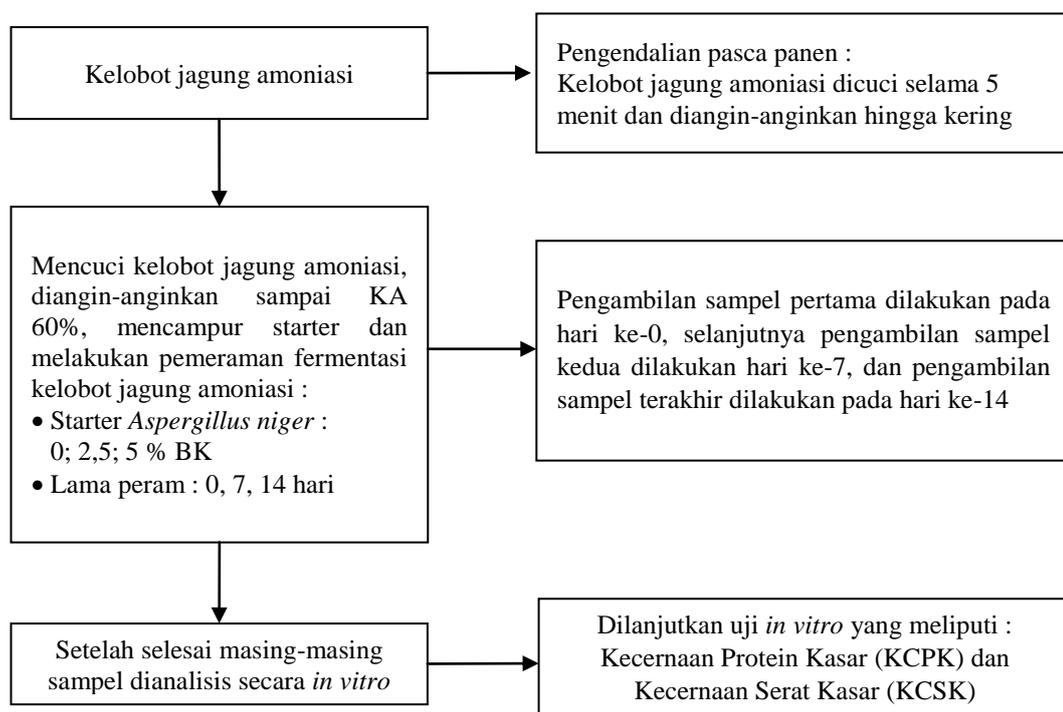


Ilustrasi 1. Pembuatan Starter *Aspergillus niger*

3.2.3. Fermentasi kelobot jagung amoniasi

Tahap Fermentasi dilakukan dengan penggunaan aras *A. niger* 0; 2,5 dan 5% terhadap bahan kering dengan lama peram yang berbeda yaitu 0, 7, dan 14

hari, dapat dilihat pada Ilustrasi 2 dan perhitungan aras *A. niger* dapat dilihat pada Lampiran 4. Tahap analisis laboratorium secara *in vitro* menggunakan cairan rumen, setelah itu dilanjutkan dengan uji protein kasar dan serat kasar untuk mengetahui pencernaan serat kasar dan pencernaan protein kasar dapat dilihat pada Ilustrasi 2.



Ilustrasi 2. Fermentasi dan Analisis Laboratorium

Kelobot jagung amoniasi terlebih dahulu dicuci selama 5 menit kemudian diangin-anginkan sebelum dilakukan fermentasi untuk mengurangi kandungan amonia. Setelah kelobot jagung amoniasi difermentasi, selanjutnya dilakukan analisis pencernaan *in vitro* serta uji protein kasar dan serat kasar untuk mengetahui nilai kecernaannya.

3.2.4. Analisis pencernaan secara in vitro

Prinsip dari pencernaan secara in vitro yaitu membuat pencernaan yang serupa dengan ternak ruminansia, tetapi dalam skala laboratorium dengan sejumlah reagen yang bekerja seperti di dalam saluran pencernaan ternak serta cairan rumen, menggunakan metode Tilley dan Terry (1963). Sampel ransum (\pm 0,55 - 0,56 g) dimasukkan dalam tabung fermentor yang diletakkan dalam water bath yang berisi akuades bersuhu 39°C. Media yang digunakan 40 ml larutan saliva buatan (cairan McDougall) dan 10 ml cairan rumen. Fermentasi dilakukan secara anaerob, gas CO₂ ditambahkan ke dalam tabung fermentor. Inkubasi dilaksanakan selama 48 jam, penggojokan dilakukan setiap 6 jam. Fermentasi dihentikan dengan merendam tabung fermentor dalam air dingin, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 – 15 menit. Endapan dipisahkan dengan supernatan. Supernatan dibuang, sedangkan endapan digunakan, ditambah dengan cairan pepsin HCl sejumlah 50 ml ke dalam tabung fermentor, kemudian diinkubasi selama 48 jam dan dilakukan penggojokan setiap 6 jam. Endapan disaring menggunakan kertas saring Whatman 41 dengan pompa vacuum. Kertas saring Whatman 41 dan residu yang masih basah diangin-anginkan, kemudian dilipat dan dimasukkan ke dalam crucible porcelain (CP), lalu CP dan residu dioven selama 24 jam. CP dan residu yang telah dioven dimasukkan ke dalam eksikator, kemudian hasil residunya ditimbang. Analisis protein kasar dilakukan menurut metode Kjeldahl di dalam AOAC (2005) dan analisis serat kasar dilakukan menurut metode AOAC (2005) untuk mengetahui nilai pencernaan protein kasar dan serat kasar.

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

Keterangan :

$\sum \text{PK sampel}$: berat BK sampel x % PK

$\sum \text{PK residu}$: berat BK residu x % PK residu

$\sum \text{PK blanko}$: berat BK blanko x % PK blanko

$$\text{Kecernaan SK} = \frac{(\sum \text{SK sampel} - (\sum \text{SK Residu} - \sum \text{SK Blanko}))}{\sum \text{SK sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

$\sum \text{SK sampel}$: berat BK sampel x % SK

$\sum \text{SK residu}$: berat BK residu x % SK residu

$\sum \text{SK blanko}$: berat BK blanko x % SK blanko

3.2.5. Rancangan percobaan

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 3 x 3. Faktor perlakuan pertama adalah aras A. niger M₀ (0%), M₁ (2,5%), dan M₂ (5%), sedangkan faktor kedua adalah lama peram yaitu T₀ (0 hari), T₁ (7 hari) dan T₂ (14 hari) dengan 3 ulangan pada masing-masing perlakuan. Kombinasi perlakuan sebagai berikut :

M₀T₀ = kelobot jagung amoniasi, aras A. niger 0%, lama peram 0 hari

M₀T₁ = kelobot jagung amoniasi, aras A. niger 0%, lama peram 7 hari

M_0T_2 = kelobot jagung amoniasi, aras A. niger 0%, lama peram 14 hari

M_1T_0 = kelobot jagung amoniasi, aras A. niger 2,5%, lama peram 0 hari

M_1T_1 = kelobot jagung amoniasi, aras A. niger 2,5%, lama peram 7 hari

M_1T_2 = kelobot jagung amoniasi, aras A. niger 2,5%, lama peram 14 hari

M_2T_0 = kelobot jagung amoniasi, aras A. niger 5%, lama peram 0 hari

M_2T_1 = kelobot jagung amoniasi, aras A. niger 5%, lama peram 7 hari

M_2T_2 = kelobot jagung amoniasi, aras A. niger 5%, lama peram 14 hari

Analisis data menggunakan analisis varians (Anova) / analisis ragam taraf signifikansi 5% untuk mengetahui pengaruh interaksi perlakuan. Apabila terdapat pengaruh maka dilakukan uji lanjut yaitu uji wilayah ganda Duncan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (Steel dan Torrie, 1991).

3.2.6. Analisis data

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

Keterangan :

i = Perlakuan aras A. niger M_0 (0%), M_1 (2,5%), M_2 (5%)

j = Perlakuan lama peram T_0 (0 hari), T_1 (7 hari), T_2 (14 hari)

k = Ulangan ke 1, 2, 3

Y_{ijk} = Kualitas pencernaan kelobot jagung pada unit ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij (taraf ke-i dari aras A. niger dan taraf ke-j dari lama peram).

μ = Nilai tengah umum kualitas pencernaan kelobot jagung

α_i = Pengaruh aditif dari aras A. niger ke-i

- β_j = Pengaruh aditif dari lama peram ke-j
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh interaksi antara aras A. niger ke-i dan lama peram ke-j
- ϵ_{ijk} = Pengaruh galat percobaan pada percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

3.2.7. Hipotesis statistik

- a. H0 : $(\alpha\beta)_{ij} = 0$, berarti tidak ada pengaruh interaksi antara penambahan aras A. niger dengan lama peram terhadap pencernaan kelobot jagung.
- H1 : minimal ada satu $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$, ada pengaruh interaksi antara penambahan aras A. niger dengan lama peram terhadap pencernaan kelobot jagung.
- b. H0 : $\alpha_i = 0$, berarti tidak ada pengaruh penambahan aras A. niger terhadap pencernaan kelobot jagung.
- H1 : minimal ada satu $\alpha_i \neq 0$, minimal ada satu penambahan aras A. niger terhadap pencernaan kelobot jagung.
- c. H0 : $\beta_j = 0$, berarti tidak ada pengaruh lama peram terhadap pencernaan kelobot jagung.
- H1 : minimal ada satu $\beta_j \neq 0$, minimal ada satu dari lama peram yang dapat mempengaruhi pencernaan kelobot jagung.

Kaidah keputusan yang harus diambil adalah (Steel dan Torrie, 1991):

- a. Pengaruh interaksi
- Apabila $F_{hitung} M \times T < F_{tabel}$ pada taraf 5% maka tidak terjadi interaksi yang nyata antara faktor M dengan faktor T (non signifikan).
 - Apabila $F_{hitung} M \times T \geq F_{tabel}$ pada taraf 5% maka terdapat interaksi

yang nyata antara faktor M dengan faktor T (signifikan).

b. Pengaruh Jumlah Aras

- Apabila $F_{hitung} M < F_{tabel}$ pada taraf 5% maka faktor M tidak berpengaruh nyata (non signifikan).
- Apabila $F_{hitung} M \geq F_{tabel}$ pada taraf 5% maka faktor M berpengaruh nyata (signifikan).

c. Pengaruh Lama Penyimpanan

- Apabila $F_{hitung} T < F_{tabel}$ pada taraf 5% maka faktor T tidak berpengaruh nyata (non signifikan).
- Apabila $F_{hitung} T \geq F_{tabel}$ pada taraf 5% maka faktor T berpengaruh nyata (signifikan).