

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian berjudul “Pengaruh Metode Pemberian Probiotik *Lactobacillus* sp. terhadap Total Bakteri Asam Laktat, *Coliform* dan Bakteri Gram Usus Halus Ayam Broiler” dilaksanakan pada November 2018 – Juni 2019. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang.

#### **3.1. Materi Penelitian**

Materi yang akan digunakan adalah 200 ekor *Day Old Chicken* (DOC) ayam broiler dengan bobot awal rata-rata  $46,97 \pm 8,5$  g dari PT. Charoen Pokphand, Tbk. strain Cobb *unsex*, probiotik *Lactobacillus* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang (Jannah *et al.*, 2018) dan pakan komersial BR-1 dan BR-IAJ tanpa AGP dari PT. Charoen Pokphand, Tbk (Tabel 1) dan air minum. Peralatan yang digunakan adalah kandang yang berisi 20 pen dengan alas sekam, lampu sebagai penerangan dan penghangat, tempat pakan dan air minum, timbangan untuk menimbang bobot ayam dan pakan, alat *force feeding* sebagai alat bantu memasukkan probiotik menuju tembolok, *mixer* untuk mencampur pakan dengan probiotik, *spiritus* dan alkohol sebagai sterilisasi saat melakukan perlakuan, termohigrometer untuk mengukur suhu dan kelembaban, pH meter digital untuk mengukur pH cairan digesta, pisau, nampan, dan plastik sebagai alat bedah ayam broiler.

Alat yang digunakan untuk analisis bakteri adalah oven untuk sterilisasi alat, erlenmeyer sebagai tempat media, cawan petri untuk tempat kultur bakteri, inkubator sebagai tempat inkubasi bakteri, tabung reaksi sebagai tempat sampel, pipet untuk mengambil dan memindahkan sampel, *counter* untuk menghitung bakteri yang tumbuh. Medium yang digunakan adalah *Cromucult Coliform Agar* (CCA) untuk *Coliform* dan *deMann Rogosa Sharpe Agar* (MRS) untuk BAL.

Tabel 1. Kandungan Nutrisi Pakan BR-1 dan BR-IAJ

Komposisi	Proporsi	
	BR-1	BR-IAJ
Kadar air (%)	13	13
Protein kasar (%)	21-23	20,5-22,5
Lemak kasar (%)	5	5
Serat kasar (%)	5	5
Abu (%)	7	7
Calcium (%)	0,9	0,9
Phospor (%)	0,6	0,6
Energi Metabolisme (kkal/kg)	3.025-3.150	4.100 <sup>*)</sup>

Sumber : Label Kandungan Nutrisi Pakan PT. Charoend Pokphand, Tbk.; <sup>\*)</sup> Putra *et al.* (2018)

### 3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian dibagi menjadi empat, yaitu rancangan penelitian, prosedur penelitian, pengumpulan data, dan parameter penelitian.

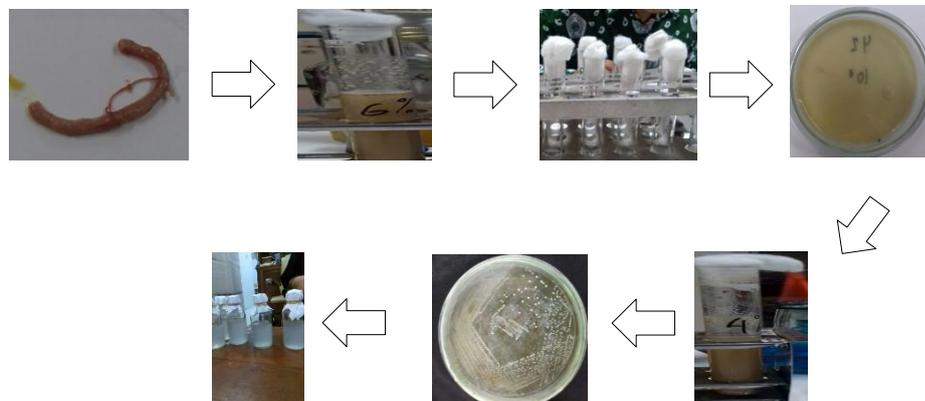
#### 3.2.1. Rancangan percobaan

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan (T0, T1, T2, T3) dan 5 ulangan, tiap unit percobaan terdiri dari 10 ekor ayam broiler. Perlakuan yang diterapkan adalah metode pemberian probiotik *Lactobacillus* sp. yang berbeda, yaitu :

- T0 : tanpa pemberian probiotik
- T1 : pemberian probiotik melalui *force feeding*
- T1 : pakan dengan penambahan probiotik
- T3 : air minum dengan penambahan probiotik

### 3.2.2. Prosedur penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari 3 tahap, yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap analisis. Tahap persiapan dimulai dari mempersiapkan probiotik *Lactobacillus* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro. Alur persiapan probiotik dapat dilihat pada Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Alur Persiapan Probiotik

Pembuatan probiotik *Lactobacillus* sp. dimulai dari isolasi bakteri asam laktat dari usus ayam  $\pm 10$  cm dihancurkan, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis 4,5 ml dan dihomogenkan. Larutan diambil sebanyak 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam MRS Broth 4,5 ml, dihomogenkan, dan

diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Larutan diambil sebanyak 0,5 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi NaCl fisiologis 4,5 ml dan dilakukan pengenceran sampai pengenceran 10<sup>-7</sup>. Pada pengenceran 10<sup>-6</sup> dan 10<sup>-7</sup>, masing-masing diambil 0,5 ml dan dikultur pada MRS agar, diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C, dan dilakukan pengamatan hasil kultur. Subkultur dilakukan pada MRS cair 4,5 ml dan diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C. Subkultur dikultur kembali di MRS agar untuk mendapatkan *Lactobacillus* sp. murni dan diinkubasi. Bakteri yang tumbuh diinokulasi ke dalam MRS Broth, diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C dan dihitung total koloni dengan konsentrasi 1,5 x 10<sup>8</sup> cfu/ml berdasarkan metode *Standard Plate Count* (SPC). Persiapan kandang meliputi pembersihan kandang, pengapuran dan fumigasi menggunakan formalin, persiapan tempat pakan dan air minum, serta pemasangan lampu, tirai, dan persiapan pakan komersial.

Tahap pelaksanaan dimulai dari DOC yang baru datang diberikan larutan air gula. Setiap pen terdiri dari 10 ekor ayam dengan 1 tempat pakan dan minum. Pemeliharaan dilakukan selama 30 hari. Pemberian pakan dilakukan 2 kali dalam sehari dan air minum dilakukan secara *ad libitum*. Perlakuan metode pemberian probiotik dapat dilihat pada Ilustrasi 2.



Ilustrasi 2. Metode Pemberian Probiotik Perlakuan T1, T2, dan T3.

Pemberian perlakuan untuk T0 tidak diberikan probiotik, T1 diberikan secara *force feeding* menggunakan spuit sebanyak 1 ml/ekor/2 hari pada fase starter dan 1ml/ekor/3 hari pada fase finisher di pagi hari, T2 diberikan melalui campuran pakan sebanyak 2% / 100 g pakan dan dicampur dengan menggunakan *mixer* sebelum diberikan kepada ternak, dan T3 diberikan melalui campuran air minum sebanyak 2% / 100 ml air minum yang akan diberi sebelum diberikan kepada ternak. Penerapan perlakuan dimulai dari ke-1 dan dilaksanakan selama 30 hari. Tahap analisis dilakukan setelah pengambilan data yang diambil pada akhir pemeliharaan.

### **3.2.3. Pengumpulan data dan parameter yang diamati**

Pengumpulan data dimulai dari pengambilan data pada hari ke- 30 dengan mengambil 20 ekor sebagai sampel, masing-masing 1 ekor/ unit perlakuan. Sampel ayam disembelih dan diambil saluran pencernaannya dan usus halus dipisahkan. pH sampel digesta diukur dengan menggunakan pH meter digital (Sjofjan *et al.*, 2005). Sampel digesta usus halus dimasukkan ke dalam plastik klip dan dibawa ke laboratorium Mikrobiologi Analis Kesehatan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang untuk pengujian. Persiapan media dilakukan sebagai tempat kultur bakteri. Sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisikan 9 ml aquades, dihomogenisasi, diencerkan sampai pengenceran  $10^{-8}$ . Sampel tersebut ditanam pada cawan petri yang berisi media CCA untuk identifikasi *Coliform*, MRSA

untuk bakteri asam laktat, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk *Coliform* dan 48 jam untuk bakteri asam laktat.

Perhitungan total bakteri asam laktat dan *Coliform* dilakukan dengan menggunakan metode hitung *Standard Plate Count* (Fardiaz, 1993) :

$$\text{Total bakteri} = \text{total koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

### 3.3. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA), dengan uji F untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter dengan taraf signifikansi 5%. Uji Jarak Berganda Duncan dilakukan bila ada pengaruh perlakuan yang nyata untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (Steel dan Torrie, 1991).

Model linear untuk rancangan acak lengkap adalah sebagai berikut:

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

Keterangan :

- $Y_{ij}$  : total bakteri asam laktat dan *Coliform* pada usus halus ayam ke-i yang memperoleh perlakuan metode pemberian probiotik *Lactobacillus* sp. ke-j
- $I$  : perlakuan ke 1, 2, 3
- $J$  : ulangan ke 1, 2, 3
- $\mu$  : nilai tengah umum perlakuan
- $\tau_i$  : pengaruh perlakuan metode pemberian probiotik *Lactobacillus* sp. ke-i
- $\varepsilon_{ij}$  : Pengaruh galat percobaan pada total bakteri asam laktat dan *Coliform* pada usus halus ayam broiler ke-i yang memperoleh perlakuan metode pemberian probiotik *Lactobacillus* sp. ke-j

Hipotesis statistika sebagai berikut :

H<sub>0</sub> :  $\tau_i = 0 \rightarrow$  tidak ada pengaruh metode pemberian probiotik *Lactobacillus* sp. terhadap total bakteri asam laktat dan *Coliform* usus halus ayam broiler.

H<sub>1</sub> :  $\tau_i \neq 0 \rightarrow$  minimal ada satu perlakuan yang memberikan pengaruh terhadap total bakteri asam laktat dan *Coliform* usus halus ayam broiler.

Kriteria penerimaan dan penolakan hipotesis:

Jika F Hitung < F tabel maka H<sub>0</sub> diterima dan H<sub>1</sub> ditolak.

Jika F Hitung  $\geq$  F tabel maka H<sub>0</sub> ditolak dan H<sub>1</sub> diterima.