

**PENGARUH SUPLEMENTASI METIONIN TERPROTEKSI TERHADAP
NILAI KECERNAAN, PROTEIN TOTAL DAN SINTESIS PROTEIN
MIKROBA PADA KUALITAS RANSUM YANG BERBEDA
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

MUHAMMAD NAUFAL AFIF



**PROGRAM STUDI S-1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
S E M A R A N G
2 0 2 6**

PENGARUH SUPLEMENTASI METIONIN TERPROTEKSI TERHADAP
NILAI KECERNAAN, PROTEIN TOTAL DAN SINTESIS PROTEIN
MIKROBA PADA KUALITAS RANSUM YANG BERBEDA
SECARA *IN VITRO*

Oleh:

MUHAMMAD NAUFAL AFIF
NIM: 23010122120027

Salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Peternakan pada Program Studi S–1 Peternakan
Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro

PROGRAM STUDI S–1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
S E M A R A N G
2 0 2 6

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Muhammad Naufal Afif
N I M : 23010122120027
Program Studi : S-1 Peternakan

dengan ini menyatakan sebagai berikut :

1. Skripsi yang berjudul : **Pengaruh Suplementasi Metionin Terproteksi terhadap Nilai Kecernaan, Protein Total dan Sintesis Protein Mikroba pada Kualitas Ransum yang Berbeda secara *In Vitro*** dan penelitian yang terkait dengan skripsi ini merupakan karya penulis sendiri.
2. Setiap ide atau kutipan dari karya orang lain berupa publikasi atau bentuk lainnya dalam skripsi ini, telah diakui sesuai dengan standar prosedur disiplin ilmu.
3. Penulis juga mengakui bahwa skripsi ini dapat dihasilkan berkat bimbingan dan dukungan penuh dari Pembimbing yaitu : **Prof. Dr. Ir. Anis Muktiani, M.Si. dan Dr. Ir. Marry Christiyanto, M.P., IPM.**

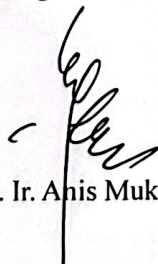
Apabila di kemudian hari dalam skripsi ini ditemukan hal-hal yang menunjukkan telah dilakukannya kecurangan akademik, maka penulis bersedia gelar sarjana yang telah penulis dapatkan ditarik sesuai dengan ketentuan dari Program Studi S-1 Peternakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

Semarang, Juni 2026


Muhammad Naufal Afif

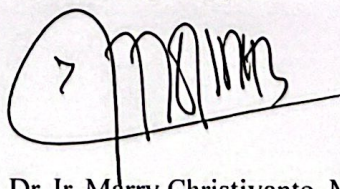
Mengetahui,

Pembimbing Utama



Prof. Dr. Ir. Anis Muktiani, M.Si.

Pembimbing Anggota



Dr. Ir. Marry Christiyanto, M.P., IPM.

Judul Skripsi : PENGARUH SUPLEMENTASI METIONIN TERPROTEKSI TERHADAP NILAI KECERNAAN, PROTEIN TOTAL DAN SINTESIS PROTEIN MIKROBA PADA KUALITAS RANSUM YANG BERBEDA SECARA *IN VITRO*

Nama Mahasiswa : MUHAMMAD NAUFAL AFIF

Nomor Induk Mahasiswa : 23010122120027

Program Studi/Departemen : S-1 PETERNAKAN/PETERNAKAN

Fakultas : PETERNAKAN DAN PERTANIAN

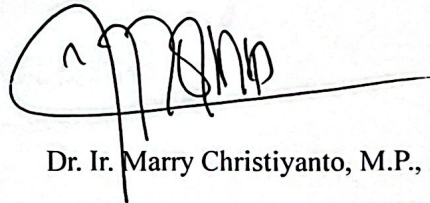
Telah disidangkan di hadapan Tim Penguji
dan dinyatakan lulus pada tanggal **24 JUN 2026**.....

Pembimbing Utama



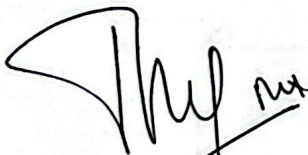
Prof. Dr. Ir. Anis Muktiani, M.Si.

Pembimbing Anggota



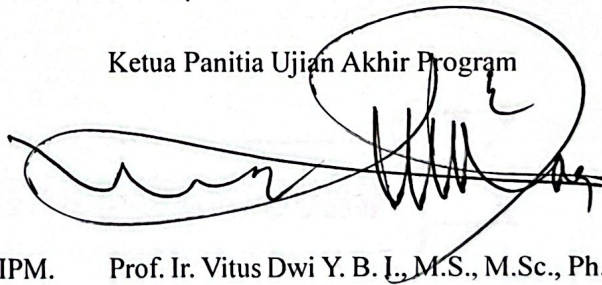
Dr. Ir. Marry Christiyanto, M.P., IPM.

Ketua Program Studi



Ir. Rudy Hartanto, S.Pt., M.P., Ph.D., IPM.

Ketua Panitia Ujian Akhir Program

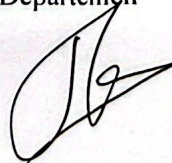


Prof. Ir. Vitus Dwi Y. B. I., M.S., M.Sc., Ph.D., IPU.



Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D.

Ketua Departemen



Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM.

RINGKASAN

MUHAMMAD NAUFAL AFIF. 23010122120027. 2026. Pengaruh Suplementasi Metionin Terproteksi terhadap Nilai Kecernaan, Protein Total dan Sintesis Protein Mikroba pada Kualitas Ransum yang Berbeda secara *In Vitro* (Pembimbing: **ANIS MUKTIANI** dan **MARRY CHRISTIYANTO**).

Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh suplementasi metionin terproteksi pada ransum sapi perah dengan kualitas yang berbeda terhadap nilai kecernaan bahan kering (KcBK), kecernaan bahan organik (KcBO), protein total dan sintesis protein mikroba yang dilakukan secara *in vitro*. Penelitian diambil dengan latar belakang bahwa sebagian kecil fraksi metionin terproteksi dapat terdegradasi di dalam rumen dan mampu mempengaruhi aktivitas mikroba rumen dalam proses pencernaan dan fermentabilitas. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni hingga Agustus 2025 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

Penelitian menggunakan sampel ransum sapi perah komersial dari PT. Global Dairi Alami yang disuplementasi metionin terproteksi (Mepron[®]) dengan taraf 0,13% (25 gram/ekor/hari). Penelitian disusun menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) berpola faktorial (2×2) dengan 4 ulangan sehingga terdapat 16 unit percobaan. Perlakuan yang diterapkan meliputi M0R1 (ransum dengan protein kasar (PK) dan *total digestible nutrients* (TDN) rendah tanpa metionin terproteksi), M1R1 (ransum dengan PK dan TDN rendah + metionin terproteksi 0,13%), M0R2 (ransum dengan PK dan TDN tinggi tanpa metionin terproteksi) dan M1R2 (ransum dengan PK dan TDN tinggi + metionin terproteksi 0,13%). Parameter yang diamati yaitu nilai KcBK, KcBO, protein total dan sintesis protein mikroba. Data diolah menggunakan *Two-Way* ANOVA taraf signifikansi 5%, apabila berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan Multiple Range Test*) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh interaksi ($p < 0,05$) antara suplementasi metionin terproteksi pada kualitas ransum yang berbeda terhadap sintesis protein mikroba, namun tidak terdapat pengaruh interaksi ($p > 0,05$) antara suplementasi metionin terproteksi pada kualitas ransum yang berbeda terhadap nilai KcBK, KcBO dan protein total. Rata-rata nilai KcBK tiap perlakuan adalah 67,69% (M0R1), 67,07% (M1R1), 82,69% (M0R2) dan 78,03% (M1R2). Rata-rata nilai KcBO tiap perlakuan adalah 66,01% (M0R1), 65,00% (M1R1), 79,16% (M0R2) dan 76,00 (M1R2). Rata-rata produksi protein total tiap perlakuan adalah 148,46 mg/g (M0R1), 150,47 mg/g (M1R1), 150,90 mg/g (M0R2) dan 152,34 mg/g (M1R2). Rata-rata sintesis protein mikroba tiap perlakuan adalah 1.062 $\mu\text{g/ml}$ (M0R1), 1.602 $\mu\text{g/ml}$ (M1R1), 1.230 $\mu\text{g/ml}$ (M0R2) dan 1.164 $\mu\text{g/ml}$ (M1R2). Simpulan dari penelitian ini adalah suplementasi metionin terproteksi 0,13% mampu meningkatkan sintesis protein mikroba pada kualitas ransum dengan kandungan protein dan TDN rendah.

KATA PENGANTAR

Metionin terproteksi merupakan asam amino esensial yang dibutuhkan sapi perah untuk sintesis protein susu. Metionin menjadi asam amino pembatas karena mudah didegradasi oleh mikroba di dalam rumen, mengalami deaminasi dan diubah menjadi amonia (NH_3). Produk metionin dikembangkan dalam bentuk terproteksi melalui proses pelapisan (*coating*) atau enkapsulasi menggunakan polimer seperti etil selulosa dan lipid untuk mengurangi tingkat degradasi di dalam rumen. Pemanfaatan metionin terproteksi ini perlu dikaji lebih lanjut secara *in vitro* karena menurut beberapa studi terdahulu, sebagian kecil fraksi metionin terproteksi dapat terdegradasi di dalam rumen, sehingga mempengaruhi aktivitas mikroba rumen dalam proses pencernaan dan fermentabilitas.

Penulis memanjatkan puji dan syukur kepada Allah SWT atas rahmat, hidayah serta karunia-Nya sehingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan secara lengkap dan tepat waktu. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Anis Muktiani, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Ir. Marry Christiyanto, M.P., IPM. sebagai Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bimbingan, arahan dan saran sehingga penelitian dan penulisan skripsi ini dapat diselesaikan.
2. Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM. selaku Ketua Departemen Peternakan, Ir. Rudy Hartanto, S.Pt., M.P., Ph.D., IPM. selaku Ketua Program Studi S-1 Peternakan dan seluruh staf akademik serta karyawan yang telah memberi fasilitas selama masa perkuliahan.

3. Dr. Ir. Marry Christiyanto, M.P., IPM. selaku Dosen Wali dan Ir. Surono, M.P. selaku Koordinator Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan yang telah memberikan arahan serta evaluasi.
4. Seluruh Dosen Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro yang telah memberikan ilmu, wawasan serta mendidik Penulis selama proses perkuliahan.
5. Kedua Orang Tua Penulis yaitu Bapak Rizaldi Marwan, S.E. dan Ibu Aries Santi, S.Sos. yang menjadi pionir bagi Penulis dalam meraih gelar akademik serta selalu memberikan dukungan dalam bentuk apresiasi, kasih sayang dan doa hingga saat ini.
6. Labib Ahmad Rozan, Naila Amalia Salicha dan Yusrian Nuranaily Marelsa Putri M.N yang merupakan sahabat Penulis sejak semester 1 serta sebagai tim penelitian yang selalu memberikan apresiasi, bantuan dan dukungan.
7. Seluruh keluarga, teman dan kerabat yang tidak dapat Penulis sebutkan satu per satu karena telah memberikan dukungan dan apresiasi.

Penulis sangat berharap dengan adanya skripsi ini, dapat memberikan wawasan dan manfaat bagi Pembaca.

Semarang, Juni 2026

Muhammad Naufal Afif

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Ransum Sapi Perah	5
2.2. Suplementasi	6
2.3. Metionin Terproteksi	7
2.4. Kecernaan <i>In Vitro</i>	8
2.5. Kecernaan Bahan Kering (KcBK)	9
2.6. Kecernaan Bahan Organik (KcBO)	10
2.7. Protein Total	11
2.8. Sintesis Protein Mikroba	12
BAB III. MATERI DAN METODE	13
3.1. Materi	13
3.2. Metode.....	15
3.3. Analisis Statistik	20
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1. Nilai KcBK yang Disuplementasi Metionin Terproteksi pada Kualitas Ransum yang Berbeda secara <i>In Vitro</i>	23
4.2. Nilai KcBO yang Disuplementasi Metionin Terproteksi pada Kualitas Ransum yang Berbeda secara <i>In Vitro</i>	25

4.3.	Produksi Protein Total yang Disuplementasi Metionin Terproteksi pada Kualitas Ransum yang Berbeda secara <i>In Vitro</i>	28
4.4.	Sintesis Protein Mikroba yang Disuplementasi Metionin Terproteksi pada Kualitas Ransum yang Berbeda secara <i>In Vitro</i>	30
BAB V.	SIMPULAN DAN SARAN	32
5.1.	Simpulan	32
5.2.	Saran.....	32
	DAFTAR PUSTAKA	33
	LAMPIRAN.....	42
	RIWAYAT HIDUP	77

