

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

#### **3.1. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian pengaruh penambahan kolin klorida pada pakan terhadap kadar kolesterol dan lipoprotein darah sapi perah laktasi dilaksanakan pada tanggal 28 Desember 2015 sampai dengan tanggal 6 Maret 2016 di kandang milik Kelompok Tani Ternak (KTT) Wahyu Agung, Desa Sumogawe, Kecamatan Getasan, Kabupaten Semarang.

#### **3.2. Materi Penelitian**

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah 8 ekor sapi perah betina Peranakan Friesian Holstein (PFH) laktasi bulan ke 3 dan ke 4 dengan periode laktasi II. Bobot badan rata-rata sapi perah adalah  $456 \pm 31$  kg ( $99 \pm 5$  kg  $BB^{0,75}$ ).

##### **3.2.1. Bahan**

Bahan yang digunakan sebagai pakan adalah rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) dan konsentrat (WA Feed) serta penambahan *additive* pakan yaitu kolin klorida 60% *corn-cob* (60% kolin klorida dan 40% *corn-cob*). Hijauan dan konsentrat diberikan dengan perbandingan 40 : 60 diberikan sesuai kebutuhan sapi perah yaitu protein kasar (PK) 13% dan *Total Digestible Nutrients* (TDN) 63% serta penambahan kolin klorida 60% *corn-cob* dalam jumlah 30 g/ekor/hari setara dengan 18 g/ekor/hari kolin klorida ( $0,02$  %  $BB^{0,75}$ ) berdasarkan penelitian

sebelumnya tentang penambahan RPC pada sapi perah (Hartwell *et al.*, 2000; Pinotti *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2006). Bahan untuk analisis kadar kolesterol dan lipoprotein darah yang terdiri dari LDL dan HDL darah sapi perah laktasi adalah sampel darah dari masing-masing sapi perah laktasi. Analisis kadar kolesterol darah menggunakan stanbio kolesterol liquicolor, analisis kadar trigliserida darah menggunakan stanbio trygliceride liquicolor, dan analisis kadar HDL darah menggunakan stanbio HDL liquicolor.

### 3.2.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah label untuk memberikan tanda pada materi dan alat, timbangan digital untuk menimbang pakan kapasitas 150 kg dengan ketelitian 0,002 kg, timbangan digital kapasitas 500 g dengan ketelitian 0,01 g digunakan untuk menimbang kolin klorida, ember sebagai tempat pakan konsentrat pada waktu menimbang, karung sebagai wadah pakan berupa hijauan, plastik sebagai wadah kolin, spuit ukuran 10 ml dan jarum sebagai alat untuk mengambil sampel darah, tabung non *ethylene diamine tetra acetic* (EDTA) sebagai wadah sampel darah, *refrigerator* sebagai tempat menyimpan sementara sampel darah serta *ice box* sebagai tempat menyimpan sampel darah selama perjalanan.

Alat yang digunakan dalam analisis kadar kolesterol, LDL, dan HDL darah sapi perah laktasi adalah Biochemistry Analyser “Caretium”, mikropipet dengan kapasitas 0,1 - 1 ml untuk mengambil reagen dan mikropipet dengan kapasitas 0,01 - 0,1 ml untuk mengambil sampel darah, mikrotip untuk tempat reagen dan

sampel, tisu untuk membersihkan sisa reagen dan sampel, serta gelas ukur sebagai wadah air untuk pembersihan alat dari sisa reagen dan sampel sebelumnya.

### **3.3. Metode Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan meliputi rancangan *Cross-over Design* berdasarkan Neter *et al.* (1990) terdiri dari 2 perlakuan  $T_0$  (0 g/ekor/hari kolin klorida *corn-cob*) dan  $T_1$  (30 g/ekor/hari kolin klorida 60% *corn-cob*) dengan 8 ulangan, yaitu 4 ekor ternak per perlakuan berlangsung dalam 2 periode sehingga periode merupakan ulangan. Masing-masing periode berlangsung selama 4 minggu. Penelitian dilaksanakan dalam 5 tahap prosedur penelitian, yaitu 1) tahap persiapan penelitian 2) tahap adaptasi pakan 3) tahap perlakuan 4) tahap pengambilan sampel dan analisis sampel 5) Analisis data.

Variabel yang diamati pada penelitian adalah 1) konsumsi bahan kering pakan, dihitung dengan cara menimbang pakan yang diberikan dikurangi dengan sisa pakan setelah 24 jam setiap hari kemudian dikalikan dengan kadar bahan kering pakan, dilakukan selama periode 1 dan periode 2 berlangsung 2) konsumsi lemak kasar pakan, dihitung dengan cara mengalikan kadar lemak kasar pakan dengan konsumsi bahan kering pakan setiap hari selama periode 1 dan periode 2 berlangsung 3) kadar kolesterol darah 4) kadar LDL darah 5) kadar HDL darah.

#### **3.3.1. Tahap persiapan penelitian**

Tahap persiapan penelitian dilakukan dengan analisis proksimat bahan pakan yang terdiri dari rumput gajah dan konsentrat (WA Feed). Hasil analisis

proksimat ditampilkan dalam Tabel 1. *Recording* bobot badan dan produksi susu harian setiap ekor sapi perah dilakukan untuk mengetahui kebutuhan nutrisi pakan sapi perah. Ransum pakan diformulasikan mencukupi kebutuhan nutrisi sapi perah yaitu mengandung 13% PK dan 63% TDN untuk semua perlakuan ( $T_0$  dan  $T_1$ ). Formulasi ransum pakan sapi perah laktasi ditampilkan dalam Tabel 2. Pengelompokan 8 ekor sapi perah dibagi menjadi 2 kelompok (untuk perlakuan  $T_0$  = 4 ekor dan  $T_1$  = 4 ekor).

Tabel 1. Hasil Analisis Proksimat Bahan Pakan Sapi Perah Laktasi

No	Bahan pakan	Nutrien				
		BK <sup>a</sup>	TDN	PK <sup>d</sup>	SK <sup>a</sup>	LK <sup>a</sup>
------( % )-----						
1	Rumput Gajah	15,32	57,33 <sup>b</sup>	8,01	33,06	2,72
2	Konsentrat <i>WA Feed</i>	88,39	69,54 <sup>c</sup>	16,70	19,92	4,55

Sumber : a. Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro (2015).  
 b. Perhitungan TDN berdasarkan rumus Hartadi *et al.* (1980).  
 c. Perhitungan TDN berdasarkan rumus Sutardi (1979).  
 d. Laboratorium Ekologi dan Produksi Tanaman Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro (2015).

Tabel 2. Formulasi Ransum Pakan Sapi Perah Laktasi

No	Bahan Pakan	Nutrien					
		Rasio	BK	TDN	PK	SK	LK
------( % )-----							
1	Rumput Gajah	40	6,12	22,93	3,20	13,22	1,08
2	Konsentrat <i>WA Feed</i>	60	53,03	41,72	10,02	11,95	2,73
	Jumlah	100	59,16	64,65	13,22	25,18	3,82

Keterangan : BK= Bahan Kering, PK= Protein Kasar, LK= Lemak Kasar, SK= Serat Kasar, TDN= *Total Digestible Nutrients*

### 3.3.2. Tahap adaptasi pakan

Tahap adaptasi pakan sapi perah diberikan ransum percobaan secara bertahap, dengan tujuan agar sapi dapat terbiasa mengkonsumsi ransum yang

digunakan dalam penelitian. Sapi perah diberi pakan hijauan 2 kali sehari yaitu pukul 08.00 WIB dan 16.00 WIB serta diberi pakan konsentrat 4 kali sehari yaitu pukul 04.00 WIB, 07.00 WIB, 13.00 WIB, dan 15.00 WIB. Penambahan kolin klorida 60% *corn-cob* 30 g/ekor/hari dilakukan pada pemberian konsentrat di pagi hari. Pemberian air dilakukan secara *adlibitum* dengan alat penampung air tipe *nipple cup*. Tahap adaptasi pakan dilakukan selama 2 minggu dengan rincian 1 minggu pertama adaptasi dengan formulasi ransum baru dengan komposisi bahan pakan tanpa penambahan kolin klorida dan 1 minggu selanjutnya adaptasi ransum baru dengan penambahan 30 g/ekor/hari kolin klorida 60% *corn-cob*.

### **3.3.3. Tahap perlakuan**

Tahap perlakuan sapi yang terdiri dari dua kelompok percobaan (masing-masing kelompok 4 ekor) diberi 2 macam perlakuan yaitu  $T_0$  (0 g/ekor/hari kolin klorida 60% *corn-cob*) dan  $T_1$  (30 g/ekor/hari kolin klorida 60% *corn-cob*) berlangsung selama 2 periode. Masa setiap periode perlakuan adalah 4 minggu. Penelitian periode ke-1 sapi kelompok I diberikan perlakuan  $T_0$  dan sapi kelompok II diberikan perlakuan  $T_1$ . Tahap adaptasi dilakukan kembali selama 2 minggu setelah percobaan periode I dengan tujuan untuk menghilangkan pengaruh pakan sebelumnya kemudian dilanjutkan percobaan periode ke-2. Perlakuan yang diberikan pada periode ke-2 dibalik sehingga sapi kelompok I diberikan perlakuan  $T_1$  dan sapi kelompok II diberikan perlakuan  $T_0$ .

### 3.3.4. Tahap pengambilan sampel dan analisis sampel

Tahap pengambilan sampel dilakukan di setiap akhir periode perlakuan untuk mengetahui kadar kolesterol, LDL, dan HDL darah. Pengambilan sampel dilakukan 4 jam setelah diberi pakan (Sharma dan Erdman, 1991) dengan spuit ukuran 10 ml pada vena jugularis sapi perah. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung non EDTA kemudian dihomogenkan dengan menggoyangkan tabung untuk disimpan sementara di dalam *refrigerator*. Analisis kadar total kolesterol, LDL, dan HDL darah dilakukan di Rumah Sakit Hewan dr. Soeparwi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Metode analisis sampel darah menggunakan *Endpoint Method* untuk mengetahui kadar total kolesterol, trigliserida, dan HDL darah yang selanjutnya dimasukkan dalam perhitungan kadar LDL darah.

Analisis kadar total kolesterol darah dilakukan dengan standarisasi alat, standarisasi reagen, dan uji sampel darah. Tahap awal adalah alat dinetralkan dengan air yang dimasukkan pada alat, bertujuan agar sisa reagen dan sampel yang tersisa pada alat dapat dibersihkan. Reagen kolesterol disiapkan sebanyak 3 buah yaitu dengan pengambilan 1 ml reagen kolesterol dan 0,01 ml reagen standar kolesterol dengan mikropipet kemudian dicampurkan keduanya pada mikrotip serta dihomogenkan untuk diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Standarisasi alat dilakukan dengan reagen kolesterol blanko ke-1 dimasukkan pada alat untuk diketahui standar nilai alat untuk uji kolesterol. Tahap selanjutnya adalah standarisasi reagen yaitu dengan dimasukkannya serum sintesis sebanyak 0,01 ml kedalam reagen kolesterol ke-2 lalu diinkubasi selama 10 menit, kemudian diujikan pada alat. Hasil kadar total kolesterol yang tertera pada layar

alat memiliki standar nilai normal 138 mg/dl dengan range 96 - 179 mg/dl, apabila nilai termasuk dalam kisaran normal tersebut maka uji sampel darah dapat dilakukan. Tahap terakhir adalah 0,01 ml sampel darah dimasukkan ke dalam reagen kolesterol ke-3 dan diinkubasi selama 10 menit. Campuran tersebut diujikan pada alat kemudian hasil nilai kadar kolesterol tertera pada layar.

Analisis kadar trigliserida darah dilakukan dengan standarisasi alat, standarisasi reagen, dan uji sampel darah. Tahap awal adalah alat dinetralkan dengan air yang dimasukkan pada alat, bertujuan agar sisa reagen dan sampel yang tersisa pada alat dapat dibersihkan. Reagen trigliserida disiapkan sebanyak 3 reagen yaitu dengan pengambilan 1 ml reagen trigliserida dengan mikropipet dan ditambahkan 1 tetes reagen aktivator kemudian dihomogenkan untuk diinkubasi selama 5 menit (hingga berubah menjadi merah muda). Reagen tersebut ditambahkan reagen standar trigliserida 0,01 ml dan diinkubasi selama 10 menit. Standarisasi alat dilakukan dengan memasukkan reagen trigliserida ke-1 pada alat untuk diketahui standar nilai alat untuk uji trigliserida. Tahap selanjutnya adalah standarisasi reagen yaitu dengan dimasukkannya serum sintesis sebanyak 0,01 ml kedalam reagen kolesterol ke-2 lalu diinkubasi selama 10 menit, kemudian diujikan pada alat. Hasil kadar trigliserida darah yang tertera pada layar alat memiliki standar normal 104 mg/dl dengan range 73 - 135 mg/dl, apabila nilai termasuk dalam kisaran normal tersebut reagen dapat digunakan pada uji sampel darah. Tahap terakhir adalah 0,01 ml sampel darah dimasukkan ke dalam reagen kolesterol ke-3 dan diinkubasi selama 10 menit. Campuran tersebut diujikan pada alat kemudian hasil nilai kadar trigliserida tertera pada layar.

Analisis kadar HDL darah dilakukan dengan standarisasi alat, standarisasi reagen, dan uji sampel darah. Tahap awal adalah alat dinetralkan dengan air yang dimasukkan pada alat, bertujuan agar sisa reagen dan sampel yang tersisa pada alat dapat dibersihkan. Reagen HDL disiapkan sebanyak 3 reagen yaitu dengan pengambilan 1 ml reagen HDL dan 0,025 ml reagen standar HDL dengan mikropipet kemudian keduanya dicampurkan pada mikrotip serta dihomogenkan untuk diinkubasi selama 10 menit. Standarisasi alat dilakukan dengan reagen HDL ke-1 dimasukkan pada alat untuk ditahui standar nilai alat untuk uji HDL. Tahap selanjutnya adalah standarisasi reagen yaitu dengan dicampurnya 0,5 ml serum sintesis dengan 0,05 ml reagen HDL ke-2 pada mikrotip kemudian didiamkan selama 5 menit. Sentrifugasi dilakukan selama 10 menit dan sampel dibiarkan selama beberapa menit hingga terbentuk endapan dan supernatan. Sebanyak 0,025 ml supernatan diambil dan diujikan pada alat. Hasil kadar HDL yang tertera pada layar alat memiliki nilai normal 79 mg/dl dengan range 55 - 102 mg/dl, apabila nilai termasuk dalam kisaran normal maka uji sampel darah dapat dilakukan. Tahap terakhir adalah mencampurkan sebanyak 0,5 ml sampel darah dengan 0,05 ml reagen HDL ke-3 yang dicampurkan dalam mikrotip kemudian didiamkan selama 5 menit. Sentrifugasi dilakukan selama 10 menit dan sampel dibiarkan selama beberapa menit hingga terbentuk endapan dan supernatan. Sebanyak 0,025 ml supernatan diambil dan diujikan pada alat dan hasil kadar HDL tertera pada layar alat.

Analisis kadar LDL darah ditentukan secara tidak langsung dengan menggunakan rumus Friedewald dengan diketahui kadar total kolesterol, trigliserida, dan HDL darah. Perhitungan rumus kadar LDL darah sebagai berikut:

$$\text{LDL} = \text{Total Kolesterol} - \left( \text{HDL} + \frac{\text{Trigliserida}}{5} \right) \dots\dots\dots (1)$$

### 3.3.5. Analisis statistik data

Rancangan percobaan menggunakan rancangan *Cross-over designs* menurut petunjuk Neter *et al.* (1990) dengan 2 perlakuan ( $T_0$  dan  $T_1$ ) dan 8 kali ulangan (dalam 2 periode):

#### 1. Periode I

$T_0$  = Pakan tanpa kolin klorida (B1, B2, B3, B4).

$T_1$  = Pakan dengan suplementasi kolin klorida (A1, A2, A3, A4)

#### 2. Periode II

$T_0$  = Pakan tanpa kolin klorida (A1, A2, A3, A4).

$T_1$  = Pakan dengan suplementasi kolin klorida (B1, B2, B3, B4)

Setiap periode perlakuan adalah 4 minggu dan selang waktu istirahat adalah 2 minggu dengan susunan *lay out* percobaan sebagai berikut:

Periode	Minggu	Sapi Ke-							
		1	2	3	4	5	6	7	8
I	1	A1	B1	A2	B2	A3	B3	A4	B4
	2	A1	B1	A2	B2	A3	B3	A4	B4
	3	A1	B1	A2	B2	A3	B3	A4	B4
	4	A1	B1	A2	B2	A3	B3	A4	B4
Istirahat Minggu ke-1									
Istirahat Minggu ke-2									
II	1	A4	B2	A1	B3	A2	B4	A3	B1
	2	A4	B2	A1	B3	A2	B4	A3	B1
	3	A4	B2	A1	B3	A2	B4	A3	B1
	4	A4	B2	A1	B3	A2	B4	A3	B1

Ilustrasi 8. Denah Rancangan Percobaan

Keterangan :  = T0  
 = T1

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan uji F berdasarkan rancangan percobaan *Cross-over designs* (Neter *et al.*, 1990) dengan model linear aditif sebagai berikut:

$$Y_{ij(k)} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \tau_{(k)} + \epsilon_{ij(k)} \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan :

$Y_{ij(k)}$  = nilai pengamatan pada perlakuan ke-i (perlakuan suplementasi kolin klorida) periode percobaan ke-j (periode I dan II) ternak sapi perah laktasi ke-k.

$\mu$  = nilai rata-rata umum.

$\alpha_i$  = pengaruh perlakuan ke-i (suplementasi kolin klorida).

$\beta_j$  = pengaruh periode percobaan ke-j (periode I dan II).

$\tau_{(k)}$  = pengaruh individu ternak sapi perah laktasi ke-k.

$\epsilon_{ij(k)}$  = pengaruh galat percobaan perlakuan penambahan kolin (i), periode percobaan (j) dan individu ternak sapi perah laktasi (k).

Data yang diperoleh diuji menggunakan analisis statistik ragam (Anova).

Kriteria yang diperoleh :

$F_{\text{Hitung}} < F_{\text{Tabel}}$  : Pengaruh perlakuan tidak nyata berpengaruh sehingga  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak.

$F_{\text{Hitung}} \geq F_{\text{Tabel}}$  : Pengaruh perlakuan nyata berpengaruh sehingga  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima.

### 3.3.6. Hipotesis statistik

Hipotesis statistik yang diajukan adalah sebagai berikut :

1.  $H_0 ; \tau_0 = \tau_1 = 0$  : tidak ada perbedaan kadar kolesterol dan lipoprotein darah antara sapi perah laktasi yang mendapat dengan tidak mendapat penambahan kolin klorida.
2.  $H_1 ; \tau_0 \neq \tau_1 \neq 0$ : terdapat perbedaan kadar kolesterol dan lipoprotein darah darah antara sapi perah laktasi yang mendapat dengan tidak mendapat penambahan kolin klorida.