

BAB 4**METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini terdiri dari 2 jenis penelitian yaitu penelitian observasional dan eksperimental.

Penelitian jenis pertama merupakan penelitian observasional analitik dengan rancangan *cross sectional study* (Babbie, 1986).

Penggunaan penelitian observasional dan rancangan *cross sectional study* ini didasari pada penelitian yang dilakukan pada dimensi waktu tertentu, dengan mempertimbangkan tidak adanya perlakuan serta tidak diketahuinya faktor mana antara faktor bebas dan tergantung yang muncul terlebih dahulu.

Dalam tahap pertama ini dilakukan pengumpulan data dan analisis deskriptif profil biologi anjing Kintamani yang meliputi (1) karakteristik eksterior, (2) perilaku, (3) gambaran darah, (4) siklus reproduksi beserta profil (5) hormon progesteron dan (6) estradiol di samping itu dilakukan juga analisis kekerabatan antara anjing Kintamani dengan Geladak. Kegunaan pengungkapan profil biologi ini adalah untuk mendapatkan model ideal prototipe trah Kintamani. Pengungkapan profil biologi diutamakan pada anjing Kintamani sedangkan pada anjing Geladak hanya antropometri saja. Hal ini disebabkan adanya keragaman yang besar pad profil biologi anjing Geladak. Kegunaan analisis kekerabatan pada penelitian ini adalah untuk menentukan kekerabatan anjing Kintamani. Pendekatan yang digunakan dalam

penentuan kekerabatan adalah dengan menggunakan analisis morfometrik tengkorak. Data yang diperoleh dalam penelitian ini digunakan sebagai model ideal prototipe anjing trah Kintamani, sehingga jenis penelitian bagian pertama ini akan dapat dipakai dalam mendeskripsikan trah Kintamani.

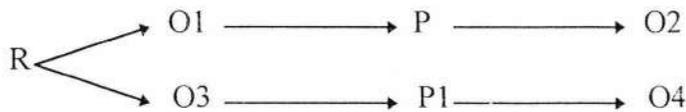
Penelitian bagian kedua merupakan penelitian eksperimental semu (*Quasi Experimental*) dengan rancangan *The randomized group pretest posttest design*, dan penelitian eksperimental sungguhan (*True Experimental*) dengan rancangan *The pretest posttest control group design*.

Rancangan *The randomized group pretest posttest design* ini digunakan untuk mengetahui pengaruh $\text{PGF}_2\alpha$ dan $\text{PGF}_2\alpha$ diikuti dengan PMSG terhadap penampilan reproduksi anjing Kintamani pada saat fase diestrus yang meliputi waktu timbulnya birahi, lama birahi, lama kebuntingan dan jumlah anak sekelahiran yang dilahirkan. Rancangan *The pretest posttest control group design* digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian PMSG berulang dan HCG pada anjing yang sedang fase anestrus terhadap penampilan reproduksi.

Untuk mengetahui pengaruh induksi birahi dengan menggunakan $\text{PGF}_2\alpha$ dan $\text{PGF}_2\alpha$ dengan PMSG pada penelitian eksperimental semu ini maka sampel penelitian (12 ekor prototipe anjing trah Kintamani betina dalam fase diestrus) yang dipilih berdasarkan seleksi prototipe trah Kintamani dibagi menjadi 2 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor. Kelompok pertama (A) diberi $\text{PGF}_2\alpha$ sebanyak 3 mg/anjing secara intramuskuler. Kelompok kedua (B) diberi

PGF₂ α sebanyak 3 mg/anjing dan pada hari ketiga diberi PMSG dengan dosis 500 IU/anjing.