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Kandungan Nutrien Ransum Perlakuan	14
2.	Rata-rata Nilai KcBK yang Disuplementasi Metionin Terproteksi pada Kualitas Ransum yang Berbeda secara <i>In Vitro</i>	23
3.	Rata-rata Nilai KcBO yang Disuplementasi Metionin Terproteksi pada Kualitas Ransum yang Berbeda secara <i>In Vitro</i>	26
4.	Rata-rata Produksi Protein Total yang Disuplementasi Metionin Terproteksi pada Kualitas Ransum yang Berbeda secara <i>In Vitro</i>	28
5.	Rata-rata Sintesis Protein Mikroba yang Disuplementasi Metionin Terproteksi pada Kualitas Ransum yang Berbeda secara <i>In Vitro</i>	30

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Perhitungan Taraf Suplementasi Metionin Terproteksi	42
2.	Perhitungan Kecernaan Bahan Kering (KcBK)	43
3.	Perhitungan <i>Two-Way</i> ANOVA KcBK	46
4.	Uji Jarak Berganda Duncan KcBK	51
5.	Perhitungan Kecernaan Bahan Organik (KcBO)	53
6.	Perhitungan <i>Two-Way</i> ANOVA KcBO	56
7.	Uji Jarak Berganda Duncan KcBO	61
8.	Perhitungan Produksi Protein Total	63
9.	Perhitungan <i>Two-Way</i> ANOVA Protein Total	64
10.	Perhitungan Sintesis Protein Mikroba	69
11.	Perhitungan <i>Two-Way</i> ANOVA Sintesis Protein Mikroba	70
12.	Uji Jarak Berganda Duncan Sintesis Protein Mikroba	75

BAB I

PENDAHULUAN

Optimalisasi produktivitas ternak sapi perah menjadi salah satu prioritas utama dalam pengembangan subsektor peternakan, baik pada skala global maupun nasional. Susu merupakan salah satu sumber protein hewani dengan nilai gizi tinggi yang berperan penting dalam pemenuhan kebutuhan gizi (Zulhandi, 2025). Kebutuhan susu nasional akan terus meningkat seiring dengan peningkatan populasi dan kesadaran masyarakat akan pentingnya konsumsi gizi dari protein hewani (Mustaqim *et al.*, 2021). Peningkatan kebutuhan susu sapi secara nasional tidak sejalan dengan produktivitas sapi perah di Indonesia yang masih tergolong rendah. Salah satu contohnya yaitu sapi perah jenis Friesian Holstein (FH) yang merupakan ras unggulan dan paling banyak dibudidayakan di Indonesia hanya mampu memproduksi susu sekitar 5.490 kg/ekor/laktasi atau 17 liter/ekor/hari (Isdarwanto *et al.*, 2025). Angka tersebut tergolong lebih rendah dibandingkan dengan produksi susu sapi FH di negara asalnya yaitu Belanda yang dapat mencapai 6.000-8.000 kg/ekor/laktasi atau 19-25 liter/ekor/hari (Ginantika *et al.*, 2021).

Tingkat produktivitas sapi perah sangat dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi di dalam ransum (Mayasari *et al.*, 2018). Nutrien yang terkandung di dalam ransum akan dicerna dan dimetabolisme untuk memenuhi kebutuhan hidup pokok, produksi, reproduksi dan berbagai proses fisiologis ternak (Pramono *et al.*, 2018). Nilai pencernaan merupakan salah satu indikator penting dalam menentukan seberapa banyak nutrisi yang dapat dimanfaatkan oleh ternak (Bui *et al.*, 2020).

Kecernaan yang optimal dapat meningkatkan efisiensi pemanfaatan nutrisi sehingga kebutuhan energi, protein dan zat gizi lainnya dapat terpenuhi untuk menunjang produktivitas ternak (Jhena *et al.*, 2020). Ketidakseimbangan nutrisi di dalam ransum, terutama dalam pemenuhan protein dan asam amino yang diperlukan untuk biosintesis protein susu merupakan salah satu faktor utama rendahnya produktivitas sapi perah (Siska *et al.*, 2021). Nutrisi yang berasal dari pakan akan dicerna dan didegradasi di dalam rumen sebelum diserap di usus halus. Pemberian pakan sumber protein seringkali tidak efisien dan cenderung boros karena sebagian besar pakan sumber protein (sekitar 60%) terdegradasi menjadi amonia (NH_3) di dalam rumen (Basri, 2024).

Protein merupakan makromolekul yang tersusun dari berbagai asam amino esensial maupun non esensial dan dihubungkan oleh ikatan peptida (Adelia, 2023). Asam amino esensial merupakan asam amino yang tidak dapat disintesis oleh tubuh dan disuplai melalui pakan, sedangkan asam amino non esensial dapat disintesis oleh tubuh melalui senyawa lain (Mukhlisah *et al.*, 2023). Asam amino esensial maupun non esensial dibutuhkan ternak untuk sintesis protein susu (Suparto, 2018). Apabila ternak mengalami defisiensi atau ketidakseimbangan asam amino, maka dapat mempengaruhi sintesis protein yang berdampak pada produktivitas ternak (Hidayati *et al.*, 2025). Perbaikan kualitas pakan perlu difokuskan melalui penyediaan sumber protein yang seimbang dan suplementasi asam amino esensial seperti metionin untuk meningkatkan produktivitas sapi perah. Metionin menjadi salah satu asam amino pembatas untuk sintesis protein dan metabolisme energi pada ternak ruminansia khususnya fase pertumbuhan dan laktasi (Wiyatna *et al.*, 2016).

Metionin menjadi asam amino pembatas karena mudah didegradasi oleh mikroba di dalam rumen, mengalami deaminasi dan diubah menjadi NH_3 sehingga dapat mempengaruhi keseimbangan asam amino di dalam tubuh (Talapessy *et al.*, 2024).

Pemberian metionin terproteksi (*rumen protected methionine*) merupakan salah satu strategi efektif untuk meningkatkan ketersediaan asam amino esensial pasca rumen (Ayyat *et al.*, 2021). Suplementasi metionin terproteksi mampu mengurangi tingkat deaminasi di dalam rumen serta menurunkan konsentrasi urea dalam darah (Li *et al.*, 2022). Beberapa metode proteksi yang dapat digunakan yaitu dengan *coating* (menggunakan lapisan lemak atau biopolimer), bentuk analog (*methionine hydroxy analogue*) atau teknologi *slow release* yang menjaga stabilitas metionin selama berada di rumen. Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa suplementasi metionin terproteksi dapat mempengaruhi fermentabilitas rumen, meningkatkan produksi asam asetat, propionat, butirat dan *volatile fatty acids* (VFA) total pada ransum dengan kualitas protein rendah (Abbasi *et al.*, 2019). Hal tersebut diduga karena sebagian kecil fraksi metionin terproteksi ($\pm 20\%$) dapat terdegradasi di rumen, sehingga mempengaruhi aktivitas mikroba rumen dalam proses pencernaan dan fermentabilitas. Penelitian mengenai pengaruh suplementasi metionin terproteksi terhadap parameter nilai pencernaan menunjukkan hasil bervariasi yang dapat dipengaruhi oleh kualitas ransum yang digunakan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji pengaruh suplementasi metionin terproteksi pada kualitas ransum yang berbeda terhadap nilai pencernaan bahan kering (KcBK), pencernaan bahan organik (KcBO), produksi protein total dan sintesis protein mikroba secara *in vitro*. Manfaat dari penelitian ini yaitu untuk

memberikan informasi ilmiah serta hasil penelitian mengenai pengaruh suplementasi metionin terproteksi pada kualitas ransum yang berbeda, ditinjau dari parameter nilai KcBK, KcBO, produksi protein total dan sintesis protein mikroba yang dilakukan secara *in vitro*.

Hipotesis dari penelitian ini adalah kombinasi antara perlakuan suplementasi metionin terproteksi pada kualitas ransum yang berbeda dapat meningkatkan nilai KcBK, KcBO, produksi protein total dan sintesis protein mikroba.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ransum Sapi Perah

Ransum didefinisikan sebagai campuran berbagai bahan pakan yang diformulasikan secara seimbang untuk memenuhi kebutuhan nutrisi sesuai dengan kondisi fisiologis dan tingkat produksi ternak (Agustono *et al.*, 2017). Ransum tidak hanya berfungsi sebagai sumber energi dan protein, tetapi juga sebagai penyedia mikronutrien seperti mineral dan vitamin yang dibutuhkan untuk menunjang kebutuhan hidup pokok, kesehatan dan produktivitas ternak (Nugraha *et al.*, 2024). Ransum sapi perah terdiri dari hijauan dan konsentrat. Hijauan merupakan bahan pakan sumber serat yang berfungsi sebagai sumber energi dan menjaga kondisi rumen serta aktivitas mikroba di dalamnya (Hidayat *et al.*, 2021). Konsentrat merupakan pakan sumber protein atau sumber energi yang menjadi pelengkap atau imbuhan untuk mencukupi kebutuhan protein, karbohidrat, lemak dan mineral yang tidak dapat dipenuhi oleh hijauan (Putri *et al.*, 2024). Penyusunan ransum harus mempertimbangkan keseimbangan antara pakan hijauan sebagai sumber serat dan konsentrat sebagai sumber protein dan energi, agar proses fermentasi di dalam rumen berlangsung secara optimal dan kebutuhan nutrisi ternak dapat terpenuhi secara efisien (Hajar, 2025).

Perbedaan kualitas ransum sapi perah didasarkan pada periode yang krusial dalam pemeliharaan sapi perah, diantaranya fase kering kandang dan fase laktasi. Kebutuhan pada fase kering kandang dipengaruhi oleh kebutuhan hidup pokok dan

aktivitas ternak. Formulasi ransum difokuskan untuk mempersiapkan kelahiran pedet serta periode laktasi berikutnya dengan menjaga kondisi dan bobot tubuh, sehingga kandungan *total digestible nutrients* (TDN) ransum relatif moderat dan protein kasar yang lebih rendah. Kebutuhan nutrisi pada fase kering kandang yaitu protein kasar 12-15%, abu 5-10%, lemak kasar 2-4%, serat kasar 18-25% dan TDN 50% (Adi *et al.*, 2020). Kebutuhan sapi perah pada fase laktasi dipengaruhi oleh kebutuhan hidup pokok dan produktivitas. Ransum diformulasikan dengan kandungan TDN dan protein yang tinggi untuk menunjang produksi susu. Kebutuhan nutrisi pada fase laktasi yaitu protein kasar 16-20%, abu 5-10%, lemak kasar 3-5%, serat kasar 17-25% dan TDN 65-70% (Christi *et al.*, 2025).

2.2. Suplementasi

Suplementasi merupakan metode penambahan bahan pakan tertentu pada ransum dengan tujuan untuk melengkapi, menyeimbangkan atau meningkatkan kandungan nutrisi yang belum terpenuhi oleh pakan utama agar kandungan nutrisi ransum semakin lengkap (Saputra *et al.*, 2022). Bahan suplemen ini mencakup mikronutrien seperti vitamin, mineral, asam amino, enzim dan mikroba (probiotik) yang dapat membantu dalam memperbaiki kesehatan pencernaan, meningkatkan konversi pakan serta mendukung produksi yang lebih tinggi dalam peternakan (Sihombing *et al.*, 2025). Penggunaan bahan suplemen bukan sebagai pengganti ransum basal, melainkan sebagai salah satu metode untuk mengatasi keterbatasan nutrisi spesifik dari segi jumlah maupun ketersediaan. Suplementasi asam amino

menjadi salah satu komponen penting di dalam ransum sapi perah, karena asam amino merupakan penyusun dari makromolekuler protein (Talapessy *et al.*, 2024).

2.3. Metionin Terproteksi

Metionin merupakan salah satu asam amino esensial yang dibutuhkan oleh ternak, sehingga ketersediaannya di dalam pakan sangat dibutuhkan untuk menunjang produktivitas. Metionin merupakan asam amino bersulfur yang berperan penting sebagai *starting point* atau inisiasi dalam sintesis protein, prekursor karnitin dan *glutathione* yang merupakan antioksidan alami guna melindungi sel dari stres oksidatif (Andri *et al.*, 2020). Metionin juga memiliki fungsi metabolik sebagai donor gugus metil (CH_3) melalui proses yang disebut transmetilasi dengan membentuk S-adenosil metionin (SAM) (Son *et al.*, 2020). Dalam proses metabolisme, metionin diaktifkan menjadi SAM yang berperan sebagai donor gugus metil utama dalam berbagai reaksi seperti metilasi *deoxyribonucleic acid* (DNA), *ribonucleic acid* (RNA), protein dan fosfolipid (Junior *et al.*, 2021). Proses ini berperan dalam pengaturan ekspresi gen, stabilitas membran sel dan fungsi normal jaringan, termasuk jaringan ambing. Reaksi metilasi yang optimal pada sapi perah dapat mendukung proses diferensiasi dan fungsi sel sekretori ambing, sehingga berkontribusi terhadap efisiensi sintesis dan sekresi komponen susu.

Metionin menjadi asam amino pembatas pada ternak ruminansia karena mudah terdegradasi di dalam rumen dan diubah menjadi amonia (NH_3) melalui proses deaminasi oleh mikroba rumen (Wei *et al.*, 2022). Penggunaan metionin

terproteksi (*rumen protected methionine*) sebagai bahan suplementasi bertujuan untuk mengurangi tingkat degradasi di dalam rumen. Produk asam amino terproteksi yang tersedia secara komersial telah dikembangkan oleh industri untuk menjaga stabilitas di dalam rumen dan meningkatkan bioavailabilitas di dalam usus halus, melalui proses pelapisan (*coating*) menggunakan biopolimer yang sensitif terhadap pH dan tahan degradasi mikroba rumen (Irawan *et al.*, 2023). Asam amino seperti metionin dan lisin merupakan prekursor penting bagi pertumbuhan mikroba rumen dan protein tubuh. Kombinasi keduanya dalam bentuk terproteksi (*rumen protected*) dapat memperbaiki efisiensi penggunaan nitrogen, menurunkan ekskresi urea dan meningkatkan efisiensi pencernaan protein (Qisthon *et al.*, 2025).

2.4. Kecernaan *In Vitro*

Analisis pencernaan secara *in vitro* merupakan metode pendugaan pencernaan pakan yang tidak melibatkan ternak secara langsung dengan meniru proses yang terjadi di dalam saluran pencernaan ruminansia menggunakan peralatan laboratorium (Mullik *et al.*, 2022). Metode pencernaan *in vitro* dilakukan secara *anaerob* di dalam tabung fermentor dengan menggunakan cairan rumen sebagai inokulum dan larutan penyangga McDougall sebagai saliva buatan dengan perbandingan 1:4 (Julianti *et al.*, 2024). Teknik *in vitro* memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan teknik *in vivo* yaitu durasi pengamatan yang relatif singkat, mampu mengevaluasi sampel dengan jumlah yang banyak dalam kondisi terkontrol, tidak membutuhkan banyak biaya serta dapat mengurangi pengaruh yang disebabkan ternak induk semang (Aswad *et al.*, 2025). Metode

kecernaan secara *in vitro* dalam beberapa kondisi dapat menghasilkan koefisien cerna yang lebih rendah 1-2% dibandingkan dengan metode *in vivo*, serta menunjukkan konsistensi yang bervariasi antar perlakuan (Zubaili *et al.*, 2017).

Beberapa variabel yang dapat diukur melalui metode *in vitro* meliputi nilai kecernaan yang mencakup kecernaan bahan kering, bahan organik, serat dan protein serta fermentabilitas yang mencakup konsentrasi NH_3 , produksi VFA total, VFA parsial, protein total dan sintesis protein mikroba (Amatullah *et al.*, 2022). Faktor-faktor yang perlu diperhatikan dalam analisis kecernaan secara *in vitro* meliputi suhu inkubasi, rasio cairan rumen dan saliva buatan, derajat keasaman (pH) yang optimal, sumber inokulum serta jumlah mikroba (Putri *et al.*, 2025). Temperatur *waterbath* selama proses inkubasi diatur pada kisaran 38-39°C, dengan nilai pH sampel 6,8-6,9 dan dalam kondisi *anaerob* untuk mendukung proses fermentasi yang optimal (Mirnawati, 2019). Proses simulasi pada metode *in vitro* meliputi proses kecernaan fermentatif di dalam retikulo rumen menggunakan cairan rumen, kemudian dilanjutkan dengan proses kecernaan enzimatik pasca rumen menggunakan larutan asam klorida (HCl) (Harahap *et al.*, 2025).

2.5. Kecernaan Bahan Kering (KcBK)

Kecernaan bahan kering (KcBK) merupakan salah satu parameter dalam mengevaluasi kualitas dan pemanfaatan nutrisi pada pakan ternak, khususnya pada ruminansia. Kecernaan bahan kering didefinisikan sebagai proporsi bahan kering pakan yang dapat dicerna dan diserap oleh ternak melalui proses pencernaan, baik secara fermentatif di dalam rumen maupun secara enzimatik di saluran pencernaan

pascarumen (Taebenu *et al.*, 2023). Nilai KcBK mencerminkan komponen bahan kering pakan yang terdiri dari protein kasar, karbohidrat (bahan ekstrak tanpa nitrogen dan serat kasar) lemak kasar serta abu yang dapat dimanfaatkan oleh ternak, sehingga sering digunakan sebagai indikator efisiensi penggunaan pakan dan potensi energi yang tersedia bagi ternak (Vilan *et al.*, 2023). Tingkat pencernaan nutrien pada ruminansia juga dipengaruhi oleh aktivitas dan populasi mikroba rumen, karena nilai pencernaan diukur berdasarkan kemampuan mikroba dalam mendegradasi komponen nutrien yang kompleks menjadi lebih sederhana melalui proses fermentasi di dalam rumen (Bano *et al.*, 2022).

2.6. Kecernaan Bahan Organik (KcBO)

Kecernaan bahan organik (KcBO) merupakan salah satu parameter penting dalam evaluasi nilai nutrisi pakan ruminansia karena mencerminkan kemampuan ternak dalam mencerna dan memanfaatkan fraksi bahan organik dari pakan. Komponen bahan organik pakan yang terdiri dari karbohidrat (bahan ekstrak tanpa nitrogen dan serat kasar), protein kasar serta lemak kasar dapat mempengaruhi nilai pencernaan bahan organik (Antika *et al.*, 2024). Nilai KcBO saling berkaitan dengan KcBK, karena sebagian besar komponen bahan kering pakan tersusun dari bahan organik (Faiz *et al.*, 2025). Perbedaan diantara keduanya hanya pada kadar abu yang merupakan materi anorganik atau mineral, sehingga nilai KcBO tidak akan jauh berbeda dengan nilai KcBK (Afif *et al.*, 2025). Nilai KcBO juga dapat dipengaruhi oleh aktivitas dan efisiensi fermentasi mikroba di dalam rumen. Mikroorganisme rumen berperan dalam mendegradasi karbohidrat struktural dan non-struktural,

serta sebagian protein dan lemak menjadi senyawa sederhana seperti asam lemak volatil (*volatile fatty acids/VFA*) yang selanjutnya digunakan sebagai sumber energi utama bagi ternak.

2.7. Protein Total

Protein total merupakan akumulasi seluruh fraksi protein yang terdiri dari protein *bypass* pakan yang tidak mengalami proses degradasi di dalam rumen dan protein mikroba (Ramandhani *et al.*, 2018). Protein *bypass* pakan yang tidak mengalami proses degradasi di dalam rumen disebut *undegraded dietary protein* (UDP) yang langsung melalui proses pencernaan enzimatik di dalam abomasum dan intestinum. Nilai UDP digunakan untuk mengukur sejumlah protein *bypass* yang dapat mempengaruhi besarnya produksi protein total (Sumadi *et al.*, 2017). Protein total memiliki keterkaitan erat dengan aktivitas fermentasi rumen dan sintesis protein mikroba. Protein pakan dan sumber nitrogen non-protein akan mengalami degradasi di dalam rumen menjadi peptida, asam amino dan amonia yang dimanfaatkan oleh mikroba rumen untuk membentuk biomassa mikroba. Protein mikroba berasal dari biomassa mikroba rumen yang terbawa bersamaan dengan digesta menuju saluran pencernaan pasca rumen (Pazla *et al.*, 2023). Produksi protein total yang diukur dalam cairan rumen atau residu fermentasi *in vitro* mencerminkan tingkat aktivitas mikroba dan ketersediaan nitrogen.

2.8. Sintesis Protein Mikroba

Sintesis protein mikroba merupakan salah satu parameter yang mencerminkan aktivitas mikroba rumen dalam memanfaatkan sumber nitrogen dan energi yang berasal dari pakan untuk membentuk biomassa seluler yang kaya akan protein. Sumber nitrogen yang digunakan mikroba rumen berasal dari protein pakan atau asam amino yang terdegradasi di rumen (*rumen degradable protein*/RDP) menjadi amonia (NH_3), maupun dari nitrogen non-protein seperti urea. Konsentrasi NH_3 yang optimal berkisar 6–21 mM, merupakan salah satu indikator penting untuk mengukur ketersediaan nitrogen bagi mikroba rumen dalam membentuk protein mikroba (Andana *et al.*, 2025). Sumber energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba rumen diperoleh dari hasil fermentasi karbohidrat pakan yang terdiri dari karbohidrat struktural maupun non-struktural menjadi *volatile fatty acids* (VFA) (Rahma *et al.*, 2026). *Volatile fatty acids* juga berperan sebagai penyedia kerangka karbon untuk pembentukan protein mikroba rumen (Jemiman *et al.*, 2025).

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian kuantitatif ini dilakukan secara eksperimental pada bulan Juni hingga Agustus 2025 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis pencernaan bahan kering, pencernaan bahan organik, protein total dan sintesis protein mikroba dilakukan secara *in vitro* sebagai analisis utama dan analisis proksimat kandungan nutrisi ransum dilakukan untuk memperoleh data pendukung.

3.1. Materi

Materi pada penelitian ini meliputi alat dan bahan. Alat yang digunakan yaitu saringan dengan tingkat kehalusan 60 *mesh*, timbangan analitik, *grinder* untuk menghaluskan pakan, termos untuk menyimpan cairan rumen, corong, kain saring, sarung tangan lateks, tabung fermentor beserta tutup karetinya, rak tabung fermentor, termometer, *waterbath*, baskom, alat *sentrifuge*, tabung *sentrifuge*, kulkas untuk menyimpan sampel, spatula, pompa vakum, corong *buchner*, loyang, oven, tang krus, tanur, desikator, *crucible porcelain* (CP), kertas saring Whatman 41 *ashless*, kertas minyak, gelas beker 250 ml, gelas ukur 10, 50 dan 100 ml, mikropipet, pipet tetes, labu destruksi dan labu destilasi untuk analisis protein total, alat spektrofotometer UV–Vis digital panjang gelombang 700 nm untuk analisis sintesis protein mikroba serta alat tulis untuk mencatat data.

Bahan yang digunakan meliputi sampel ransum sapi perah komersial dari PT. Global Dairi Alami dengan suplementasi metionin terproteksi (Mepron®) taraf 0,13%. Bahan untuk analisis *in vitro* meliputi inokulum dari cairan rumen sapi, air hangat suhu 39–40°C, larutan McDougall sebagai *buffer* atau saliva buatan, gas CO₂, air es untuk menghentikan proses fermentasi, larutan pepsin HCl sebagai media pencernaan enzimatis, *aquadest*, larutan *trichloroacetic acid* (TCA) 20% dan *sulfosalicylic acid* (SSA) 2%, katalisator selenium, larutan asam sulfat (H₂SO₄) pekat, larutan NaOH 45%, larutan H₃BO₃ 4%, indikator *methyl red* (MR) dan *methyl blue* (MB), larutan HCl 0,1 N, larutan NaOH 0,1 N, larutan standar *bovine serum albumin* (BSA) 1 mg/ml, larutan folin Lowry 1:1 dan reagen Lowry. Kandungan nutrisi ransum perlakuan tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Nutrien Ransum Perlakuan

Kandungan Nutrien	Perlakuan			
	M0R1	M1R1	M0R2	M1R2
Komposisi dalam 100% BK				
	------(%)-----			
Kadar Air (KA)	8,16	7,66	6,62	5,78
Bahan Kering (BK)	91,84	92,34	93,38	94,22
Bahan Organik (BO)	82,93	83,28	85,13	88,88
Kadar Abu	9,70	9,81	8,83	11,43
Protein Kasar (PK)	7,85	13,33	16,43	17,41
Lemak Kasar (LK)	4,05	3,43	4,38	4,14
Serat Kasar (SK)	26,53	21,95	13,21	13,16
BETN	51,87	51,47	57,15	53,86
TDN*	61,70 ¹⁾	65,94 ¹⁾	72,03 ²⁾	70,10 ²⁾

Keterangan: Analisis proksimat ransum di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro (2025).

M0 = tanpa suplementasi metionin terproteksi, M1 = suplementasi metionin terproteksi 0,13%, R1 = ransum dengan kualitas PK dan TDN rendah, R2 = ransum dengan kualitas PK dan TDN tinggi.

* Nilai TDN dihitung berdasarkan rumus Sutardi (2001).

¹⁾ TDN (%) = 70,60 + (0,259 × PK) + (1,01 × LK) – (0,76 × SK) + (0,0991 × BETN).

²⁾ TDN (%) = 2,79 + (1,17 × PK) + (1,74 × LK) – (0,295 × SK) + (0,810 × BETN).

3.2. Metode

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yang meliputi tahap persiapan, analisis *in vitro*, tahap pengambilan data dan tahap pengolahan data.

3.2.1. Tahap persiapan

Tahap persiapan yang dilakukan pertama kali yaitu dengan menghaluskan sampel ransum menggunakan *grinder* hingga lolos saringan 60 *mesh*. Kemudian mempersiapkan semua alat dan bahan untuk analisis *in vitro* yang meliputi tabung fermentor, tutup tabung, gelas ukur, *waterbath*, rak tabung fermentor, air hangat, larutan *buffer* McDougall dan pepsin HCl. Sampel ransum yang sudah dihaluskan kemudian ditimbang dengan berat 0,55-0,56 g. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam tabung fermentor. Persiapan larutan McDougall dan menurunkan pH larutan McDougall hingga 6,8 dengan cara dialiri gas CO₂. Persiapan termos sebagai media penyimpanan cairan rumen dengan mengisi air hangat suhu 39-40°C. Pengambilan cairan rumen sapi dari rumah pemotongan hewan (RPH) Penggaron, Kota Semarang. Termos dikosongkan terlebih dahulu sebelum diisi cairan rumen. Isi rumen diperas menggunakan kain saring dan cairannya ditampung di dalam termos.

3.2.2. Rancangan penelitian

Penelitian disusun menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) berpola faktorial (2×2) dengan 4 ulangan sehingga terdapat 16 unit percobaan. Perlakuan yang diterapkan sebagai berikut:

- M0R1 = Ransum dengan Kualitas PK dan TDN Rendah Tanpa Suplementasi Metionin Terproteksi
- M1R1 = Ransum dengan Kualitas PK dan TDN Rendah yang Disuplementasi Metionin Terproteksi 0,13%
- M0R2 = Ransum dengan Kualitas PK dan TDN Tinggi Tanpa Suplementasi Metionin Terproteksi
- M1R2 = Ransum dengan Kualitas PK dan TDN Tinggi yang Disuplementasi Metionin Terproteksi 0,13%

3.2.3. Analisis *in vitro*

Analisis *in vitro* mengacu pada metode Tilley dan Terry (1963). Tabung fermentor yang telah diisi sampel dengan berat 0,55-0,56 g kemudian ditambahkan larutan *buffer* McDougall sebanyak 40 ml. Tabung fermentor ditutup rapat dan diletakkan pada rak tabung. Pastikan suhu *waterbath* mencapai 39°C, kemudian tabung fermentor beserta rak dimasukkan ke dalam *waterbath* agar suhu McDougall sama dengan suhu *waterbath*. Cairan rumen sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi larutan McDougall dan sampel, kemudian tabung diisi dengan gas CO₂ dan ditutup rapat agar tetap *anaerob*. Pembuatan blanko hanya berisi larutan penyangga dan cairan rumen tanpa sampel bahan pakan. Pengukuran pencernaan bahan kering dan pencernaan bahan organik diinkubasi selama 48 jam dan dilakukan penggojokan setiap 6 jam, kemudian dilakukan inkubasi ulang selama 48 jam dengan larutan pepsin HCl. Pengukuran protein total dan sintesis protein mikroba diinkubasi selama 3 jam.

3.2.4. Analisis pencernaan bahan kering (KcBK)

Analisis KcBK dilakukan dengan menginkubasi sampel selama 48 jam di dalam *waterbath* dan dilakukan penggojokan setiap 6 jam sekali. Sampel yang telah diinkubasi selama 48 jam kemudian dikeluarkan dari *waterbath* dan diletakkan di dalam air es untuk menghentikan proses fermentasi. Sampel di *sentrifuge* dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit dan diambil endapannya. Endapan ditambahkan dengan pepsin HCl sebanyak 50 ml (untuk melanjutkan proses pencernaan secara enzimatis), kemudian diinkubasi kembali di dalam *waterbath* selama 48 jam dan dilakukan penggojokan setiap 6 jam sekali. Endapan hasil inkubasi disaring menggunakan kertas saring Whatman 41 *ashless*. Pompa vakum digunakan untuk mempercepat proses penyaringan sampel. Pembilasan residu menggunakan *aquadest*. Sampel hasil penyaringan kemudian dikeringkan udara dan dimasukkan ke dalam *crucible porcelain* (CP). Residu kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 110°C selama 6 jam. CP dan sampel yang sudah dioven kemudian didinginkan dalam desikator selama 15 menit lalu ditimbang. Nilai KcBK dihitung berdasarkan rumus Rahmawati *et al.* (2021):

$$\text{KcBK} = \frac{\text{Berat BK Sampel} - (\text{Berat BK Residu} - \text{Berat BK Blanko})}{\text{Berat BK Sampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

Berat BK Sampel = Kadar BK Sampel (%) × Berat Sampel (g)

Berat BK Residu = (Berat CP + KS + Residu setelah Oven (g)) – (Berat CP + Berat KS (g))

Berat BK Blanko = (Berat CP + KS + Blanko setelah Oven (g)) – (Berat CP + Berat KS (g))

3.2.5. Analisis pencernaan bahan organik (KcBO)

Analisis KcBO dilakukan dengan menginkubasi sampel selama 48 jam di dalam *waterbath* dan dilakukan penggojokan setiap 6 jam sekali. Sampel yang telah diinkubasi selama 48 jam kemudian dikeluarkan dari *waterbath* dan diletakkan di dalam air es untuk menghentikan proses fermentasi. Sampel di *sentrifuge* dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit dan diambil endapannya. Endapan ditambahkan dengan pepsin HCl sebanyak 50 ml (untuk melanjutkan proses pencernaan secara enzimatis), kemudian diinkubasi kembali di dalam *waterbath* selama 48 jam dan dilakukan penggojokan setiap 6 jam sekali. Endapan hasil inkubasi disaring menggunakan kertas saring Whatman 41 *ashless*. Pompa vakum digunakan untuk mempercepat proses penyaringan sampel. Pembilasan residu menggunakan *aquadest*. Sampel hasil penyaringan kemudian dikeringkan udara dan dimasukkan ke dalam *crucible porcelain* (CP). Residu kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 110°C selama 6 jam. Untuk mengukur nilai KcBO, sampel dipijarkan dalam tanur pada suhu 600°C selama 4 jam hingga menjadi abu. Sampel kemudian didinginkan dalam desikator selama 15 menit lalu ditimbang. Nilai KcBO dihitung berdasarkan rumus Evvyernie *et al.* (2025):

