

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian dan Analisis kandungan nutrient bahan pakan dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Maliki Ibrahim Malang dan di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya pada tanggal 21 Mei – 30 Mei 2011 dan 07 Juli – 26 Juli 2011.

#### **3.2 Alat Dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Peralatan yang digunakan dalam fermentasi siwalan terdiri atas: gelas ukur, plastik, penggiling, kaca pengaduk, timbangan sartorius kapasitas 100 g dengan kepekaan 0,0001 dan oven 60°C,
2. Peralatan analisis proksimat
  - a. Alat yang digunakan dalam analisa kandungan BK terdiri atas: cawan porselen, eksikator, oven 60°C dan 105°C, penjepit dan timbangan sartorius kapasitas 100 g dengan kepekaan 0,0001 g.
  - b. Alat yang digunakan dalam analisis kandungan BO terdiri atas: penjepit, tanur 550°C dan timbangan sartorius kapasitas 100 g dengan kepekaan 0,0001 g.

- c. Alat yang digunakan dalam analisis kandungan PK terdiri atas: alat destruksi, alat pendidih, alat titrasi, beaker glass, erlenmeyer, labu *kjehdahl*, pipet dan timbangan sartorius kapasitas 100 g dengan kepekaan 0,0001 g.
  - d. Alat yang digunakan dalam analisis kandungan SK terdiri atas: alat filtrasi, alat pendidih, beaker glass khusus untuk Sk, cawan filtrasi, eksikator, oven 140°C, pompa vacum, tanur 550°C dan timbangan sartorius kapasitas 100 g dengan kepekaan 0,0001 g.
  - e. Alat yang digunakan dalam analisis kandungan LK terdiri atas: alat ekstraksi Goldfish, beaker glass khusus LK, alat porselen, gelas ukur, oven vacuum 80°C, timbangan analitik, eksikator, dan penjepit.
3. Pengambilan cairan rumen terdiri atas: beaker glass, kain saring, termos air panas dan selang suntikan pengambil cairan rumen.
  4. Pengukuran pencernaan secara *in vitro* terdiri atas: alat sentrifuge, bunsen valve, cawan porselen, dispenser 50 ml, eksikator, gas CO<sub>2</sub>, kertas saring bebas abu whatman no 4, pemanas, pendingin, pH meter, stirrer, storage flask, sumbat karet, oven 105°C, thermometer dan timbangan Sartorius.

### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Bahan yang digunakan dalam pembuatan sabut siwalan terfermentasi terdiri atas: EM-4, sabut siwalan dalam bentuk tepung dan aquades.
2. Bahan kimia untuk analisis proksimat

- a. Bahan kimia yang digunakan dalam analisis kandungan BK terdiri atas: tidak menggunakan bahan kimia
  - b. Bahan kimia yang digunakan dalam analisis kandungan BO terdiri atas: tidak menggunakan bahan kimia
  - c. Bahan kimia yang digunakan dalam analisis kandungan PK terdiri atas: aquades, batu didih,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat (95-97%),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N 25 ml, indicator mix 3 tetes (0,1 g methylen blue + 0,2 g methylen red dilarutkan dalam 100 ml alkohol), Katalisator selenium gemisch, NaOH 40% 20 ml dan NaOH 0,1 N.
  - d. Bahan kimia yang digunakan dalam analisis kandungan SK terdiri atas: aquadest, acetone,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,3 N 50 ml, NaOH 1,5 N 2,5 ml, EDTA, pasir dan HCl 0,3 N 50 ml.
  - e. Bahan kimia yang digunakan dalam analisis kandungan LK terdiri atas: N-hexan dan batu didih
3. Pengukuran pencernaan secara *in vitro*: aquadest, larutan *buffer* McDougall's ( $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12  $\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, KCl,  $\text{MgCl}_2$ , dan larutan  $\text{CaCl}_2$ ) dan larutan HCl pepsin, HCl 0,1 N

### 3.3 Metode Kerja

#### 3.3.1 Prosedur Fermentasi Sabut Siwalan

1. Sabut siwalan dicacah hingga didapatkan ukuran paling kecil 1-5 cm
2. Dimasukkan dalam oven  $60^\circ\text{C}$  selama 24 jam
3. Digiling

4. Sabut siwalan ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan dalam plastik
5. diberi EM-4 sesuai dengan perlakuan dan aquades sebanyak 30% dari berat sampel
6. Diaduk sampai rata
7. Diinkubasi selama 7 hari

