

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dengan judul Penambahan additif pakan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum terhadap total *Escherichia coli* dan *Coliform* pada usus halus ayam kampung dilaksanakan pada tanggal 11 Agustus – 11 Oktober 2014 di Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Analisis total *Escherichia coli* dan *Coliform* dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Analis Kesehatan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhamadiyah Semarang. Analisis kandungan bahan pakan dilaksanakan di Laboratorium *Feedtech* PT. Charoen Pokphand, Tbk, Makasar.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *day old chick* (DOC) ayam kampung dari PT. Tirto Hartono, Sleman, Yogyakarta sebanyak 100 ekor (*unsexed*) dengan bobot badan $37,90 \pm 1,36$ g (CV = 3,59%). Ransum terdiri dari jagung giling, bekatul, tepung ikan, tepung cangkang kerang dengan komposisi dan kandungan nutrien seperti disajikan pada Tabel 1. Dosis penambahan probiotik *R. Oryzae* adalah 0%, 0,1% dan 0,2%. Kandang yang digunakan kandang baterai, tempat pakan, tempat minum, plastik untuk menampung feses, pH meter untuk mengukur pH usus, timbangan digital untuk menimbang probiotik dan ransum, cawan petri untuk pengembangbiakan bakteri dan fungi, oven untuk menginkubasi biakan, autoklaf untuk sterilisasi. *erlenmeyer* untuk tempat media,

potato dextrose agar (PDA), pipet untuk memindahkan sampel, tabung reaksi untuk pengenceran sampel dan *near infra red system* (NIRS) untuk menganalisis kandungan nutrisi yang terkandung dalam bahan pakan serta kandungan nutrisi ransum.

Tabel 1. Komposisi dan Kandungan Nutrien Ransum

Bahan Pakan	Persentase
	----- % -----
Jagung giling	35
Bekatul	46
Tepung ikan	18
Tepung cangkang kerang	1
Jumlah	100
Kadar air (%)	10,01
Protein (%)	15,76
Lemak (%)	14,91
Serat Kasar (%)	5,27
Abu (%)	13,08
Kalsium (%)	2,00
Phosphor (%)	1,32
EM (kkal/kg)	3215,32

Sumber: Dianalisis di Laboratorium *Feedtech* PT. Charoen Pokphand, Tbk, Makasar, 2014.

3.2. Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 perlakuan dan 5 ulangan. Setiap unit ulangan penelitian terdiri dari 6-7 ekor ayam. Perlakuan penelitian terdiri dari :

T0 = Ransum tanpa penambahan probiotik *Rhizopus oryzae* (kontrol)

T1 = Ransum + 0,1% penambahan probiotik *Rhizopus oryzae*

T2 = Ransum + 0,2% penambahan probiotik *Rhizopus oryzae*

3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian dibagi menjadi 3 tahap yaitu persiapan, pelaksanaan dan pengambilan data. Persiapan dilakukan mulai dari pembiakan *R. oryzae* (dari usus) pada media PDA dengan penambahan *cloramfenicol* (antibiotik yang digunakan pada campuran media pembiakan fungi agar bakteri tidak dapat tumbuh) kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Berikutnya pembuatan sediaan kultur kering probiotik dengan cara biakan *R. Oryzae* dalam cawan petri yang sudah diinkubasi selama 3 hari, diambil 5 cawan, kemudian dicampurkan secara merata ke dalam 1 kg dedak dan 5 cawan lainnya ke dalam 1 kg jagung giling. Masing-masing campuran ditambahkan aquades 500 ml, kemudian ditutup rapat dan diperam selama 1 minggu, setiap 2 hari sekali campuran diaduk agar pembiakan jamur dapat merata di seluruh media dedak dan jagung. Dedak dan jagung dikeringkan setelah selesai pemeraman. Persiapan lainnya meliputi pengadaan bahan pakan yang didapat dari Bamboo Poultry, persiapan kandang meliputi sanitasi dengan detergen, pemberian desinfektan, pengapuran, kemudian penyemprotan akhir menggunakan desinfektan, penyiapan *brooder*, penyekatan kandang sesuai jumlah perlakuan, persiapan perlengkapan pemeliharaan seperti dipasang lampu *bohlam* sebagai pengganti *brooder* atau pemanas dan pembelian DOC ayam kampung.

Tahap pelaksanaan dimulai dari *chick in*, kemudian ayam yang baru datang diberikan larutan gula jawa. Setiap petak kandang terdiri dari 3 kandang baterai diisi 6-7 ekor ayam dan dilengkapi dengan 1 buah tempat makan dan

minum. Ransum perlakuan diberikan sejak awal, dosis probiotik yaitu 0% (kontrol), 0,1% dan 0,2%. Setiap 1 gram kultur probiotik kering yang ditambahkan dalam ransum terkandung koloni fungi *R. oryzae* sebanyak $5,2 \times 10^2$ cfu/g. Ransum diberikan pada ayam setiap hari dan setiap hari Senin pukul 06.00 WIB dilakukan penimbangan pakan untuk 1 minggu kedepan. Pakan diberikan secara bertahap, sedangkan air minum diberikan secara *ad libitum*. Sisa ransum ditimbang seminggu kemudian pada hari Senin pukul 06.00 WIB. Tiap petak kandang diberi penerangan bohlam 25 watt.

Tahap pengambilan data dilaksanakan saat ayam kampung berumur 2 bulan dengan mengambil 15 ekor sebagai sampel, masing-masing 1 ekor tiap perlakuan dan ulangan. Sampel ayam disembelih kemudian dibelah bagian *abdomen* dan diambil saluran pencernaannya. Bagian usus halus dipisahkan untuk diambil sampel digestanya yang kemudian digesta dikeluarkan dan ditampung, kemudian dilakukan pengukuran pH menggunakan pH meter.

Digesta yang sudah diukur pHnya dimasukkan ke dalam botol vial kemudian ditutup rapat dan dimasukkan ke *ice bag* yang berisi es batu agar sampel bakteri tidak mati. Sampel dibawa ke laboratorium Mikrobiologi Analis Kesehatan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhamadiyah Semarang untuk pengujian. Pertama ambil sampel 0,5 gr, tahap selanjutnya di masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisikan NaCl fisiologis (0,9%), lalu di encerkan sampai pengenceran 10^{-8} , setelah itu di tanam pada cawan petri yang diberi CCA (*cromucult agar*), kemudian diinkubasi di inkubator yang bersuhu 37°C . Koloni *Coliform* (berwarna merah muda) dan *Escherichia coli* (berwarna

biru, hitam, keunguan) dihitung menggunakan metode hitungan cawan atau *total place count* (TPC).

Perhitungan total bakteri dan total fungi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Fardiaz, 1993) :

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

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

3.4. Analisis Data

Data hasil penelitian diolah secara statistik menggunakan analisis ragam rancangan acak lengkap. Apabila hasil F hitung $\geq F$ tabel pada taraf 5% menunjukkan pengaruh nyata dilanjutkan uji wilayah ganda Duncan pada taraf 5% (Steel dan Torrie, 1995).

Model linier rancangan acak lengkap sebagai berikut :

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

Keterangan :

Y_{ij} : jumlah total *Coliform* dan *E.coli* pada usus ayam kampung ke-i yang memperoleh perlakuan penambahan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum ke-j

i : perlakuan ke 1,2,3

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

μ : nilai tengah umum performa ayam kampung

- τ_i : pengaruh perlakuan penambahan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum ayam kampung ke-i
- ε_{ij} : pengaruh galat percobaan pada jumlah total *Coliform* dan *E.coli* pada usus halus ayam kampung ke-i yang memperoleh perlakuan penambahan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum ke-j

Hipotesis Statistik

Pengaruh penambahan probiotik *Rhizopus oryzae* pada pakan terhadap total *Coliform* dan *Escherichia coli* pada usus halus ayam kampung yaitu :

- H_0 : $\tau_0 = \tau_1 = \tau_2 = 0$ (semakin tinggi presentase penambahan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum tidak berpengaruh terhadap total *E. coli* dan *Coliform* pada usus halus ayam kampung)
- H_1 : $\tau_0 \neq \tau_1 \neq \tau_2 = 0$ (semakin tinggi presentase penambahan probiotik *Rhizopus oryzae* dalam ransum berpengaruh terhadap total *E. coli* dan *Coliform* pada usus halus ayam kampung)

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.