

III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai Agustus 2003 di Laboratorium Fisiologi, Departemen Fisiologi dan Farmakologi, FKH IPB bekerja sama dengan Laboratorium Nutrisi dan Biologi Radiasi, Pusat Studi Ilmu Hayati (PSIH) IPB. Hewan percobaan yang digunakan adalah 36 ekor mencit putih betina (*Mus musculus*) berumur 8 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Pemuliaan Ternak, Departemen Ilmu Produksi Ternak FAPET IPB. Selama penelitian, mencit tersebut dipelihara di kandang (indoor) Unit Pelaksana Teknis Hewan Laboratorium (UPT Helab) FKH IPB.

Penelitian dilaksanakan dengan dua tahapan yaitu tahap persiapan dan tahap pelaksanaan. Tahap persiapan meliputi pembuatan ekstrak dan minuman ekstrak daun katuk, persiapan kandang, pakan dan hewan percobaan. Sedangkan tahap pelaksanaan dimulai dari perlakuan sampai pengamatan.

III.1. Pesiapan Pembuatan Ekstrak dan Minuman Ekstrak Daun Katuk

Katuk kering (KK) dan katuk hijau (KH) diperoleh dari hasil produksi standar PSIH IPB. Proses ekstraksi dari kedua bahan tersebut dilakukan menurut metode penelitian Yuliani dkk (1997). Prosedur ekstraksi yang digunakan adalah 100 g remasan daun katuk dilarutkan dalam pelarut ethanol 70% dengan perbandingan 1:4. Larutan ini dipanaskan dan diaduk selama 6 jam pada suhu 60°C, kemudian disaring dengan kertas saring sebanyak 2 kali. Filtrat yang dihasilkan diuapkan menggunakan *hot plate* selama 9 jam pada suhu 50°C. Ekstrak yang diperoleh berupa pasta sebesar 31% untuk ekstrak daun katuk kering (KK) dan 30% untuk ekstrak daun katuk hijau (KH).

Minuman ekstrak daun katuk diperoleh dengan cara melarutkan 6 gram ekstrak dalam 1 liter aquades sehingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak daun katuk 0.6%. Konsentrasi minuman ekstrak ini diperoleh berdasarkan hasil penelitian pendahuluan terhadap warna, aroma dan rasa larutan yang masih sesuai dengan tingkat palatabilitas mencit dalam bentuk sediaan minuman. Dosis yang diberikan pada mencit dengan bobot badan rata-rata 25 g dan rata-rata konsumsi minum 7 ml adalah 1.68 g/kg BB/hari. Dosis ini merupakan dosis yang aman bagi mencit dan berada di bawah dosis lethal sediaan daun katuk yang telah dilaporkan oleh Suprayogi (2002).

III.2. Persiapan Kandang, Pakan dan Hewan Percobaan

Sebelum penelitian dimulai, kandang, tempat pakan dan minum dibersihkan dan didesinfeksi menggunakan formalin 3%. Mencit ditempatkan dalam kandang plastik berukuran 40X30X15 cm dan ditutup dengan kawat. Kandang dialasi dengan sekam, kemudian 3 ekor mencit betina dimasukkan ke dalam setiap kandang. Pakan yang diberikan berupa pakan komersil HI-PRO-VITE 789[®] yang memiliki kandungan protein kasar 26-28%, lemak kasar 3-5%, serat kasar 4-6%, abu 5-8% dan kadar air 11-13%. Pemberian pakan dan minum dilakukan secara *ad libitum*. Rataan pakan yang dikonsumsi mencit setiap harinya selama breeding diperoleh sebesar 6.09 gram \pm 0.15 dan rata-rata minum mencit setiap harinya selama breeding sebesar 7.93 ml \pm 0.07. Kandang pemeliharaan dilengkapi dengan termohigrometer untuk mengukur suhu dan kelembaban harian. Rataan harian kondisi bioklimat ruang kandang selama penelitian adalah 26.88^oC \pm 2.75 dengan kelembaban 78.20% \pm 11.21.

III.3. Protokol Penelitian

Semua mencit diadaptasikan selama 14 hari untuk menghindari stress. Adaptasi terhadap lingkungan kandang dan pakan dilakukan selama 7 hari pertama, kemudian selama 7 hari berikutnya dilanjutkan dengan adaptasi perlakuan. Selama masa adaptasi ini, 36 ekor mencit putih betina dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok kontrol (K) yang hanya diberi air, kelompok ekstrak katuk kering (KK) dan kelompok ekstrak katuk hijau (KH). Masing-masing kelompok terdiri atas 12 ekor mencit putih betina dan memperoleh kesempatan yang sama dalam mendapatkan air minum. Pemberian minuman ekstrak daun katuk pada kelompok mencit percobaan dilakukan sampai penelitian berakhir atau sampai hewan pada masa post partus dan telah diambil sampel darahnya (\pm 28 hari).

Setelah melewati masa adaptasi, mencit dikawinkan dengan perbandingan jantan dan betina 1:3 sampai terjadi kebuntingan. Mencit betina yang terdeteksi bunting dipisahkan ke kandang lain sampai terjadi partus. Hal ini dilakukan agar mencit jantan tidak mengganggu mencit betina yang bunting hingga menjelang partus dan menghindari terjadinya perkawinan kembali setelah partus.

Setelah terjadinya partus, dilakukan pengambilan sampel darah dengan cara mengeutanasi induk mencit dengan menggunakan eter. Pada saat mencit dalam keadaan tidak sadar, dilakukan pengambilan sampel darah secara intra cardial dengan menggunakan spuit 1cc dan selanjutnya ditampung pada tabung yang sudah diberi anti koagulan EDTA untuk perlakuan selanjutnya. Sampel yang digunakan untuk setiap perlakuan pada masing-masing hari adalah 3 ekor bersamaan dengan pengamatan involusi uterus.

Pengambilan sampel darah dilakukan menurut waktu pengamatan yaitu:

- hari ke-0 (kurang lebih 24 jam post partus).
- hari ke-2 (kurang lebih 48 jam post partus).
- hari ke-5 (kurang lebih 120 jam post partus).
- hari ke-7 (kurang lebih 168 jam post partus).

Protokol penelitian secara rinci dapat dilihat pada Tabel 3.

III.4. Pengukuran Parameter Penelitian

a. Sel Darah Merah (Eritrosit)

Analisa sampel darah dilakukan dengan menggunakan hemositometer. Untuk menghitung jumlah sel darah merah digunakan kamar hitung Neubauer. Sebelumnya darah diambil dengan mengisapnya menggunakan pipet eritrosit sampai batas angka 0.5 kemudian diencerkan dengan menggunakan larutan *Hayem* dengan cara mengisapnya sampai batas tanda 101 pada pipet eritrosit. Kemudian dikocok membentuk gerakan angka 8 agar yang tercampur hanya larutan yang berada pada bagian pipet yang membesar saja (1.0-101.0). Larutan yang tidak terkocok dibuang, setelah itu setetes cairan yang terkocok dimasukkan ke dalam kamar hitung. Biarkan butir darah dalam kamar hitung mengendap terlebih dahulu sehingga memudahkan pengamatan. Untuk perhitungannya dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x (Djojosoebagio, 1989).

b. Nilai Hematokrit (PCV)

Pengukuran nilai hematokrit dilakukan dengan menggunakan tabung mikrokapiler yang sudah diisi darah dan disumbat ujungnya menggunakan

crestaseal kemudian disentrifuse selama 5 menit dan hasil yang diperoleh dibaca dengan *microcapillary hematokrit reader* (Djojosoebagio, 1989).

c. Kadar Hemoglobin (Hb)

Untuk mengukur nilai Hb dilakukan dengan metode Sahli. Mulanya tabung Sahli diisi dengan larutan HCL 0.1 N sampai angka 20 ml (garis paling bawah pada tabung). Kemudian darah diisap dengan pipet Sahli sampai batas angka 20 dan dicampurkan dengan HCL 0.1 N tersebut. Biarkan selama 3 menit hingga terbentuk asam hematin kemudian diaduk hingga homogen. Tabung Sahli diletakkan pada alat hemoglobinometer yang didalam terdapat standar warna. Kemudian ditambahkan aquades ke dalam tabung sambil diaduk sampai warnanya sama dengan warna standar. Pengukuran kadar hemoglobin diperoleh dengan membaca tinggi permukaan cairan pada tabung Sahli dan melihat skala kolom g% (Djojosoebagio, 1989).

d. Sel Darah Putih (Leukosit) dan Diferensiasi Leukosit

Untuk menghitung jumlah sel darah putih, tahapan yang dilakukan sama halnya dengan sel darah merah. Perbedaannya terletak pada pengencer yang digunakan yaitu larutan *Turk* dan cara penghitungannya pada kamar hitung. Penghitungan sel darah merah dilakukan dengan menghitung jumlah sel darah pada 5 kotak dari 25 bujur sangkar yang terdapat dalam kamar hitung (4 kotak yang terdapat pada sudut dan 1 kotak yang terletak di tengah). Bujur sangkar ini merupakan 1 bujur sangkar besar dari 9 bujur sangkar besar yang terletak ditengah-tengah pada kamar hitung. Penghitungan sel darah putih dilakukan dengan menghitung sel darah yang terdapat pada 4 kotak besar dan terletak pada sudut

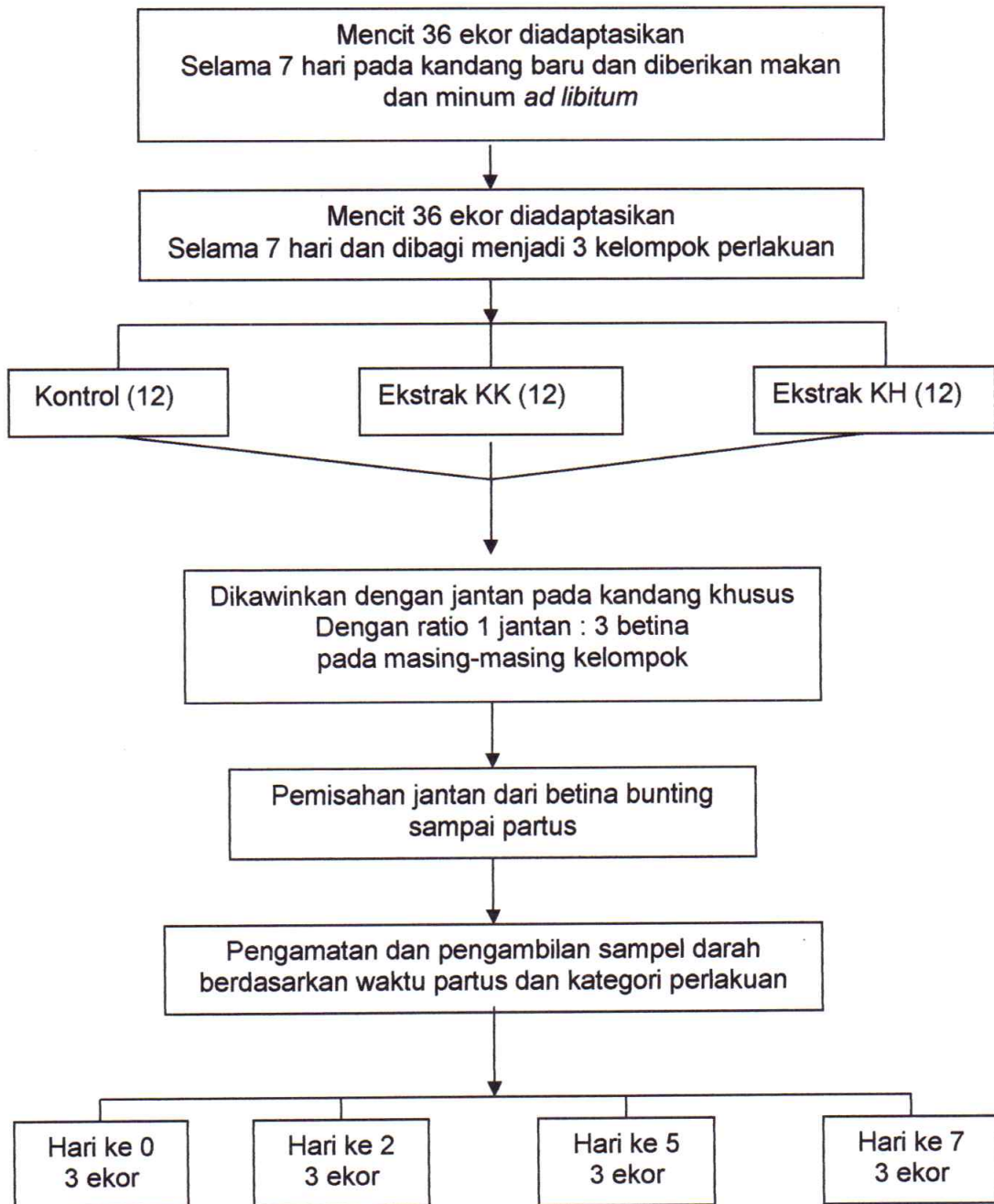
kamar hitung. Sedangkan diferensiasi leukosit dilihat dengan cara pembuatan preparat ulas darah tipis menggunakan pewarnaan giemsa dan dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali dengan bantuan minyak emersi (Djojosoebagio, 1989).

III.5. Pengolahan Data

Data yang diperoleh akan dianalisis menggunakan sidik ragam ANOVA untuk mengetahui interaksi antar kelompok perlakuan. Jika diantara perlakuan diperoleh hasil yang berbeda nyata akan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan. Secara skematis protokol penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Protokol penelitian.

Aktivitas	Minggu ke-									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Adaptasi										
Perlakuan pemberian minuman ekstrak KK dan KH										
Breeding										
Pemisahan betina bunting										
Partus										
Pengambilan sampel dan pengamatan										
Pengamatan preparat ulas darah										



Gambar 6. Gambaran Umum Metode Penelitian