### **3.3.2 Posedur pengambilan Cairan Rumen**

1. Didihkan air kemudian dimasukkan ke dalam termos
2. Dibuang air yang terdapat dalam termos
3. Dimasukkan selang suntikan ke dalam rumen melalui perut sapi yang telah dimodifikasi
4. Dimasukkan segera ke dalam termos yang telah kosong
5. Disaring terlebih dahulu dengan kain penyaring sebelum dicampur dengan larutan *buffer*

### **3.3.3 Prosedur Analisis Proksimat menurut Petunjuk AOAC (1980)**

#### **3.3.3.1 Penetapan Kadar Bahan Kering (BK)**

Penetapan Kadar Bahan Kering (BK) Udara

Prosedur kerja:

1. Menimbang kertas (A g) dan dalam sampel sebanyak 150-200 g, kemudian menimbang kertas + sampel (B g)
2. Kertas + sampel dimasukkan ke oven dengan suhu 60°C sampai didapat berat yang konstan selama 12-24 jam

3. Kertas dan sampel dikeluarkan dan diangin-anginkan selama 2-3 jam, kemudian ditimbang (C g)
4. Perhitungan kandungan BK:

$$BK = \frac{C-A}{B-A}$$

Penetapan Kadar Bahan Kering (BK) sebenarnya

Prinsip:

Pemanasan pada suhu 105°C, maka air yang terkandung dalam satu sampel akan menguap seluruhnya.

Prosedur kerja:

1. Cawan porselen dimasukkan dalam oven 105°C selama 1 jam.
2. Cawan diambil dan dimasukkan dalam eksikator selama 1 jam, kemudian ditimbang (A g).
5. Menimbang sampel sebanyak 5 gr dimasukkan dalam cawan sampel ditimbang kembali (B g) dan dimasukkan ke dalam eksikator selama 1 jam, kemudian ditimbang (C g).
6. Perhitungan kandungan BK:

$$BK = \frac{C-A}{B-A} \times 100\%$$

$$BK \text{ sebenarnya} = \frac{BK \text{ Oven}}{100\%} \times BK \text{ Udara}$$

### 3.3.3.2 Penetapan Kadar Bahan Organik (BO)

Prinsip:

Pemanasan pada suhu 550–600°C maka semua bahan organik akan terbakar.

Bahan yang tersisa (residu) yang tidak terbakar disebut abu.

Prosedur kerja:

1. Cawan porselen dimasukkan dalam tanur 550°C selama 4 jam, kemudian dimasukkan dalam eksikator selama 1 jam dan ditimbang (D gram)
2. Perhitungan kandungan BO :

$$abu = \frac{D - A}{2B - A} \times 100\%$$

$$BO = 100\% - abu$$

### 3.3.3.3 Penetapan Kadar Protein Kasar (PK)

#### Prinsip:

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dengan katalisator dapat memecah ikatan N organik dalam sampel pakan menjadi (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam suasana basa akan melepaskan NH<sub>3</sub> yang kemudian didestilasi. Hasil destilasi ditampung dalam beaker glass yang telah berisi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 yang ditambahkan indikator max. Setelah selesai destilasi, larutan penampung dititrasi dengan NaOH 0,1 N sampai berubah warna

#### Prosedur kerja:

1. Destruksi
  - 1.1 Menimbang kertas minyak (A gram), ditambahkan sampel sebanyak 3 gr dan kemudian ditimbang kembali (B gram).
  - 1.2 Sampel dimasukkan ke dalam labu *Kjeldahl* dan ditambahkan katalisator (tablet *kjeldahl*) 1,4 gr dan batu didih. Kemudian ditambah dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat 5 ml dengan dispenser
  - 1.3 Destruksi sampai berwarna hijau jernih
  - 1.4 Ditambah aquadest 60 ml (dibagi 4 kali), dikocok dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer
2. Destilasi

Ditambahkan NaOH 40% 25 ml dalam erlenmeyer tersebut dan dilakukan destilasi, ditampung dengan beaker glass yang sebelumnya diisi dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N 25 ml indikator max 3 tetes

### 3. Titrasi

3.1 beaker glass yang berisi hasil penyulingan dititrasi dengan NaOH 0,1 N sampai warnanya berubah menjadi jernih dan diukur volume titrasinya (C ml)

3.2 membuat blanko dengan cara melakukan titrasi pada beaker glass yang berisi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 ml dan indikator max 3 tetes, kemudian diukur volume titrasinya (D g)

3.3 perhitungan kandungan PK:

$$PK = \frac{(D - C) \times 0,1 \times 0,014 \times 6,25}{B - A} \times 100\%$$

#### 3.3.3.4 Penetapan Kadar Serat Kasar (SK)

Prinsip SK:

Analisis bahan yang tidak larut dalam H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan larutan NaOH, sisa bahan pakan yang tercerna setelah proses perebusan kemudian ditimbang dan diabukan menunjukkan jumlah serat yang terdapat dalam suatu bahan pakan.

