

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 RANCANGAN PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah observasional analitik dengan rancangan cross sectional study dan eksperimental.

Penggunaan jenis penelitian observasional dan rancangan cross sectional study ini didasarkan pada penelitian yang dilakukan dimensi tertentu dengan mempertimbangkan tidak adanya perlakuan serta tidak diketahui faktor mana dari faktor bebas dan tergantung yang muncul terlebih dahulu.

Penggunaan jenis penelitian eksperimental ini mempertimbangkan adanya perlakuan berupa sinkronisasi dan super ovulasi terhadap tikus betina.

4.2 POPULASI

Sampel diambil dari populasi mencit, tikus dan tikus liar, masing-masing hewan yang dipakai minimal berumur 1 hari, karena observasi dimulai dari awal kelahiran sampai berumur 30 hari.

4.3 IDENTIFIKASI VARIABEL DAN DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

4.3.1 Identifikasi variabel

Variabel bebas

Mencit, tikus putih dan tikus liar rumah masing-masing keturunan dibiakkan

Variabel tergantung

Data karakteristik eksterior, perilaku dan masa estrus mencit, tikus putih dan tikus liar rumah. Data mengenai hasil pengukuran : berat badan, panjang badan dan panjang ekor. Berat badan yang dimaksud dalam penelitian ini adalah hasil pengukuran berat badan hewan coba dengan timbangan analitik yang dinyatakan dalam gram. Panjang badan dan panjang ekor adalah hasil pengukuran hewan coba dengan meteran yang dinyatakan dalam cm.

4.3.2 Definisi operasional variabel

Mencit (*Mus musculus*) banyak ditemukan didaerah lain yang tidak dekat dengan manusia asal ada makanan dan tempat berlindung, semua galur mencit yang ada pada waktu ini merupakan turunan dari tikus liar sesudah melalui peternakan selektif. Tikus putih (*Rattus rattus*) hewan ini lebih besar dari mencit. Ada beberapa galur yang tidak berhenti tumbuh selama hidupnya. Otot skelet tikus mempunyai struktur sama dengan otot skelet manusia, asam amino penyusun

myofilamennya pun tidak jauh berbeda. Otot skelet ini meliputi 40 - 50 % dari berat badan.

Tikus liar rumah (*Rattus-rattus diardii*) adalah tikus-tikus yang diketemukan di rumah-rumah dengan pengamatan menampakkan ciri-ciri, bulu panjang, berwarna keabu-abuan dengan abdomen keputih-putihan. Mata berwarna hitam dan kulit berpigmen.

Superovulasi adalah suatu proses yang dapat merangsang ovarium menghasilkan jumlah sel telur yang melebihi jumlah sel telur yang diovulasikan secara normal.

Karakteristik eksterior adalah ciri-ciri luar yang dimiliki hewan coba yang dapat dilihat atau diamati dari luar seperti bulu, ekor, moncong dan mata.

Biometri adalah ukuran badan tertentu pada tikus yang pengukurannya dilakukan untuk mengetahui panjang tubuh, panjang ekor dan berat badan.

Sistem reproduksi hewan betina terdiri dari ovarium, tuba falopii (oviduct), uterus dan vagina. Pada hewan betina yang sudah dewasa sistem hormonal uterus dan siklus ovarium dikendalikan oleh aksis hipotalamus pituitari (hipofisa anterior) dalam pars distalis of pituitary.

Didalam taksonomi kita kenal aliran taksonometri yang menentukan jauh dekatnya kekerabatan antara dua takson melalui pemberian sistem cluster analysis dibentuk kelompok-kelompok untuk menggambarkan antara anggota kelompok (Tjiptoepomo, 1989).



Gambaran kromosom adalah perubahan atau kelainan baik itu berupa jumlah maupun bentuk struktur kromosom pada stadium metafase dari siklus mitosis yang dilihat melalui kariotiping.

4.4. MATERI PENELITIAN

Untuk pemeriksaan reproduksi digunakan materi : PGF₂ α sintetik, untuk sinkronisasi birahi.

Untuk pemeriksaan perbandingan biometri dibutuhkan :

- Panjang badan, berat badan dan panjang ekor.

Untuk pemeriksaan kromosom diperlukan bahan sebagai berikut :

- Sumsum tulang
- Larutan KCl 0,075 m, sebagai pengembang sel
- Larutan asam asetat dan etanol sebagai fiksatif
- Zat warna giemsa, untuk mewarnai kromosom

4.5 ALAT PENELITIAN

Alat untuk pemeriksaan reproduksi diperlukan alat-alat sebagai berikut :

- Aquades
- Kapas pembersih
- Larutan giemsa 30 %
- Kaca pembesar

Alat untuk pemeriksaan perbandingan biometri diperlukan alat-alat sebagai berikut

- Pita ukur
- Timbangan analitik (Neraca Ohaus)

Alat untuk pembuatan kariotiping dipergunakan alat-alat sebagai berikut :

- Seperangkat alat seksi untuk membedah
- Sentrifuge untuk memisahkan leukosit
- Tabung reaksi untuk menempatkan bahan yang akan disentrifuge
- Inkubator CO₂ untuk menginkubasi biakan sel
- Fotomikroskop untuk memotret kromosom

4.6 TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

4.6.1 Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga .

4.6.2 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan dalam waktu 3 bulan dari bulan Agustus 1997 sampai bulan Nopember 1997.

4.7 PROSEDUR PENGAMBILAN DATA

Data mengenai siklus reproduksi didapat dari pengamatan selama satu siklus.

Data mengenai jumlah kromosom didapat dari hasil kariotiping.

Data mengenai perbandingan biometri dilakukan dengan mengukur berat badan, panjang badan dan panjang ekor.

4.8 PENGAMATAN SIKLUS ESTRUS BETINA

Pengamatan siklus estrus terhadap tikus betina dilakukan setiap 2 hari sekali pada pagi hari dengan metode hapusan vagina. Dengan metode ini digunakan kapas (cotten butes) yang mempunyai ujung halus dan dicelupkan dengan aquadest. Cairan yang mengandung sel-sel vagina diteteskan pada kaca obyek dan diperiksa dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 450 X. Pengamatan dilakukan selama satu bulan (30 hari). Jika mencit (*Mus musculus*), tikus putih (*Rattus rattus*) dan tikus liar (*Rattus rattus diardii*) menunjukkan siklus estrus yang teratur, maka dapat dikatagorikan sebagai tikus betina fertil.

4.9 PEMERIKSAAN KROMOSOM

Proses pembuatan karyotiping adalah sebagai berikut :

- a. Menyuntik mencit (*Mus musculus*), tikus putih (*Rattus rattus*) dan tikus liar (*Rattus rattus diardii*) dengan colchisin 0.003 % sebanyak 0.3 ml di daerah intraperitoneal.
- b. Setelah 20 menit, masing-masing hewan coba dibunuh dengan kapas yang dibasahi dengan kloroform diletakkan dalam stopless tertutup. Segera diambil

tulang femur, tibia dan humerus dengan jalan memisahkan dengan skapel dan dipotong kedua ujungnya dengan gunting.

- c. Mengeluarkan sumsum dari tulang dengan cara menginjeksi KCl 0.0075 m melalui ruas tulang tersebut dan sumsum tulang ditampung dalam tabung sentrifuse.
- d. Sediaan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit.
- e. Sediaan disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm.
- f. Membuang K Cl sehingga tinggal endapannya.
- g. Menambahkan K Cl 0.075 m sebanyak yang dibuang dan sediaan dikocok dengan pipet sampai homogen.
- h. Sediaan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit.
- i. Sediaan disentrifuse selama 10 menit.
- j. K Cl dibuang, tinggal endapannya.
- k. Menambahkan larutan fiksatif (asam asetat glasial : metanol = 1 : 3) sebanyak K Cl yang dibuang dan diaduk dengan pipet sampai homogen.
- l. Sediaan didiamkan dalam almari es selama 10 menit.
- m. Sediaan disentrifuse selama 10 menit.
- n. Larutan fiksatif dibuang dan tinggalkan sedikit.
Sediaan dikocok dengan pipet sampai homogen.
- o. Menambahkan larutan fiksatif sebanyak yang dibuang dan sediaan dikocok dengan pipet sampai homogen.
- p. Sediaan didiamkan pada temperatur kamar selama 10-15 menit.

- q. Sediaan disentrifuse selama 10 menit.
- r. Larutan fiksatif dibuang dan tinggalkan sedikit
- s. Preparat dibuat dengan cara meneteskan sediaan pada kaca obyek dengan pipet dengan jarak ± 25 cm, dikeringkan dan siap untuk melakukan teknik pewarnaan dengan giemsa 0.003 dalam 0.014 m buffer fosfat .
- t. Sediaan dibilas dengan air ledeng/kran.
- u. Mengeringkan sediaan dengan pengering $\pm 37^{\circ}$ C.

4.10 MAKANAN HEWAN

Tiap hari seekor tikus makan 12 gr sampai 20 gr makanan dan bila dalam keadaan bunting atau menyusui jumlah tersebut bertambah. Komposisi makanan tersebut adalah protein 20-25 % atau 12 % bila berisi asam amino esensial yang lengkap, lemak 5 %, pati 45-50 %, serat kasar 5 % dan abu 4-5 %. Disamping itu juga mengandung vitamin A 4000 IU/kg, α tokoferol 30 mg/kg, asam linoleat 3 gr/kg, tiamin 4 mg/kg, riboflavin 3 mg/kg, pantotenat 8 mg/kg, vitamin B₁₂ 50 μ g/kg, biotin 10 μ g/kg, piridoksin 40-300 μ g/kg dan kolin 1000 mg/kg (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988), sedangkan untuk vitamin C tidak ada persyaratan (Zutphen, et al, 1993).

4.11 ANALISA DATA

Data penelitian dianalisis dengan uji Anova satu arah, jika didapat $F_{hitung} > F_{tabel}$ atau jika diperoleh $P < 0,05$, maka perhitungan dilanjutkan dengan Cluster Analisis untuk melihat perbedaan antar pasangan dalam pola hubungan antar variabel. Hasil uji Cluster Analisis akan bermakna apabila diperoleh $P < 0,05$ (Gaspersz, 1991).

Semua analisis dikerjakan dengan komputer program SPSS versi 4 dan Systat versi 5.