

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang.

Efisiensi pemanfaatan pakan ternak ruminansia masih menjadi tantangan utama dalam industri peternakan. Permasalahan yang sering terjadi adalah tingginya degradasi protein di rumen yang menyebabkan rendahnya ketersediaan protein bypass. Konsumsi pakan yang tidak efisien berakibat pada tingginya produksi gas rumah kaca terutama gas metana (CH₄) dan kerugian energi yang cukup besar pada ternak sekitar 2-12% (Vargas-Ortiz *et al.*, 2022). Ruminansia bertanggung jawab atas produksi gas metan 47%, N₂O 29% dan 27% CO₂ dari total 14,5% emisi gas rumah kaca yang berasal dari aktivitas antropogenik peternakan (Meza-Bone *et al.*, 2022; Gerber *et al.*, 2013). Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan memanipulasi fermentasi oleh mikroba rumen dengan menggunakan bahan yang tersedia dan tercukupi (Sun *et al.*, 2023). Eksplorasi yang berkelanjutan untuk mencari dan menemukan bahan pakan yang sesuai dengan kandungan senyawa tertentu yang mampu memaksimalkan penyerapan nutrisi oleh ternak ruminansia merupakan suatu keharusan. Salah satu bahan pakan yang berpotensi digunakan adalah daun maja (*Crecentia cujete*).

Daun maja merupakan tanaman khas daerah tropis yang mudah didapatkan dan memiliki kandungan tanin pada daunnya sebesar 7.92g/100g BK. Tanin diketahui dapat digunakan sebagai agen yang dapat memanipulasi ekosistem rumen. Tanin mampu meningkatkan bypass protein rumen dan mampu mengurangi kerugian yang disebabkan oleh fragmentasi protein yang berlebihan dalam rumen (Besharati *et al.*, 2022). Senyawa ini dapat bermanfaat atau merugikan untuk ternak ruminansia sesuai dengan struktur dan konsentrasinya (Fonseca *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2018; Min *et al.*, 2020). Tanin dalam konsentrasi rendah dapat mendukung aktivitas mikroba rumen. Sebaliknya, tanin dalam konsentrasi yang tinggi dapat mengurangi konsumsi ransum karena rasanya yang sepat, mengurangi pencernaan, serta mengurangi efek toksik pada mikroba rumen karena dapat menghambat aktivitas enzim (Besharati *et al.*, 2022; Verma *et al.*, 2021).

Tanin akan melindungi protein dari degradasi mikroba rumen sehingga mampu meningkatkan proteolisis di abomasum. Protein yang terikat oleh tanin berdampak positif dalam undegradasi protein dalam rumen sehingga meningkatkan aliran protein ke duodenum, efisiensi pemanfaatan nitrogen, mengurangi produksi gas metan, memaksimalkan sintesis protein mikroba serta mengurangi efek toksik dari tingginya konsentrasi NH₃ dalam rumen (Brutti *et al.*, 2023).

1.2. Landasan Teori

Pakan yang mengandung tanin dapat membantu mengurangi kehilangan protein akibat dari proses fermentasi dalam sistem pencernaan ruminansia. Tanin memiliki kemampuan untuk membentuk kompleks dengan protein, membentuk

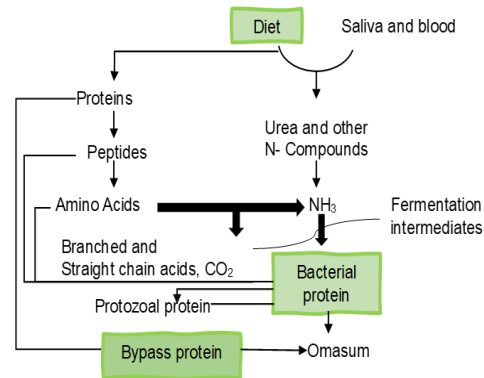
ikatan stabil sehingga menghambat aksi enzim dalam pemecahan protein menjadi fragmen yang lebih kecil. review sebelumnya yang dideskripsikan oleh (Besharati *et al.*, 2022) menuliskan bahwa tanin dan sumber pakan yang mengandung tanin dapat ditambahkan ke dalam ransum pada takaran tertentu agar ruminansia dapat memanfaatkan protein dengan lebih baik dan mengurangi kehilangan yang disebabkan oleh fragmentasi protein yang berlebihan di dalam rumen.