Prosedur kerja:

1. Kertas ditimbang (A g) sampel diambil kira-kira 1 gram ditaruh pada kertas minyak dan ditimbang kembali (B g). Sampel dituangkan kedalam beaker glass khusus untuk analisis SK dan ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 N sebanyak 50 ml dengan menggunakan gelas ukur, dididihkan selama 30 menit

2. Ditambahkan dengan cepat 25 ml NaOH 1,5 N dan dididihkan selama 25 menit tepat
3. Ditambahkan dengan cepat 0,5 gram EDTA kemudian dididihkan lagi selama 25 menit tepat
4. Beaker gelas diambil dari alat pemanas
5. Seiring dengan cawan filtrasi yang sebelumnya telah diisi dengan pasir
6. Beaker glass dibersihkan dengan aquadest panas sedikit sampai semua larutan masuk ke dalam cawan filtrasi
7. Ditambahkan 50 ml HCl 0,3 N didiamkan 1 menit lalu dihisap dengan pompa vacum
8. Ditambahkan aceton kemudian didiamkan selama 1 menit lalu dihisap sampai kering
9. Selanjutnya di oven 140°C selama 1,5 jam, kemudian diletakkan ke dalam eksikator selama 1 jam dan ditimbang dengan teliti (C g)
10. Dimasukkan ke dalam tanur 550°C selama 2 jam
11. Dikeluarkan dengan tang penjepit dan dimasukkan kembali ke dalam eksikator selama 1 jam dan ditimbang (D g).
12. Perhitungan kandungan SK:

$$SK = \frac{C - D}{B - A} \times 100\%$$

#### 3.3.3.5 Penetapan Kadar Lemak Kasar (LK)

1. Dimasukkan beaker glass yang sudah diberi 2-3 buah batu didih ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 1 jam.
2. Diambil beaker glass dan dimasukkan ke dalam eksikator selama 1 jam

3. Ditimbang kertas saring bebas abu (A gram).
4. Diambil sampel kira-kira 3-5 gram, ditaruh di atas kertas saring dan ditimbang kembali (B gram).
5. Dibungkus sampel dengan menggunakan kertas saring tersebut, kemudian dimasukkan sampel ke dalam alat porselen.
6. Diambil beaker glass khusus untuk analisis lemak dari eksikator dan ditimbang (C gram), diisi beaker glass dengan 50 ml n-hexan dengan menggunakan gelas ukur.
7. Beaker glass dan alat porselen dipasang ke alat ekstraksi Goldfish, dan diekstraksi selama 4 jam.
8. Diambil alat porselen dengan labu khusus untuk mengumpulkan hexan lagi, sampai hexan dalam beaker glass tinggal sedikit saja.
9. Beaker glass yang telah berisi lemak dimasukkan ke dalam oven vacuum 80°C
10. Dihisap udara dari oven selama 1,5 jam
11. Beaker glass dimasukkan ke dalam eksikator selama 1 jam, dan ditimbang dengan teliti (D gram).

$$LK = \frac{D - C}{B - A} \times 100\%$$

### 3.3.4 Prosedur Pengukuran Kecernaan *in vitro* menurut Tilley dan Terry (1963)

Prosedur kerja:

1. pembuatan larutan *buffer phospat bicarbonate* yang terdiri dari 3 larutan yaitu:

1.1 larutan yang terdiri dari 4,65 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 9,8 gr  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,47 gr  $\text{NaCl}$  dan 0,57 gr  $\text{KCl}$  yang dilarutkan 200 ml aquadest.

1.2 Larutan  $\text{MgCl}$  6% (6 gr  $\text{MgCl}$  dalam larutan 100 ml aquadest)

1.3 Larutan  $\text{CaCl}$  4% (4 gr  $\text{CaCl}$  dalam larutan 100 ml aquadest)

Cara pembuatan: 20 ml larutan pertama dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 ml, ditambahkan 2 ml  $\text{MgCl}$  6% dan 2 ml  $\text{CaCl}$  4% lalu diencerkan dengan aquadest sampai volume 100 ml.

2. Pembuatan larutan  $\text{HCl}$  pepsin yaitu dengan melarutkan 2 gr pepsin ditambah 8,35 ml  $\text{HCl}$  0,1 N dalam 100 ml aquadest

3. Prosedur pengukuran pencernaan in vitro:

3.1 Menimbang sampel 0,5 gr, kemudian dimasukkan ke dalam tabung fermentor untuk masa inkubasi 48 dan 96 jam.

3.2 Larutan *buffer* dimasukkan ke dalam erlenmeyer kapasitas 3 lt kemudian ditentukan pHnya antara 6,9 sampai 7,0 dan dipanaskan dengan stirrer pada temperature  $39^{\circ}\text{C}$  sambil dialiri gas  $\text{CO}_2$

3.3 Menambahkan 1 lt cairan rumen ke dalam erlenmeyer kapasitas 3 lt yang telah diisi larutan *buffer*, kemudian diaduk dengan stirrer selama 10 menit dan dialiri gas  $\text{CO}_2$  agar mendapat kondisi anaerob

3.4 Mengontrol pH cairan rumen buatan (pH harus antara 6,7 pada temperature  $39^{\circ}\text{C}$ )

3.5 Campuran cairan rumen dan *buffer* sebanyak 50 ml ditambahkan ke dalam fermentor yang telah berisi sampel, kemudian ditutup dengan

sumbat karet yang dilengkapi dengan *Bunsen valve* dan diinkubasikan dalam incubator 30°C

3.6 Membuat sampel standard dengan cara yang sama

3.7 Membuat blanko dengan cara yang sama tetapi tanpa sampel yang diuji

3.8 Sesudah 1 jam isi fermentor dikocok dengan hati-hati agar tidak ada partikel padat yang menempel di dinding fermentor, selanjutnya menggoyangkan setiap 4 jam sekali

3.9 Setelah 48 jam aktivitas mikroba dihentikan dengan cara memasukkan dalam air es

3.9.1 sampel dengan masa inkubasi 48 jam disaring dengan menggunakan kertas saring bebas abu Whatman 41 Ø 0, 25 mm, kemudian endapannya dikeringkan dalam oven 105°C selama 12 jam, didinginkan dalam eksikator selama 1 jam kemudian ditimbang.

3.9.2 Sampel dimasukkan kembali ke dalam tanur dengan suhu 550°C, didinginkan dalam eksikator selama 1 jam kemudian ditimbang sehingga didapatkan BOT dari residu tersebut.

3.10 fraksi sampel yang tidak tercerna (untuk masa inkubasi 96 jam) diendapkan dengan menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit

3.11 setelah 15 menit disentrifuge, cairan supernatant dibuang dan residu sampel ditambah larutan pepsin sampai 50 ml

3.12 tabung fermentor diletakkan kembali dalam incubator tanpa dialiri gas CO<sub>2</sub>, suhu dijaga 30°C tanpa penutup *Bunsen valve*.

3.13 Pada fase kedua ini tabung fermentor diinkubasi selama 48 jam

3.14 Setelah 48 jam sampel dalam tabung fermentor, endapan dalam tabung disaring dengan menggunakan kertas saring bebas abu whatman 41 0,25 mm, kemudian dikeringkan dalam oven 105°C selama 12 jam, didinginkan dalam eksikator selama 1 jam kemudian ditimbang.

3.15 Sampel dimasukkan kembali kedalam tanur dengan suhu 550°C , didinginkan dalam eksikator selama 1 jam kemudian ditimbang

3.16 Kecernaan BK dan BO masing-masing perlakuan dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{KcBK}(\%) = \frac{\text{BK awal (BK residu - BK blanko)}}{2\text{BK awal}} \times 100\%$$

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

Keterangan:

KcBK = kecernaan bahan kering

KcBO = kecernaan bahan organik

BK awal = berat sampel × % BK

BK residu = (berat cawan + residu setelah di oven 105°C) –  
(berat cawan - kertas saring)

BO residu = BK residu - residu tanur 550°C

Residu tanur 550°C = berat residu setelah tanur 550°C – berat cawan

BK blanko = (berat cawan + residu setelah dioven 105°C) – (berat cawan + kertas saring)

