

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2017 sampai Januari 2018 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro Semarang. Pengujian dan analisis kandungan nutrisi ransum dan tepung umbi porang dilakukan di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Pengujian dan analisis total bakteri asam laktat (BAL) dan *Coliform* dilakukan di Laboratorium Fisiologi dan Biokimia, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Ternak dan Ransum Penelitian

Ternak yang digunakan dalam penelitian yaitu 144 ekor ayam broiler *strain* Lohmann *unsex* umur 14 hari dengan bobot badan $142,08 \pm 15,42$ g sebagai objek penelitian. Ransum basal mengandung protein kasar 20% dan energi metabolis 3.000 kkal/kg yang terdiri dari jagung kuning, bekatul, bungkil kedelai, tepung ikan, CaCO_3 , mineral mix (Tabel 3). Ransum komersil jenis B511 (Charoen Phokpand) diberikan pada ayam umur 1 – 7 hari dengan kandungan protein kasar 22 – 24%. dan energi metabolis 2.800 – 3.100 kkal/kg. Tepung umbi porang dan *Lactobacillus sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Kandang *battery* untuk pemeliharaan, tempat ransum dan tempat minum untuk masing-masing petak,

timbangan untuk menimbang ayam dan ransum, *hygrometer* untuk mengukur suhu dan kelembapan kandang, alat tulis untuk mencatat, medium *deMan, Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA) untuk analisis total BAL, medium *MacConkey Agar* untuk analisis total *Coliform* serta satu set peralatan analisis total bakteri asam laktat dan *Coliform*. Ransum perlakuan dibentuk menjadi *pellet* kemudian dijemur dibawah sinar matahari hingga kering sampai kadar air 14% dan selanjutnya diberikan kepada ternak. Komposisi bahan penyusun ransum dan kandungan nutriennya terdapat dalam Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi Bahan Pakan Penyusun Ransum dan Kandungan Nutriennya

Bahan pakan	Proporsi
	------(%)-----
Jagung kuning	53
Bungkil kedelai	24
Dedak halus	12
Tepung ikan	10
CaCO ₃	0,5
Premix	0,5
Total	100
Kandungan Nutrien* (%)	
Energi Metabolis (Kkal/kg)**	3.000,64
Protein Kasar	20,12
Lemak Kasar	2,75
Serat Kasar	3,92
Ca	1,03
P	0,65
Metionin ***	0,44
Lisin ***	1,29
Arginin***	1,42

Keterangan: *Di analisis di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro (2017)

**Energi Metabolis (kkal/kg) dihitung dengan rumus $40,81 [0,87 (\text{protein kasar} + 2,25 \times \text{lemak kasar} + \text{BETN}) + k]$ (Balton, 1967)

***Berdasarkan tabel National Research Council (NRC) (1994)

3.2. Prosedur Penelitian

3.2.1. Persiapan penelitian

Penelitian dilakukan dalam 3 tahapan yaitu persiapan, pelaksanaan perlakuan, pengambilan dan pengolahan data. Tahapan persiapan penelitian meliputi pembuatan tepung umbi porang, persiapan *Lactobacillus sp.*, persiapan pembuatan ransum, persiapan kandang dan peralatan serta persiapan DOC. Tahapan awal proses pembuatan tepung umbi porang yaitu dengan mengupas umbi porang segar kemudian dibersihkan dan dicuci dengan air setelah bersih dari kulit diiris tipis-tipis. Umbi porang dikeringkan dengan dijemur dibawah sinar matahari hingga kering dengan kadar air 14% dan didapat berat konstan selanjutnya umbi porang digiling menjadi tepung.

Persiapan dan peralatan yang digunakan sebelum DOC datang, meliputi sanitasi kandang dan peralatan dengan pencucian peralatan yang akan digunakan, penyemprotan desinfektan pada seluruh bagian kandang dan peralatan serta pengapuran. Kandang diistirahatkan selama satu minggu setelah sanitasi, kemudian dilakukan persiapan *brooder* untuk DOC dan kandang baterai untuk perlakuan. *Day old chick* yang baru datang ditimbang untuk mendapatkan bobot badan awal dan diberi air gula selama satu jam untuk mengantisipasi stress selama perjalanan.

Lactobacillus sp. yang digunakan dalam bentuk cair yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dengan populasi *Lactobacillus sp.* 10^8 CFU/ml. Medium MRS broth

dibuat dengan mengencerkan 52,2 g bubuk MRS broth dalam 1 liter akuades. Medium diaduk hingga homogen dan dipanaskan sampai mendidih kemudian diangkat, setelah agak dingin medium dimasukkan dalam botol. Medium disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C. Kultur bakteri diinokulasikan pada media MRS broth secara aseptik kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

3.2.2. Pelaksanaan penelitian

Ransum perlakuan diberikan pada saat ayam broiler berumur 14 hari. Satu minggu pertama sebelumnya ayam diadaptasikan dengan pemberian ransum komersil B511 (PT. Charoend Phokphand). Minggu kedua merupakan periode adaptasi pada hari ke 8 dan 9 ayam diberi sebesar 75% ransum komersial dan 25% ransum perlakuan, pada hari 10 dan 11 sebesar 50% ransum komersial dan 50% ransum perlakuan dan pada hari 12 dan 13 sebesar 25% ransum komersial dan 75% ransum perlakuan. Ransum perlakuan 100% mulai diberikan pada hari ke 14 – 42. Ransum dan air minum diberikan *ad libitum*. Tepung umbi porang dan *Lactobacillus sp.* (10^8 CFU/ml) diberikan pada pagi hari dalam bentuk *crumble* dengan dicampur sedikit ransum hingga habis dikonsumsi, selanjutnya diberi ransum untuk kebutuhan perhari, tanpa campuran aditif.

3.2.3. Pengambilan dan pengolahan data

Parameter yang diukur pada penelitian meliputi laju digesta, pH usus, total bakteri asam laktat dan total bakteri *Coliform*. Pengukuran laju digesta dilakukan

saat ayam berumur 39 hari menggunakan indikator Fe_2O_3 . Laju digesta diukur dengan menghitung selisih waktu saat ransum berindikator diberikan dengan ekskreta berindikator pertama kali dikeluarkan dan dihitung rata-ratanya (Fitriyah *et al.*, 2013). Laju digesta diamati dengan melihat ekskreta berwarna merah yang keluar pertama kali sesuai warna indikator dan waktu dicatat.

Pengukuran pH digesta mengacu pada Chen *et al.* (2015). Ayam diambil secara acak masing-masing 1 ekor per unit percobaan. Pengukuran pH digesta setelah ayam broiler dipotong dan dikeluarkan isinya saat ayam berumur 42 hari. pH digesta diukur menggunakan pH meter pada bagian usus halus (*duodenum*, *jejunum*, *ileum*). Ayam broiler dipotong, organ dalam dipisahkan melalui pembedahan dan dikeluarkan isi digesta kemudian diukur menggunakan pH meter digital yang sebelumnya telah dikalibrasi. Cara untuk kalibrasi yaitu dengan mencelupkan elektroda pH meter pada cairan dengan pH 4,7 dan 6,8. pH meter dibersihkan terlebih dahulu dengan akuades dan dilap menggunakan tisu setiap akan mengukur pH.

Perhitungan total bakteri asam laktat dan *Coliform* menggunakan metode *total plate count* (TPC) menurut Fardiaz (1993). Total BAL dan *Coliform* dihitung dengan mengambil isi digesta usus halus ayam broiler secara acak masing-masing satu unit percobaan. Isi digesta diambil, dimasukkan pada pot sampel dan ditutup rapat, selanjutnya dimasukkan ke *ice bag* dan dibawa ke Laboratorium Fisiologi dan Biokimia, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro untuk dilakukan pengujian. Sampel yang diperoleh dianalisis total bakteri asam laktat dan *Coliform*.

Total bakteri asam laktat dihitung menggunakan medium *deMan, Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA). Sterilisasi peralatan menggunakan oven bersuhu 170°C selama 1 jam, sterilisasi medium dan tabung reaksi menggunakan *autoclave* selama 15 menit. Sampel diencerkan dalam akuades steril dengan perbandingan 1 : 9. Pengenceran pertama sebanyak 1 g sampel digesta dimasukkan tabung reaksi berisi 9 ml aquades, kemudian dihomogenisasi dan diperoleh pengenceran 10^{-1} . Satu ml dari tabung reaksi pertama dimasukkan ke tabung kedua, tabung tersebut divortex hingga homogen dan diperoleh pengenceran 10^{-2} , kemudian dilakukan pengenceran dengan cara yang sama hingga 10^{-8} . Pencawanan menggunakan media biakan MRSA pada pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8} .

Pembuatan MRS agar untuk medium biakan bakteri asam laktat 68,2 g dilarutkan pada 1.000 ml aquades, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Satu ml sampel hasil pengenceran ditetaskan ke dalam cawan petri yang sudah berisi MRS agar setengah padat \pm 10 ml. Cawan petri digerakkan membentuk angka 8 agar homogen. Cawan petri yang telah padat diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 37° C selama 48 jam. Koloni BAL yang tumbuh dihitung menggunakan *hand counter*. Koloni BAL menunjukkan bentuk bulat dan elips dengan zona bening di sekeliling koloni (Lindawati dan Suardana, 2016).

Pelaporan perhitungan total bakteri asam laktat menggunakan metode *standard plate count* (SPC). Perhitungan total bakteri asam laktat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Fardiaz, 1993):

$$\text{Total bakteri asam laktat (CFU/g)} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

Perhitungan total *Coliform* menggunakan medium *MacConkey Agar* dengan takaran 50 g untuk 1.000 ml aquades. Medium dilarutkan dengan aquades dan disterilisasi menggunakan *autoclave*, selanjutnya media dituang pada cawan petri steril sebanyak 15 ml kemudian ditutup. Perhitungan koloni bakteri dengan pengenceran sampel, sebanyak 1 g digesta dimasukkan tabung reaksi berisi 9 ml aquades kemudian dihomogenisasi dan diperoleh pengenceran 10^{-1} . Satu ml dari tabung reaksi pertama dimasukkan ke tabung kedua, tabung tersebut divortex hingga homogen dan diperoleh pengenceran 10^{-2} , kemudian dilakukan pengenceran hingga 10^{-8} . Medium *MacConkey Agar* dituang ke dalam cawan petri dan ditunggu hingga padat. Uji bakteri *Coliform* menggunakan pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} . Sampel ditetaskan pada cawan petri yang berbeda sebanyak 1 ml. Cawan petri digerakkan membentuk angka 8 agar homogen. Cawan petri berisi sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian koloni dihitung berdasarkan jenis bakteri yang terlihat. Ciri koloni *Coliform* yang tumbuh berbentuk bulat kecil dengan tepi rata dan memiliki permukaan cembung (Darmawan *et al.*, 2015).

Pelaporan perhitungan total *Coliform* menggunakan metode *standard plate count* (SPC). Perhitungan total *Coliform* dihitung dengan rumus sebagai berikut (Fardiaz, 1993):

$$\text{Total } Coliform \text{ (CFU/g)} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

3.3. Rancangan Percobaan dan Analisis Statistik

Penelitian disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan pola faktorial 3×2 dan 4 kali ulangan. Faktor perlakuan yang diterapkan pertama adalah penambahan tepung umbi porang yaitu 3 taraf (0,8%/ A_1 , 1%/ A_2 dan 1,2%/ A_3 dari total konsumsi ransum tiap ekor perhari) sebagai faktor A. Faktor perlakuan kedua adalah penambahan *Lactobacillus sp.* yaitu 2 taraf ($1,2 \text{ ml} \times 10^8$ CFU/ml dan $2,4 \text{ ml} \times 10^8$ CFU/ml tiap ekor perhari) sebagai faktor B.

Kombinasi perlakuan tepung umbi porang dan *Lactobacillus sp.* sebagai berikut:

A1B1 : tepung umbi porang 0,8% + *Lactobacillus sp.* 1,2 ml

A1B2 : tepung umbi porang 0,8% + *Lactobacillus sp.* 2,4 ml

A2B1 : tepung umbi porang 1,0% + *Lactobacillus sp.* 1,2 ml

A2B2 : tepung umbi porang 1,0% + *Lactobacillus sp.* 2,4 ml

A3B1 : tepung umbi porang 1,2% + *Lactobacillus sp.* 1,2 ml

A3B2 : tepung umbi porang 1,2% + *Lactobacillus sp.* 2,4 ml

Model linier aditif yang digunakan berdasarkan pada rancangan acak lengkap pola faktorial (Steel dan Torrie, 1995) adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan :

i = 1,2,3

j = 1,2

k = 1,2,3,4

Y_{ijk} = pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij (taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B)

μ = nilai tengah umum populasi

α_i = pengaruh taraf ke-i dari faktor A

β_j = pengaruh taraf ke-j dari faktor B

$(\alpha\beta)_{ij}$ = pengaruh interaksi taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B

E_{ijk} = pengaruh galat percobaan pada petak percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

Data dianalisis ragam pada taraf signifikansi 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan dan interaksinya. Uji Wilayah Ganda Duncan dilakukan apabila terdapat pengaruh nyata dari faktor perlakuan untuk mengetahui letak perbedaan antar perlakuan dan kombinasinya.

Hipotesis statistik yang diuji dalam penelitian yaitu sebagai berikut:

a. $H_0 : (\alpha\beta)_{ij} = 0$, artinya tidak ada pengaruh interaksi terhadap parameter yang diukur.

$H_1 : (\alpha\beta)_{ij} \neq 0$, artinya ada pengaruh interaksi yang mempengaruhi parameter penelitian.

b. $H_0 : \alpha_i = 0$ artinya tidak ada pengaruh faktor A terhadap parameter yang diukur.

$H_1 : \text{minimal ada satu } \alpha_i \neq 0$, minimal ada satu pengaruh faktor A terhadap parameter yang diukur.

c. $H_0 : \beta_j = 0$, artinya tidak ada pengaruh faktor B terhadap parameter yang diukur.

$H_1 : \text{minimal ada satu } \beta_j \neq 0$, minimal ada satu pengaruh faktor B terhadap parameter yang diukur.

Kaidah penentuan penerimaan yang harus diambil adalah (Steel dan Torrie, 1995):

- a. Pengaruh interaksi tepung umbi porang (faktor A) dan *Lactobacillus sp.* (faktor B)
- Apabila F hitung faktor A (Tepung umbi porang) \times faktor B (*Lactobacillus sp.*) $< F$ tabel pada taraf 5% maka tidak terjadi interaksi yang nyata antar faktor A dengan faktor B (non signifikan).
 - Apabila F hitung $A \times B \geq$ tabel pada taraf 5% maka terdapat interaksi yang nyata antara faktor A dengan faktor B (signifikan).
- b. Pengaruh Penambahan Tepung Umbi Porang
- Apabila F hitung faktor A $< F$ tabel pada taraf 5% maka faktor A tidak berpengaruh nyata (non signifikan).
 - Apabila F hitung faktor A $\geq F$ tabel pada taraf 5% maka faktor A berpengaruh nyata (signifikan).
- c. Pengaruh *Lactobacillus sp.*
- Apabila F hitung faktor B $< F$ tabel pada taraf 5% maka faktor B tidak berpengaruh nyata (non signifikan).
 - Apabila F hitung faktor B $\geq F$ tabel pada taraf 5% maka faktor B berpengaruh nyata (signifikan).