

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian mengenai “Pengaruh Penambahan Prbiotik pada Ransum Kering dan Basah terhadap Kadar Kolesterol, *Low Density Lipoprotein* dan *High Density Lipoprotein* Darah Itik Peking” dilaksanakan pada bulan Oktober – Desember 2015 di Laboratorium Produksi Ternak Unggas Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Analisis kadar kolesterol, *Low Density Lipoprotein* dan *High Density Lipoprotein* di lakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Tengah.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan adalah 120 ekor itik Peking (*unsex*) umur 21 hari dengan bobot badan $750,564 \pm 15,283$ g (CV = 4,072%). Bahan penyusun ransum meliputi jagung, bekatul, bungkil kedelai, tepung ikan dan mineral mix produksi Medion. Kandungan protein ransum 14,87% dan kandungan energi 3.088,70 kkal/kg.

Tabel 3. Kandungan Nutrien Bahan Penyusun Ransum dalam Kering Udara

Bahan Pakan ¹	Kandungan Nutrien						
	KA	PK	LK	SK	Ca	P	EM ²
Jagung	12,3295	7,377	0,699	0,730	0,001	0,105	3321
Bungkil kedelai	11,1966	44,118	0,320	2,314	0,151	0,551	2216
Tepung ikan	9,1297	41,126	11,819	8,180	7,515	3,135	2219
Bekatul	10,9027	11,813	10,274	11,875	0,009	1,051	2287

¹Hasil Analisis Bahan Pakan yang telah dikonversi ke Kering Udara sesuai analisis berdasarkan Bahan Kering (Lampiran 1) di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro; ²Hartadi (1980), PK = 14,872%; LK = 3, 685%, SK = 3,839%.

Komposisi dan kandungan nutrisi ransum yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi dan Kandungan Nutrien Ransum

Bahan Ransum	Komposisi
Jagung (%)	60,000
Bekatul (%)	20,000
Bungkil kedelai (%)	9,000
Tepung ikan (%)	10,000
Mineral (%)	1,000
Total (%)	100,000
Kandungan nutrisi	
Protein kasar (%) ¹	14,872
Lemak kasar (%) ¹	3,685
Serat kasar (%) ¹	3,839
Ca (%) ¹	1,087
P (%) ¹	0,646
EM (kkal/kg) ²	3.088,700

¹Berdasarkan hasil analisis Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro (2016); ²EM berdasarkan perhitungan manual sesuai tabel NRC (1994)

Probiotik yang digunakan menggunakan merk Starbio[®] produksi PT. Lembah Hijau Multifarm, Sukaharjo Jawa Tengah. Kandungan mikroba Starbio[®] dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Jenis Mikroba pada Probiotik Starbio

Mikroba	CFU/g (10 ⁸)
Mikroba proteolitik	60
Lignolitik	60
Mikroba nitrogen fiksasi non simbiotik	40
Selulolitik	8
Amilolitik	4
Mikroba pengurai fosfat	3
Mikroba pengurai sulfur	3
Lipolitik	5

Berdasarkan Label Kemasan Probiotik Starbio[®]

Kandang yang digunakan berupa kandang slat dengan ukuran 100 cm x 85 cm x 80 cm, setiap unit berisi 5 ekor itik. Peralatan yang digunakan meliputi tempat ransum, tempat minum, nampan, instalasi listrik, indukan, *sprayer*, timbangan analitik berkapasitas 25 kg dan 50 kg dengan ketelitian 1 gram, *sprit* 3 ml, alkohol 70 %, kapas, *vacuntaier*, *watch*, *sentrifuge*, cup serum, *cooling boox*, *frezzer*, thermometer, hygrometer dan peralatan tulis.

3.2. Metode penelitian

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahap yaitu tahap persiapan penelitian, pelaksanaan, pengambilan data dan analisis data.

3.2.1. Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 2 x 3 dengan 4 ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah ransum kering dan ransum basah sebagai faktor 1, sedangkan faktor 2 adalah level pemberian probiotik. Kombinasi perlakuan sebagai berikut :

T₁A₁ : ransum kering tanpa probiotik

T₁A₂ : ransum kering + probiotik 9 g/kg ransum

T₁A₃ : ransum kering + probiotik 12 g/kg ransum

T₂A₁ : ransum basah tanpa probiotik

T₂A₂ : ransum basah + probiotik 9 g/kg ransum

T₂A₃ : ransum basah + probiotik 12 g/kg ransum

3.2.2. Persiapan penelitian

Tahap persiapan meliputi pembuatan kandang, pembersihan kandang dan lingkungan, sanitasi menggunakan deterjen dan pemberian kapur, fumigasi, pembelian peralatan, penyediaan bahan pakan dan pembelian *day old duck* (DOD) di penetasan itik mandiri Payung Asri, Banyumanik, Semarang. Provinsi Jawa Tengah.

Day Old Duck yang datang diberi air gula dengan kadar 2% untuk mencukupi energi yang hilang selama perjalanan menuju kandang. Itik ditimbang, itik diberi pakan BR 511[®] PT. Charoen Pokphand dengan kandungan protein sebesar 21 – 23 % (sesuai label kemasan) pada umur 1 -14 hari, itik ditempatkan kandang slat. Pembuatan ransum dilakukan 2 hari sekali.

Pemberian ransum umur 15 - 21 hari dilakukan perlakuan adaptasi ransum pabrikan dengan ransum perlakuan, Perbandingan ransum komersial dengan ransum perlakuan yaitu 75 : 25 , lalu 50 : 50, 25 : 75 (masing-masing 2 hari pemberian)

3. 2. 3. Pelaksanaan

Pelaksanaan penelitian mulai pada umur 22 - 60 sesuai dengan rancangan percobaan. Perlakuan pertama terdiri dari ransum kering dan ransum basah (air dan ransum 2 : 1). Perlakuan kedua yaitu penambahan probiotik starbio Pemberian air minum diberikan secara *ad libitum* pada tempat air minum tersendiri. Pemberian ransum itik Peking menyesuaikan dengan standar pemberian ransum berdasarkan NRC (1994) yang ditunjukkan pada Tabel 2. dan diberikan 3 kali sehari.

3. 2. 4. Pengambilan data

Pengambilan data penelitian dilaksanakan pada umur 60 hari dengan menggunakan sampel 1 ekor itik jantan dan 1 ekor itik betina secara acak pada setiap unit percobaan.

Darah diambil setelah itik dipuaskan selama 2 jam. Sampel darah diambil menggunakan *sprit* 3 ml dari *vena branchialis*, kemudian dimasukkan ke dalam tabung *vacuntainer* yang sudah diberi label, selama proses pengambilan *vacuntainer* dimasukkan pada *cooling box*, selanjutnya di sentrifuge untuk mengambil serum darah, kemudian serum darah dimasukkan ke dalam cup serum berlabel. Cup serum yang sudah terisi plasma disimpan pada suhu 4°C selama 1 malam, selanjutnya cup serum yang sudah terisi di analisis di Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Tengah.

3.2.5. Parameter penelitian

Parameter penelitian yang diamati sebagai berikut :

1. Kadar kolesterol darah
2. Kadar *low density lipoprotein* (LDL)
3. Kadar *high density lipoprotein* (HDL)

Analisis kadar kolesterol, *low density lipoprotein* dan *high density lipoprotein* menggunakan metode di Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Tengah. Sebagai berikut :

Kadar kolesterol darah di analisis menggunakan metode *Cholesterol-oxidase para-aminophenazone* (CHOD-AP) *enzimatic colorimetric*. Prinsip kerja analisis

kolesterol melalui reaksi oksidasi dan hidrolisis enzimatis. Reagen yang digunakan adalah reagen enzim dan larutan standar. Reagen enzim terdiri dari pipet buffer dengan pH 6,9 (90 mmol/l), 4 - aminophenazone (0,4 mmol/l), phenol (26 mmol/l), peroxidase (1250 U/l), kolesterol estrase (300 U/l), kolesterol oksidase (200 U/l) dan larutan standar 200 mg/dl (5,17 mmol/l). Larutan standar terbuat dari kolesterol (200 mg/l). Metode CHOD-PAP yaitu dengan mengisi tiga tabung kuvet. Tabung pertama yang diisi serum darah 10 µl ditambah 1 ml reagen, tabung kedua diisi 10 µl standar kolesterol dan tabung ketiga merupakan blanko reagen diisi reagen warna 1 ml, standar 1 ml dan serum 1 ml kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 20 - 25°C, selanjutnya mengukur absorpsi sampel dan absorpsi standar pada blanko reagen dalam 60 menit. Pengukuran menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm dengan perhitungan :

$$\text{Kolesterol (mg/dl)} = \frac{\text{Absorban sampel}}{\text{Absorban standar}} \times \text{Conc.std/ca} \quad (\text{Hans dkk., 1980})$$

Prinsip pemeriksaan *low density lipoprotein* yaitu reaksi pertama, kolesterol dipisahkan dari VLDL, kilomikron dan HDL dengan deterjen berupa bantuan kolesterol esterase dan kolesterol oksidase terbentuk H₂O₂. H₂O₂ dengan amonia anitipirin dengan bantuan peroksidase membentuk produk tidak berwarna. Pada reaksi pertama LDL tetap, reaksi kedua dengan pemberian deterjen 2, kolesterol terlepas dari LDL dengan kolesterol estrase dan kolesterol oksidase membentuk H₂O₂ yang kemudian dengan aminotipirin dan DSBmT. Bantuan enzim peroksidase memberikan hasil yang berwarna, warna yang dihasilkan adalah warna biru. Intensitas warna menunjukkan kadar LDL kolesterol yang dapat dipengaruhi

bilirubin 20 mg/dl, hemoglobin 500 mg/dl dan triglisrida. Pengukuran pemeriksaan menggunakan panjang gelombang 550 nm.

HDL dihitung menggunakan metode *enzymatic colorimetric* setelah presipitasi β -lipoprotein dengan asam phosphotungstate-MgCl₂. Reagen yang digunakan adalah phosphotungstic acid (0,55 mmol/l), magnesium chloride (25 mmol/l) dan kolesterol sebagai larutan standart (50 mg/l). Cara kerja analisis HDL adalah pembuatan blanko dengan mengisi sumuran *microplate* dengan 100 μ l air destilasi. Pembuatan larutan standar dilakukan dengan cara mengisi microplate dengan larutan standart 100 μ l dan sampel serum diambil sebanyak 100 μ l dengan mikropipet dan dimasukkan kedalam sumuran *microplate*. Pada masing - masing sumuran yang berisi blanko,larutan standar dan sampel ditambah reagen sebanyak 100 μ l kemudian dilakukan pencampuran dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 20 - 25°C atau 5 menit suhu 37°C. Kadar HDL kemudian dibaca dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 50 nm.

3. 2. 5. Analisis data

Metode linier aditif sesuai petunjuk Gordeyase Mas (2009) sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_t + \beta_a + (\alpha\beta)_{ta} + \epsilon_{tar} ; t = (1,2) \quad a = (1,2,3) \quad r = (1,2,3,4)$$

Keterangan :

Y_{tar} = kadar kolesterol, LDL dan HDL darah itik peking pada percobaan ke-r yang memperoleh kombinasi perlakuan ke-t dari jenis ransum dan ke-a dari level probiotik

μ = nilai tengah umum (rata-rata populasi) kadar kolesterol, LDL dan HDL darah itik peking.

α_t = pengaruh aditif dari jenis ransum ke-t.

β_a = pengaruh aditif level probiotik ke-a.

$(\alpha\beta)_{ta}$ = pengaruh interaksi antara bentuk pemberian pakan ke-i dan level probiotik ke-j.

ϵ_{tar} = pengaruh galat percobaan pada kadar kolesterol, LDL dan HDL darah itik peking yang memperoleh kombinasi perlakuan jenis ransum ke-t dengan level probiotik ke-a.

Data yang diperoleh dianalisis ragam (*Analisis of Variance*), dengan uji F pada taraf signifikansi 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Terdapat pengaruh perlakuan yang nyata dilakukan Uji Jarak Ganda Duncan untuk mengetahui perbedaan perlakuan (Steel and Torrie, 1995).

3. 3. Hipotesis Statistik

a. H_0 : $(\alpha\beta)_{ta} = 0$: tidak ada pengaruh interaksi antara ransum kering dan basah dengan penambahan probiotik terhadap kadar kolesterol LDL dan HDL darah itik Peking

H_1 : minimal ada satu $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$: pengaruh interaksi antara ransum kering dan basah dengan penambahan probiotik terhadap kadar kolesterol, LDL dan HDL darah itik peking

b. H_0 : $\alpha_t = 0$: tidak ada pengaruh rasum kering dan basah terhadap kadar kadar kolesterol, LDL dan HDL darah itik Peking

- H_1 : minimal ada satu $\alpha_t \neq 0$: pengaruh antara ransum kering dan basah terhadap kadar kolesterol, LDL dan HDL darah itik peking
- c. H_0 : $\beta_a = 0$: tidak ada pengaruh penambahan probiotik terhadap kadar kolesterol LDL dan HDL darah itik Peking
- H_1 : minimal ada satu $\beta_a \neq 0$: pengaruh antara penambahan probiotik terhadap kadar kolesterol, HDL dan LDL darah itik peking

Kriteria pengujian adalah sebagai berikut :

- a. Jika $F_{hit} < F_{tabel}$, maka H_0 diterima yang berarti tidak ada pengaruh perlakuan terhadap kadar kolesterol, LDL dan HDL darah itik Peking
- b. Jika $F_{hit} \geq F_{tabel}$, maka H_0 ditolak berarti yang ada pengaruh perlakuan terhadap kadar kolesterol, LDL dan HDL darah itik Peking