BO blanko = Bk blanko – residu blanko setelah tanur 550°C

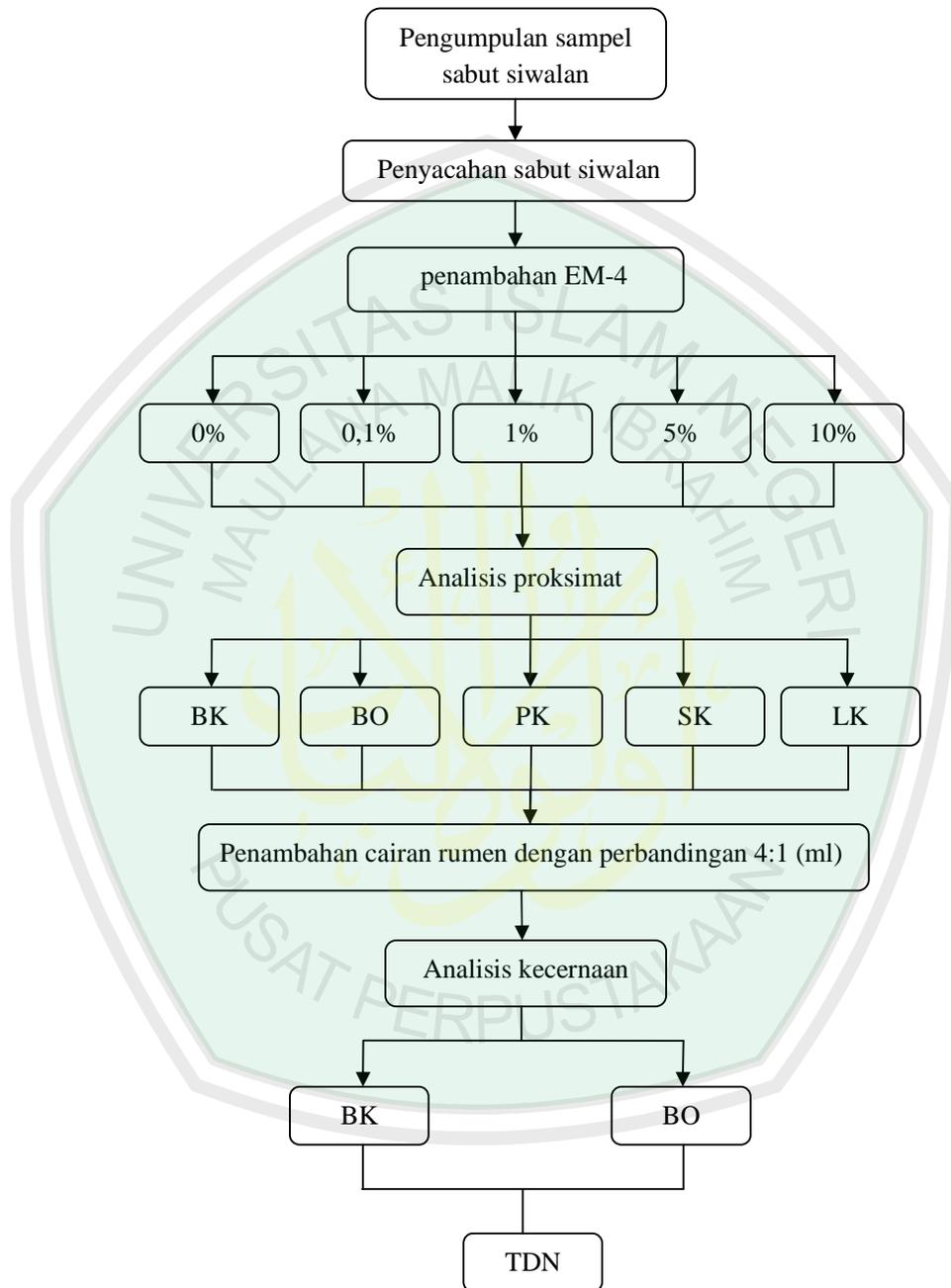
Residu blanko tanur 550°C = berat blanko setelah tanur 550°C – berat cawan

$$TDN (\%) = KcBO (\%)(BK) \times 1,05$$

### 3.4 Analisis Data

Penelitian ini merupakan jenis penelitian yang bersifat eksperimental laboratories. Rancangan penelitian yang digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL)  $5 \times 3$  (5 perlakuan, 3 ulangan). Apabila uji nilai signifikansi dalam analisis ragam menunjukkan perbedaan nyata atau sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (5%).

### 3.5 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian