

## BAB III

### MATERI DAN METODE

Penelitian tentang profil eritrosit ayam broiler yang diberi bahan pakan campuran onggok dan tepung daun Kelor (*Moringa oleifera*) yang difermentasi dengan *C. crassa* dilaksanakan pada bulan Mei – Juli 2019 di Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis profil darah merah dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan Kota Semarang.

#### 3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian yaitu 200 ekor *day old chick* (DOC) ayam broiler (*unsex*) strain *Lohmann* yang diproduksi oleh PT. Japfa Comfeed Indonesia dengan bobot awal rata-rata  $46,28 \pm 0,86$  g. Kandang yang digunakan adalah kandang komunal yang berukuran  $1 \text{ m} \times 1 \text{ m}$  dengan jumlah 20 petak, sehingga setiap unit percobaan berisi 10 ekor ayam.

Peralatan yang digunakan meliputi tempat pakan, tempat minum, lampu 100 watt sebagai pemanas untuk ayam umur 1 – 7 hari dan lampu 40 watt untuk ayam umur 8 – 35 hari pada setiap petak, *thermohigrometer* untuk mengukur suhu dan kelembaban kandang, timbangan digital untuk menimbang ayam dan pakan, sekop untuk membersihkan *litter*, kapur untuk pengapuran awal sebelum *chick in* dan untuk menyerap ammonia pada *litter* selama pemeliharaan,  $\text{KMnO}_4$  dan formalin untuk fumigasi, desinfektan untuk pencegahan penularan penyakit dan alat tulis. Perlengkapan untuk pengambilan darah meliputi *sprit* 3 ml, kapas, alkohol,

*vacutainer* yang berisi *Ethylene Diamine Tetra Aceticacid* (EDTA) dan *cooling box*. Bahan yang digunakan antara lain kapang *Chrysonilia crassa*, nasi aking untuk substrat peremajaan kapang, onggok, daun Kelor, vaksin *Newcastle Disease-Infectious Bronchitis* (ND-IB) dan Gumboro, vitachick, air minum serta ransum pakan *starter* dan *finisher*.

### **3.2. Metode**

Metode penelitian yang dilakukan meliputi rancangan percobaan, prosedur penelitian dan analisis data.

#### **3.2.1. Rancangan percobaan**

Rancangan percobaan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan yang diberikan yaitu :

T1 : Ransum basal

T2 : Ransum basal + 0,1% antibiotik *zinc bacitracin*

T3 : Ransum + 20% fermentasi campuran onggok dan tepung daun Kelor

T4 : Ransum + 20% fermentasi campuran onggok dan tepung daun Kelor + 0,1% probiotik *B. subtilis*

Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah jumlah total eritrosit, kadar hemoglobin, persentase hematokrit dan indeks eritrosit (MCV, MCH dan MCHC).

### 3.2.2. Prosedur penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari tahap persiapan, tahap pemeliharaan dan tahap pengambilan data. Tahap persiapan kandang dimulai dengan pembersihan kotoran yang berada di dalam maupun luar kandang, kemudian dilanjutkan dengan pencucian lantai kandang. Langkah berikutnya yaitu pembuatan petak-petak kandang komunal menggunakan bambu dengan ukuran  $1 \times 1 \text{ m}^2$  sebanyak 20 unit dan kemudian melakukan pengapuran pada lantai serta dinding kandang. Tirai kemudian dipasang pada setiap sisi kandang serta pemasangan instalasi listrik. Langkah selanjutnya yaitu melakukan pencucian tempat pakan dan tempat minum serta melakukan penaburan sekam sebagai alas kandang. Fumigasi kandang dilakukan dengan cara pengasapan menggunakan formalin dan  $\text{KMNO}_4$  serta dilakukan pada kandang yang tertutup.

Persiapan pakan dimulai dengan peremajaan kapang *C. crassa*. Peremajaan kapang diawali dengan pembuatan medium PDA menggunakan bahan yang terdiri dari 500 ml filtrat kentang, 10 g *dextrose*, 10 g serbuk agar, 125 mg antibiotik *chloramphenicol*. Bahan-bahan kemudian dicampur dan disterilisasi basah dengan menggunakan *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 2 atm. Medium PDA yang sudah disterilisasi kemudian dituang dalam cawan petri steril sebanyak  $\pm 20 \text{ ml}$  dan dibiarkan hingga padat. Langkah selanjutnya yaitu peremajaan *C. crassa* dari isolat ke dalam medium PDA dan diinkubasi selama 2 hari secara aerobik. Pemanenan dilakukan dengan cara 10 cawan petri yang berisi kultur ditambah dengan 10 ml aquades. Aquades dan kapang *C. crassa* lalu diambil dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang sudah disterilisasi.

*Starter/inokulum* dibuat dengan cara menambahkan nasi aking sebanyak satu kg dengan 100 ml *C. crassa* yang sudah dipanen, kemudian diaduk hingga merata. Nasi aking berfungsi sebagai substrat bagi pertumbuhan kapang *C. crassa*. Nasi aking yang sudah ditambahkan *C. crassa* kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang hingga terlihat kapang berwarna orange. Kapang kemudian dijemur di bawah sinar matahari hingga kering, kemudian dihaluskan menggunakan blender.

Tahap selanjutnya yaitu penyediaan onggok sebagai bahan utama pakan yang dibeli dari daerah Pati dan Boyolali, sedangkan daun Kelor dibeli melalui *online shop* dari daerah Sragen dalam keadaan kering udara. Daun Kelor kemudian dijemur hingga kering di dalam ruangan tanpa terkena sinar matahari. Daun Kelor yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan *grinder* tipe *disk mill* dan diayak menggunakan saringan tepung.

Pembuatan pakan fermentasi dilakukan dengan menggunakan onggok, tepung daun Kelor serta kapang *C. crassa*. Fermentasi dilakukan dengan cara sebanyak 60% onggok dimasukkan ke dalam *plastic bag* kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan *steamer* selama 60 menit dengan suhu 100° C, onggok dikeluarkan dari *steamer* dan kemudian dibiarkan hingga mencapai suhu ruang. Onggok yang sudah disterilisasi kemudian ditambah dengan tepung daun Kelor sebanyak 35% dan starter *C. crassa* sebanyak 5% lalu digojok hingga homogen. Fermentasi dilakukan secara *aerob* dengan cara *plastic bag* dilubangi dan diletakkan pada suhu ruang selama 4 hari tanpa dibolak-balik. Pemanenan dilakukan pada hari ke 4 yaitu pada saat pertumbuhan kapang mengalami fase

eksponensial atau fase pertumbuhan optimum kapang, pakan yang terfermentasi kemudian dijemur hingga diperoleh kadar air  $\pm$  14%. Kandungan nutrisi onggok, tepung daun Kelor dan fermentasi keduanya disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi Nutrien Onggok, Tepung Daun Kelor dan Fermentasi Tepung Daun Kelor dan Onggok

Komposisi nutrien (%)	Onggok	Tepung daun Kelor	Fermentasi tepung daun Kelor dan onggok
Kadar Air <sup>1</sup>	11,00	11,10	8,75
Protein Kasar <sup>1</sup>	2,24	29,90	17,60
Lemak Kasar <sup>1</sup>	0,91	5,38	4,41
Serat Kasar <sup>1</sup>	31,80	13,20	9,01
Abu <sup>1</sup>	3,65	12,60	10,10
Energi Metabolis (kcal/kg) <sup>2</sup>	2.434	2.975	3.170

Sumber :

<sup>1</sup>Analisis Proksimat Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Universitas Diponegoro (2019)

<sup>2</sup>Hasil dari perhitungan dengan menggunakan rumus Balton (Siswohardjono, 1982)

EM = 40,81 (0,87 (PK + 2,25LK + BETN) + 2,5)

Ransum disusun dengan perhitungan kebutuhan nutrisi ayam broiler pada fase *starter* dan *finisher*. Pembuatan ransum dimulai dengan membuat bahan pakan fermentasi yang ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Persentase Pembuatan Bahan Pakan Fermentasi

Bahan Fermentasi	Kadar -----(%)-----
Onggok	60,00
Tepung Daun Kelor	35,00
Kapang <i>Chrysonilia crassa</i>	5,00
Total	100,00

Campuran tersebut kemudian digunakan sebagai bahan pakan dengan komposisi sesuai dengan Tabel 6.

Tabel 6. Bahan Pakan, Persentase Penggunaan Pakan Basal dan Nutrisi Bahan Pakan Perlakuan

Bahan Pakan	Persentase Bahan Ransum			
	<i>Starter</i>		<i>Finisher</i>	
	T1 dan T2	T3 dan T4	T1 dan T2	T3 dan T4
	-----%-----			
MBM	4,70	4,25	2,35	2,25
Jagung Kuning	54,80	38,50	58,50	42,39
<i>Soybean Oil</i>	1,55	1,75	3,25	3,35
Bungkil Kedelai	35,70	32,25	32,65	28,76
Onggok & kelor fermentasi	0	20,00	0	20,00
DL-methionin	0,30	0,30	0,30	0,30
L-Lysine	0,20	0,20	0,20	0,20
Limestone	0,50	0,50	0,50	0,50
<i>Dicalcium phosphate</i>	1,50	1,50	1,50	1,50
Premix	0,50	0,50	0,50	0,50
NaCl	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Kandungan Nutrisi</b>				
Protein Kasar (%) <sup>1</sup>	22,04	22,03	20,04	20,00
Serat Kasar (%) <sup>1</sup>	5,59	6,27	5,54	6,23
Energi Metabolis (Kal/g) <sup>2</sup>	2.901	2.900	3.063	3.056

Sumber :

<sup>1</sup>Hasil Perhitungan Formulasi Ransum<sup>2</sup>Hasil dari perhitungan dengan menggunakan rumus Balton (Siswohardjono, 1982)

EM = 40,81 (0,87 (PK + 2,25LK + BETN) +2,5)

Tahap pemeliharaan ayam broiler dilakukan selama 35 hari mulai dari DOC. Ayam broiler diberikan pakan komersial pada umur 1 – 7 hari pemeliharaan dan pakan perlakuan mulai diberikan pada saat ayam berumur 8 hari. Pemberian pakan dan minum dilakukan secara *ad libitum*. Pencatatan pemberian pakan dilakukan setiap hari dan penimbangan sisa pakan dilakukan setiap minggu untuk menghitung konsumsi pakan rata-rata. Penimbangan bobot badan dilakukan setiap seminggu sekali untuk memperoleh pertambahan bobot badan harian (PBBH). Pemberian vaksin dilakukan pada pemeliharaan hari ke-4 dan hari ke-14 dengan vaksin ND IB serta hari ke-21 dengan vaksin Gumboro.

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-34, setiap unit percobaan diambil sampel sebanyak 1 ekor ayam broiler. Darah ayam diambil melalui *vena brachialis* sebanyak  $\pm 0,5$  ml dengan menggunakan *sprit* berukuran 3 cc. Sampel darah kemudian dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* yang berisi antikoagulan EDTA lalu digojok dan segera dimasukkan ke dalam *cooling box* yang berisi *ice pack* untuk menghindari kerusakan sampel darah.

Analisis sampel darah dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Hewan Kota Semarang untuk mengetahui parameter total eritrosit, hemoglobin, hematokrit dan indeks eritrosit (MCV, MCH dan MCHC). Pengukuran total eritrosit dan konsentrasi hematokrit dilakukan dengan menggunakan alat PRIMA<sup>®</sup> fully-auto Hematology Analyzer dan menggunakan metode *Electrical Impedance*. Pengukuran kadar hemoglobin menggunakan metode *Cyanide Free Hemoglobin Spectrophotometry* pada alat Hematology Analyzer. Nilai indeks eritrosit diperoleh dengan perhitungan yang menggunakan rumus sebagai berikut (Swenson dan Wiliam, 1993) :

- *Mean Corpuscular Volume* (MCV)

$$\text{MCV (fl)} = \frac{\text{Hematokrit} \times 10}{\text{Total eritrosit}}$$

- *Mean Corpuscular Hemoglobin* (MCH)

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{Hemoglobin} \times 10}{\text{Total eritrosit}}$$

- *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration* (MCHC)

$$\text{MCHC (\%)} = \frac{\text{Hemoglobin} \times 100}{\text{Hematokrit}}$$

### 3.2.3. Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) pada taraf 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Perlakuan yang memberikan pengaruh yang signifikan akan dilanjutkan dengan Uji *Duncan* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Model linier yang digunakan menurut Freund dan Wilson (2003) adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

$Y_{ij}$  : Hasil pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu$  : Nilai tengah umum (rata-rata populasi) hasil pengamatan

$\tau_i$  : Pengaruh perlakuan ke-i

$\varepsilon_{ij}$  : Pengaruh aditif dari galat percobaan yang mendapatkan perlakuan ke-i ulangan ke-j

Hipotesis statistika yang diterapkan yaitu :

$H_0$  :  $\tau_i = 0$ , tidak ada pengaruh perlakuan pemberian pakan kombinasi tepung daun Kelor dan onggok yang difermentasi dengan *C. crassa* terhadap profil eritrosit ayam broiler.

$H_1$  :  $\tau_i \neq 0$ , ada pengaruh perlakuan pemberian pakan kombinasi tepung daun Kelor dan onggok yang difermentasi dengan *C. crassa* terhadap profil eritrosit ayam broiler.

Kriteria pengujian :

F hitung < F tabel maka  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak

F hitung  $\geq$  F tabel maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima