

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 23 Mei - 25 Juni 2016 di Kandang Ayam, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis kandungan bahan pakan dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis total leukosit dan diferensial leukosit dilaksanakan di Rumah Sakit Hewan Prof. Soeparwi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah 160 ekor DOC (*Day Old Chick*) broiler jantan dengan bobot awal rata-rata $41,30 \pm 2,68$ g, kandang koloni ukuran $1 \times 1 \times 1,5$ m sebanyak 20 petak, *litter*, timbangan analitik untuk menimbang pakan, lampu bohlam 25 watt sebagai penerangan dan penghangat, tempat pakan dan minum dan termometer untuk mengukur suhu dan kelembaban dalam dan luar kandang. Alat untuk pengambilan sampel darah yaitu *sputit*, *vacutainer* berisi EDTA (*Ethylen Diamine Tetra Aceticacid*) sebagai antikoagulan dan *ice box* juga digunakan dalam penelitian ini.

Bahan yang digunakan yaitu desinfektan untuk sanitasi tempat pakan dan minum serta fumigasi kandang, onggok, *gathot*, urea, bahan pakan yang terdiri dari jagung kuning, bungkil kedelai, tepung ikan, bekatul, *limestone*, metionin, kalsium fosfat, lisin, premix, menir, NaCl dan antibiotik (neomycin). Komposisi, kandungan nutrisi dan persentase ransum disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Ransum, Persentase dan Kandungan Nutrien Ransum

Bahan Pakan	Perlakuan			
	T0	T1	T2	T3
	----- (%) -----			
Bekatul	6,75	6,75	1,25	1,25
Jagung Kuning	54,00	54,00	45,00	45,00
Tepung Ikan	9,00	9,00	10,60	10,60
Bungkil Kedelai	27,00	27,00	23,50	23,50
Metionin	0,23	0,23	0,25	0,25
Lisin	0,06	0,06	0,15	0,15
Limestone	1,01	1,01	0,80	0,80
Kalsium fosfat	0,20	0,20	0,20	0,20
Premix	0,50	0,50	0,50	0,50
NaCL	0,25	0,25	0,25	0,25
Menir	1,00	1,00	1,50	1,50
Onggok fermentasi	0,00	0,00	16,00	16,00
Antibiotik (neomycin)	0,00	0,0003	0,0003	0,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Energi Metabolis (kkal/kg)	2892	2892	2873	2873
Protein Kasar (%)	22,05	22,05	21,97	21,97
Serat Kasar (%)	3,52	3,52	5,67	5,67
Kalsium (%)	1,03	1,03	1,03	1,03
Fosfor (%)	0,56	0,56	0,54	0,54
Lisin (%)	1,43	1,43	1,43	1,43
Metionin (%)	0,66	0,66	0,66	0,66

(*) Komposisi ransum telah terpublikasi di jurnal *Livestock Research* (Sugiharto *et al.*, 2016).

(**) Energi metabolis dihitung berdasarkan rumus Balton (Siswohardjono, 1982).

$$EM: 40,81 \times (0,87 (PK + (2,25 \times LK) + BETN) + 2,5$$

3.2. Metode

Penelitian terbagi menjadi tiga tahapan yaitu tahap persiapan, pemeliharaan dan tahap pengambilan data. Tahap persiapan dimulai dari sanitasi dan fumigasi kandang, persiapan bahan pakan dan fermentasi onggok. Proses pembuatan onggok yang difermentasi dengan *A. charticola* dimulai dengan melakukan peremajaan *A. charticola* pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan diinkubasi

selama 2 hari dengan suhu 38°C. *A. charticola* kemudian diinokulasikan ke dalam onggok steril sebanyak 10 cawan petri dan ditambahkan aquades steril dengan perbandingan 1 ℓ aquades steril dalam 1 kg onggok. Onggok kemudian diinkubasi selama 4 hari selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah koloni dengan metode *Total Plate Count* (TPC) yang memperoleh hasil $3,6 \times 10^{10}$ cfu/g. Selanjutnya onggok difermentasi dengan starter kultur kering, caranya yaitu onggok disterilisasi kemudian dilakukan penanaman inokulan 110g/kg ditaburkan secara merata dan perlahan, lalu tambahkan urea dengan dosis 41 g/kg kemudian inkubasi selama 4 hari, 2 hari sekali dilakukan pencampuradukan. Jemur hingga kering udara untuk mencegah pembusukan.

Tahap pemeliharaan dimulai dari melakukan penimbangan bobot awal DOC kemudian melakukan *chick in* DOC sebanyak 160 ekor ke dalam 20 *flock* yang telah dilengkapi dengan tempat pakan dan minum, lampu sebagai pemanas dan *litter* berupa koran pada minggu pertama kemudian minggu selanjutnya menggunakan sekam. Satu *flock* berisi 8 ekor DOC. Pemberian ransum sesuai perlakuan diberikan sejak awal pemeliharaan. Air minum diberikan secara *ad-libitum*. Penimbangan sisa pakan dilakukan seminggu sekali. Suhu dan kelembaban kandang dan lingkungan dicatat pada setiap pukul 06.00, 12.00, 18.00 dan 00.00.

Tahap pengambilan data dilakukan pada akhir masa pemeliharaan pada hari ke- 30. Tiap *flock* diambil satu ekor ayam untuk pengambilan darah. Pengambilan darah dilakukan di bagian *vena brachialis* menggunakan *sprit*. Darah kemudian dimasukkan ke dalam *vacutainer* yang berisi EDTA sebagai antikoagulan. Sampel dimasukkan ke dalam *ice box* untuk dianalisis ke Laboratorium.

Metode analisis perhitungan total leukosit menggunakan metode bilik hitung. Langkah pertama menghisap darah menggunakan pipet leukosit hingga angka 0,5. Ujung pipet dibersihkan menggunakan *tissue* agar bersih dari darah yang menetes. Menghisap larutan Turk sampai angka 11. Pipet diputar membentuk angka 8 agar homogen darah dan larutan Turk. Sampel darah yang telah homogen kemudian dimasukkan ke kanan dan kiri bilik hitung dengan cara menempelkan ujung pipet ke cover glass agar udara tidak masuk. Sampel darah kemudian dihitung menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10× (Lestari dkk., 2013).

Pengukuran diferensial leukosit dengan menggunakan larutan Giemsa. Darah diambil menggunakan pipet kemudian diteteskan ke ujung gelas obyek. Mengambil satu gelas obyek lagi kemudian letakkan di atas gelas obyek yang telah diberi sampel darah lalu bentuk sudut 30-45°. Gelas obyek yang berada di atas ditarik hingga darah mengalir dengan daya kapiler hingga 2/3 bagian gelas obyek (Lestari dkk., 2013). Preparat darah dibiarkan kering di udara terbuka kemudian difiksasi dengan methanol 3-5 menit. Preparat darah dibiarkan kering di udara terbuka. Selanjutnya preparat direndam ke dalam larutan Giemsa selama 15-60 menit. Pengenceran larutan Giemsa dengan cara membuat perbandingan 1:1 yaitu 1 tetes larutan Giemsa dalam 1 ml aquades buffer. Preparat dicuci dengan air bersih dan biarkan mengering di udara terbuka. Preparat ulas darah dihitung di bawah mikroskop.

3.3. Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL)

dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan sesuai petunjuk Steel dan Torrie (1995). Setiap unit perlakuan terdiri dari 8 ekor ayam. Perlakuan penelitian terdiri dari:

- T0 = Ransum tanpa mengandung onggok fermentasi dan antibiotik
 T1 = Ransum mengandung antibiotik
 T2 = Ransum mengandung antibiotik dan onggok fermentasi
 T3 = Ransum mengandung onggok fermentasi

Data hasil penelitian selanjutnya diolah secara statistik dengan menggunakan analisis ragam pada taraf 5%, apabila terdapat pengaruh perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji wilayah Duncan (Steel dan Torrie, 1995).

Model statistik rancangan percobaan adalah sebagai berikut :

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

Keterangan:

- Y_{ij} : Profil leukosit dan diferensial leukosit ayam broiler ke-j yang mendapat penambahan onggok fermentasi dan/atau antibiotik dalam ransum ke-i
 μ : nilai tengah umum profil leukosit dan diferensial leukosit ayam broiler
 τ_i : pengaruh perlakuan penambahan onggok fermentasi dan/atau antibiotik dalam ransum ke-i
 ε_{ij} : Pengaruh galat percobaan pada profil leukosit dan diferensial leukosit ayam broiler ke- j yang memperoleh perlakuan penambahan onggok fermentasi dan/atau antibiotik dalam ransum ke- i

Kriteria untuk pengambilan simpulan adalah, apabila $F_{hitung} < F_{tabel}$ maka terima H_0 dan tolak H_1 dan apabila $F_{hitung} \geq F_{tabel}$ maka tolak H_0 dan terima H_1 . Hipotesis statistik sebagai berikut:

H_0 : $\tau = 0$, tidak ada pengaruh penambahan onggok fermentasi dan/atau antibiotik dalam ransum terhadap profil leukosit dan diferensial leukosit ayam broiler.

H_1 : $\tau \neq 0$, terdapat pengaruh penambahan onggok fermentasi dan/atau antibiotik dalam ransum terhadap profil leukosit dan diferensial leukosit ayam broiler.