

## BAB III

### MATERI DAN METODE

Penelitian dengan judul “Pengaruh Pemberian Kalsium Mikropartikel dan Probiotik *Lactobacillus sp.* terhadap Kondisi Usus Halus dan Pertambahan Bobot Badan Harian Ayam Broiler” dilaksanakan pada bulan Desember 2017 sampai Februari 2018 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan serta Kandang Digesti, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Total bakteri asam laktat (BAL) dan *Coliform* dianalisis di Laboratorium Fisiologi dan Biokimia, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

#### 3.1. Ternak, Ransum, dan Peralatan Penelitian

Ternak yang digunakan dalam penelitian adalah ayam broiler sebanyak 160 ekor *strain* MB 202 New Lohmann (*unsex*) umur 14 hari dengan bobot badan pada awal perlakuan  $407,65 \pm 16,51$  g. Probiotik *Lactobacillus sp.* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Gadjah Mada, ransum komersial CP 511, cangkang telur diperoleh dari limbah pembuatan roti di Gunungpati, Semarang. Bahan penyusun ransum adalah cangkang telur reguler (non-mikropartikel), cangkang telur mikropartikel, jagung, bekatul, tepung ikan, bungkil kedelai dan premiks non-antibiotik, dengan formulasi pada Tabel 4.

Alat yang digunakan adalah *grinder*, dan *pelleter* untuk membuat *pellet*, *Ultrasonic Bath* dengan merk *Power Sonic* 405 untuk membuat mikropartikel cangkang telur. Kandang baterai untuk pemeliharaan ayam dilengkapi dengan tempat pakan dan air minum. Timbangan analitik kapasitas 10 kg dengan

ketelitian 0,0001 g untuk menimbang ayam dan ransum. *Termohyrometer* untuk mengukur suhu dan kelembaban kandang.

Tabel 4. Formulasi Ransum Penelitian

Bahan Pakan	Komposisi				
	T0	T1	T2	T3	T4
	----- (%) -----				
Jagung Giling	44,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Bekatul	17,00	19,00	19,00	19,00	19,00
Bungkil Kedelai	31,00	23,00	23,00	23,00	23,00
Tepung Ikan	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50
Cangkang Telur Non-mikropartikel	2,00	2,00	0,00	2,00	0,00
Cangkang Telur Mikropartikel	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00
Premiks	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Total	100	100	100	100	100
<b>Kandungan Nutrien (%)*</b>					
Energi Metabolis (kkal/kg)**	2914,51	2915,67	2915,67	2915,67	2915,67
Protein Kasar	21,21	18,13	18,13	18,13	18,13
Lemak Kasar	2,16	2,22	2,22	2,22	2,22
Serat Kasar	4,31	4,45	4,45	4,45	4,45
Kalsium	1,22	1,20	1,20	1,20	1,20
Fosfor	0,55	0,57	0,57	0,57	0,57
Metionin***	0,38	0,36	0,36	0,36	0,36
Lisin***	1,25	1,06	1,06	1,06	1,06
Arginin***	1,48	1,26	1,26	1,26	1,26

\*Dianalisis Proksimat di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro (2017)

\*\*Berdasarkan Rumus Balton (Siswohardjono, 1982)

\*\*\*Berdasarkan Tabel National Research Council (1994)

Alat yang digunakan untuk analisis bakteri yaitu oven untuk sterilisasi alat, autoklaf untuk sterilisasi medium, erlenmeyer untuk tempat medium, pipet untuk memindahkan sampel, tabung reaksi sebagai tempat pengenceran sampel, cawan petri sebagai tempat untuk kultur bakteri, inkubator untuk menginkubasi sampel biakan, *colony counter* untuk menghitung total bakteri, Mac Conkey Agar

sebagai medium bakteri *Coliform*, dan deMann Rogosa Sharpe Agar (MRSA) sebagai medium BAL.

### **3.2. Prosedur Penelitian**

Penelitian diawali dengan tahap persiapan dan dilanjutkan tahap pelaksanaan. Tahap persiapan meliputi persiapan kandang dan pembuatan ransum mikropartikel. Pembuatan mikropartikel kalsium meliputi limbah cangkang telur dibersihkan kemudian dikeringkan. Cangkang telur yang telah kering kemudian dibuat menjadi tepung, sebagian tepung cangkang telur kemudian dibuat mikropartikel dengan ukuran 1,0403  $\mu\text{m}$  menggunakan sonifikator di laboratorium dan dikeringkan kembali. Tepung cangkang telur mikropartikel kemudian dianalisis kandungan kalsiumnya. Persiapan kandang meliputi sanitasi kandang, pembuatan *brooder* untuk DOC, kandang baterai disiapkan sesuai dengan jumlah ayam, pemasangan tempat pakan dan air minum serta biosekuriti kandang. Kandang diberi label setiap perlakuan dan ulangan serta disusun secara acak.

