

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimen yaitu penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003:63).

B. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena penelitian dilakukan di laboratorium atau rumah kaca dimana cuaca dapat dikontrol dengan kondisi yang relatif homogen (Nazir, 2003:235). Secara acak ayam-ayam dikelompokkan pada setiap kelompok kontrol dan perlakuan.

Setiap perlakuan dalam penelitian ini mendapatkan pengulangan yang diperoleh dari rumus pengulangan RAL sebagai berikut (Gomez dan Arturo, 1995):

$$(t)(r) - 1 \geq 20$$

$$(4)(r) - 1 \geq 20$$

$$4r - 4 \geq 20$$

$$4r \geq 24$$

$$r \geq 6$$

Keterangan:

t = perlakuan

r = pengulangan

Berdasarkan rumus tersebut, maka jumlah pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebanyak enam ekor. Setiap kotak diberi tanda dan nomor untuk ayam. Penempatan perlakuan pada setiap kandang dilakukan randomisasi. Setelah dilakukan randomisasi maka didapat penempatan perlakuan pada setiap kandang. Penempatan semua ayam perlakuan untuk setiap kandang dapat dilihat pada Tabel 3.1 di bawah ini.

Tabel 3.1 Pengaturan Randomisasi Ayam

1 A	2 A	3 A	4 D
5 C	6 A	7 D	8 B
9 D	10 C	11 B	12 C
13 C	14 B	15 D	16 B
17 A	18 C	19 B	20 D
21 D	22 A	23 B	24 C

Kandang	No. Ayam					
A	1	2	3	6	17	22
B	8	11	14	16	19	23
C	5	10	12	13	18	24
D	4	7	9	15	20	21

Keterangan:

Kandang 1 : diberi komposisi pakan A yang tidak mengandung tepung kulit pisang (kontrol)

Kandang 2 : diberi komposisi pakan B yang mengandung tepung kulit pisang sebesar 30%

Kandang 3 : diberi komposisi pakan C yang mengandung tepung kulit pisang sebesar 50%

Kandang 4 : diberi komposisi pakan D yang mengandung tepung kulit pisang sebesar 70%

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahapan yaitu pra-penelitian dan penelitian inti. Tahapan pra-penelitian terdiri dari persiapan alat dan bahan, persiapan kandang, pembuatan tepung kulit pisang raja bulu, pembuatan pakan buatan, pemeliharaan DOC (*Day Old Chick*) dan aklimatisasi. Tahapan selanjutnya adalah penelitian inti yang di dalamnya mencakup pemberian komposisi pakan yang berbeda, pengambilan sampel organ hati, pengukuran berat organ hati, dan analisis kadar kolesterol hati.

Komposisi pakan yang diberikan yaitu pakan A (pakan yang tidak mengandung tepung kulit pisang), B (pakan yang mengandung tepung kulit pisang sebesar 30%), C (pakan yang mengandung tepung kulit pisang sebesar 50%), dan D (pakan yang mengandung tepung kulit pisang sebesar 70%). Pakan yang diberikan berupa tepung (*mash*) yaitu 100 gr/ekor/hari sebanyak dua kali sehari yaitu pagi dan sore hari selama empat minggu, sedangkan pemberian air minum dilakukan secara *ad libitum*. Penimbangan bobot badan dilakukan setiap minggu. Setelah itu ayam percobaan dipotong kemudian dibedah untuk diambil organ hatinya. Organ hati ditimbang kemudian dilakukan pengukuran kadar kolesterol hati dengan menggunakan metode CHOP-PAP *Enzimatic Colorimeter Test for Cholesterol with Lipid Clearing Factor* (LCF) (Boehringer, 1993).

Analisis data meliputi analisis berat dan kadar kolesterol hati. Setelah memperoleh hasil kemudian data diolah dengan menggunakan program SAS (*Statistical Analysis System*). Langkah pertama yang dilakukan adalah menguji distribusi data dengan uji normalitas kemudian dilanjutkan uji homogenitas. Selanjutnya data diolah dengan analisis ragam (ANOVA) untuk menguji

signifikansi data. Jika terdapat perbedaan yang signifikan maka dilakukan dengan uji lanjutan yaitu Uji Duncan.

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah ayam broiler betina, sedangkan yang dijadikan sampel adalah organ hati 24 ekor ayam broiler yang berumur tujuh minggu.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan mulai bulan September-Desember 2009. Penelitian dilaksanakan di beberapa tempat. Pembuatan tepung kulit pisang dilakukan di Rumah Kontrakan. Pembuatan pakan buatan dilakukan di Subang. Pemeliharaan ayam broiler, pemberian perlakuan, dan pengambilan sampel organ hati dilakukan di Rumah Pemeliharaan Hewan, Subang. Analisis tepung kulit pisang dilakukan di Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, LPPM IPB. Analisis bahan pakan buatan dilakukan di Balai Penelitian Ternak, Ciawi. Penimbangan berat organ hati ayam broiler dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan, Jurusan Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI. Analisis kadar kolesterol hati ayam broiler dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi, FKH IPB.

E. Prosedur Kerja

1. Persiapan Kandang

Kandang ayam terbuat dari kayu dengan ukuran 7x5 meter dengan menggunakan lantai dari bilahan bambu. Kandang dibagi menjadi empat unit

kandang kecil dengan cara diberi sekat berukuran 1 m² dan diberi sekam padi sebagai alasnya. Sekam padi digunakan sebagai alas penutup untuk menyerap kotoran agar lantai tidak lembab dan basah serta proses dekomposisi kotoran ayam berlangsung sempurna. Alas kandang diganti setiap tiga hari sekali. Ketebalan alas kandang jangan lebih dari 8 cm untuk daerah dingin dan tidak lebih dari 5 cm untuk daerah panas karena bahan alas dan ketebalannya sangat mempengaruhi temperatur di dalam tempat pemeliharaan anak ayam tersebut.

Persiapan kandang dimulai dari pembersihan atau pencucian kandang dari kotoran kemudian pemasangan tirai dari plastik untuk menjaga suhu dalam kandang agar sesuai dengan kebutuhan ayam. Selanjutnya pemasangan pemanas, tempat makan, dan air minum dengan kapasitas air 1 liter. Tempat makan dan air minum dipasang berselang-seling, sedangkan pemanas dipasang di tengah-tengah. Persiapan terakhir adalah fumigasi kandang dengan tujuan untuk membunuh mikroorganisme penyebab penyakit. Bahan yang digunakan adalah formalin yang dicampur dengan air dengan dosis 1:10 lalu disemprotkan ke seluruh bagian kandang. Setelah semua persiapan kandang selesai maka DOC siap dimasukkan.

2. Pembuatan Tepung Kulit Pisang Raja Bulu

Kulit pisang yang digunakan adalah pisang raja bulu yang diperoleh dari Toko Kue dan Roti Kartika Sari, Bandung. Pembuatan tepung kulit pisang raja bulu dilakukan berdasarkan pembuatan tepung kulit pisang yang dilakukan oleh Hernawati dan Aryani (2008). Tahap pertama dalam pembuatan tepung kulit pisang raja bulu adalah kulit pisang raja bulu yang telah matang dibersihkan

terlebih dahulu. Kulit pisang kemudian dipotong-potong dadu berukuran kecil kira-kira 1 cm untuk mempercepat pengeringan.

Setelah itu potongan kulit pisang tersebut direndam dalam natrium metabisulfit selama 10 menit dengan tujuan untuk menghilangkan getah dan membunuh mikroorganisme. Sebanyak 1 kg kulit pisang direndam dalam 1 liter air dengan 15 gram natrium metabisulfit. Potongan kulit pisang tersebut kemudian ditiriskan, selanjutnya dikeringkan di bawah sinar matahari selama tiga hari. Kulit pisang raja bulu yang telah kering kemudian digiling dengan menggunakan blender hingga halus dan dihasilkan tepung kulit pisang.

Setelah kulit pisang raja bulu dijadikan tepung lalu dianalisis zat-zat gizi yang terkandung di dalamnya. Analisis kandungan nutrisi tepung kulit pisang raja bulu dilakukan di Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat, IPB. Hasil analisis proksimat dari tepung kulit pisang menunjukkan bahwa kandungan energinya tinggi yaitu sebesar 4.288 kkal/kg dan juga serat kasar sebesar 12,08 g/100 g, sedangkan kandungan proteinnya rendah yaitu 4,08 g/100 g. Hasil analisis proksimat tepung kulit pisang raja bulu dapat dilihat pada Tabel 3.2 di bawah ini.

Tabel 3.2 Hasil Analisis Proksimat Tepung Kulit Pisang Raja Bulu

Senyawa	Jumlah
Air (g/100 gr)	10,72
Protein (g/100 gr)	4,08
Lemak (g/100 gr)	12,84
Energi (Kg/kcal)	4.288
Serat Kasar (g/100 gr)	12,08
Abu (g/100 gr)	9,91
Ca (g/100 gr)	0,53
P (g/100 gr)	0,25

Tepung kulit pisang merupakan salah satu bahan dalam pakan buatan ayam broiler. Berdasarkan hasil analisis proksimat (Tabel 3.2), tepung kulit pisang mengandung energi dan serat kasar yang cukup tinggi. Laju pertumbuhan ayam broiler yang cepat untuk mencapai bobot badan secara singkat merupakan hal yang penting. Oleh karena itu, ayam broiler membutuhkan pakan yang mengandung energi metabolisme yang lebih tinggi dibandingkan ayam petelur (Suprijatna *et al.* 2005:183).

3. Pembuatan Pakan Buatan

Proses pembuatan pakan buatan terlebih dahulu menyiapkan semua bahan dasar pakan. Bahan dasar pakan terdiri dari dua macam, yaitu bahan dasar tepung atau non cair, seperti dedak, jagung kuning, bungkil kelapa, bungkil kedelai, tepung ikan, top mix, tepung tulang, CaCO_3 , dan tepung kulit pisang, sedangkan bahan dasar cair yang digunakan adalah minyak kelapa. Semua bahan tersebut ditimbang sesuai dengan formulasi dan kebutuhan ayam broiler.

Komposisi pakan A tidak dicampur dengan tepung kulit pisang, sedangkan untuk pakan B, C, dan D ditambahkan tepung kulit pisang ke dalam komposisi pakannya. Semua bahan dasar tepung tersebut dicampur terlebih dahulu dengan cara diaduk. Pengadukan bertujuan untuk mencampur semua bahan baku menjadi satu. Pengadukan harus dilakukan sebaik mungkin sehingga partikel-partikel bahan baku dapat tersebar merata ke setiap bagian kemudian baru dicampur dengan minyak kelapa dan diaduk kembali sampai merata pada seluruh bagian. Tujuannya untuk menghindari terjadinya penggumpalan atau pelekatan. Berikut adalah rincian dari pembuatan komposisi pakan A, B, C, dan D.

a. Pembuatan Komposisi Pakan A (Tanpa Penambahan Tepung Kulit Pisang)

Pembuatan 100 gram pakan diperlukan dedak 15 gr, jagung kuning 40 gr, bungkil kedelai dan kelapa masing-masing 10 gr, tepung ikan 15 gr, minyak kelapa 5 gr, top mix dan tepung tulang masing-masing 2 gr, dan CaCO_3 1 gr.

b. Pembuatan Pakan B (Penambahan Tepung Kulit Pisang Sebesar 30%)

Pembuatan 100 gram pakan diperlukan tepung kulit pisang 30 gr, dedak 10 gr, jagung kuning 20 gr, bungkil kedelai dan kelapa masing-masing 8 gr, tepung ikan 15 gr, minyak kelapa 4 gr, top mix dan tepung tulang masing-masing 2 gr, dan CaCO_3 1 gr.

c. Pembuatan Pakan C (Penambahan Tepung Kulit Pisang Sebesar 50%)

Pembuatan 100 gram pakan diperlukan tepung kulit pisang 50 gr, dedak dan jagung kuning masing-masing 8 gr, bungkil kedelai dan kelapa masing-masing 6 gr, tepung ikan 15 gr, minyak kelapa, top mix, dan tepung tulang masing-masing 2 gr, dan CaCO_3 1 gr.

d. Pembuatan Pakan D (Penambahan Tepung Kulit Pisang Sebesar 70%)

Pembuatan 100 gram pakan diperlukan tepung kulit pisang 70 gr, dedak 4 gr, jagung kuning dan bungkil kedelai masing-masing 1 gr, bungkil kelapa dan tepung ikan masing-masing 10 gr, minyak kelapa, top mix, tepung tulang, dan CaCO_3 masing-masing 1 gr.

4. Pemeliharaan DOC (*Day Old Chick*)

Anak ayam umur satu hari (DOC) diperoleh dari penyedia bibit ayam “Missouri” Bandung dengan umur, ukuran, dan bobot badan yang relatif sama. Kesamaan umur penting terutama dalam upaya menjaga kesehatan anak ayam

(Rasyaf, 2008). Pemeliharaan anak ayam umur sehari (DOC) dilakukan selama dua minggu. Setelah DOC datang kemudian ditempatkan dalam kandang. Hal yang pertama kali dilakukan adalah menyalakan pemanas. Suhu ruangan yang diperlukan selama proses pemeliharaan DOC antara 28-30°C. Selanjutnya, pemberian air minum yang dicampur dengan air gula untuk mengembalikan kondisi ayam yang stress dan energi yang hilang selama perjalanan. Ayam-ayam dibiarkan minum selama dua jam, apabila air gula sudah habis maka diganti dengan air biasa.

Selama pemeliharaan DOC diberi pakan standar atau pabrik dan air minum yang diberikan secara *ad libitum*. Pemberian pakan dilakukan sebanyak dua kali sehari yaitu pagi dan sore hari. Ransum yang digunakan adalah ransum untuk periode *starter* yakni dari anak ayam umur satu hari sampai tiga minggu dengan kandungan protein 21% dan energi 2900 kkal/kg (Scott *et al.* 1982).

5. Aklimatisasi

Setelah berumur dua minggu, sebanyak 24 ekor ayam diaklimatisasi sebelum diberi perlakuan. Aklimatisasi dilaksanakan selama seminggu agar hewan dapat beradaptasi dengan pakan buatan yang diberikan. Kapasitas ayam untuk setiap kandang kecil adalah enam ekor ayam/m². Selama aklimatisasi ayam-ayam tersebut diberi pakan buatan dan pabrik sebanyak 100 gr/hari/ekor. Pemberian pakan dilakukan setiap dua kali sehari yaitu pagi dan sore hari dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Tempat makan dan air minum selalu dibersihkan setiap hari dan diganti airnya atau diisi ulang apabila sudah kosong, sedangkan pemanas sudah dapat

dimatikan terutama pada siang hari. Pemakaian pemanas dihentikan setelah ayam berumur 12 hari dan disesuaikan dengan keadaan suhu dalam kandang (Yunus *et al.* 2007:56). Pada akhir minggu ketiga dilakukan penimbangan berat badan sebagai berat badan awal. Aklimatisasi biasanya dilakukan untuk menghadapi faktor-faktor yang terjadi di lingkungan lebih terkontrol.

Perlakuan ransum yang diberikan selama aklimatisasi adalah:

R1: ransum mengandung 30% pakan buatan dan 70% pakan pabrik

R2: ransum mengandung 50% pakan buatan dan 50% pakan pabrik

R3: ransum mengandung 70% pakan buatan dan 30% pakan pabrik

R4: ransum mengandung 100% pakan buatan

6. Tahap Perlakuan

Setelah aklimatisasi, ayam broiler yang telah berumur tiga minggu diberi pakan yang berbeda. Ayam broiler dibagi menjadi empat kelompok dan masing-masing kelompok diberi pakan A, B, C, dan D. Pemberian pakan dilakukan dua kali sehari yaitu pagi dan sore hari. Jumlah pakan yang diberikan mengacu pada standar Ensminger yaitu sebanyak 100 g/ekor/hari. Pemberian air minum diberikan secara *ad libitum*. Setiap minggu dilakukan penimbangan bobot badan ayam dengan tujuan untuk melihat pertumbuhan ayam selama diberikan perlakuan. Pada hari terakhir pengamatan ayam broiler ditimbang kembali berat badannya.

7. Pengambilan Sampel Organ Hati

Setelah melewati masa perlakuan (*treatment*) dengan cara pemberian pakan dengan penambahan tepung kulit pisang selama empat minggu, selanjutnya

dilakukan tahap pengambilan organ dengan cara pemotongan hewan uji. Ayam yang telah dibedah kemudian diambil bagian-bagian organ yang akan diuji yaitu organ hati. Hal tersebut dilakukan dengan hati-hati agar organ yang akan diuji tidak rusak. Organ hati tersebut kemudian ditimbang untuk mengetahui rata-rata berat hati setiap kelompok perlakuan.

8. Pengukuran Kadar Kolesterol Hati

Kadar kolesterol diukur dengan metode CHOD-PAP *Enzymatic Colorimeter Test for Cholesterol with lipid Clearing Factor* (LCF). Sebelumnya dilakukan proses ekstraksi terlebih dahulu dengan cara mengambil sampel hati sebanyak 2 gr untuk masing-masing kelompok perlakuan. Sampel dihaluskan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang steril.

Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi yaitu dengan cara 10 ml larutan dietileter ditambahkan ke dalam tabung berisi sampel dan dibiarkan selama 48 jam (agar terjadi penguapan). Sebanyak 2 ml larutan PBS ditambahkan ke dalam tabung reaksi hasil ekstraksi dan disentrifuge pada kecepatan 1500 rpm selama 20 menit kemudian supernatan di pipet dan dimasukkan ke dalam microtube.

Sebanyak 200 μ l sampel hati dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya sebanyak 1 ml reagen kolesterol dimasukkan ke dalam tabung dan diaduk dengan vortex agar homogen. Sampel dan standar diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20-25°C kemudian seluruh larutan dituang ke dalam *cuvete* dan dimasukkan ke dalam spectrophotometer dengan panjang gelombang 500 nm dan hasilnya dapat dilihat dalam bentuk absorbansi.

Sampel dan standar diukur absorbannya terhadap blanko (reagen) murni yang nantinya didapat ΔA . Pengujian dilakukan sebanyak dua kali (duplo). Berikut ini adalah rumus pengukuran kadar kolesterol hati:

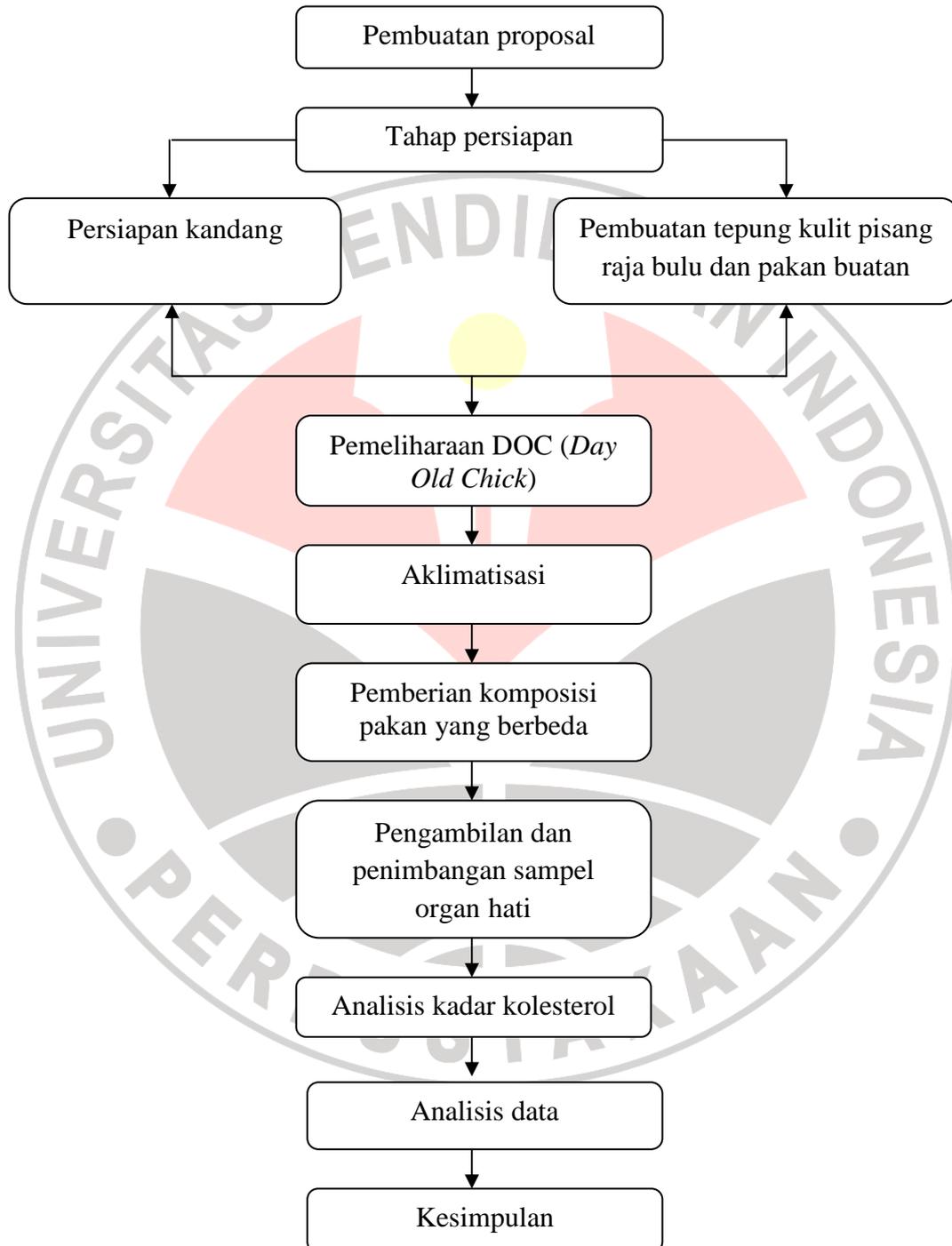
$$C = \frac{\text{konsentrasi standar} \times (\Delta A)[\text{mg/dl}]}{\Delta \text{ standar}}$$

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistika dengan menggunakan program SAS (*Statistical Analysis System*). Uji kenormalan data dilakukan Uji Kolmogorov-Smirnov, sedangkan uji homogenitas data dilakukan Uji Leven's. Selanjutnya data diolah dengan analisis ragam (ANOVA). Apabila antara perlakuan terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$), maka analisis data dilanjutkan dengan menggunakan uji lanjutan yaitu Uji Duncan. Uji tersebut dilakukan untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara signifikan.

G. Diagram Alur Penelitian

Adapun alur penelitian yang dilakukan yaitu :



Gambar 3.1 Alur Penelitian