

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 21 Juli 2014 sampai dengan 24 Agustus 2014 dan penelitian lanjutan pada bulan Desember 2014 sampai dengan Januari 2015 di Peternakan Ayam Petelur CV Varia Agung, Desa Varia Agung Kecamatan Seputih Mataram, Lampung Tengah.

Pembuatan Probiotik Lokal dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Analisis kolesterol kuning telur dilakukan di Laboratorium Balai Besar Industri Agro (BBIA) di Bogor, analisis lemak kuning telur dan bobot telur dilakukan di Laboratorium Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

Analisis kolesterol lengkap darah ayam dilakukan di Laboratorium Kesehatan Kosasih Bandar Lampung.

### 3.2 Alat dan Bahan

Seperangkat alat untuk analisis proksimat bahan ransum, analisis kadar lemak, analisis kadar kolesterol kuning telur, dan analisis kadar kolesterol lengkap darah ayam.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, wadah plastik, tampah bambu, plastik, autoklaf untuk menetralkan suatu benda menggunakan uap ( $121^{\circ}\text{C}$ ) selama  $\pm 15$  menit; inkubator berfungsi untuk menginkubasi atau memeras mikroba pada suhu yang terkontrol, kemasan plastik biasa; plastik tahan panas; aluminium foil; kertas kopi; kertas HVS; refrigerator; cawan petri; tabung reaksi; mikropipet; dan oven.

Tabung darah yang mengandung *Ethylen-Diamine-Tetraacetic-Acid* (EDTA), alat tulis untuk melakukan pencatatan spuit 3cc; cooler box atau termos es untuk menyimpan sampel darah.

Bahan yang digunakan adalah ayam petelur (layer) umur kira-kira 43 minggu *strain Isa Brown*. Ayam yang digunakan sebanyak 36 ekor yang ditempatkan dalam *cage*, dan masing-masing *cage* terdiri dari 2 ekor. Sistem pemeliharaan layer dengan menggunakan kandang panggung yang terbuat dari bilah kayu.

Ransum ayam petelur fase *layer* berbentuk *mash* dengan komposisi konsentrat (Top 36-PT CARGIL) 35%, jagung (50%), bekatul (14%), dan premix (1%).

Probiotik komersial yang digunakan yaitu produk Han Poong Industry Co, LTD dari Korea dengan nama dagang Soluble Organik Green Culture ZS. Probiotik komersial ini adalah campuran probiotik (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, dan *Aspergillus oryzae*). Probiotik lokal dengan komposisi (*Saccharomyces sp*, *Bacillus sp*, dan *Rhizopus sp*).

### **3.3 Tahapan Penelitian**

#### **3.3.1 Pembuatan Probiotik Lokal**

##### **3.3.1.1 Pembuatan Inokulum *Saccharomyces*, *Rhizopus sp*, dan bakteri *Bacillus***

Merica dan cabai dihaluskan kemudian diayak. Bawang putih dan lengkuas dihaluskan dan ditambahkan lagi ke dalamnya hingga rata. Ketan putih direndam semalam, lalu ditiriskan. Kemudian ditumbuk sampai halus lalu diayak. Bumbu dan tepung tersebut kemudian dicampur hingga rata, lalu tambahkan air dan gula pasir, aduk rata sampai menjadi adonan yang mudah dibentuk, tetapi adonan tidak terlalu basah. Kemudian adonan dibentuk menjadi bulatan-bulatan pipih ( diameter  $\pm$  4 cm). Bulatan tersebut lalu diletakkan pada tampah bambu yang telah diberi alas merang padi, kemudian dibagian atas ditaburi dengan *Saccharomyces*, *Mucor*, dan bakteri *Bacillus* penghasil enzim hidrolitik yang sudah terseleksi. Tahap berikutnya ditutup dengan daun pisang atau lembaran plastik dan diinkubasi selama  $\pm$  2 malam agar mikroba tumbuh. Kemudian dijemur hingga kering di bawah sinar matahari selama  $\pm$  2 - 5 hari atau di atas tungku jika musim hujan.

##### **3.3.1.2 Pembuatan inokulum (*Rhizopus sp*)**

Ampas kelapa disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit. Setelah selesai didinginkan, kemudian ditaburi dengan biakan kapang *Rhizopus sp* secukupnya. Setelah tercampur rata dibungkus dengan plastik atau daun. Kemudian diinkubasi selama 2 – 3 hari. Setelah padat lalu jemur di bawah sinar matahari.

##### **3.3.1.3 Tahap Akhir**

Pada tahap ini dilakukan pembuatan probiotik lokal yang merupakan pencampuran semua inokulum tersebut dengan menambahkan aquades steril dan kemudian dikeringkan lagi. Probiotik tersebut berwarna putih yang mengandung campuran mikroba yang menguntungkan. Mikroba tersebut berupa kapang (*Rhizopus sp.*), yeast

(*Saccharomyces sp.*), dan bakteri (*Bacillus sp.*) penghasil enzim amilase dan selulase.

Hasil penelitian Sumardi, *et al.* (2010) menunjukkan bahwa mikroba tersebut dapat menurunkan populasi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.*

### 3.4 Persiapan Ransum Percobaan

Ransum yang digunakan pada penelitian ini adalah ransum penelitian (ransum kontrol) yang digunakan di peternakan CV Varia Agung Jaya. Formula ransum terdiri dari komposisi konsentrat (Top 36-PT CARGIL) 35%, jagung (50%), bekatul (14%), dan premix (1%). Dari hasil perhitungan berdasarkan hasil proksimat terhadap pakan diperoleh kandungan protein kasar sebesar 14,90% atau 15%. Menurut SNI 01-3929-2006, kebutuhan protein kasar pada ransum ayam petelur adalah tidak kurang 15%. Hasil analisis proksimat disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Kandungan nutrisi bahan pakan

Zat makanan	Bekatul	Konsentrat	Jagung kuning
Kadar air (%)*	12,54	6,91	10,51
Protein kasar (%)*	8,71	28,74	6,94
Lemak kasar (%)*	9,55	8,60	6,71
Serat kasar (%)*	12,52	3,67	2,51
Abu (%)*	10,86	23,79	1,78
Bahan EkstraTanpa Nitrogen (%)*	45,94	28,31	71,56
Energi Metabolis (kkal/kg)	2.860**	2.710,93***	3.370**

Sumber: \*Hasil analisis proksimat di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak, Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Unila, 2014

\*\*Fathul et al. (2013)

\*\*\*Hasil perhitungan 70% dari energi bruto (Patrick dan Schaible, 1980)

Tabel 2. Kandungan nutrisi ransum basal

<b>Nutrisi</b>	<b>Kandungan</b>
Kadar air (%)*	12,54
Protein kasar (%)*	8,71
Lemak kasar (%)*	9,55
Serat kasar (%)*	12,52
Abu (%)*	10,86
Bahan EkstraTanpa Nitrogen (%)*	45,94
Energi Metabolis (kkal/kg)	2.860**

Sumber: \*Hasil analisis proksimat di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak, Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Unila, 2014

\*\*Fathul et al. (2013)

\*\*\*Hasil perhitungan 70% dari energi bruto (Patrick dan Schaible, 1980)

Ransum yang digunakan berbentuk *mash*, konsumsi ayam sebanyak 110g/ekor/hari, kemudian ditambahkan probiotik sesuai dengan perlakuan.

### 3.5 Persiapan Kandang

- a. Kandang penelitian ayam petelur fase layer disiapkan sebanyak 40 petak dengan ukuran 26 x 30 x 15 cm;
- b. Peralatan kandang, seperti tempat pakan dan tempat minum, disanitasi;
- c. Kandang disanitasi dan didesinfeksi;
- d. Pemasangan peralatan sesuai dengan petak kandang dan penyemprotan dengan desinfektan dilakukan setelah kandang mengering.

### 3.6 Kegiatan Penelitian

- a. Ayam dimasukkan ke dalam 20 petak kandang, dengan masing-masing petak berisi 2 ekor ayam
- b. *Prelimum* dilakukan untuk adaptasi ransum perlakuan selama 6 hari;
- c. Ransum diberikan sesuai dengan perlakuan 2 kali sehari yaitu pukul 07.00 WIB dan pukul 14.00 WIB;
- d. Air minum diberikan secara *ad libitum*;
- e. Pemeliharaan dilakukan selama 4 minggu;
- f. Dilakukan kegiatan pengambilan sampel darah, dan
- g. Dilakukan kegiatan pengambilan sampel telur ayam

Pengambilan sampel darah dilakukan pada minggu ketiga penelitian. Setiap petak kandang diambil sebanyak satu ekor ayam untuk diambil sampel darahnya. Tahap pertama, posisi ayam harus dalam posisi berbaring dan kondisi ayam tenang, lalu memegang kepala ayam ke satu sisi dan membuka bagian sayapnya. Tahap kedua, mencari titik pada tubuh ayam yang memiliki banyak pembuluh darah sehingga akan mempermudah dalam pengambilan sampel darah. Bagian tersebut sebelumnya dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol, yang bertujuan untuk menghindari adanya bakteri, selain itu dapat meminimalisir terjadinya infeksi pada ternak setelah dilakukan pengambilan sampel darah. Tahap ketiga, darah diambil dengan cara memasukkan jarum suntik ke *vena brachialis* dengan posisi jarum yang runcing berada di bawah (posisi jarum menengadah ke atas) supaya darah dapat terhisap oleh tabung hisap. Pada saat jarum suntik masuk ke dalam pembuluh darah, diusahakan alat suntik jangan bergerak

karena dapat merobek pembuluh darah pada ayam dan dapat mengakibatkan pembengkakan pada bagian tersebut akibat pembuluh darah yang pecah/ robek. Apabila hal ini terjadi dapat membahayakan ayam dan kesehatannya akan terganggu akibat rasa sakit yang ditimbulkan dari bagian yang bengkak. Selain itu, ujung jarum suntik disarankan masuk ke dalam vena, tetapi jangan sampai melukai bagian yang lain. Darah diambil sebanyak 2 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung darah yang mengandung EDTA untuk menghindari pembekuan darah, kemudian disimpan dalam *cooler box* atau termos es sampai dilakukan analisis. Sampel darah langsung dibawa ke Laboratorium Kesehatan Kosasih, Rajabasa Bandar Lampung.

Prosedur penetapan kadar kolesterol lengkap darah ayam menggunakan fotometer dengan metode CHOD-PAP (Cholesterol Oxidase-Peroxidase Aminoantipyrine Phenol) dengan panjang gelombang 546 dan suhu 37°C sebagai berikut:

1. Kolesterol total

500µl reagen + 5µl standar/sampel, diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit, lalu dibaca dengan alat fotometer dengan menu CHOL-s.

2. Trigliserida

500µl reagen + 5µl standar/sampel, diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit, lalu dibaca dengan alat fotometer dengan menu TRIG.

3. HDL (Reagen selavo)

Supernatan : 50µl reagen HDL + 500 µl serum diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, lalu disentrifuge selama 15 menit.

Blanko : 500µl Reagen Chol + 10µl aquadest

Sampel : 500µl Reagen Chol + 10µl supernatan

Kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit, lalu dibaca pada alat dengan menu HDL-Chol.

4. LDL dihitung dengan cara indirek :

(TRIG : 5 + HDL) – Chol. Jika Triglicerida yang didapat nilainya lebih dari 500mg/dL, maka LDL tidak dapat dihitung.

Pengambilan sampel kuning telur ayam dilakukan pada minggu keempat penelitian dan dianalisis kadar lemaknya di Laboratorium Produksi Ternak, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung

Tahapan yang dilakukan dalam mengukur lemak kuning telur adalah :

Kertas saring (6 x 6 cm<sup>2</sup>) dipanaskan di dalam oven 105°C selama 6 jam, kemudian didinginkan di dalam desikator selama 15 menit. Kertas saring (A) ditimbang, lalu ditambahkan sampel kuning telur ± 0,1 gram kemudian ditimbang bobot kertas sampel yang sudah ditambahkan sampel kuning telur (B). Kertas saring lalu dilipat, kemudian dipanaskan di dalam oven 105°C selama 6 jam, kemudian didinginkan di dalam desikator selama 15 menit, lalu ditimbang lagi bobotnya (C). Lalu kertas saring berisi sampel dimasukkan ke dalam soxhlet (ekstraktor), lalu dihubungkan dengan labu didih, kemudian dimasukkan 300 ml pertoleum eter atau chloroform ke dalam soxhlet, lalu di hubungkan dengan kondensor dan dialirkan air ke dalam kondensor. Kemudian dididihkan selama 6 jam (dihitung mulai dari mendidih), setelah itu matikan alat pemanas, dan aliran air dihentikan . Lipatan kertas saring berisi residu dipanaskan di dalam oven 105°C selama 6 jam, kemudian didinginkan di dalam desikator selama 15 menit, dan ditimbang bobotnya (D). Analisis dilakukan secara duplo. Kadar lemak dihitung dengan rumus :



$$KL (\%) = \frac{(C-A) - (D-A)}{B-A} \times 100 \%$$

Keterangan:

KL = Kadar lemak (%);

A = Bobot kertas saring (gram);

B = Bobot kertas saring berisi sampel sebelum dipanaskan (gram);

C = Bobot kertas saring berisi sampel sesudah dipanaskan (gram);

D. = Bobot kertas saring berisi residu sesudah dipanaskan (gram);

### 3.7 Perlakuan Penelitian

Perlakuan penelitian tahap pertama dengan menggunakan 3 perlakuan pemberian probiotik dalam ransum dengan 6 kali ulangan, setiap ulangan digunakan 2 ekor ayam petelur, sehingga terdapat 36 ekor unit percobaan.

Perlakuan dalam penelitian ini sebagai berikut :

P0 : Ransum Kontrol (tanpa pemberian probiotik);

PL : Ransum + 3% probiotik local;

PK : Ransum + 3% probiotik komersial.

Pada penelitian ini dilakukan uji probiotik lokal pada ayam petelur (layer), dan dibandingkan dengan probiotik komersial. Pengaruh penambahan probiotik terhadap kadar kolesterol kuning telur dilakukan selama 5 minggu. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kolesterol kuning telur dan bobot telur ayam.

Penelitian tahap kedua dengan menggunakan 4 perlakuan , setiap perlakuan diulang 5 kali, dan masing-masing petak kandang berisi 2 ekor ayam. Keempat perlakuan tersebut adalah:

P0 : Ransum tanpa penambahan probiotik (0%);

P1 : Ransum + probiotik (1%);

P2 : Ransum + probiotik (2%);

P3 : Ransum + probiotik (3%).

Parameter yang diamati dalam penelitian tahap kedua adalah kolesterol darah ayam yaitu kolesterol total HDL, LDL, dan trigliserida serta analisis lemak kuning telur.

### **3.8 Analisis Data**

Data dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam dari Rancangan Acak Lengkap (RAL). Apabila terdapat perbedaan di antara perlakuan maka dilanjutkan dengan Uji Polynomial Orthogonal pada taraf 5% (Steel dan Torrie, 1992).

### 3.9 Bagan Alir Penelitian

Secara terperinci tahap pelaksanaan penelitian dengan menggunakan bagan alir sebagai berikut:

