

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dengan judul “Pengaruh Suplementasi Berbagai Level Zinc Terhadap kadar *Volatile Fatty Acids*, Amonia, Protein Total, dan Protein Mikrobial, pada Rumen Kambing secara *In Vitro*” dilaksanakan pada bulan Agustus – September 2020 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Zn-Proteinat yang mengandung Zn sebesar 789,17 mg/kg BK, Pakan yang terdiri dari indigofera, rumput odot, kaliandra dan konsentrat, cairan rumen kambing, larutan McDougall, pepsin HCl serta gas CO₂. Alat yang akan digunakan untuk percobaan *in vitro* meliputi tabung fermentor, *waterbath*, oven, *centrifuge*, seperangkat alat uji *Volatile Fatty Acids* (VFA), seperangkat alat uji amonia, seperangkat alat uji protein total.

3.2. Metode

3.2.1. Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 4 ulangan, sehingga terdapat 16 unit percobaan. Perlakuan yang diberikan yaitu :

- P0 : Ransum kontrol
- P1 : Ransum kontrol + 12,5 mg/kg Zn
- P2 : Ransum kontrol + 25 mg/kg Zn
- P3 : Ransum kontrol + 37,5 mg/kg Zn

3.2.2. Tahap prosedur penelitian

Parameter yang diukur dalam penelitian ini meliputi produksi VFA, NH₃, protein mikroba, dan protein total. Pelaksanaan penelitian dilakukan dalam 3 tahap yaitu persiapan, percobaan secara *in vitro*, dan pengambilan data.

3.2.2.1. Tahap Persiapan. Persiapan dilakukan dengan menyiapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan seperti cairan rumen yang didapat dari rumah potong hewan (RPH) kota Semarang, bahan pakan untuk menyusun ransum pakan, dan membuat Zn-Proteinat. Bahan pakan yang digunakan berupa indigofera, rumput odot dan kaliandra serta konsentrat ditimbang, kemudian dijemur dibawah sinar matahari, setelah kering ditimbang untuk mendapatkan bahan kering udara dan selanjutnya dihaluskan, kemudian dilakukan analisis proksimat untuk mengetahui kandungan nutrient pada bahan pakan yang digunakan untuk menyusun ransum sesuai kebutuhan. Hasil analisis proksimat disajikan pada Tabel 1 dan formulasi ransum yang digunakan disajikan pada Tabel 2. Zn-Proteinat dibuat dengan mencampurkan Zn organik dengan aquades kemudian diaduk hingga homogen, setelah homogen ditambahkan pollard kemudian diaduk hingga homogen, setelah tercampur rata dijemur hingga kering. Tahap selanjutnya dilakukan penggilingan untuk menghaluskan Zn-Proteinat yang telah kering menggunakan grinder untuk

disuplementasikan pada pakan yang digunakan sesuai dengan kebutuhan. Alat-alat laboratorium yang digunakan untuk analisis disiapkan dan disterilisasi sebelum dilakukan analisis dan pengambilan data.

Tabel 1. Analisis Proksimat Bahan Pakan

Bahan Pakan	BK	Kandungan Nutrien dalam 100% BK					TDN
		Abu	PK	SK	LK	BETN	
Rumput odot	24	15	17	38	4	27	52
Kaliandra	27	6	21	18	2	53	69
Indigofera	22	6	24	18	6	45	73
Bungkil kedelai	88	18	38	6,57	3	35	73
DDGS	88	6	29	11	8	46	83
Bekatul	83	19	10	36	4	31	52
Kopra	87	7	20	51	11	11	78
Pollard	88	5	16	20	2	57	67
Kleci	88,35	6,46	16,24	43,13	6,08	28,09	50
Kangkung Kering	86,9	13,36	11,13	23,24	2,47	49,8	63

Keterangan : TDN dihitung menggunakan rumus Sutardi (2001)

Pakan dengan SK < 18% dan PK < 20%, $TDN = 2,79 + 1,17 PK + 1,74 LK - 0,295 SK + 0,81 BETN$

Pakan dengan SK < 18% dan PK > 20%, $TDN = 25,6 + 0,53 PK + 1,7 LK - 0,474 SK + 0,732 BETN$

Pakan dengan SK > 18% dan PK < 20%, $TDN = 70,6 + 0,259 PK + 1,01 LK - 0,76 SK + 0,0991 BETN$

Pakan dengan SK > 18% dan PK > 20%, $TDN = 3,17 + 0,64 PK + 2,08 LK - 0,06755 SK + 0,094 BETN$

Tabel 2. Formulasi ransum dan Kadar Nutrien Ransum

Bahan Pakan	Komposisi	PK	Abu	SK	LK	TDN
------(%)-----						
Bungkil Kedelai	4,84	1,83	0,86	0,32	0,14	3,53
DDGS	4,07	1,19	0,25	0,43	0,32	3,38
Kopra	2,39	0,47	0,17	1,04	0,27	1,30
Bekatul Kleci	3,82	0,37	0,71	1,37	0,17	2,00
Wheat brand	4,07	0,66	0,26	1,75	0,25	2,02
R. Odot	8,28	1,49	0,33	0,50	0,55	7,18
Indigofera	7,61	1,27	1,11	2,89	0,31	3,93
Kaliandra Kleci	1,56	0,39	0,17	0,15	0,03	1,19
Kangkung kering	2,52	0,49	0,14	0,27	0,01	1,89
Total	31,20	5,07	2,02	13,46	1,90	15,49
	29,64	2,46	3,47	6,44	0,57	18,70
	100	15,69	9,49	28,61	4,51	60,62

3.2.2.2. Percobaan *in vitro*. Percobaan secara *in vitro* dilakukan dengan metode Tilley dan Terry (1963) dengan 2 tahap, yaitu tahap fermentatif dan enzimatik. Tahap fermentatif dilakukan selama 48, dengan cara menginkubasi campuran larutan McDougall 40 ml, cairan rumen 10 ml, sampel 0,55 g yang telah ditambahkan gas CO₂. Tahap enzimatik dilakukan setelah tahap fermentatif dengan memisahkan supernatan dan residu pakan, dimana residu pakan ditambahkan larutan pepsin HCl sebanyak 50 ml, kemudian diinkubasi selama 48 jam.

3.2.2.3 Pengukuran produksi VFA. Pengukuran produksi VFA diawali dengan fermentasi sampel selama 4 jam dengan cara inkubasi campuran larutan McDougall 40 ml, cairan rumen 10 ml, sampel 0,55 g yang telah ditambahkan gas CO₂, kemudian dilakukan metode destilasi uap dimana supernatant dimasukan dalam tabung destilasi, kemudian ditambahkan 1 ml H₂SO₄ 15% dan ditutup dengan

penutup yang telah terangkai dengan labu pendingin dan panaskan dengan air panas selama destilasi. Uap air panas akan mendesak VFA dan akan terkondensasi dalam pendingin. Hasil destilat ditampung dalam erlenmeyer yang telah diisi dengan 5 ml NaOH 0,5 N hingga mencapai 100 ml. Hasil destilat kemudian ditambah 2 tetes indikator phenolphthalin (PP) dan dititrasi dengan HCl 0,5 N sampai warna titrat berubah dari merah muda menjadi tidak berwarna. Produksi VFA total dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{VFA total (mM)} = (\text{volume titran blanko} - \text{volume titran sampel}) \times \text{N HCl} \times 1000/5$$

3.2.2.4. Pengukuran kadar NH₃. Analisis NH₃ dilakukan dengan metode mikrodifusi Conway. Cawan Conway diolesi vaselin bagian bibirnya. Sebanyak 1 ml supernatan ditempatkan pada salah satu sisi sekat cawan, disisi yang lain ditempatkan 1 ml larutan Na₂CO₃ jenuh. Pada bagian tengah cawan ditempatkan 1 ml asam borat. Cawan Conway yang bibirnya sudah diolesi vaselin kemudian ditutup rapat sehingga kedap udara. Larutan Na₂CO₃ jenuh dicampurkan dengan supernatan dengan cara menggoyangkan dan memiringkan cawan. Selanjutnya cawan dibiarkan selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah itu dititrasi dengan H₂SO₄ 0,005N sampai warnanya berubah dari biru menjadi kemerah-merahan. Kadar NH₃ dihitung dengan menggunakan rumus :

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

3.2.2.5. Pengukuran produksi protein total. Uji produksi protein total secara *in vitro* menurut metode Tilley dan Terry (1963) tahap 1 dilakukan inkubasi campuran larutan McDougall 40 ml, cairan rumen 10 ml, sampel 0,55 g dan gas CO₂ selama

48 jam. Setelah tahap 1 campuran dihomogenkan, diambil 10 ml selanjutnya ditambah TCA+SSA sebanyak 10 ml dan diendapkan selama 4-5 jam. Setelah endapan itu disaring. Hasil penyaringan di oven pada suhu 105°C untuk mendapatkan bahan keringnya (BK). Kemudian residu hasil pengendapan dianalisis protein. Protein total dihitung dengan rumus :

$$\frac{(\text{ml titran} - \text{ml blanko}) \times N \text{ HCl} \times 14 \times 6,25}{\text{Berat sampel endapan dari residu 10 ml}}$$

3.2.2.6. Pengukuran produksi protein mikroba. Sintesis protein mikrobia dapat dihitung dengan mencari nilai bahan organik terdegradasi dalam rumen (BOTR) yang akan digunakan untuk menghitung produksi microbial nitrogen (MN) sehingga dapat digunakan untuk menghitung sintesis protein mikroba (SPM) menggunakan rumus Chen dan Gomes (1995):

$$\text{BOTR} = (\text{Sampel pakan} \times \% \text{BO}) \times \text{KCBO} \times 0,65$$

$$\text{MN} = 32 \text{ g/Kg} \times \text{BOTR}$$

$$\text{SPM(g/hari)} = \text{MN} \times 6,25$$

3.3. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam dengan taraf signifikansi 5%. Apabila terdapat pengaruh perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Model matematika rancangan acak lengkap yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

- Y_{ij} : Hasil pengamatan ke-i yang memperoleh perlakuan ke-j
 μ : Nilai tengah umum (rata-rata populasi) hasil pengamatan
 τ_i : Pengaruh perlakuan ke-i
 ε_{ij} : Pengaruh galat percobaan yang memperoleh perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Hipotesis yang diuji:

H0: $\tau_i = 0$, tidak ada pengaruh suplementasi mineral Zn pada pakan terhadap produksi VFA, NH_3 , protein total, dan protein mikrobia

H1: $\tau_i \neq 0$, terdapat pengaruh suplementasi mineral Zn pada pakan terhadap produksi VFA, NH_3 , protein total, dan protein mikrobia

Kriteria Pengambilan Keputusan:

1. Apabila $F_{\text{hitung}} < F_{\text{tabel}}$ dengan $\alpha = 0,05$ maka tidak ada pengaruh suplementasi mineral Zn pada pakan terhadap produksi VFA total, NH_3 , protein total, dan protein mikrobia
2. Apabila $F_{\text{hitung}} \geq F_{\text{tabel}}$ dengan $\alpha = 0,05$ terdapat pengaruh suplementasi mineral Zn pada pakan terhadap produksi VFA total, NH_3 , protein total, dan protein mikrobia