

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian tentang pengaruh interaksi amoniasi dengan lama peram fermentasi terhadap pencernaan dan fermentabilitas ampas aren (*Arenga pinnata* Merr) secara *in vitro* dilaksanakan selama 4 bulan, dari bulan Oktober 2019 – Januari 2020. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian yaitu ampas aren. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah ampas aren, starter *Trichoderma reesei*, urea untuk amoniasi, aluminium foil, aquades, pH *stick*, plastik putih, pemanas, fermentor dan cairan rumen. Bahan kimia yang digunakan meliputi larutan penyangga (McDougall), kertas saring Whatman 41, gas CO₂, larutan pepsin HCl 0,1%, indikator Phenolphthalein, asam borat, indikator campuran brom kresol hijau dan metil merah, larutan H₂SO₄ 15%, larutan Na₂CO₃ jenuh, larutan NaOH 0,5 N, larutan HCl 0,5 N larutan H₂SO₄ 0,0055 N, dan vaselin.

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi yaitu gunting, timbangan analitik merk Fujitsu dengan kapasitas 2 kg dan ketelitian 0,001 g, alat sterilisasi, plastik klip, ayakan dan alat-alat laboratorium seperti gelasukur, *waterbath*, gelas beker, tabung fermentor, termometer, pengaduk, erlenmeyer, termos, saringan,

sprit, pipet, sentrifus, cawan porselin, cawan Conway, tanur, labu destilasi, labu pendingin, oven, tabung destilasi dan peralatan destilasi.

3.2. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dalam 3 tahap yaitu tahap persiapan, tahap amoniasi, tahap fermentasi dan tahap analisis laboratorium.

3.2.1. Tahap persiapan

Tahap ini meliputi persiapan semua materi baik alat maupun bahan yang akan digunakan seperti sanitasi ruang fermentasi, pembuatan fermentor, sterilisasi fermentor menggunakan uap, analisis proksimat ampas aren mentah, perhitungan kadar starter *Trichoderma reesei* untuk fermentasi, sterilisasi ampas aren, mempersiapkan isolat dan kadar suplementasi urea untuk amoniasi.

3.2.2. Tahap amofer

Tahap pembuatan amoniasi dilakukan pada ampas aren yang telah di keringkan kemudian ditimbang 6 kg. Urea ditimbang dengan berat 385,63 g kemudian dicampur dengan air sebanyak 3118 ml. Ampas aren yang sudah ditimbang diletakkan di atas alas kemudian campuran air dan urea dituang di atas ampas aren dan dicampur hingga homogen. Ampas aren yang telah rata tercampur urea dan air kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik dan ditutup rapat kemudian diperam selama 2 minggu. Ampas aren yang telah diamoniasi selama 2 minggu kemudian diangin-anginkan.

Tahap fermentasi. Tahap fermentasi dilakukan terhadap ampas aren yang sudah diamoniasi kemudian diangin-anginkan sampai kering dan dilakukan sterilisasi. Ampas aren yang sudah disterilisasi kemudian didinginkan yang selanjutnya digunakan untuk fermentasi. Fermentasi dilakukan dengan cara ampas aren amoniasi yang telah disterilisasi kemudian ditimbang dan diletakkan ke dalam wadah. Ampas aren kemudian ditambahkan strater *T. reesei* 1,5% dari BK yang telah dilarutkan dengan aqua pro injection dan dihomogenkan kemudian diletakkan pada nampan fermentasi masing-masing 100 g. Nampan yang berisi ampas aren kemudian dimasukkan ke dalam fermentor untuk dilakukan proses pemeraman. Lama proses pemeraman selama fermentasi meliputi 0 hari, 3 hari dan 6 hari.

3.2.3. Tahap analisis KcBK, KcBO, VFA dan NH₃

Analisis KcBK dan KcBO dilakukan menggunakan metode Tilley dan Terry. (1963) dalam Harris (1970) yaitu dengan 0,55 g sampel ampas aren dimasukkan ke dalam tabung fermentor kemudian ditambahkan 40 ml larutan McDougall dan diinkubasi hingga suhunya sama dengan suhu cairan rumen yaitu 39 – 42°C. Proses selanjutnya ditambahkan 10 ml cairan rumen ke dalam tabung fermentor kemudian tabung fermentor dialiri gas CO₂ selama 10 – 20 detik untuk menciptakan suasana anaerob. Tabung fermentor ditutup kemudian diinkubasi selama 48 jam di *waterbath* pada suhu 39°C. Tabung fermentor digojok setiap 6 jam agar cairan rumen dan sampel selalu kontak. Setelah diinkubasi selama 48 jam fermentasi dihentikan dengan cara tabung fermentor dimasukkan ke dalam air

es 10 – 15 menit untuk menghentikan fermentasi atau dapat menggunakan larutan HgCl₂. Sampel kemudian disentrifus selama 10 - 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan dibuang kemudian endapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung fermentor dan ditambahkan larutan pepsin-HCl 0,1% 50 ml kemudian diinkubasi selama 48 jam. Selama proses inkubasi lakukan penggojokan 6 jam sekali. Residu hasil inkubasi setelah 48 jam kemudian disaring dengan kertas saring Whatman 41 (yang telah ditimbang) dengan bantuan pompa vakum dan dibilas dengan aquades. Endapan hasil penyaringan kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselin (yang telah ditimbang) kemudian dioven pada suhu 105°C sampai bobotnya konstan, setelah itu dimasukkan dalam eksikator selama 15 menit kemudian residu dan cawan porselin ditimbang. Setelah diketahui beratnya residu kemudian diabukan di dalam tanur listrik pada suhu 550°C selama 6 jam sampai berwarna putih, didinginkan dan ditimbang. Dilakukan pula pengukuran terhadap blanko (tanpa sampel). Nilai KcBK dan KcBO dihitung menggunakan rumus:

KcBK (%) =

$$\frac{((\text{berat sampel} \times \% \text{ BK sampel}) - (\text{bahan kering residu} - \text{blanko}))}{\text{Bahan kering sampel}} \times 100\%$$

KcBO (%) =

$$\frac{((\text{berat sampel} \times \% \text{ BO sampel}) - (\text{bahan organik residu} - \text{blanko}))}{\text{Bahan organik sampel}} \times 100\%$$

Analisis produksi VFA dan NH_3 dilakukan dengan 0,55 g sampel dimasukkan ke dalam tabung fermentor kemudian ditambahkan 40 ml larutan McDougall kemudian diinkubasi hingga suhunya sama dengan suhu rumen yaitu $39 - 42^\circ\text{C}$. Cairan rumen 10 ml ditambahkan ke dalam tabung fermentor kemudian tabung fermentor dialiri gas CO_2 selama 10 – 20 detik untuk menciptakan suasana *anaerob*. Tutup tabung fermentor lalu diinkubasi selama 3 jam di *waterbath* pada suhu 39°C . Tabung fermentor yang telah diinkubasi selama 3 jam, kemudian dimasukkan ke dalam air es 10 – 15 menit untuk menghentikan fermentasi. Sampel kemudian disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan diambil dengan *sprit* dan dimasukkan ke dalam botol plastik kemudian disimpan dalam freezer.

Analisis produksi VFA total menggunakan metode destilasi uap (Departement of Dairy Science, 1966) yaitu dengan 5 ml supernatan diambil dengan *sprit* lalu dimasukkan ke dalam tabung destilasi kemudian ditambahkan H_2SO_4 15% 1 ml. Tabung destilasi kemudian dimasukkan ke dalam labu destilasi yang telah berisi 700 ml aquades. Labu destilasi dihubungkan dengan labu pendingin. Aquades dipanaskan dengan kompor listrik sehingga terjadi penguapan. Hasil destilasi ditampung di dalam tabung Erlenmeyer yang telah ditambahkan NaOH 0,5 N 5 ml hingga mencapai 100 ml. Hasil destilasi kemudian ditambahkan indikator Phenolphthalein sebanyak 2 tetes kemudian hasil destilasi larutan dititrasikan dengan menggunakan HCl 0,5 N hingga warna berubah dari merah muda menjadi bening. Pengukuran Blanko dilakukan juga dengan 5 ml

NaOH 0,5 N dan 2 tetes Phenolphtalein hingga warna berubah dari merah muda menjadi bening. Produksi VFA dihitung menggunakan rumus:

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

Keterangan:

Y = ml HCl yang dibutuhkan untuk titrasi 5 ml NaOH larutan blangko.

Z = ml HCl yang dibutuhkan untuk titrasi hasil destilasi sampel.

Analisis kadar NH_3 menggunakan metode mikro difusi Conway (Department of Dairy Science, 1966). dengan cawan Conway disiapkan kemudian dicuci dan dikeringkan sebelum digunakan, setelah itu permukaan bibir cawan Conway diolesi vaselin hingga merata. Bagian tengah cawan ditambahkan asam borat 30% dan ditambahkan 1 tetes indikator campuran metil merah dan brom kresol hijau, kemudian Na_2CO_3 jenuh 1 ml ditambahkan pada salah satu sisi cawan Conway dan supernatan 1 ml ditambahkan pada salah satu sisi cawan Conway yang bersebelahan dengan Na_2CO_3 jenuh. Cawan kemudian ditutup dengan rapat hingga tidak ada rongga udara dan digoyangkan perlahan agar Na_2CO_3 dan supernatan tercampur. Cawan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam hal ini bertujuan agar NH_3 dapat diikat oleh asam borat dengan ditandai perubahan warna dari merah muda menjadi ungu. Setelah 24 jam tutup cawan dibuka kemudian asam borat 30% dititrasi dengan H_2SO_4 0,0055 N hingga warna berubah dari ungu menjadi merah muda. Rumus produksi amonia sebagai berikut:

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

Keterangan:

N-NH₃ = konsentrasi N-NH₃ yang diperoleh

N H₂SO₄ = normalitas larutan H₂SO₄

3.3. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 2 x 3 dengan 3 ulangan. Faktor pertama adalah amoniasi yaitu A0 (ampas aren tapan amoniasi) dan A1 (ampas aren amoniasi). Faktor kedua perbedaan lama peram yaitu 0, 3 dan 6 hari. Data kemudian dianalisis dengan uji F jika data berbeda nyata dilakukan uji lanjutan dengan uji Wilayah Ganda Duncan pada taraf 5% untuk mengetahui perbedaan nilai tengah antar perlakuan.

Model linier rancangan acak lengkap pola faktoria sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_j + ab_{ijk} + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = pengamatan pada perlakuan tanpa amoniasi dan amoniasi ke-i, lama peram fermentasi ke-j dan ulangan ke-k

i = jumlah perlakuan (1,2)

j = jumlah ulangan (0,1,2,3)

μ = nilai tengah umum

α_i = pengaruh perlakuan tanpa amoniasi dan amoniasi ke-i

b_i = pengaruh lama peram fermentasi ke-j

ab_{ijk} = pengaruh interaksi antara perlakuan tanpa amoniasi dan amoniasi ke-i dengan lama peram fermentasi ke-j

ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan perlakuan tanpa amoniasi dan amoniasi ke-i, lama peram fermentasi ke-j dan ulangan ke-k

Hipotesis :

H_0 = tidak ada interaksi antara perlakuan amoniasi dengan lama peram fermentasi terhadap VFA, NH_3 , KcBK dan KcBO ampas aren.

H_1 = ada interaksi antara perlakuan amoniasi dengan lama peram fermentasi terhadap VFA, NH_3 , KcBK dan KcBO ampas aren.