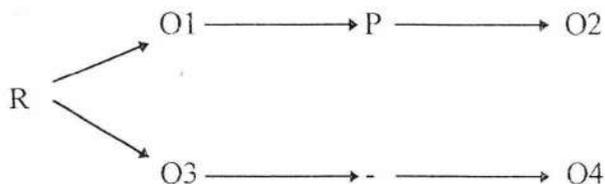
Jika dibuat bagan model penelitian tersebut, maka dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 4.1 : Bagan model penelitian *The randomized group pretest posttest design* (R = randomisasi, O1 dan O2 = pemeriksaan sebelum perlakuan, P = perlakuan, O2 dan O4 = pemeriksaan setelah perlakuan)

Untuk mengetahui pengaruh induksi birahi dengan menggunakan PMSG dan HCG pada penelitian *The pretest posttest control group design* ini maka sampel penelitian (12 ekor prototipe anjing trah Kintamani betina dalam fase anestrus) yang dipilih berdasarkan seleksi prototipe trah Kintamani dibagi menjadi 2 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor. Kelompok pertama (C) diberi PMSG sebanyak 200 IU/anjing secara berturut-turut selama lima hari dan pada hari ke lima diberi HCG sebanyak 500 IU/anjing. Kelompok kedua (D) diberi plasebo.

Jika dibuat bagan model penelitian tersebut, maka dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 4.2 : Bagan model penelitian *The pretest posttest control group design*. (O1 dan O3 = pemeriksaan sebelum perlakuan, P = perlakuan, O2 dan O4 = pemeriksaan setelah perlakuan)

4. 2 Populasi Dan Sampel

4. 2. 1 Populasi

Populasi anjing Geladak dan Kintamani yang dipakai dalam penelitian ini adalah anjing-anjing Geladak yang berada di daerah pedesaan dan perkotaan di Bali, sedang untuk anjing Kintamani diambil dari habitat aslinya yaitu di desa Sukawana, Kecamatan Kintamani, Kabupaten Bangli, Propinsi Bali.

4. 2 .2 Sampel

4.2.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel penelitian pada penelitian jenis pertama untuk anjing Kintamani diambil dengan cara *purposive* atau *judgmental sampling* yaitu dengan mendatangi rumah-rumah penduduk untuk mencatat dan mengamati langsung semua anjing-anjing yang mungkin ditemukan di desa Sukawana, Kintamani Bangli dan untuk anjing Geladak diambil pada lokasi di luar desa Sukawana. Persyaratan sampel yang digunakan pada penelitian jenis pertama ini adalah anjing yang minimal berumur 12 bulan, karena pada umur ini telah mencapai dewasa tubuh, secara fisik dan klinis adalah sehat.

Pemilihan sampel penelitian jenis kedua juga dilakukan dengan *purposive* atau *judgmental sampling* yaitu dengan mempertimbangkan keadaan populasi dan karakteristik anjing Kintamani. Persyaratan sampel untuk penelitian tahap kedua ini adalah prototipe anjing Kintamani betina, telah pernah beranak, serta berat badan, pengalaman beranak, pakan dan lingkungan yang sama.

4.2.2.2 Penentuan Besar Sampel

Besar sampel untuk penelitian jenis pertama adalah bervariasi untuk setiap parameter yang diamati, akan tetapi sedapat mungkin dilakukan pada semua anjing yang memenuhi syarat sebagai sampel yang ada di desa Sukawana. Bervariasinya besar sampel pada penelitian jenis pertama ini disebabkan oleh hambatan waktu pengamatan, kesulitan dalam pengamatan karena cara hidup anjing yang berkeliaran dan kesulitan dalam penanganan.

Besar sampel untuk penelitian jenis kedua adalah sebanyak 24 ekor. Penentuan besarnya sampel penelitian jenis kedua ini didasarkan pada kesulitan mencari anjing yang digunakan terutama yang sedang berada dalam fase diestrus.

4.3 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

4.3.1 Identifikasi Variabel

Variabel Bebas

Penelitian pertama : Anjing Geladak , anjing Kintamani.

Penelitian kedua : $\text{PGF}_2\alpha$, $\text{PGF}_2\alpha$ dengan PMSG dan PMSG dengan HCG.

Variabel Tergantung :

Data profil biologi

Data mengenai waktu timbulnya birahi, lama birahi, lama kebuntingan dan jumlah anak yang dilahirkan sebagai akibat penyuntikan $\text{PGF}_2\alpha$, $\text{PGF}_2\alpha$ diikuti oleh PMSG dan PMSG diikuti oleh HCG.

Variabel Kendali :

Umur anjing.

Variabel Pengganggu

Managemen pemeliharaan

4. 3.2 Definisi Operasional Variabel

Anjing Geladak adalah anjing yang ditemukan di perkotaan dan pedesaan di Bali yang dengan pengamatan menampakkan ciri-ciri bulu pendek dan penampilan luar yang bervariasi atau campuran dengan asal-usul yang tidak diketahui secara pasti.

Anjing Kintamani adalah anjing yang ditemukan di pedalaman Kintamani atau tempat lain yang berasal dari pedalaman Kintamani yang dengan pengamatan menampakkan ciri-ciri bulu panjang dan penampilan luar yang homogen satu sama lainnya.

Induksi birahi adalah membirahikan anjing betina dewasa dengan memakai preparat $\text{PGF}_2\alpha$, $\text{PGF}_2\alpha$ dengan PMSG dan PMSG dengan HCG dengan harapan agar terjadi birahi dalam waktu yang ditentukan.

Data profil biologi anjing adalah penampilan biologi yang dapat diamati dan diukur pada seekor anjing terutama karakteristik eksterior, perilaku, gambaran darah, siklus reproduksi beserta profil hormon estradiol dan progesteron.

Karakteristik eksterior adalah ciri-ciri luar yang dimiliki oleh anjing Kintamani yang dapat dilihat atau diamati dari luar seperti bulu, ekor, moncong, mata, telinga, berat dan tinggi badan.

Perilaku agresif adalah suatu gerakan yang mempunyai tujuan baik mengusir, memakan ataupun menyebabkan larinya musuh dengan jalan melukai atau merangsang musuh untuk melarikan diri dengan jalan tanpa kontak langsung atau dengan ancaman.

Gambaran darah adalah data yang berhubungan dengan komposisi darah yaitu sel darah merah, sel darah putih, trombosit, hematokrit, Hb, dan harga absolut neutrofil, eosinofil, monosit dan limfosit anjing Kintamani.

Siklus reproduksi adalah data yang berhubungan dengan reproduksi pada anjing yang dimulai sejak munculnya pubertas, estrus, kebuntingan serta melahirkan, yang dapat diamati secara langsung pada induk betina.

Lebar tengkorak adalah jarak antara tulang *zygomatic* kanan dengan kiri yang dapat diukur dengan pita ukur pada tengkorak seekor anjing.

Panjang tengkorak adalah jarak antara tulang *occipital* bagian luar dengan bagian depan tulang *incisive*.

Ukuran Indeks Tengkorak adalah lebar tengkorak dikalikan 100 dan dibagi dengan panjang tengkorak.

Tinggi badan adalah jarak antara bagian bawah kaki depan anjing dengan titik tertinggi pada gumba (*withers*) seekor anjing dalam posisi berdiri.

Berat badan anjing adalah berat tubuh seekor anjing dalam kilogram sebagai hasil penimbangan dengan timbangan badan, dengan cara menimbang seseorang yang memegang anjing. Berat anjing didapat pada pengurangan berat total hasil penimbangan dengan berat orang.

Pubertas adalah umur pada saat birahi pertama terjadi pada seekor anjing atau waktu terjadi perubahan pada saat betina memasuki dewasa kelamin dan mampu bereproduksi.

Musim kawin diartikan sebagai aktivitas musiman seekor anjing dan pada saat ini anjing mengalami birahi.

Proestrus adalah sebagai saat permulaan terjadinya perdarahan pada vagina seekor anjing betina dan berakhir pada saat mau menerima pejantan.

Estrus diartikan sebagai waktu saat pertama dan terakhir seekor betina mau menerima pejantan untuk dikawini.

Lama kebuntingan adalah lama waktu seekor induk anjing bunting yang dihitung mulai perkawinan pertama sampai melahirkan anak.

Diestrus diartikan sebagai waktu yang dimulai saat penghentian penerimaan seekor betina terhadap pejantan dan berakhir pada saat terjadinya regresi korpus luteum dan ini dapat dilihat pada penurunan kadar progesteronnya.

Anestrus adalah fase berhentinya aktivitas ovarium seekor anjing betina dan lamanya anestrus dihitung sejak akhir diestrus sampai dimulainya fase proestrus berikutnya.

Jumlah anak sekelahiran adalah jumlah anak yang dilahirkan oleh seekor anjing betina dalam satu kali melahirkan.

4. 4 Bahan Penelitian

Untuk analisis kekerabatan digunakan bahan sebagai berikut :

- Tengkorak anjing yang didapat pada anjing mati atau dibunuh.

Untuk pemeriksaan darah digunakan bahan-bahan sebagai berikut:

- Darah diambil vena safena dengan spuit berukuran 10 ml.
- Untuk pemeriksaan Hb digunakan larutan Drabkin's.
- Untuk pemeriksaan sel darah putih digunakan larutan HCL 1%, asam asetat 2% dan larutan Turk.
- Untuk pemeriksaan sel darah merah digunakan larutan Hayem.
- Untuk pemeriksaan trombosit digunakan larutan Rees-Ecker.

Untuk penelitian eksperimental digunakan materi sebagai berikut :

- Anjing prototipe trah Kintamani betina dewasa yang diambil pada penelitian observasional sebelumnya.
- $PGF_2\alpha$ sintetik (Glandin N, produksi TAD Pharmazeutisches Werk GMBH) untuk sinkronisasi birahi.
- PMSG (Foligon, produksi Intervet) untuk menggertak pertumbuhan folikel.
- HCG(Chorulon,produksi Intervet) untuk menggertak ovulasi
- Kit RIA- progesteron (Coat-A-Count Progesteron), untuk pengukuran progesteron.
- Kit RIA-estradiol (Coat-A-Count Estradiol), untuk pengukuran estradiol.

4.5 Alat Penelitian

Untuk mengukur panjang dan lebar tengkorak digunakan penggaris plastik dengan ketelitian 0,1 untuk tinggi tubuh digunakan pita pengukur merk Butterfly dengan ketelitian 0,1 dan berat badan ditimbang dengan timbangan badan merk Sayota, buatan Taiwan dengan ketelitian 0,5

Untuk pemeriksaan darah tepi dipergunakan alat-alat sebagai berikut :

- Pipet mikrohematokrit dengan panjang 7 cm dan diameter 1,0 mm dan *microhaematocrit reader*, digunakan untuk mengukur PCV.
- Spektrofotometer yang digunakan untuk mengukur kadar Hb.
- Hemositometer untuk penghitungan sel darah merah dan sel darah putih dan trombosit
- Objek glass untuk pembuatan hapusan darah.

Untuk pemeriksaan kadar hormon estradiol dan progesteron diperlukan peralatan sebagai berikut :

- Pengocok listrik vortex.
- Mikropipet.
- Gamma counter.
- Inkubator.
- Freezer.

4.6 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Dusun Paketan, Desa Sukawana, Kecamatan Kintamani, Kabupaten Bangli, Propinsi Bali, sekitar 14 Km di sebelah utara pusat Kecamatan Kintamani. Denah desa Sukawana dapat dilihat pada lampiran I.

Desa ini terletak di daerah dengan ketinggian 1620 m dari permukaan laut. Luas seluruh desa adalah 3661 hektar. Suhu berkisar antara 18⁰ C dan 25⁰ C.

Dusun Sukawana adalah suatu desa di dataran tinggi Bali Tengah yang merupakan daerah perkebunan dan secara tipologi geografik tergolong daerah pegunungan.

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Mei tahun 1997 dan berakhir pada bulan September tahun 1998.

4.7 Prosedur Pengambilan Data.

4.7.1 Data Profil Biologi

1. Data berat badan didapat dengan cara menimbang seseorang yang memegang seekor anjing dengan timbangan badan. Berat badan anjing didapat dengan jalan mengurangi berat keseluruhan dengan berat orang.
2. Data tinggi tubuh diambil dengan mengukur tinggi tubuh seekor anjing dengan pita ukur, pada keadaan berdiri pada kaki depan sampai gumba (*withers*).
3. Data mengenai karakteristik bagian luar tubuh dilakukan dengan pengamatan langsung di lapangan.
4. Data perilaku agresif pada anjing Kintamani didapat pada pengamatan langsung perilaku yang ditunjukkan seekor induk yang sedang menyusui baik berupa

perilaku agresif maupun perilaku perhatian pada anak terhadap masuknya peneliti ke tempatnya. Skor (*rating*) perilaku induk dicatat pada setiap induk. Berdasarkan evaluasi langsung dapat ditentukan skor perilaku agresif pada induk anjing Kintamani (adaptasi dari Buddenberg *et al.*, 1986). Skor untuk perilaku agresif dinilai 1 sampai dengan 7. Deskripsi skor (*rating*) perilaku ini dapat dilihat pada tabel 4.1 berikut :

Tabel 4.1 Skor (*rating*) perilaku pada anjing.

| Skor | Deskripsi |
|------|--|
| 1 | Induk sangat agresif terhadap masuknya manusia |
| 2 | Lebih perhatian dalam memberi perlindungan terhadap anak |
| 3 | Ingin menyerang untuk melindungi anak |
| 4 | Kurang agresif, tetapi perhatian terhadap masuknya manusia |
| 5 | Induk perhatian tetapi tidak menunjukkan keinginan menyerang |
| 6 | Sedikit perhatian pada anak terhadap masuknya manusia |
| 7 | Tidak perhatian pada anak dan akrab dengan masuknya manusia |

5. Data ukuran tengkorak kepala diambil dengan mengukur panjang dan lebar tengkorak dengan pita ukur. Panjang tengkorak adalah jarak antara penonjolan tulang *occipital* bagian luar dengan bagian depan tulang *incisive*. Lebar tengkorak adalah lebar jarak antara tulang *zygomatic* kanan dan kiri.

$$\text{Ukuran Indeks Tengkorak (Evan, 1993^b)} = \frac{\text{Lebar} \times 100}{\text{Panjang}}$$

6. Data mengenai kadar Hb didapat dengan metode pemeriksaan Sianomethemoglobin. Metode ini menggunakan Spektrofotometer. Pada metode

ini semua derivat hemoglobin dirubah oleh ferrisianida menjadi methemoglobin, selanjutnya oleh ion sianida dirubah menjadi komponen merah yang stabil.

7. Penentuan nilai PCV

Packed cell volume (PCV) ditentukan dengan menggunakan metode Mikrohematokrit. Metode ini menggunakan pipet mikrohematokrit kapiler panjang 7 cm dengan diameter 1,0 mm. Pipet tersebut sudah dilengkapi dengan anti koagulan sehingga dapat langsung digunakan.

8. Penghitungan sel darah merah dan sel darah putih (Benyamin,1978).

Prinsip penghitungan sel darah adalah pengenceran dan pengecatan dengan pelarut khusus yang menggunakan pipet khusus, kemudian dihitung pada kamar hitung.

9. Penghitungan Trombosit

Trombosit dihitung dengan metode Rees Ecker. Pada metode ini penghitungan trombosit dilakukan secara langsung menggunakan hemositometer dengan pelarut khusus.

10. Penghitungan jenis sel darah putih

Data mengenai hitung jenis sel darah putih didapat dengan penghitungan jenis sel darah putih pada pemeriksaan hapusan darah. Pembuatan hapusan darah dilakukan dengan metode slide.

11. Data Siklus Reproduksi.

Data mengenai siklus reproduksi pada anjing Kintamani didapat dengan pengamatan anjing selama satu siklus yaitu dimulai saat melahirkan sampai melahirkan berikutnya.

12. Data Hormon Progesteron dan Estradiol.

Data mengenai kadar hormon estradiol dan progesteron didapat dengan menggunakan teknik RIA fase padat yaitu teknik kompetitif antigen dengan antigen berlabel ^{125}I untuk mengikatkan diri pada *antigen binding site* yang dimiliki oleh antibodi spesifik yang sudah dilekatkan pada dinding tabung polypropylen.

Untuk mendapatkan kesamaan pandangan pada penggunaan teknik RIA ini perlu diadakan uji keabsahan untuk menguji bahan atau alat yang dapat dipakai sehingga suatu *assay* dapat dipercaya. Kepekaan (*sensitivity*) teknik RIA ini adalah 0,24 nmol /L untuk progesteron dan 4,7 pmol/L untuk estradiol.

4.7.2. Induksi Birahi.

Untuk mengetahui pengaruh induksi birahi pada anjing yang sedang dalam fase diestrus dipakai rancangan *The randomized group pretest posttest design* dengan dua macam perlakuan yaitu $\text{PGF}_2\alpha$ dan $\text{PGF}_2\alpha$ diikuti PMSG. Sebanyak 12 ekor anjing betina dipakai dalam penelitian ini dan dibagi menjadi 2 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 6 ekor anjing betina.

Kelompok pertama (A) : sebanyak 6 ekor anjing setelah diperiksa secara hormonal berada dalam fase diestrus lalu disuntik dengan 3 mg/anjing $\text{PGF}_2\alpha$ secara intramuskuler. Apabila terlihat birahi, dikawinkan pada hari kedua hingga ketiga dengan pejantan. Dicatat waktu timbulnya birahi dan anak yang dilahirkan.

Kelompok ke dua (B) : sebanyak 6 ekor anjing diberi suntikan 3 mg $\text{PGF}_2\alpha$ /anjing, pada hari ketiga diberi suntikan sebanyak 500 IU PMSG/anjing. Apabila timbul birahi dikawinkan pada hari kedua hingga hari ketiga dengan pejantan. Dicatat waktu timbulnya birahi dan anak yang dilahirkan.

Untuk mengetahui pengaruh induksi birahi pada anjing yang sedang dalam fase anestrus dipakai rancangan *The pretest posttest control group design*. Sebanyak 12 ekor anjing betina dipakai dalam penelitian ini dan dibagi menjadi 2 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 6 ekor anjing betina. Kelompok pertama (C) diberi suntikan 200 IU PMSG/anjing selama lima hari berturut-turut. Pada hari ke lima diberi suntikan 500 IU HCG/anjing secara intramuskuler. Kelompok ke dua (D) diberi plasebo. Apabila timbul birahi dikawinkan pada hari kedua hingga ketiga dengan pejantan. Dicatat waktu timbulnya birahi dengan anak yang dilahirkan.

4.8 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan program SPSS For Windows Versi 6.0 dan program Systat For windows Versi 5. Analisis statistik yang dilakukan adalah :

1. Analisis Multivariat untuk menguji perbedaan rata-rata berat badan, tinggi badan, gambaran darah, dan ukuran tengkorak antara anjing Kintamani dan anjing Geladak (Sharma,1997)
2. Analisis Diskriminan (*Discriminant analysis*) digunakan untuk mengidentifikasi variabel morfometri tengkorak yang dapat membedakan antara anjing Kintamani dengan Geladak (Sharma,1997)
3. Untuk menentukan tingkat perbedaan anjing Kintamani dengan anjing Geladak dipergunakan analisis indeks tengkorak dengan pendekatan konsep Koefisien Perbedaan (*Coefficient of Difference*, Crowson, 1970). Konsep Koefisien Perbedaan untuk sifat yang dapat diukur menyatakan bahwa apabila perbedaan angka rata-rata dua populasi dibagi dengan jumlah simpangan baku keduanya lebih besar dengan 1,28 maka kedua populasi tersebut sudah dinyatakan berbeda dalam tingkat sub spesies (Crowson,1970).
4. Uji anava sama subjek digunakan untuk mengetahui pengaruh penyuntikan $\text{PGF}_2\alpha$, $\text{PGF}_2\alpha$ yang diikuti oleh PMSG dan PMSG berulang yang diikuti oleh HCG terhadap perubahan kadar hormon estrogen dan progesteron.
5. Untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh antara $\text{PGF}_2\alpha$ dengan $\text{PGF}_2\alpha$ yang diikuti oleh PMSG dan antara PMSG berulang yang diikuti oleh HCG dilakukan dengan uji t.