Tahap pelaksanaan meliputi pemeliharaan ayam mulai dari DOC sampai dewasa atau bobot potong selama 42 hari. Pemeliharaan ayam terdiri dari pemeliharaan DOC di *brooder*, penempatan ayam pada kandang baterai kemudian pemberian ransum perlakuan dan air minum secara *ad libitum*. Ayam mulai umur 11 sampai 13 hari diadaptasi sebelum diberikan ransum perlakuan yaitu pada umur 11 hari diberikan ransum komersial 75% : 25% ransum perlakuan, umur 12 hari berupa ransum komersial 50% : 50% ransum perlakuan, dan umur 13 hari berupa ransum komersial 75% : 25% ransum perlakuan. Ransum komersial

diberikan ketika mulai umur 1 sampai 13 hari dan dilanjutkan dengan ransum perlakuan pada umur 14 sampai 42 hari. Ransum perlakuan yang diberikan sebelumnya telah dibuat dalam bentuk pellet untuk mempermudah ayam dalam mengkonsumsi ransum. Probiotik *Lactobacillus sp.* diberikan pada pagi hari pukul 06.00 WIB sebanyak  $1,2 \times 10^8$  CFU/ml menggunakan spuit, dengan dicampur dalam sedikit porsi ransum sampai terkonsumsi habis, selanjutnya diberi ransum tanpa *Lactobacillus sp.* sesuai dengan porsi ransum sehari. Kandang dibersihkan dari ekskreta setiap hari agar ayam tetap nyaman dan menjaga kandang agar tidak ada gangguan dari luar.

### **3.3. Parameter Penelitian**

Parameter penelitian meliputi laju digesta, pH usus halus serta total bakteri asam laktat (BAL) dan *Coliform*. Pengukuran laju digesta dilakukan sesuai dengan metode Rahmawati *et al.* (2014). Laju digesta diamati pada hari ke 36 - 39 yang dilakukan dengan cara menambahkan indikator  $Fe_2O_3$  sebanyak 0,5 % dari 150 g ransum. Penambahan indikator  $Fe_2O_3$  dengan hari berselang-seling selama 4 hari yaitu pada hari ke 36 dan 38. Sampel ayam untuk pengukuran laju digesta diambil sebanyak 20 ekor dengan masing-masing 1 ekor/unit perlakuan secara acak, kemudian diberi ransum yang sudah dicampur indikator  $Fe_2O_3$ . Indikator berfungsi sebagai penanda dimulainya pengukuran laju digesta. Waktu ekskreta berwarna sesuai indikator pertama kali keluar dicatat. Pemberian ransum tanpa indikator dilakukan pada hari ke 37 dan 39, kemudian waktu ekskreta yang tidak berwarna pertama kali keluar dicatat.

Pengukuran pH usus halus sesuai dengan metode Rahmawati *et al.* (2014). Data pH usus halus diukur pada hari ke 41 dengan cara mengambil 20 ekor sampel ayam dengan masing-masing 1 ekor/unit perlakuan secara acak. Ayam disembelih pada bagian *vena jugularis*, kemudian dibelah dadanya agar lebih mudah mengambil saluran pencernaan. Bagian digesta usus halus terutama duodenum dipisahkan untuk diukur pH menggunakan pH meter. Sampel digesta bagian duodenum ditampung dalam pot sampel ukuran 10 ml, kemudian ditutup rapat, selanjutnya dimasukkan ke dalam *ice bag* untuk menjaga bakteri dalam sampel agar tidak mati. Pot sampel berisi sampel digesta diambil kemudian dilakukan pengukuran total bakteri asam laktat (BAL) dan *Coliform*.

Total BAL dan *Coliform* ditentukan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) (Fardiaz, 1993). Pengambilan data total BAL dan *Coliform* dilakukan pada hari ke 45 dengan cara mengambil 20 sampel cairan digesta pada bagian duodenum secara acak dengan masing-masing 1 sampel/unit perlakuan. Sterilisasi alat, medium deMann Rogosa Sharpe Agar (MRSA) dan MacConkey Agar serta tabung reaksi yang berisi aquades 9 ml. Sterilisasi alat dengan menggunakan oven suhu 170°C selama 1 jam, sedangkan sterilisasi medium dan tabung reaksi menggunakan autoklaf selama 15 menit.

Sampel digesta diencerkan dengan memasukkan 1 g ke dalam tabung reaksi pertama yang berisi 9 ml aquades kemudian dilakukan homogenisasi dan diperoleh pengenceran  $10^{-1}$ . Satu mililiter dari tabung pertama kemudian dimasukkan ke tabung kedua, tabung tersebut dikocok hingga homogen dan diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ , 1 ml dari tabung kedua kemudian dimasukkan ke

tabung ketiga, tabung tersebut dikocok dan diperoleh pengenceran  $10^{-3}$ , selanjutnya diencerkan sampai  $10^{-8}$ . Medium yang telah disterilisasi kemudian dituangkan kedalam cawan petri dan ditunggu sampai padat. Perbanyakan BAL dan *Coliform* dilakukan dengan proses *plating*, kultur dari pengenceran BAL  $10^{-5}$  sampai  $10^{-8}$ , dan *Coliform*  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$  diinokulasikan pada masing-masing medium yaitu MRSA untuk BAL dan MacConkey Agar untuk *Coliform* dengan metode cawan tuang. Cawan berisi sampel diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam untuk uji bakteri *Coliform* dan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam untuk uji bakteri asam laktat. Sampel yang telah diinkubasi kemudian dihitung total koloni berdasarkan ciri koloni BAL dan *Coliform* yang terlihat. Ciri koloni BAL yang tumbuh pada media deMann Rogosa Sharpe Agar (MRSA) yaitu bentuk koloni bulat, berwarna putih, tekstur halus dan basah (Purwohadisantoso *et al.*, 2009). Ciri koloni *Coliform* yang tumbuh pada medium MacConkey Agar yaitu berwarna merah atau merah muda (Hasriani *et al.*, 2013), selanjutnya perhitungan jumlah bakteri yang sesungguhnya menggunakan rumus Fardiaz (1993) sebagai berikut :

$$\text{Total bakteri} = \text{total koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

Pertambahan bobot badan harian (PBBH) dihitung berdasarkan selisih antar bobot akhir (umur 42 hari) dengan bobot awal (umur 14 hari) dibagi waktu lama pemeliharaan, dengan menggunakan rumus :

$$\text{PBBH} = \frac{\text{bobot badan akhir (g)} - \text{bobot badan awal (g)}}{\text{lama pemeliharaan (hari)}}$$

### 3.4. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan serta 4 ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 8 ekor. Perlakuan yang diterapkan sebagai berikut :

- T<sub>0</sub> : Ransum menggunakan non-mikropartikel kalsium dengan protein 21%
- T<sub>1</sub> : Ransum menggunakan non-mikropartikel kalsium dengan protein 18%
- T<sub>2</sub> : Ransum menggunakan mikropartikel kalsium dengan protein 18%
- T<sub>3</sub> : Ransum menggunakan non-mikropartikel kalsium dengan protein 18% +  
*Lactobacillus sp.* 1,2 ml
- T<sub>4</sub> : Ransum menggunakan mikropartikel kalsium dengan protein 18% +  
*Lactobacillus sp.* 1,2 ml

Semua data yang diperoleh dianalisis variansi (anova) dengan taraf signifikansi 5% untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan. Uji Jarak Berganda Duncan's (*Duncan's Multiple Range Test/DMRT*) dilakukan apabila perlakuan menunjukkan pengaruh nyata, untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (Yitnosumarno, 1993).

Model linier yang digunakan sebagai berikut :

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

Keterangan :

- i = perlakuan (1, 2, 3, 4, 5)  
j = ulangan (1, 2, 3, 4)  
Y<sub>ijk</sub> = kondisi usus halus ke- j yang memperoleh perlakuan pemberian kalsium mikropartikel dan probiotik *Lactobacillus sp.*  
μ = nilai tengah umum kondisi usus halus  
τ<sub>i</sub> = pengaruh perlakuan pemberian kalsium mikropartikel dan probiotik *Lactobacillus sp.*

$\epsilon_{ij}$  = galat percobaan pada perlakuan pemberian kalsium mikropartikel dan probiotik *Lactobacillus sp.*

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

$H_0 : \tau = 0$ ; tidak ada pengaruh perlakuan pemberian kalsium mikropartikel dan probiotik *Lactobacillus sp.* terhadap kondisi usus halus ayam broiler

$H_1 : \tau \neq 0$ ; minimal ada satu pengaruh perlakuan pemberian kalsium mikropartikel dan probiotik *Lactobacillus sp.* terhadap kondisi usus halus ayam broiler

Kriteria penerimaan dan penolakan hipotesis :

Apabila  $F_{hitung} < F_{tabel}$ , maka  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak.

Apabila  $F_{hitung} \geq F_{tabel}$ , maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima.