

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dengan judul “ Total Fungi, Bakteri, dan *Enterobacteriaceae* dalam Usus Halus dan Seka Ayam Broiler akibat Pemberian Pakan Onggok yang Difermentasi dengan *Acremonium charticola* ” dilaksanakan pada bulan Juni-Juli 2016. Pemeliharaan ayam dilakukan di Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis kandungan bahan pakan dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Nutrisi Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis total fungi, bakteri dan *enterobacteriaceae* dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Biokimia, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah *day old chick* (DOC) ayam broiler jantan *strain Lohmann* sebanyak 160 ekor dengan bobot awal rata-rata $41,30 \pm 2,68$ g (CV= 6,49%). Ransum disusun dari jagung kuning, bungkil kedelai, tepung ikan, bekatul, DL-Methionine 990 g, L-lysine 780 g, Dicalcium phosphate, limestone, premix, antibiotik neomycin dengan dosis pemakaian 300 mg/kg, onggok yang difermentasi dengan kapang *A. charticola*, menir (pecahan beras) dan NaCl dengan komposisi dan kandungan nutrisi ransum disajikan pada Tabel 1. Ayam dikandangkan pada kandang koloni yang berukuran $1 \times 1 \times 1,5$ m dengan jumlah 20 petak dan masing-masing petak berisi 8 ekor ayam broiler.

Tabel 1. Komposisi dan Kandungan Nutrisi Ransum

Bahan Pakan	Perlakuan			
	T0	T1	T2	T3
	----- % -----			
Bekatul	6,75	6,75	1,25	1,25
Jagung Kuning	54	54	45	45
Tepung Ikan	9	9	10,6	10,6
Bungkil Kedelai	27	27	23,5	23,5
DL – Methionine 990 g	0,23	0,23	0,25	0,25
L – Lysine 780 g	0,06	0,06	0,15	0,15
Limestone	1,01	1,01	0,8	0,8
Dicalcium Phospate	0,2	0,2	0,2	0,2
Premix	0,5	0,5	0,5	0,5
NaCL	0,25	0,25	0,25	0,25
Antibiotik	0	0,0003	0,0003	0
Menir (pecahan beras)	1	1	1,5	1,5
Onggok	0	0	16	16
Total	100	100	100	100
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
Calsium (%)	1,03	1,03	1,03	1,03
Pospor (%)	0,56	0,56	0,54	0,54
Lysine (%)	1,43	1,43	1,43	1,43
Metionin (%)	0,66	0,66	0,66	0,66

Perlengkapan dan peralatan kandang yang digunakan meliputi sekam dan koran sebagai *litter*, tempat pakan untuk wadah pakan, tempat minum untuk wadah air minum, bohlam 25 watt untuk pemanas dan penerangan, termohigrometer untuk mengukur suhu dan kelembaban lingkungan, pH meter untuk mengukur pH digesta, timbangan untuk menimbang ransum dan sisa pakan, autoklaf untuk sterilisasi basah, oven untuk sterilisasi kering, plastik klip untuk menyimpan sampel sementara, tabung reaksi untuk pengenceran sampel, *fortex* dan pipet untuk memindahkan sampel, cawan petri untuk kultur fungi, bakteri,

dan *enterobacteriaceae* pada usus dan seka ayam broiler, inkubator untuk menginkubasi biakan, *colony counter* untuk menghitung jumlah koloni, *Erlenmeyer* untuk tempat sterilisasi media, pembuatan *potato dextrose agar* (PDA) terdiri dari kentang, agar dan *dextrose*, antibiotik *chloramphenicol* digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri (pembinaan fungi) dan agar *MacConkey* sebagai medium selektif untuk pembinaan *enterobacteriaceae*.

3.2. Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Setiap unit ulangan penelitian terdiri dari 8 ekor ayam. Perlakuan penelitian terdiri dari :

T0 = Ransum tanpa penambahan onggok fermentasi dengan *A. charticola* dan antibiotik (kontrol)

T1 = Ransum + antibiotik (300 mg/kg)

T2 = Ransum yang mengandung onggok fermentasi dengan *A. charticola* (16%) + antibiotik (300 mg/kg)

T3 = Ransum yang mengandung onggok fermentasi *A. charticola* (16%)

Parameter yang diukur meliputi total fungi, total bakteri, dan total *enterobacteriaceae* dalam usus halus dan seka ayam broiler. Data yang diperoleh diolah secara statistik berdasarkan analisis ragam.

3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi 3 tahap yaitu persiapan, pemeliharaan dan pengambilan data. Tahap persiapan dilakukan penyediaan bahan pakan sebagai ransum, pembuatan medium *potato dextrose agar* (PDA) dan peremajaan *A. charticola*. Pembuatan PDA untuk pembiakan bakteri terdiri dari filtrat kentang 500 g, *dextrose* 10 g dan agar 10 g, sedangkan pembiakan fungi medium PDA ditambahkan dengan *chloramphenicol* kemudian dilakukan sterilisasi basah.

Pembuatan kultur *starter* dimulai dengan proses peremajaan *A. charticola* pada media PDA kemudian diinkubasi pada suhu 38°C selama 2 hari secara aerob. Setelah inkubasi, *A. charticola* yang diperoleh selanjutnya diinokulasikan pada ongkok steril sebanyak 5 cawan petri dan ditambah aquades steril dengan perbandingan 1 liter aquades dalam 1 kg ongkok. Selanjutnya ongkok diinkubasi selama 4 hari sampai kapang tumbuh secara merata pada ongkok kemudian dilakukan perhitungan jumlah koloni berdasarkan metode *Total Plate Count* (TPC) dan diperoleh hasil $3,6 \times 10^{10}$ cfu/g.

Proses pembuatan ongkok yang di fermentasi dengan *A. charticola* dilakukan dengan cara melakukan sterilisasi ongkok, melakukan penanaman inokulan dengan menaburkan kultur *starter* dengan secara perlahan dan merata pada ongkok, menambahkan urea sebagai sumber N yang telah dilarutkan pada air steril dengan dosis 41 g/kg substrat (ongkok). Inkubasi dilakukan selama 4 hari dan setiap 2 hari ongkok diaduk agar inokulum tumbuh merata. Proses selanjutnya adalah menjemur ongkok di bawah sinar matahari sehingga proses fermentasi terhenti.

Tahap pemeliharaan dimulai dengan penimbangan bobot awal *day old chick* (DOC). Setelah penimbangan, DOC dimasukkan ke dalam petak dan tiap petak berisi 8 ekor DOC yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum, lampu bohlam 25 watt sebagai sumber pemanas, koran sebagai *litter* pada minggu pertama kemudian minggu selanjutnya diganti dengan sekam. Pemberian ransum sesuai perlakuan dilakukan sejak awal pemeliharaan. Pakan diberikan pada pagi dan sore hari sedangkan air minum diberikan secara *ad libitum*. Sisa pakan ditampung setiap harinya dan ditimbang seminggu sekali. Pengukuran suhu dan kelembaban kandang dan lingkungan dilakukan pada pukul 06.00 WIB, 12.00 WIB, 18.00 WIB dan 24.00 WIB.

Tahap pengambilan data dilaksanakan pada hari ke-28 pemeliharaan. Pengambilan data dilakukan dengan mengambil sampel ayam sebanyak 20 ekor. Ayam disembelih dan dibelah bagian *abdomen* agar mudah mengambil saluran pencernaannya. Bagian usus halus dan seka diambil untuk dikeluarkan digestanya, digesta dimasukkan ke dalam kantong plastik klip dan dimasukkan ke dalam *freezer*. Sampel dibawa ke laboratorium untuk dianalisis total fungi, bakteri, dan *enterobacteriaceae*. Analisis dimulai dari pembuatan PDA untuk pembiakan bakteri, untuk media total fungi menggunakan PDA ditambahkan antibiotik *chloramphenicol* sedangkan untuk biakan *enterobacteriaceae* menggunakan agar spesifik *MacConkay*. Media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 15 ml kemudian ditutup dan diletakkan di atas meja, media digoyangkan membentuk angka delapan agar homogen kemudian tunggu hingga memadat. Pengenceran sampel dimulai dari konsentrasi 10^{-1} hingga 10^{-10} . Sampel untuk pembiakan fungi

diambil pada tingkat pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} , pembiakan bakteri diambil dari tingkat pengenceran 10^{-9} dan 10^{-10} , dan pembiakan *enterobacteriaceae* diambil pada tingkat pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} , masing-masing pada tiap pengenceran diambil 1 ml dengan menggunakan pipet dan dituang pada cawan petri yang telah berisi media. Selanjutnya biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2×24 jam untuk biakan fungi, sedangkan pada biakan bakteri dan *enterobacteriaceae* diinkubasi selama 24 jam.

Total fungi, bakteri, dan *enterobacteriaceae* dihitung menggunakan metode hitungan cawan atau *total plate count (TPC)*. Pelaporan hasil perhitungan menggunakan metode *standart plate count (SPC)*. Perhitungan total bakteri, total fungi, dan total *enterobacteriaceae* dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Fardiaz, 1993):

$$\text{Total Fungi} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

$$\text{Total Bakteri} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

$$\text{Total } \textit{Enterobacteriaceae} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

3.4. Analisis Data

Data hasil penelitian diolah secara statistik menggunakan analisis ragam berdasarkan rancangan acak lengkap ($P < 0,05$). Apabila hasil F hitung menunjukkan pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji wilayah ganda Duncan pada taraf 5% (Steel dan Torrie, 1995).

Model linier rancangan percobaan adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

Y_{ij} : Jumlah total fungi, bakteri, dan *enterobacteriaceae* dalam usus halus dan seka ayam broiler ke-j yang memperoleh perlakuan penambahan ongkok yang difermentasi *Acremonium charticola* dalam ransum ke-i

I : perlakuan ke 1,2,3,4

j : ulangan ke 1,2,3,4,5

μ : nilai tengah umum total fungi, bakteri, dan *enterobacteriaceae* dalam usus halus dan seka ayam broiler.

τ_i : pengaruh perlakuan penambahan ongkok yang difermentasi *A. charticola* dalam ransum ayam broiler ke-i.

ε_{ij} : pengaruh galat percobaan pada total fungi, bakteri, dan *enterobacteriaceae* dalam saluran pencernaan ayam broiler ke-j yang memperoleh perlakuan penambahan ongkok yang difermentasi *A. charticola* dalam ransum ke-i.

Hipotesis statistik:

H_0 : $\tau_0 = \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = 0$ (Penambahan ongkok yang difermentasi dengan *A. charticola* dalam ransum tidak berpengaruh terhadap total fungi, bakteri, dan *enterobacteriaceae* pada usus halus dan seka ayam broiler).

H_1 : minimal ada satu $\tau_0 \neq \tau_1 \neq \tau_2 \neq \tau_3 = 0$ (Minimal ada satu perlakuan yang berpengaruh terhadap total fungi, bakteri, dan *enterobacteriaceae* pada usus halus dan seka ayam broiler).

Kriteria pengambilan keputusan hipotesis di atas adalah :

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

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