Pembentukan tanin-protein kompleks di dalam rumen ternak terjadi karena adanya ikatan hidrogen interaksi hidropobik dan ikatan kovalen antara senyawa tersebut. Selain itu tanin juga mampu mempengaruhi asam lemak rantai pendek yang merupakan hasil fermentasi dari karbohidrat tidak tercerna atau terserap oleh usus halus, N-NH₃, kecernaan bahan kering, dan produksi gas metana (CH₄) sehingga efisiensi penggunaan nitrogen bisa terkontrol (Brutti *et al.*, 2023). Penelitian lain oleh (Chuzaeami *et al.*, 2023) menuliskan bahwa tanin memiliki sifat pengikat protein dan memainkan peran penting dalam rumen, berfungsi sebagai pelindung protein dalam pencernaan pakan oleh ternak ruminansia. Senyawa ini mempunyai kemampuan untuk menjaga protein dalam pakan, dan pemberian pakan dengan kandungan protein tinggi tanpa perlindungan tanin dapat mengurangi efisiensi pakan karena protein tersebut rentan terdegradasi menjadi amonia (NH₃) oleh mikroba rumen tanpa mengganggu aktifitas mikroba rumen tersebut. Sejalan dengan pendapat (Wang *et al.*, 2022) yang menyatakan bahwa penambahan tanin tidak mempengaruhi kinerja pertumbuhan dan keanekaragaman mikrobiota rumen. Namun, Tanin berfungsi mengendalikan parasit, khususnya nematoda di saluran pencernaan ternak, sehingga berkontribusi terhadap kesehatan ternak secara keseluruhan dan meningkatkan produktivitas.

Selain itu tanin juga berperan sebagai pelindung protein dengan cara mengikat bahan pakan menjadi senyawa kompleks yang tahan terhadap degradasi oleh bakteri proteolitik. Protein yang dilindungi ini mengalami hidrolisis di abomasum pada kondisi pH rendah. Protein yang melewati abomasum kemudian dicerna secara enzimatik di usus menjadi asam amino, yang berfungsi sebagai suplai nutrisi bagi inang. Protein yang lolos dari degradasi mikroba dalam rumen disebut sebagai protein *bypass*. Tanin secara efektif mengubah *Rumen Degradable Protein* (RDP) menjadi *Undegradable Protein* (UDP), yang kemudian meningkatkan metabolisme protein, artinya tanin mampu menurunkan konsentrasi amonia dan meningkatkan aliran asam amino esensial ke dalam duodenum (Jayanegara *et al.*, 2020).

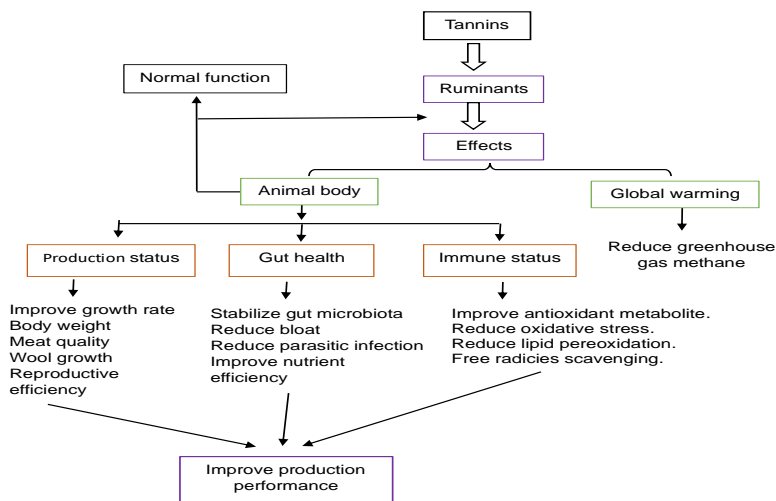
Pakan yang mengandung UDP mampu meningkatkan efisiensi pakan, kecernaan bahan organik dan protein kasar, glukosa darah dan konsentrasi insulin, Selain itu, pemberian pakan dengan perbandingan protein tidak terdegradasi yang lebih tinggi mampu mengurangi konsentrasi NH₃-N pada rumen dan akibatnya menurunkan ekskresi N urin yang menunjukkan efisiensi pemanfaatan N yang lebih tinggi dan pemanfaatan lemak menjadi energi yang lebih efisien (Valizadeh *et al.*, 2021). Sedangkan RDP akan menghasilkan asam amino yang kemudian dideaminasi menjadi NH₃. Perbedaan degradasi protein kasar diduga akibat dari komposisi bahan pakan yang menyusun ransum, meskipun secara umum memiliki kandungan protein yang relatif sama. Tingginya komposisi protein mikroba dalam rumen berbanding lurus dengan komposisi protein dalam pakan karena protein kasar merupakan komponen penting untuk sintesis protein mikroba, hal ini menandakan

ketersediaan unsur nitrogen untuk mikroba rumen. Namun, kelebihan produksi N-NH₃ tidak memberikan manfaat positif bagi produksi protein mikroba. Sebaliknya, hal ini dapat menurunkan nilai efisiensi protein karena sejumlah besar nitrogen dikeluarkan melalui urin dan feses (Afzalani *et al.*, 2021). Mekanisme degradasi dan undegradasi protein dalam rumen dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme Degradasi dan undegradasi Protein (Allison, 1993)

Penentuan kandungan tanin pada pakan yang akan ditambahkan ke dalam ransum mempunyai peranan penting dalam menentukan jumlah tanin yang akan ditambahkan untuk mengurangi efek negatif tanin pada ternak dan mikroorganisme rumen, efeknya dapat berpengaruh pada kinerja ternak (Tong *et al.*, 2022). Sebaliknya, tanin yang dapat dihidrolisis secara efisien dapat meningkatkan protein *bypass*, sehingga menghasilkan kinerja tinggi pada ternak ruminansia seperti hasil susu dan produksi susu (Besharati *et al.*, 2022). Secara umum potensi tanin terhadap ternak ruminansia dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh tanin terhadap ternak ruminansia (Carulla *et al.*, 2005) design oleh (Nawab *et al.*, 2020).

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh daun maja (*Crescentia cujete*) dalam ransum ruminansia terhadap karakteristik fermentasi rumen, produksi gas dan *undegraded rumen protein*, sehingga diharapkan penelitian ini mampu memberikan dasar teoritis untuk membuat dan mengembangkan pemanfaatan daun maja dalam pakan ternak di masa mendatang.

1.4. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini memberikan kontribusi dalam pengembangan pakan ternak yang lebih efisien dan keberlanjutan. Selain itu, penelitian ini membuka peluang untuk memanfaatkan sumber daya alam yang tersedia dan tercukupi sebagai alternatif yang berkelanjutan dalam meningkatkan produktivitas dan kesehatan ternak dan Implikasi praktis dari penelitian ini adalah membuka peluang dalam pengembangan strategi pakan inovatif yang mengoptimalkan potensi daun maja sehingga memberikan dampak signifikan pada sektor peternakan.

BAB II

MATERI DAN METODE

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Agustus 2024 – Desember 2024. Tahapan formulasi, pengolahan dan pembuatan ransum dilakukan di Laboratorium Nutrisi Ruminansia, Universitas Hasanuddin. Sedangkan tahapan pengujian nilai pH, konsentrasi NH_3 , kadar tanin, protein dan kandungan kimia ransum perlakuan dianalisis di Laboratorium Kimia Pakan Ternak, Universitas Hasanuddin. Selanjutnya pengujian produksi gas dan preparasi dilakukan di Laboratorium nutrisi dan Ternak perah, IPB. Pengujian VFA parsial dilakukan di Balai Pengujian Standar Instrumen Unggas Dan Aneka Ternak, BSIP Ciawi sedangkan analisis total populasi protozoa diamati di laboratorium terpadu-BMN, IPB.

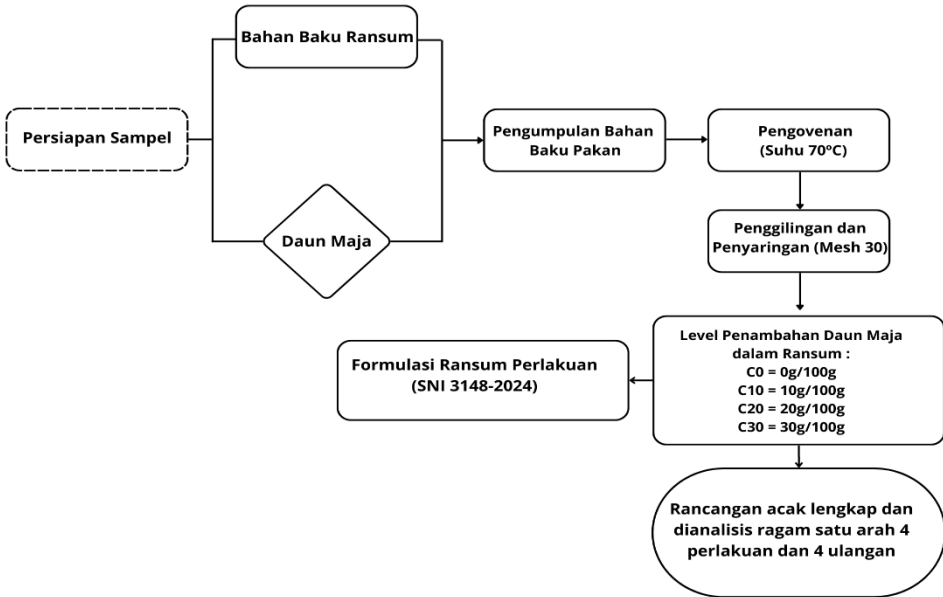
2.2. Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun maja, tumpi jagung, dedak padi, jagung giling, onggok, bungkil kedelai, molases, mineral mix, cairan rumen, saliva buatan, CO_2 , asam borat, NaOH , Na_2CO_3 , H_2SO_4 , NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, KCl , NaCl , MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , HCl , dan aquades.

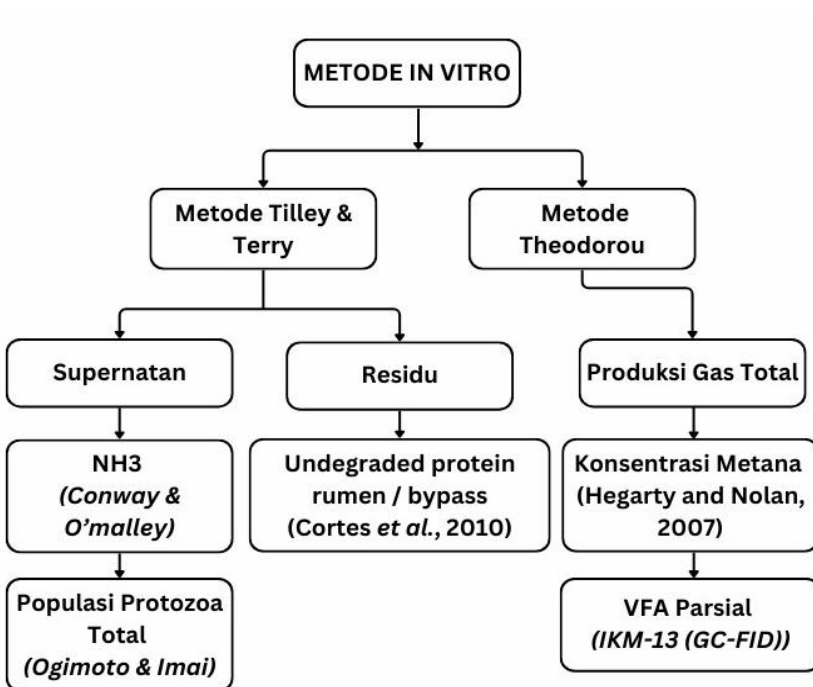
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah penggiling, timbangan analitik, termometer, gelas ukur, pipet tetes, cawan, oven, desikator, pH meter elektronik, counting chamber, botol scott, aluminium foil, mikroskop, destilasi uap, erlenmeyer, pipet, buret makro, termos (kapasitas 500 ml), kain nylon mess 300, tabung fermentor (80 mL) dengan skala 50 ml dilengkapi penutup karet dan pembebas udara (*Bunsen valve*), inkubator dengan suhu 38-39°C, storage flask 5 L, sentrifus dengan kecepatan 2500 rpm, syringe otomatis, motor stirrer, kain nylon (untuk menyaring cairan rumen), tabung gas CO_2 , dilengkapi alat bubbling (jarum suntik di bagian ujung), penyaring dengan pompa vakum, labu ukur, pipet 10 ml, pH meter, termometer, Oven 105°C, tanur 600°C, cawan porselin, eksikator, timbangan analitis.

2.3. Metode Penelitian

Tahapan penelitian dimulai dari mempersiapkan bahan baku dalam pembuatan ransum. Setelah bahan baku tersedia selanjutnya dilakukan pengolahan bahan baku dan melakukan formulasi ransum perlakuan sesuai yang tertera pada diagram alir Gambar 3, dan tahapan pengujian ransum secara *in vitro* dapat dilihat pada diagram alir yang tertera di Gambar 4.



Gambar 3. Diagram alir persiapan dan pembuatan ransum penelitian



Gambar 4. Diagram alir pengujian dalam penelitian

2.4. Pengolahan Daun Maja (*Crescentia cujete*)

Daun maja yang digunakan pada penelitian berasal dari Kec. Pallangga Kab. Gowa, Sulawesi Selatan. Daun maja dipetik dan dikumpulkan secara menyeluruh dari daun muda sampai tua tanpa tangkai dan dipotong-potong untuk memudahkan dalam pengolahan. Setelah ditimbang daun maja lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 70°C selama 3 hari. Daun maja yang telah kering ditimbang untuk mendapatkan berat kering. Daun maja dihaluskan dan disaring dengan saringan ukuran mesh 30. Daun maja selanjutnya diuji untuk mengetahui kandungan nutrisi dan tanin. Kandungan nutrisi dan tanin daun maja dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan nutrisi dan tanin daun maja (100% BK)

Bahan organik	90.59
Serat kasar	26.04
Protein kasar	12.45
Lemak kasar	3.14
BETN	48.95
Ca	2.70
Phospor	0.32
Tannin total	7.92

Dianalisis di laboratorium kimia pakan Universitas Hasanuddin

2.5. Pembuatan ransum

Tahapan pembuatan ransum dimulai dengan menyiapkan bahan pakan yang akan digunakan meliputi tumpi jagung, dedak padi, jagung giling, onggok, bungkil kedelai, molases, dan mineral mix yang didapatkan dari penyalur sekitar kota Makassar. Tumpi jagung, dedak padi, jagung giling, onggok, bungkil kedelai dioven selama 3 hari pada suhu 70°C. Bahan pakan selanjutnya digiling dan disaring menggunakan mesh 30 agar didapatkan tekstur yang seragam untuk memastikan pencampuran homogen. Ransum formulasi mengacu pada konsentrat untuk sapi pedaging (SNI 3148-2:2024).

Proses pencampuran ransum dilakukan dengan cara manual dan dimulai dari bahan dengan komposisi yang paling sedikit. Molases dan mineral mix dicampur dengan bahan perantara seperti jagung giling. pencampuran selanjutnya dilakukan dengan susunan bahan pakan dengan komposisi paling banyak berada di lapisan paling bawah secara berurutan yaitu tumpi jagung, onggok, dedak padi, bungkil kedelai dan lapisan yang paling atas adalah jagung giling yang sebelumnya telah dicampur dengan mineral mix dan molases. Bahan kemudian dibolak balik secara horisontal dan vertikal secara bergantian selama ± 20 menit.

2.6. Desain Penelitian dan Komposisi Pakan Perlakuan

Ransum yang telah diformulasi diaplikasikan kedalam pakan perlakuan dengan menambahkan daun maja dengan 4 level perlakuan yaitu :

- **C0** : (kontrol): ransum tanpa penambahan tepung daun maja.
- **C10** : ransum dengan penambahan 10 g/100g tepung daun maja.
- **C20** : ransum dengan penambahan 20 g/100g tepung daun maja.
- **C30** : ransum dengan penambahan 30 g/100g tepung daun maja.

Komposisi ransum dan kandungan nutrisi dari setiap pakan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi ransum dan kandungan nutrisi dan tannin pakan perlakuan (g/100g BK)

Komposisi Ransum	Perlakuan			
	C0	C10	C20	C30
Tumpi jagung	30	30	30	30
Dedak padi	20	20	20	20
Jagung Giling	12	12	12	12
Onggok	21	21	21	21
Bungkil Kedelai	15	15	15	15
Molases	1	1	1	1
Mineral Mix	1	1	1	1
Daun maja	0	10	20	30
Kandungan Kimia (%)				
Serat Kasar	17.20*	18.08**	18.97**	19.85**
Protein Kasar	15.51*	15.20**	14.90**	14.59**
Lemak Kasar	1.89*	2.02**	2.14**	2.27**
BTN	58.46*	57.51**	56.56**	55.61**
Ca	0.45*	0.67**	0.90**	1.12**
P	0.56*	0.54**	0.51**	0.49**
Tannin	-	0.79***	1.58***	2.38***

*Dianalisis di laboratorium kimia pakan ternak, Universitas Hasanuddin

**Didapatkan dari perhitungan kandungan nutrisi ransum dan kandungan nutrisi daun maja hasil analisis laboratorium.

***Didapatkan dari perhitungan kandungan tanin daun maja hasil analisis laboratorium

2.7. Pengambilan Cairan Rumen

Prosedur pengambilan cairan rumen dilakukan dengan menyiapkan termos yang telah diisi dengan air hangat (39°C) agar sesuai dengan kondisi alami rumen. Sebelum diisi cairan rumen, termos dikosongkan sejenak. Cairan rumen diambil dan disaring menggunakan kain penyaring, kemudian dimasukkan ke dalam termos melalui corong. Cairan rumen di bawa ke laboratorium untuk dilakukan percobaan pengujian secara *in vitro*. Cairan rumen yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari rumen sapi potong yang terdapat di Rumah Potong Hewan (RPH) UD. Akbar

Jaya Sejahtera kel. Samata Kec. Somba Opu Kab. Gowa dan bersertifikat no: 06020013030319.

2.8. Pembuatan Mc Dougall

Larutan Mc Dougall adalah larutan buatan yang mensimulasikan cairan saliva ruminansia. Larutan ini berfungsi sebagai buffer untuk menjaga kestabilan pH selama proses fermentasi, sehingga kondisi fermentasi mikroba rumen dapat berlangsung optimal dalam lingkungan anaerob. Komposisi larutan ini dirancang untuk mendukung aktivitas mikroba dengan menyediakan ion-ion mineral (Tilley & Terry, 1963). Larutan Mc Dougall yang digunakan dalam penelitian ini dibuat dengan cara menambahkan sebanyak 1000 ml air destilasi kedalam 0.25 ml larutan mineral makro lalu diaduk hingga campuran merata selanjutnya penambahan larutan buffer dan larutan mineral mikro masing masing 500 ml dan 100 ml larutan pereduksi. Setelah larutan tercampur rata tambahkan air destilasi hingga larutan mencapai 2500 ml. Setelah larutan tercampur. Pengaliran gas CO₂ selama semalaman dengan tujuan agar larutan tidak mengandung gas O₂ dan berada pada pH 7.

2.9. Inkubasi *In Vitro* dan Penentuan Karakteristik Fermentasi Rumen.

Tabung fermentor 100 ml yang telah diisi dengan 0.5 gram sampel, kemudian ditambahkan larutan Mc Dougall dan cairan rumen dengan perbandingan 4:1 (Tilley & Terry, 1963) sebanyak 50 ml pada masing-masing tabung fermentor. Tabung fermentor ditutup dengan karet berventilasi dan dimasukkan ke dalam shaker water bath dengan suhu 39°C dan diinkubasi selama 4 jam. Setelah inkubasi selesai tabung fermentor dikocok dan di cek pH (6.5-6.9). Masukkan tabung fermentor dicentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian diambil untuk analisa lebih lanjut. NH₃ diukur menggunakan metode mikrodifusi conway (Conway & Bryne, 1933) dengan rumus : NH₃ = (ml H₂SO₄ titran × N H₂SO₄ × 1000) mM. VFA parsial diukur menggunakan metode gas Chromatography (Galyean 2010) dengan merk Shimadzu GC 2010 plus – FID (*Flame Ionisation Detector*). Kadar VFA parsial dihitung menggunakan rumus : VFA parsial (mM) = luas sampel (mm²)/luas standar (mm²) × konsentrasi standar (mM) dan efisiensi fermentasi dihitung dengan persamaan sebagai berikut :

$$FE (\%) = \frac{(0.622 * A + 1.092 * P) * 100}{A + P + 2 * B} \quad (1)$$

A adalah asetat, *P* adalah Propinat dan *B* adalah butirrat (Baran & Žitňan, 2002).

2.10. Pengukuran Produksi Gas, Konsentrasi CH₄ dan Persamaan Kinetika

Fermentasi dilakukan secara *in vitro* dengan metode Theodorou *et al.* (1994) Pencernaan *in vitro* dilakukan dengan cara ransum perlakuan sebanyak 0.75 gram dimasukkan ke dalam botol infus volume 100 ml, kemudian ditambahkan 25 ml cairan

rumen dan 50 ml larutan Mc Dougall. Botol infus ditutup menggunakan karet penutup botol lalu disegel menggunakan crimper. Tabung infus dimasukkan ke dalam water bath dengan suhu 39°C dan dilakukan pengambilan gas pada jam ke 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 dan 48. Jumlah produksi gas diukur menggunakan syringe berbahan plastik dengan volume 50 ml. Bagian ujung syringe dihubungkan dengan jarum dengan posisi tegak lurus. Syringe ditusukkan pada penutup karet dalam botol ke bagian dalam botol. Secara otomatis, volume produksi gas yang dihasilkan akan tertarik ke atas dan mendorong syringe. Setelah tertarik, syringe dicabut dari botol dan volume produksi gas dapat diketahui melalui pembacaan manual pada skala yang terdapat pada syringe. Kinetika produksi gas dihitung dengan pendekatan persamaan eksponensial yang digagas oleh (Orskov & Mcdonald, 1979) :

$$p = a + b (1 - e^{-ct}) \quad (2)$$

Dengan p adalah produksi gas kumulatif pada waktu t , produksi gas dari fraksi yang mudah larut (a), produksi gas dari fraksi yang potensial terdegradasi (b), laju produksi gas (c) dan $a+b$ adalah produksi gas maksimum (*asymptote*). Persamaan eksponensial dihitung dengan *non linear regression analyze* menggunakan aplikasi SPSS versi 25.

konsentrasi metana (CH_4) dihitung dengan metode Stoikiometri, estimasi konsentrasi metana (CH_4) dihitung berdasarkan komposisi VFA parsial dengan persamaan berikut :

$$CH_4 = 0.5 C_2 + 0.5 C_4 - 0.25 C_3 - 0.25 C_5 \quad (3)$$

C_2 adalah asetat, C_3 adalah propinat, C_4 adalah butirrat dan C_5 adalah valerat (Hegarty and Nolan, 2007)

2.11. Penentuan Kadar *Undegraded Rumen Protein*

Inkubasi in vitro dilakukan dengan prosedur Tilley dan Terry (1963), yang dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama dengan inkubasi 48 jam untuk memperkirakan degradasi protein rumen ($rumen_{deg}$) dan tahap kedua inkubasi selama 72 jam lagi dengan penambahan HCl/pepsin untuk memperkirakan degradasi total protein kasar (*Abomasal digestibility*). Setelah inkubasi, isi tabung dari tahap pertama dan kedua disaring menggunakan kain nylon 50µm. Residu dikeringkan (72 jam pada suhu 70°C), ditimbang, dan dianalisis dengan metode steam destilation. Pada tahap pertama degradasi protein rumen dihitung dari jumlah protein sampel awal dengan residu protein pada inkubasi 48 jam. Prosedur yang sama digunakan untuk menghitung total degradasi protein kasar dari tahap kedua. Perbedaan antara total degradasi protein kasar dan degradasi rumen diasumsikan setara dengan bypass protein yaitu, protein yang tidak terdegradasi dalam kondisi ruminal tetapi terdegradasi dalam kondisi pasca-ruminal (Cortés *et al.*, 2009).

2.12. Penentuan Populasi Protozoa Total

Populasi protozoa total ditentukan menggunakan metode Ogimoto & Imai (1981). Pengujian mikrobiologis ini menggunakan pakan komplit yang telah terproteksi daun maja dengan level yang berbeda yang ditambahkan ke dalam 8 ml cairan rumen yang sebelumnya telah diinkubasi dalam tabung fermentor dan 32 ml larutan McDougall. Inkubasi dilakukan pada suhu 39°C. Dengan kondisi anaerob selama 4 jam. Setelah proses inkubasi selesai, cairan rumen dari masing-masing perlakuan dicampur dengan larutan *Trypan blue formalin salin* (TBFS) dengan perbandingan 1:2 untuk memfiksasi dan mewarnai protozoa.

Campuran tersebut kemudian diteteskan sebanyak dua tetes pada counting chamber dengan ketebalan 0.2 mm dan dibaca di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali. Perhitungan dilakukan pada 16 kotak kecil dengan luas masing-masing 0.0625 mm². Populasi protozoa dihitung menggunakan rumus :

$$PP = \frac{1}{0.2 \times 0.0625 \times 16 \times 16} \times 1000 \times fp \times C \quad (4)$$

PP adalah populasi protozoa (sel/ml), *fp* adalah Faktor pengencer dan *C* adalah Populasi protozoa dalam *Counting chamber*.

2.13. Analisis Data

Desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan *One Way Anova*. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan ($p < 0.05$) dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan yang signifikan di antara rata-rata perlakuan menggunakan software IBM SPSS Statistics versi 25 dan uji Polinomial orthogonal untuk mengetahui hubungan korelasi level daun maja dengan bypass protein rumen menggunakan microsoft excel 2021 dengan mengikuti model statistik:

$$Y_{ij} = \mu + N_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} = hasil pengamatan dari perlakuan ke-*i* dan kelompok ke-*j*

μ = nilai rata-rata hasil pengamatan

N_i = pengaruh perlakuan ke-*i* (1,2,3,4)

ϵ_{ij} = pengaruh acak perlakuan ke-*i* dalam pengulangan ke-*j* (1,2,3,4)