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

Keterangan:

Berat BO Sampel = Kadar BO Sampel (%) × Berat Sampel (g)

Berat BO Residu = (Berat CP + KS + Residu setelah Oven (g)) – (Berat setelah Tanur + KS (g))

Berat BO Blanko = (Berat CP + KS + Blanko setelah Oven (g)) – (Berat setelah Tanur + KS (g))

3.2.6. Analisis protein total

Analisis protein total menggunakan metode Kjeldahl (AOAC, 1975). Metode ini dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 10 ml yang telah diinkubasi selama 3 jam. Sampel diendapkan dengan 20 ml larutan *trichloroacetic acid* (TCA) 20% dan *sulfosalicylic acid* (SSA) 2% selama 6 jam, kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas Whatman 41 *ashless*. Endapan dan kertas saring kemudian dioven dengan suhu 110°C selama 4 jam lalu ditimbang. Endapan dan kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam labu destruksi dan ditambahkan katalisator selenium 1 gram serta asam sulfat (H₂SO₄) pekat sebanyak 15 ml. Proses destruksi dilakukan hingga warna larutan berubah menjadi hijau jernih. Hasil destruksi kemudian dimasukkan ke dalam labu destilasi, ditambahkan *aquadest* sebanyak 50 ml dan NaOH 45% sebanyak 40 ml, kemudian dilakukan destilasi dengan penangkap H₃BO₃ 4% sebanyak 20 ml dan diberikan 2 tetes indikator *methyl red* (MR) + *methyl blue* (MB). Proses destilasi dihentikan ketika sudah terjadi perubahan warna dari ungu menjadi hijau. Hasil destilasi kemudian dititrasi dengan HCl 0,1 N hingga menjadi warna ungu (AOAC, 1975). Produksi protein total dihitung berdasarkan rumus Nuswantara *et al.* (2021):

$$\text{Protein Total} = \frac{(\text{Titran Sampel (ml)} - \text{Blanko (ml)}) \times (\text{N HCl} \times 14 \times 6,25)}{\text{Berat Sampel}} \text{ (mg/g)}$$

3.2.7. Analisis sintesis protein mikroba

Analisis sintesis protein mikroba dilakukan dengan menggunakan metode Lowry (Plummer, 1971). Metode ini dilakukan dengan mengambil sampel yang telah diinkubasi selama 3 jam, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan diambil endapannya. Endapan diberi NaOH 0,1 N sebanyak 10 ml. Pembuatan larutan standar dengan mencampur larutan standar *bovine serum albumin* (BSA) 1 mg/ml dan *aquadest* dengan perbandingan 0:5, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1 dan 5:0. Larutan standar kemudian ditambahkan reagen Lowry 5 ml (ditunggu selama 10 menit) dan ditambahkan folin Lowry 1:1 0,5 ml (ditunggu selama 30 menit). Larutan standar diuji menggunakan alat spektrofotometer UV–Vis untuk menentukan kurva kalibrasi. Sebelum pengujian, sampel diencerkan terlebih dahulu dengan *aquadest*. Pengenceran sampel yang digunakan yaitu 1:1 (0,5 ml supernatan dan 0,5 ml *aquadest*). Sampel diambil sebanyak 0,5 ml, kemudian ditambahkan reagen Lowry 5 ml dan folin Lowry 1:1 0,5 ml. Sampel pengenceran kemudian diuji dengan menggunakan alat spektrofotometer UV–Vis. Hasil analisis dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Protein Mikroba} = \frac{\text{Absorbansi} \times \text{Faktor Pengenceran} \times \text{Sampel (ml)}}{\text{Volume Pengenceran (ml)}} \times 1.000 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

3.3. Analisis Statistik

Analisis statistik pada penelitian ini menggunakan analisis varian dua arah (*Two–Way ANOVA*) dengan taraf signifikansi 5%, apabila berpengaruh nyata maka

dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan Multiple Range Test/DMRT*) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Model linear rancangan acak lengkap berpola faktorial mengacu pada rumus Weisha *et al.* (2025):

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

Keterangan:

- Y_{ijk} : Nilai pengamatan pada faktor M (suplementasi metionin terproteksi) taraf ke- i dan faktor R (kualitas ransum yang berbeda) taraf ke- j pada ulangan ke- k .
- μ : Komponen aditif dari rata-rata umum.
- α_i : Komponen aditif dari pengaruh faktor M (suplementasi metionin terproteksi) pada taraf ke- i .
- β_j : Komponen aditif dari pengaruh faktor R (kualitas ransum yang berbeda) pada taraf ke- j .
- $(\alpha\beta)_{ij}$: Komponen interaksi antara faktor M dan faktor R.
- ε_{ijk} : Pengaruh galat pada tiap pengamatan.

Terdapat tiga hipotesis statistik yang diuji, yaitu hipotesis mengenai pengaruh interaksi, pengaruh faktor M (suplementasi metionin terproteksi) dan pengaruh faktor R (kualitas ransum yang berbeda).

Hipotesis Pengaruh Interaksi

H_0 : Tidak ada pengaruh interaksi antara perlakuan suplementasi metionin terproteksi taraf 0,13% pada kualitas ransum yang berbeda terhadap variabel pengamatan.

H_1 : Minimal ada satu pengaruh interaksi antara perlakuan suplementasi metionin terproteksi taraf 0,13% pada kualitas ransum yang berbeda terhadap variabel pengamatan.

Hipotesis Pengaruh Faktor M

H0 : Tidak ada pengaruh perlakuan suplementasi metionin terproteksi taraf 0,13% terhadap variabel pengamatan.

H1 : Minimal ada satu pengaruh perlakuan suplementasi metionin terproteksi taraf 0,13% terhadap variabel pengamatan.

Hipotesis Pengaruh Faktor R

H0 : Tidak ada pengaruh kualitas ransum yang berbeda terhadap variabel pengamatan.

H1 : Minimal ada satu pengaruh kualitas ransum yang berbeda terhadap variabel pengamatan.

Kriteria Pengambilan Keputusan

Jika $F_{hitung} \leq F_{tabel}$ dengan $\alpha = 0,05$ maka H0 diterima dan H1 ditolak.

Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ dengan $\alpha = 0,05$ maka H0 ditolak dan H1 diterima.