

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian dengan judul ‘‘Total Bakteri Asam Laktat dan *Coliform* Usus Halus dan Seka Ayam Broiler yang Diberi Probiotik *Chrysonilia crassa* atau *Bacillus subtilis*’’ dilakukan pada bulan Juli – Agustus 2017 di kandang ayam, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis kandungan bahan pakan di Laboratorium Ilmu Nutrisi Pakan dan analisis total bakteri asam laktat dan *coliform* di Laboratorium Fisiologi dan Biokimia, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

#### **3.1. Materi**

Materi penelitian adalah *day old chick* (DOC) *strain Lohman* sebanyak 200 ekor dengan bobot awal rata-rata  $41,11 \pm 0,16$  g. Ransum terdiri dari *Crude Palm Oil* (CPO), dedak, jagung, tepung gandum, tepung roti, *Meat Bone Meal* (MBM), *Destilers Dried Grains with Solubles* (DDGS), *Soya Bean Meal* (SBM), *L-threonin*, *lisin*, *metionin*, tepung tulang, garam, *premix*, *antibiotic Zinc Bacitracin* dengan dosis pemakaian 0,04%, probiotik *Bacillus subtilis* dengan dosis pemakaian 0,01% dan kapang *Chrysonilia crassa* dengan dosis pemakaian 1%.

#### **3.2. Metode**

##### **3.2.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 10 ekor ayam.

Perlakuan penelitian terdiri dari :

T0 = Pakan kontrol

T1 = Pakan kontrol + *Zinc Bacitracin* 0.04%

T2 = Pakan kontrol + *B. subtilis* 0.01%

T3 = Pakan kontrol + kapang *C. crassa* 1%

Parameter yang diamati yaitu total *coliform* dan total bakteri asam laktat di dalam usus halus dan seka ayam broiler.

### 3.2.2. Peralatan Penelitian

Perlengkapan dan peralatan kandang yang digunakan terdiri dari sekam dan koran sebagai *litter*, tempat pakan, tempat minum, bohlam, *termohigrometer* sebagai pengukur suhu dan kelembaban, pH meter digunakan untuk mengukur pH digesta usus dan timbangan digital untuk menimbang antibiotik dan probiotik dalam ransum. Peralatan dan perlengkapan analisis meliputi autoklaf untuk sterilisasi basah, oven untuk sterilisasi kering, kantong plastik klip untuk tempat penyimpanan sampel sementara, tabung reaksi untuk pengenceran sampel, pipet volume untuk memindahkan sampel saat pengenceran, cawan petri untuk kultur bakteri asam laktat dan *coliform*, inkubator untuk melakukan inkubasi biakan, *colony counter* untuk menghitung jumlah koloni mikroba, *Erlenmeyer* untuk tempat pembuatan medium. ‘‘deMan Rogosa Sharpe Agar’’ (MRS) merupakan medium selektif untuk biakan bakteri asam laktat, MRS memiliki kandungan *Peptone*, *Lab Lamco powder*, *Yeast extract*, *Glucose*, *Sorbitan mono-oleate*, *Dipotassium hydrogen phosphate*, *Sodium acetate*, *Triammonium citrate*,

*Magnesium sulphate*, *Manganese sulphate* dan ‘‘MacConkey’’ merupakan medium selektif untuk biakan *coliform*. MacConkey memiliki kandungan *Peptone*, *Proteose peptone*, *Lactose monohydrate*, *Bile salts*, *Sodium chloride*, *Neutral red*, *Crystal violet* dan *agar*.

Penelitian dilakukan dalam 3 tahap yaitu persiapan, pemeliharaan dan pengambilan data. Tahap persiapan yaitu penyediaan bahan pakan sebagai penyusun ransum, pembuatan medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan pembuatan kultur kering *C. crassa*. Pembuatan medium PDA terdiri dari filtrat kentang 350 ml, *dextrose* 7 g dan serbuk agar 7 g kemudian dilakukan sterilisasi basah menggunakan autoklaf, setelah suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$  ditambahkan antibiotik *chloramphenicol*. Pembuatan starter kultur kering *C. crassa*, dimulai dari proses peremajaan isolat *C. crassa* yang ditumbuhkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu  $38^{\circ}\text{C}$  selama 2 hari secara aerob. Isolat *C. crassa* yang tumbuh selanjutnya diinokulasikan kedalam bekatul steril melalui proses *solid state fermentation* dengan perbandingan 5 cawan petri dalam 500 g bekatul steril. Campuran bekatul dan isolate kemudian diinkubasi selama 4 hari dan setiap 2 hari sekali dilakukan pengadukan, agar *C. crassa* dapat tumbuh merata di seluruh medium bekatul. Sampel bekatul yang ditumbuhi kapang dihitung jumlah koloni kapangnya. Berdasarkan metode *Total Plate Count* (TPC) diperoleh hasil  $1,0 \times 10^{11}$  cfu/g, selanjutnya bekatul dijemur hingga kondisi kering udara. Bahan pakan, persentase penggunaan serta kandungan nutrisi ransum dapat dilihat pada Tabel 2. Kandang yang digunakan

adalah kandang koloni dengan jumlah 20 petak. Masing-masing petak berisi 10 ekor broiler.

Tabel 2. Bahan Pakan, Persentase Penggunaan Serta Kandungan Nutrisi Ransum.

Bahan Pakan	Presentase Kandungan Nutrisi Ransum			
	T0	T1	T2	T3
	------(%)-----			
CPO	3,50	3,50	3,50	3,50
Dedak	4,45	4,45	4,45	4,45
Jagung	45,5	45,5	45,5	45,5
Tepung Gandum	10,0	10,0	10,0	10,0
Tepung Roti	5,00	5,00	5,00	5,00
MBM	2,80	2,80	2,80	2,80
CFM	2,00	2,00	2,00	2,00
CGM	3,60	3,60	3,60	3,60
DDGS	3,00	3,00	3,00	3,00
SBM	17,0	17,0	17,0	17,0
<i>L-threonin</i>	0,08	0,08	0,08	0,08
Lisin	0,55	0,55	0,55	0,55
Metionin	0,37	0,37	0,37	0,37
Tepung Tulang	1,50	1,50	1,50	1,50
Garam	0,15	0,15	0,15	0,15
Premix	0,50	0,50	0,50	0,50
Total	100	100	100	100
<i>Zinc Bacitracin</i>	-	0,04	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	0,01	-
<i>Chrysonilia crassa</i>	-	-	-	1
<b>Kandungan Nutrisi Pakan</b>				
Energi Metabolis (kkal/kg)	3300	3300	3300	3300
Bahan Kering (%)	89,64	89,64	89,64	89,64
Protein Kasar (%)	21,93	21,93	21,93	21,93
Lemak Kasar (%)	6,40	6,40	6,40	6,40
Serat Kasar (%)	5,62	5,62	5,62	5,62
Abu (%)	6,39	6,39	6,39	6,39

Tahap pemeliharaan diawali dengan *chick in* dan penimbangan terhadap bobot awal DOC pada setiap box. Ayam kemudian dimasukkan kedalam petak dan tiap petak diisi 10 ekor DOC. Pemeliharaan minggu pertama dilengkapi

dengan bohlam 25 watt sebagai sumber pemanas dan koran untuk *litter*, tempat pakan dan tempat minum. *Litter* pada tiap petak diganti dengan sekam pada minggu berikutnya. Pemberian ransum sesuai perlakuan diberikan sejak awal pemeliharaan hingga akhir pemeliharaan. Air minum diberikan secara *ad libitum*. Sisa pakan ditampung dan ditimbang setiap satu minggu sekali. Ayam di vaksin pada umur 4 hari dengan jenis vaksin ND melalui tetes mata, umur 10 hari dilakukan vaksin IBD melalui air minum dan umur 18 hari dilakukan vaksin ND Lasota melalui air minum. Pengukuran suhu dan kelembaban dilakukan pada pukul 06.00 WIB, 12.00 WIB, 18.00 WIB dan 24.00 WIB.

### **3.2.3. Pengambilan Data**

Tahap pengambilan data dilaksanakan pada hari ke-35 pemeliharaan. Pengambilan data dilakukan dengan mengambil 1 ekor ayam dari masing-masing perlakuan di tiap ulangan. Sampel Ayam disembelih dan dibelah pada bagian *abdomennya* diambil bagian saluran pencernaannya. Bagian usus halus dan seka diambil untuk dikeluarkan isi dari digestanya. Isi digesta tersebut dimasukkan kedalam kantong plastik klip kemudian disimpan di dalam *freezer*. Sampel digesta dibawa ke laboratorium untuk dianalisis total bakteri asam laktat dan *coliform*.

Analisis dimulai dari pembuatan medium MRS Agar sebagai medium biakan dari bakteri asam laktat dengan takaran 68,2 g MRS Agar untuk setiap 1 liter aquades dan MacConkey untuk medium biakan bakteri *coliform* dengan takaran 50 g MacConkey untuk setiap 1 liter aquades. Medium disterilkan dalam

autoklaf, selanjutnya dituangkan kedalam cawan petri sebanyak  $\pm 15$  ml dan didiamkan hingga dingin.

Proses perhitungan total bakteri asam laktat dan *coliform* dengan menggunakan metode pengenceran. Pengenceran sampel dimulai dari  $10^{-1}$  hingga  $10^{-6}$ . Sampel untuk biakan bakteri *coliform* diambil dari tingkat pengenceran  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$ , sedangkan untuk biakan bakteri asam laktat diambil dari tingkat pengenceran  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$ . Setiap pengenceran diambil 1 ml dengan menggunakan pipet volume kemudian dituangkan pada cawan petri yang telah berisi medium. Selanjutnya medium dan sampel diinkubasi pada inkubator yang bersuhu  $38^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam untuk bakteri *coliform*, sedangkan untuk biakan bakteri asam laktat selama 48 jam. Bakteri yang tumbuh dihitung menggunakan *colony counter*.

Total bakteri asam laktat dan *coliform* dihitung dengan metode hitungan cawan atau *total plate count* (TPC). Hasil perhitungan disusun berdasarkan metode *standart plate count* (SPC). Perhitungan total bakteri asam laktat dan *coliform* dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Fardiaz, 1993) :

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

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

### 3.3. Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik menggunakan analisis ragam rancangan acak lengkap ( $P < 0,05$ ), kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1993).

Model linier rancangan percobaan adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

$Y_{ij}$  : Total bakteri asam laktat dan *coliform* dalam usus halus dan seka ayam broiler ke -j yang memperoleh perlakuan pemberian probiotik ke-i

$\mu$  : Nilai tengah umum (Rata-rata populasi total bakteri asam laktat dan *coliform*)

$\tau_i$  : Pengaruh aditif dari perlakuan pemberian probiotik ke-i

$\varepsilon_{ij}$  : Pengaruh galat percobaan pada total bakteri asam laktat dan *coliform* ke-j yang memperoleh perlakuan pemberian probiotik ke-i

Kriteria pengambilan keputusan :

1. Apabila F hitung < F tabel dengan  $\alpha = 0,05$  maka tidak ada pengaruh perlakuan pemberian probiotik terhadap total bakteri asam laktat dan *coliform* dalam usus halus dan seka ayam broiler.
2. Apabila F hitung  $\geq$  F tabel dengan  $\alpha = 0,05$  minimal ada satu perlakuan pemberian probiotik yang mempengaruhi total bakteri asam laktat dan *coliform* dalam usus halus dan seka ayam broiler, dilanjutkan dengan uji beda (Duncan).