

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Mei sampai dengan Juli 2016, pemeliharaan ayam broiler dilaksanakan selama 28 hari di Laboratorium Produksi Ternak Unggas Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis darah dilaksanakan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.1. Materi

Penelitian ini menggunakan 100 *day-old-chick* broiler Lohman jantan (MB-202) dengan bobot badan awal rata-rata $41,30 \pm 2,68$ gram. Cairan Amnion (CA) yang digunakan didapat dari sapi yang baru saja melahirkan dan ditampung secara aseptik ke dalam botol dan disimpan dalam suhu -20°C hingga digunakan dalam penelitian ini.

Kandang ayam yang digunakan adalah kandang alas sekam dengan ukuran $1 \times 1 \times 1$ meter. Pada setiap *flock* terdapat tempat minum, tempat pakan dan lampu penghangat. Termohigrometer dipasang dalam dan luar kandang untuk mengetahui kondisi suhu dan kelembaban kandang. Komposisi bahan pakan dan kandungan nutrisi ransum yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Untuk mengetahui profil hematologis ayam broiler, peralatan yang digunakan untuk mengambil sampel darah adalah spuit 3 ml, vacutainer EDTA, *ice pack* dan *cool box*.

Tabel 1. Komposisi Bahan Pakan dan Kandungan Nutrisi Ransum

| Bahan Pakan | Jumlah ------(%)----- |
|---|--------------------------|
| Jagung | 54,0 |
| Bungkil kedelai | 27,0 |
| Tepung ikan | 9,00 |
| Bekatul | 6,75 |
| Menir | 1,00 |
| DL-Methionine | 0,23 |
| L-lysine | 0,06 |
| Tepung kapur | 1,01 |
| Dicalcium phosphatase | 0,20 |
| Premix | 0,50 |
| NaCl | 0,25 |
| Total | 100,00 |
| Kandungan Nutrisi Ransum | |
| Energi Metabolis (kkal/kg) ² | 2.892 |
| Protein Kasar (%) | 22,5 |
| Serat Kasar (%) | 3,52 |
| Kalsium (%) | 1,03 |
| Fosfor (%) | 0,56 |
| Metionin (%) | 0,66 |
| Lisin (%) | 1,43 |

Peralatan yang digunakan untuk menganalisis sampel darah adalah mikroskop, pipet eritrosit, larutan Hayem, bilik hitung *improve neubeuer*, kaca penutup, kaca objek, hemoglobin kit metode Sahli, batang pengaduk, sentrifus, tabung mikropipiler, tabel Janetsky, *sealing compound*, pipet leukosit, larutan Turk, larutan giemsa, methanol, aquades dan tisu.

3.2. Metode

Teradapat tiga tahap dalam penelitian ini, yaitu tahap persiapan, tahap pemeliharaan serta tahap analisis sampel dan data.

3.2.1. Tahap persiapan

Tahap persiapan meliputi pengambilan CA dari sapi yang baru saja melahirkan secara aseptis ke dalam botol. Kemudian CA disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu -20°C hingga tahap pemeliharaan dilaksanakan. Persiapan kandang meliputi pembersihan, pengkapuran, instalasi peralatan kandang dan listrik, penentuan rancangan serta petak percobaan serta fumigasi kandang.

3.2.2. Tahap pemeliharaan

Kandang yang digunakan untuk memelihara ayam broiler selama perlakuan adalah tipe *flock* dengan ukuran $1 \times 1 \times 1$ meter. Terdapat 10 petak yang masing-masing berisi 10 ekor ayam. Ayam dipelihara selama 28 hari, pemberian pakan dan air minum secara *ad-libitum*. Pada penelitian ini terdapat 2 perlakuan, yaitu T0 tanpa perlakuan sebagai kontrol dan perlakuan T1 penambahan CA ke dalam air minum sebanyak 1% (1/100ml) selama penelitian.

3.2.3. Tahap analisis sampel dan data

3.2.3.1. Preparasi darah, pada akhir pemeliharaan (hari ke-28), diambil sampel darah ayam melalui *vena brachialis* pada sayap ayam. Pengambilan darah menggunakan spuit ukuran 3 ml yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung vacutainer yang berisi EDTA, setelah darah dipindahkan ke vacutainer digojok merata agar darah tidak menggumpal, lalu dimasukkan ke *ice box* berisi *ice pack* dan dikirim ke laboratorium untuk dianalisis.

3.2.3.2. Analisis darah sebagai parameter, parameter yang diukur adalah jumlah eritrosit, hemoglobin, hematokrit, jumlah leukosit dan diferensial leukosit yang terdiri dari heterofil, eosinofil, limfosit dan monosit. Indeks *Mean Corpuscular Hemoglobine* (MCH), *Mean Corpuscular Volume* (MCV) dan *Mean Corpuscular Hemoglobine Concentration* (MCHC) diketahui menggunakan perhitungan setelah jumlah eritrosit, hemoglobin dan hematokrit didapatkan. Prosedur analisis darah yang dilakukan mengacu Wibowo dkk. (2016) dan Fajar dkk. (2015).

Jumlah eritrosit diukur dengan cara menghisap sampel darah dengan pipet eritrosit hingga skala 0,5 dan menambahkan larutan Hayem sampai skala 11, kemudian larutan dihomogenkan, setelah homogen larutan diteteskan pada bilik hitung *improve neubeuer* yang sudah ditutup oleh kaca penutup. Perhitungan dilakukan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100 kali dan dibantu dengan *handcounter*. Cara menghitung mengikuti prosedur perhitungan eritrosit.

Kadar hemoglobin diukur dengan cara mengisi tabung Sahli hingga 2 ml, menghisap darah menggunakan pipet Sahli hingga skala 20 lalu darah dimasukkan ke tabung Sahli dan dihomogenkan menggunakan batang pengaduk. Setelah itu menambahkan aquades hingga warna pada tabung Sahli sama dengan pada komparator blok dan membaca kadar hemoglobin yang tertera pada tabung Sahli.

Kadar hematokrit diukur dengan cara memasukkan darah kedalam tabung mikrokalpiler hingga $\frac{3}{4}$ bagian dan kedua ujungnya ditutup menggunakan *sealing compound*. Kemudian disentrifuse pada kecepatan 3.000 rpm selama 5 menit. Tinggi padatan darah dalam mikrokalpiler diukur menggunakan tabel Janetsky dan didapat besaran kadar hematokrit dalam %.

Jumlah leukosit diukur dengan cara menghisap sampel darah dengan pipet leukosit hingga skala 0,5 dan menambahkan larutan Turk sampai skala 101, kemudian larutan dihomogenkan, setelah homogen larutan diteteskan pada bilik hitung *improve neubeuer* yang sudah tertutup oleh kaca penutup. Perhitungan dilakukan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100 kali dan dibantu dengan *handcounter*. Cara perhitungan mengikuti prosedur perhitungan leukosit.

Diferensial leukosit diketahui dengan cara membuat preparat apus darah, yaitu meletakkan beberapa tetes darah pada kaca objek dan diratakan tipis merata, lalu difiksasi menggunakan methanol dan ditunggu kering, kemudian melakukan pewarnaan menggunakan giemsa, ditunggu beberapa saat, dibilas menggunakan aquades dan dikeringkan. Preparat apus darah yang sudah jadi diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali dan di bedakan antara fraksi heterofil, eosinofil, limfosit dan monosit yang kemudian dipersentasekan.

Indeks *Mean Corpuscular Hemoglobine* (MCH) dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{MCH } (\mu^3) = (\text{hemoglobin} \times 10) : \text{jumlah eritrosit}$$

Indeks *Mean Corpuscular Volume* (MCV) dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{MCV (fl)} = (\text{hematokrit} \times 10) : \text{jumlah eritrosit}$$

Indeks *Mean Corpuscular Hemoglobine Concentration* (MCHC) dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{MCHC (\%)} = (\text{hemoglobin} : \text{hematokrit}) \times 100\%$$

3.3. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 perlakuan dan 5 ulangan, sehingga analisis data dilakukan dengan uji t (t - test). Prosedur analisis data uji t yang dilakukan mengacu kepada Mas dan Prastiwi (2016). Model matematis dan hipotesis statistik yang diterapkan adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

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

Kriteria pengujian yang diterapkan yaitu :

- Jika $-t_{\text{tabel}} < t_{\text{hitung}} < t_{\text{tabel}}$, maka H_1 diterima
- Jika diluar dari ketentuan di atas, maka H_0 diterima

H_0 : $\mu_1 = \mu_2$, tidak ada perbedaan rata-rata parameter yang diukur pada ayam broiler yang diberi CA dan tanpa diberi CA dalam air minum.

H_1 : $\mu_1 \neq \mu_2$, terdapat perbedaan rata-rata parameter yang diukur pada ayam broiler yang diberi CA dan tanpa diberi CA dalam air minum.