BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2015 di kandang peternak di Desa Kedu Temanggung dan pada bulan April 2016 di kandang unggas Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis Parameter dilakukan di Laboratorium Pathologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.1. Materi Penelitian

Penelitian menggunakan 90 ekor ayam kedu umur 1 hari, dibagi menjadi dua kelompok masing-masing 45 ekor dengan rerata bobot badan 39,11±3,48 gram dipelihara di Temanggung dan 45 ekor dengan rerata bobot badan 30±4,33 gram dipelihara di kandang unggas Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang. Ransum yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ransum komersial (BR 1 Starter). Peralatan penelitian meliputi timbangan untuk menimbang ternak dan pakan, termohigrometer untuk mengukur suhu dan kelembaban, tabung vakum *venoject* yang sudah dilengkapi dengan EDTA *(ethylene diamine tetra acid)* digunakan untuk menampung darah, *coolbox* untuk menempatkan tabung vakum *venoject* yang berisi sampel darah.

3.2. Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan ditempat yang berbeda yaitu Peternakan ayam kedu di desa Kedu Temanggung dengan ketinggian 800 m dpl (BMKG, 2013) dengan

suhu 22-27 ^{o}C, kelembaban 60-72% dan di kandang unggas Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Kelurahan Tembalang Semarang dengan ketinggian 270 m dpl (BMKG, 2013) dengan suhu 26-32 ^{o}C, kelembaban 46-66%. Pengamatan suhu dan kelembaban selama penelitian pada ke-2 lokasi penelitian disajikan pada Lampiran 4 dan 6.

3.3. Metode Penelitian

Persiapan penelitian dimulai dari persiapan kandang sebelum ayam datang yaitu menyiapkan kandang dan melakukan sanitasi kandang dan perkandangan dengan cara mencuci kandang dengan air kapur, melakukan fumigasi, memasang instalasi listrik, pembuatan *brooder* dan pemasangan koran bekas untuk alas. Pemberian air gula saat DOC datang. Mempersiapkan tempat pakan dan minum. Pemeliharaan ternak selama 13 hari pada masing-masing lokasi penelitian.

Kandang yang digunakan pada penelitian adalah sistem terbuka dengan tirai plastik sebagai penutup kandang. Pembukaan Tirai kandang pada waktu pagi dan ditutup pada sore hari. Pengukuran suhu dan kelembaban didalam kandang pada waktu pagi, siang dan malam hari. Penempatan ayam di dalam kandang yang terbuat dari bambu dengan *brooder* dari bola lampu listrik 5 watt dan dinyalakan selama 24 jam serta dilengkapi tempat makan dan minum.

Pemberian pakan dilakukan dua kali dalam sehari yaitu pada pukul 07.00 WIB dan 13.00 WIB. Ransum yang digunakan dalam penelitian sesuai dengan ransum yang diberikan para peternak yaitu ransum BR 1. Pemberian air minum dilakukan secara *ad libitum* yang ditambahkan vitachick® dan vita stress©.

Periode pengambilan data dilakukan saat ayam berumur 1, 4, 7, 10 dan 13 hari. Setiap periode diambil sampel ayam sebanyak 9 ekor secara acak. Pengambilan sampel darah dilaksanakan dengan menyembelih ayam pada bagian leher. Sampel darah ditampung pada tabung vacum *venojek* yang sudah dilengkapi anti koagulan *ethylene diamine tetra acid* (EDTA). Darah dianalisiskan kadar eritrosit, haemoglobin, hematokrit dan total protein darah menggunakan metode spektrofotometer di Laboratorium Kesehatan Hewan Fakultas Ilmu Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.4. Pengukuran Parameter

3.4.1. Jumlah sel darah merah

Jumlah sel darah merah dapat diketahui dengan menggunakan *haemocytometer* (Sonjaya, 2015). Pengambilan darah dari tabung menggunakan pipet eritrosit (pipet sel darah merah) dengan bantuan alat pengisap (aspirator) sampai batas angka 0,5. Ujung pipet dibersihkan dengan tisu. Larutan pengencer Hayem diisap sampai tanda 101 yang tertera pada pipet eritrosit, kemudian pipa aspirator dilepaskan. Kedua ujung pipet ditutup dengan ibu jari dan jari telunjuk tangan kanan, kemudian isi pipet dikocok dengan membentuk gerakan angka 8, dan cairan yang tidak ikut terkocok dibuang. Setetes cairan dimasukkan kedalam kamar hitung dan biarkan butir-butir dalam kamar hitung mengendap. Butir darah merah dihitung dengan mikroskop pada pembesaran 40 kali (a). Perhitungan dilakukan pada 5 buah kotak, eritrosit yang 26 terletak dan menyinggung garis batas sebelah kiri dan atas dihitung, sedangkan pada garis batas kanan dan bawah tidak dihitung.

3.4.2. Kadar hemoglobin

Kadar hemoglobin dihitung dengan menggunakan metode Sahli. Tabung Sahli diisi dengan larutan HCl 0,1 N sampai angka 10. Darah diisap sampai batas 20 cmm (0,02 ml) dengan pipet Sahli dan aspirator. Darah dimasukkan ke dalam tabung Sahli dan diletakkan diantara kedua bagian standar warna dalam alat hemoglobinometer, kemudian dibiarkan selama 5-10 menit sampai terbentuk asam hematin berwarna coklat. Ditambahkan setetes demi setetes aquadestilata dengan pipet sambil diaduk, sampai warna larutan darah sama dengan warna standar. Perhitungan kadar hemoglobin dilakukan dengan membaca tinggi permukaan cairan pada tabung Sahli, dengan melihat skala g % yang berarti banyaknya hemoglobin dalam gram per 100 ml darah (Sonjaya, 2015).

3.4.3. Nilai hematokrit

Nilai hematokrit ditentukan dengan metode mikrohematokrit (Sonjaya, 2015). Darah dari tabung ditempelkan dengan ujung mikrokapiler yang bertanda (merah atau biru). Darah dibiarkan mengalir sampai 4/5 bagian pipa kapiler terisi kemudian ujung pipa kapiler disumbat dengan *wax* (penyumbat). Pipa kapiler tersebut ditempatkan di *microcentrifuge* kemudian disetel dengan kecepatan 2500-4000 rpm selama ±15 menit, kemudian terbentuk lapisan plasma, lapisan putih abu, dan lapisan merah. Nilai hematokrit ditentukan dengan mengukur % volume eritrosit (lapisan merah) dari darah dengan menggunakan alat baca mikrohematokrit (*microcapillary hematokrit reader*).

3.4.4. Pengukuran total protein plasma

Analisis kadar protein plasma total, dilakukan menggunakan prinsip uji biuret. Pembuatan pereaksi biuret dan larutan standar protein. Pereaksi biuret dipipetkan kedalam 62 tabung yang terdiri dari satu tabung blanko, satu tabung standar dan 60 tabung reaksi, masing-masing sebanyak 8 mL, kemudian tabung blanko ditambahkan aquades 50µL, tabung standar ditambahkan 100µL larutan standar protein dan tabung sampel ditambahkan 100µL plasma. Semua tabung dihomogenkan kemudian diamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Larutansampel uji, standar, dan blanko dibaca serapannya pada panjang gelombang 540 nm.

3.5. Analisis Data

Analisis yang digunakan adalah uji-t untuk menguji kesamaan rata-rata 2 populasi (Petrie dan Wotson, 1999). Setiap unit pengamatan (umur) terdiri atas 9 ekor ayam kedu dengan jumlah sampel keseluruhan 90 ekor masing-masing 45 ayam pada dataran rendah dan 45 ayam pada dataran tinggi. Data yang diperoleh kemudian dianalisis untuk membandingkan dua kondisi yang berbeda yaitu dataran tinggi dan dataran rendah pada masing-masing umur pengukuran dengan uji-t yaitu sebagai berikut:

1. Perbandingan pada masing-masing umur pengukuran dengan n = 9, maka rumus uji-t yang digunakan untuk data kurang dari 30 (n<30) adalah sebagai berikut :

$$t_{hitung} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sp\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Keterangan :

$\bar{x}_1$ dan $\bar{x}_2$ = rata-rata hitung data dataran tinggi dan rendah

n_1 dan n_2 = jumlah data

Sp = simpangan baku gabungan

2. Perbandingan secara keseluruhan dengan n=45, maka rumus uji-t yang digunakan untuk data lebih dari 30 (n>30) adalah sebagai berikut :

$$t_{hitung} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sp\sqrt{n}}$$

Keterangan :

$\bar{x}_1$ dan $\bar{x}_2$ = rata-rata hitung kelompok I dan II

n = jumlah data

Hipotesis:

H_0 : $\mu_1=\mu_2$; tidak ada perbedaan status hematologis pada daerah dataran tinggi dan dataran rendah pada masing-masing umur

H_1 : $\mu_1\neq\mu_2$; terdapat perbedaan status hematolgis pada daerah dataran tinggi dan dataran rendah pada masing-masing umur

Kriteria Pengujian :

Jika $t_{tabel} < t_{hitung} < t_{tabel}$ maka H_0 diterima dan H_1 ditolak pada taraf 5 %.

Jika t_{hitung} diluar kisaran t_{tabel} maka H_0 ditolak dan H_1 diterima pada taraf 5 %.