

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dengan judul Profil Darah Merah Ayam kampung Umur 30 Hari Akibat Penambahan Probiotik *Rhizopus oryzae* dalam Ransum, dilaksanakan pada bulan Juli - September 2015. Persiapan kandang dilaksanakan pada bulan Juli - Agustus 2015. Pemeliharaan ayam dilaksanakan 16 Agustus sampai 16 September 2015 di kandang unggas Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis profil darah merah dilaksanakan tanggal 16 September di Rumah Sakit Hewan Prof. Soeparwi, Universitas Gadjah Mada.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan pada penelitian ini adalah adalah 100 ekor *Day Old Chick* (DOC) ayam kampung (*unsex*) dengan bobot badan awal rata-rata $39,65 \pm 1,46$ gram. Kandang yang digunakan berupa jenis kandang battery sebanyak 20 petak (unit) dengan ukuran 60×35×35 cm, masing-masing petak berisi 5 ekor ayam. Perlengkapan dan peralatan kandang berupa tempat pakan, tempat minum dan lampu pemanas pada tiap petak. Termohigrometer dalam kandang untuk mengukur suhu dan kelembaban. Selain itu juga terdapat timbangan digital yang digunakan untuk menimbang pakan, kebutuhan probiotik dan bobot ayam setiap minggu. Peralatan yang digunakan untuk pembiakan probiotik *Rhizopus oryzae* antara lain tabung reaksi yang digunakan untuk tempat

mengambil sampel probiotik berupa digesta pada saluran pencernaan untuk dimurnikan. *Autoclaf* digunakan untuk sterilisasi peralatan dan media. *Stearer* digunakan untuk homogenisasi media cair, cawan petri sebagai tempat menumbuhkan *Rhizopus oryzae*, erlemeyer untuk tempat medium. Bahan-bahan yang digunakan yaitu agar - agar powder, ekstrak kentang dan *dextrose* yang digunakan untuk pembuatan media *Potato Dextrise Agar* (PDA). Pelatan yang digunakan untuk pengambilan darah yaitu *sprit* (jarum suntik) untuk pengambilan darah, *vacumtainer* yang berisi antikuagulan *Ethylen Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA) sebagai wadah darah dan *cool box* sebagai tempat penyimpanan sementara darah sebelum dianalisis.

Formulasi bahan ransum yang diberikan terdiri dari Jagung Giling, Bekatul, Bungkil Kedelai, Tepung Ikan, Tepung Kerang dengan komposisi dan kandungan nutrient seperti disajikan pada Tabel 1. Probiotik fungi *Rhizopus oryzae* ditambahkan ke dalam 1000 gram pakan, pemberian probiotik dicampur ke dalam pakan dan diberikan sekali selama satu minggu. Perlakuan dalam penelitian ini ada 4 yaitu:

T0 = Ransum kontrol tanpa penambahan Probiotik *Rhizopus oryzae*

T1 = Ransum dengan penambahan 0,2 % Probiotik *Rhizopus oryzae*

T2 = Ransum dengan penambahan 0,4 % Probiotik *Rhizopus oryzae*

T3 = Ransum dengan penambahan 0,6 % Probiotik *Rhizopus oryzae*

Tabel 1. Komposisi Bahan Pakan dan Kandungan Nutrisi Ransum

Bahan Pakan	Jumlah
	----- (%) -----
Jagung Giling	55,00
Bekatul	15,00
Bungkil Kedelai	27,00
Tepung Ikan	2,50
Tepung Kerang	0,50
Jumlah	100,00
Kandungan Nutrisi Ransum Sesuai Perhitungan *	
Energi Metabolis (kkal/kg)	2913
Protein Kasar (%)	20,54
Serat Kasar (%)	3,19
Lemak Kasar (%)	4,11
Abu (%)	4,09
BETN (%)	68,08
Calsium (%)	0,53
Phospor (%)	0,35
Kandungan Nutrisi Ransum Sesuai Analisis Proksimat **	
Energi Metabolis (kkal/kg) ^a	3284
Protein Kasar (%)	19,04
Serat Kasar (%)	6,26
Lemak Kasar (%)	2,60
Abu (%)	10,12
BETN (%)	61,97

Keterangan :

* : Hartadi *et al.* (1993).

** : Hasil Analisis Proksimat di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang, 2015.

^a : Dihitung dengan Rumus Bolton (Siswohardjono, 1982)
 $EM = 40,81(0,87(PK+2,25 LK + BETN) + k)$; $k = 4,9$

3.2. Metode Penelitian

Penelitian dibagi menjadi 3 tahap yaitu persiapan, pelaksanaan dan pengambilan data. Tahap persiapan meliputi persiapan pakan dan kandang.

Persiapan pakan dimulai dari pembiakan *Rhizopus oryzae* pada media *Potato Dextrise Agar* (PDA) dengan penambahan *cloramfenicol* kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya 6 biakan yang telah diinkubasi yang berisi *Rhizopus oryzae* dicampurkan secara merata ke dalam 0,5 kg dedak padi dan 6 biakan lainnya ke dalam 0,5 kg jagung giling masing-masing ditambahkan aquades secukupnya, kemudian campuran ditutup rapat dan diperam selama 1 minggu hingga fungi tumbuh merata pada dedak padi dan jagung giling jumlah koloni 1×10^{10} cfu/gram. Persiapan kandang meliputi Sanitasi dan fumigasi menggunakan *formaldehyde* yaitu merupakan campuran antara formalin dan kalium permanganat (KMnO₄). Kandang ukuran 60×35×35 cm, persiapan perlengkapan kandang (sapu, tempat pakan dan minum).

Tahap pelaksanaan dimulai dari *chick in*, dilakukan penimbangan bobot badan kemudian ayam yang baru datang diberikan larutan gula jawa. Pakan perlakuan diberikan sejak ayam berumur 1 hingga 30 hari. Pakan dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Penimbangan sisa pakan dilakukan setiap hari untuk menghitung jumlah konsumsi serta penimbangan bobot badan dilakukan setiap 7 hari sekali. Pengukuran suhu dan kelembaban ruang kandang dilakukan 4 kali sehari.

Tahap pengambilan data dilaksanakan pada yaitu umur 30 hari. Sampel ayam sebanyak 20 ekor yang diambil masing-masing 1 ekor di tiap ulangannya. Dilakukan pengambilan darah melalui *vena brachialis* bagian sayap dengan menggunakan *sprit* (jarum suntik). Darah yang diambil sebanyak ± 2 cc dimasukkan ke dalam *vacuum tube* yang berisi antikuagulan EDTA (*Ethylene*

Diamine Tetra Acetic Acid) dikocok membentuk angka 8 secara perlahan-lahan sampai tercampur agar tidak menggumpal (lisis). Sampel tersebut disimpan sementara dalam *cool box* yang berisi es batu agar darah tidak menggumpal. Sampel dibawa ke laboratorium rumah sakit hewan, Universitas Gadjah Mada untuk dianalisis profil darah.

Analisis total eritrosit menggunakan metode bilik hitung (*Improved Neubauer*), darah yang sudah dikoleksi dalam tabung venojeck dengan cepat dihisap dengan menggunakan pipet eritrosit yang telah dipasang aspirator sampai dengan skala 1. Kemudian, dengan menggunakan pipet yang sama larutan hayem dihisap sampai dengan skala 101, kemudian homogenkan selama 2 menit agar larutan menjadi homogen. Cara kerja larutan hayem adalah merusak sel-sel lain yang ada di dalam sel darah selain sel darah merah. Tetesan pertama dibuang dengan diserap menggunakan kertas tissue dan tetes berikutnya digunakan. Ujung pipet eritrosit ditempelkan pada tepi gelas penutup bilik hitung, sehingga larutan akan mengalir dengan sendirinya. Perhitungan dilakukan pada 80 kotak dan dicatat jumlah eritrosit (Patria *et al.*, 2013).

$$\text{Rumus perhitungan jumlah eritrosit} = E \times 50 \times 1000 = 5000 E/\text{mm}^3$$

Metode yang digunakan untuk mengukur kadar hemoglobin adalah metode Sahli. Larutan HCl 0,01 N diteteskan pada tabung Sahli sampai tanda tera 0,1 atau garis bawah, kemudian sampel darah dihisap menggunakan pipet hingga mencapai tanda tera atas. Sampel darah segera dimasukkan ke dalam tabung dan diusahakan agar semua darah dalam pipet masuk ke dalam tabung, ditunggu beberapa saat hingga terjadi reaksi asam hematin warna berubah coklat kehitaman

akibat reaksi antara HCl dengan hemoglobin. Darah diencerkan dengan aquades setetes demi setetes sambil diaduk dan disesuaikan dengan warna larutan yang terdapat pada blok komparator (warna standar), setelah warna sama dengan larutan standar, maka pengenceran dihentikan. Tinggi larutan dalam tabung hemoglobin dibaca dan dicatat, nilai hemoglobin dikolom “gram%” yang tertera pada tabung haemoglobin, yang berarti banyaknya haemoglobin dalam gram 100 ml darah (Patria *et al.*, 2013).

Metode penentuan hematokrit menggunakan metode mikro sentrifugasi.. Melakukan pengisian darah yang sudah tercampur antikoagulan ke dalam pipa mikrokapiler dilakukan dengan memiringkan tabung yang berisi sampel darah dengan menempatkan ujung mikrokapiler yang bertanda merah. Pipa diisikan darah mencapai sekitar 6/7 bagian pipet, tutup ujung masuknya darah dengan penutup khusus atau dengan menggunakan malam (seal). Kemudian diletakkan dialat sentrifugasi lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Kemudian nilai hematokrit yang diperoleh dibaca pada alat baca khusus (*microhematocrit reader*) (Dharmawan, 2002).

3.3. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan, setiap ulangan terdiri dari 5 ekor ayam kampung. Parameter yang diamati meliputi total eritrosit, hemoglobin dan hematokrit. Data diuji dengan analisis ragam dan bila hasil menunjukkan

pengaruh nyata maka untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji jarak ganda Duncan. (Mas, 2009)

Model linear aditif yang digunakan adalah :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} ; i=(1,2,3,4) ; j = (1,2,3,4,5)$$

Keterangan :

Y_{ij} : Profil darah merah ayam kampung pada petak percobaan ke-j yang memperoleh perlakuan penambahan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum ke-i

μ : nilai tengah umum Profil darah merah ayam kampung

τ_i : Pengaruh perlakuan penambahan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum ke-i

ε_{ij} : pengaruh galat percobaan pada petak percobaan ke-j yang memperoleh perlakuan pengaruh penggunaan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum ke-i.

i : Perlakuan ke-i ($i : 1,2,3,4$)

j : Ulangan ke-j ($j : 1,2,3,4,5$)

Hipotesis statistik dari pengaruh penggunaan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum terhadap Profil darah merah ayam kampung umur 30 hari adalah :

$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = 0$ (berarti tidak ada pengaruh penggunaan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum terhadap profil darah merah ayam kampung umur 30 hari).

H_1 : Paling sedikit ada satu $\tau_i \neq 0$ (berarti minimal ada satu pengaruh penggunaan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum terhadap profil darah merah ayam kampung umur 30 hari).

Kriteria pengambilan keputusan hipotesis adalah :

Bila $F_{hitung} < F_{tabel}$ dengan $\alpha = 0,05$ maka H_0 diterima H_1 ditolak

Bila $F_{hitung} \geq F_{tabel}$ dengan $\alpha = 0,05$ maka H_0 ditolak H_1 diterima.