

III. BAHAN DAN METODE

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di laboratorium Makanan Ternak, Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dari Januari sampai dengan Februari 2011.

B. Bahan dan Alat

1. Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan bagas tebu yang berasal dari PT. Gulaku di Kecamatan Gunung Madu, Lampung Tengah. Selain itu, digunakan kapang untuk fermentasi bagas, cairan rumen kambing, larutan saliva, dan larutan merkuri chorida (HgCl_2) untuk menghentikan fermentasi oleh mikroba. Hasil dari fermentasi ialah cairan supernatan untuk mengukur konsentrasi VFA dan NH_3 . Penelitian ini juga menggunakan larutan natrium hidroksida (NaOH) 0,5N digunakan untuk menampung VFA yang telah terkondensasi, indikator phenolptalein, HCl 0,5N yang digunakan pada saat titrasi VFA dan 1 ml larutan asam borat 2%, serta indikator red blue, larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) dan H_2SO_4 pekat.

2. Alat

Penelitian ini menggunakan alat timbangan analitik untuk menimbang zat kimia secara teliti, gelas ukur untuk mengukur zat cair, pengaduk untuk mengaduk campuran zat kimia, tabung fermentor untuk memfermentasi cairan rumen selama di *water bath shaker* yang digunakan sebagai pengganti perut rumen, tang penjepit untuk memudahkan saat mengambil tabung fermentor, dan alat sentrifuse untuk memisahkan antara supernatan dengan endapan. Selain itu juga menggunakan erlenmeyer untuk menampung VFA saat didestilasi dan alat destilasi uap untuk mengukur konsentrasi VFA, alat pipet tetes untuk meneteskan indikator, buret untuk titrasi, serta cawan *Conway* untuk mengukur konsentrasi NH_3 .

C. Metode Penelitian

1. Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan perlakuan kapang yang terdiri atas lima macam, yaitu:

R1: Bagas tebu difermentasi dengan *Aspergillus spp.*2

R2: Bagas tebu difermentasi dengan *Aspergillus spp.*3

R3: Bagas tebu difermentasi dengan *Aspergillus spp.*4

R4: Bagas tebu difermentasi dengan *Penicyllium spp.*1

R5: Bagas tebu difermentasi dengan *Penicyllium spp.*2

Masing-masing perlakuan diulang lima kali sehingga diperoleh dua puluh lima satuan percobaan.

2. Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis ragam pada taraf nyata 5% dan atau 1% yang sebelumnya diuji homogenitas, aditivitas, dan normalitas. Selanjutnya pada data tersebut dilakukan uji lanjut dengan Duncan pada taraf 5% dan atau 1% (Steel dan Torrie, 1991).

3. Pelaksanaan penelitian

a. Fermentasi bahan

Penyiapan Suspensi spora yaitu isolat fungi yang telah diremajakan pada *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring diinkubasi selama 3 hari. Pada masing-masing isolat tersebut dimasukkan larutan NaCl steril dan dilakukan penggojokan dengan vortex mixer hingga spora terlepas. Kemudian dilakukan pemisahan antara suspensi dengan medianya PDA sehingga diperoleh suspensi spora. Setelah itu, spora dihitung kepadatannya dengan menggunakan *hemocytometer* melalui mikroskop.

b. Pembuatan saliva buatan

- 1) Untuk membuat 1 liter cairan, masukkan \pm 1 liter aquades ke dalam labu berkapasitas 1 liter kemudian berturut-turut dimasukkan ke dalamnya NaHCO_3 9,8 gr, $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7gr; KCl 0,57 gr; NaCl; 0,47 gr; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 gr; CaCl_2 0,04 gr;
- 2) Ditambahkan aquades sampai volume 1 liter;
- 3) Dihembuskan CO_2 perlahan-lahan ke dalam campuran sampai pH 6,8;

- 4) Kemudian pH dicek bila belum mencapai 6,8 dihembuskan kembali CO₂ sampai pH 6,8.

c. Pengambilan cairan rumen kambing

- 1) Sebelum pengambilan cairan rumen, termos diisi dengan air panas bersuhu 39°C agar suhunya sesuai dengan suhu cairan rumen;
- 2) Cairan rumen diambil dari rumen kambing setelah dipotong dalam jangka waktu yang singkat setelah pemotongan;
- 3) Rumen berikut penampungnya dimasukkan ke dalam termos, kemudian ditutup rapat;
- 4) Selanjutnya air termos dibuang pada saat rumen diambil, kemudian rumen disaring dengan kain kassa untuk mendapatkan cairan rumen.

d. Pencampuran cairan rumen dan bagas dalam fermentasi

- a) Satu gram sampel bagas tebu terfermentasi dimasukkan ke dalam tabung fermentor, kemudian tambahkan larutan saliva buatan sebanyak 12 ml pada shakerbath pada suhu 39°C, dan masukkan cairan rumen segar sebanyak 8 ml sebagai inokulan, lalu tabung fermentor ditutup rapat dan digoyang dengan pelan agar cairan merata, metode ini berdasarkan Tilley dan Terry (Muhtarudin *et al.*, 2002);
- b) Tabung fermentor di inkubasi secara *anaerob* selama 24 jam
- c) Setelah 24 jam tutup tabung dibuka dan ditambah larutan HgCl₂ jenuh sebanyak 0,2 ml untuk menghentikan fermentasi oleh mikroba rumen;

- d) Menyentrifuse cairan fermentasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 12,5 menit;
- e) Memisahkan antara supernatan (cairan jernih di bagian atas) dengan endapan.

4. Peubah yang diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini yaitu konsentrasi VFA dan konsentrasi NH_3 secara *in vitro* pada cairan rumen kambing.

a. Konsentrasi NH_3

Konsentrasi NH_3 ditentukan dengan teknik *Microdifusi Conway* menurut Muhtarudin (2002): yaitu sebanyak 1 ml larutan NaCO_3 jenuh ditempatkan di sekat sebelah kanan cawan *conway*. Pada cawan kecil di bagian tengah diisi dengan asam borat sebanyak 1 ml dan indikator red blue, kemudian cawan *conway* ditutup rapat dengan tutup bervaselin, lalu digoyang-goyang sehingga supernatan bercampur dengan larutan NaCO_3 jenuh. Cawan dibiarkan selama 24 jam pada suhu ruang di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak. Amonia yang terikat dengan asam borat dititrasi dengan H_2SO_4 0,0143 N sampai warna berubah menjadi kemerah-merahan. Selanjutnya kadar NH_3 dihitung dengan rumus:

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

b. Konsentrasi VFA

Konsentrasi VFA diukur dengan destilasi uap menurut Muhtarudin (2002), yaitu sebanyak 5 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung destilasi yang dipanaskan dengan uap air. Tabung segera ditutup rapat setelah ditambah 1 ml H_2SO_4 15%.

Uap air panas akan membawa VFA melewati tabung pendinginan, sehingga akan terkondensasi dan ditampung dengan erlenmeyer berisi 5 ml NaOH 0,5 N sampai mencapai volume sekitar 300 ml. Selanjutnya ditambahkan indikator phenolptalein sebanyak 1 tetes dan dititrasi dengan HCl 0,5 N. Titrasi berakhir pada saat titik awal perubahan warna dari merah menjadi bening. Lakukan titrasi blanko terhadap 5 ml NaOH 0,5 N. Kadar total VFA dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Total VFA} = (B-S) \times N \text{ HCl} \times 1000/5$$

Keterangan:

B: volume titran blanko

N: normalitas larutan HCl

S: volume titran sampel