

III. METODOLOGI

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juni sampai dengan bulan Agustus 2003, di Departemen Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor dan Laboratorium Nutrisi dan Biologi Radiasi, Pusat Studi Ilmu Hayati (PSIH), IPB.

Daun katuk kering dan katuk hijau diperoleh dari PSIH, IPB. Bahan tersebut diekstraksi dan ekstrak kentalnya dilarutkan dengan air sebagai minuman yang digunakan dalam penelitian ini. Hewan percobaan yang digunakan adalah 45 ekor mencit (*Mus musculus*) betina berumur 8 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Pemuliaan Ternak, Departemen Ilmu Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Mencit tersebut dipelihara di Unit Pelayanan Teknis Hewan Laboratorium (UPT-HELAB), dengan kondisi lingkungan kandang yaitu temperatur berkisar antara $26.88^{\circ}\text{C} \pm 2.75$ dan kelembaban $78.20\% \pm 11.21$.

III.1. Pembuatan Katuk Kering dan Katuk Hijau

Katuk hijau adalah daun katuk segar yang telah melalui proses fermentasi (oksidasi enzimatis) dan pengeringan, sedangkan katuk kering diperoleh dari daun katuk segar yang telah dikeringkan tanpa melalui proses fermentasi.

Daun katuk kering diperoleh dengan cara mengeringkan daun katuk segar menggunakan oven pada suhu 50°C selama 25 jam. Sedangkan katuk hijau diperoleh melalui beberapa tahap, antara lain perontokan, pelayuan, fermentasi (oksidasi enzimatis), dan pengeringan. Daun katuk yang telah dirontokkan dari batangnya dilayukan dalam mesin pelayu (*withering through*) selama 1 jam. Proses

fermentasi dilakukan dengan cara memasukkan daun yang telah layu ke dalam kotak gabus (*steroform*) selama 12 jam. Hasil fermentasi tersebut dikeringkan dalam oven 150 °C selama 1,5 jam.

III.2 Pembuatan Ekstrak Katuk Kering dan Katuk Hijau

Pembuatan ekstrak daun katuk sesuai dengan Yuliani *et al.* (1997), yaitu 100 gram remasan daun katuk yang sudah kering dilarutkan dalam etanol 70% dengan perbandingan 1:4. Larutan tersebut dipanaskan pada suhu 60 °C selama 3 jam sambil dilakukan pengadukan. Untuk memisahkan residunya maka dilakukan penyaringan sebanyak dua kali. Filtrat yang dihasilkan diuapkan dengan *hot plate* selama 9 jam pada suhu 50 °C. Ekstrak yang diperoleh berupa cairan kental yang menyerupai pasta. Kadar katuk hijau yang didapat adalah 30% dan kadar katuk kering yang didapat adalah 31%.

Larutan ekstrak daun katuk diperoleh dengan cara melarutkan 6 gram ekstrak kental ke dalam 1 liter aquades, sehingga didapatkan konsentrasi 0,6%. Dosis yang diberikan pada mencit dengan rata-rata BB 25 gram dan konsumsi minum rata-rata 7 ml/ekor/hari adalah 1,68 g/kg BB.

III.3 Persiapan Kandang dan Hewan Coba

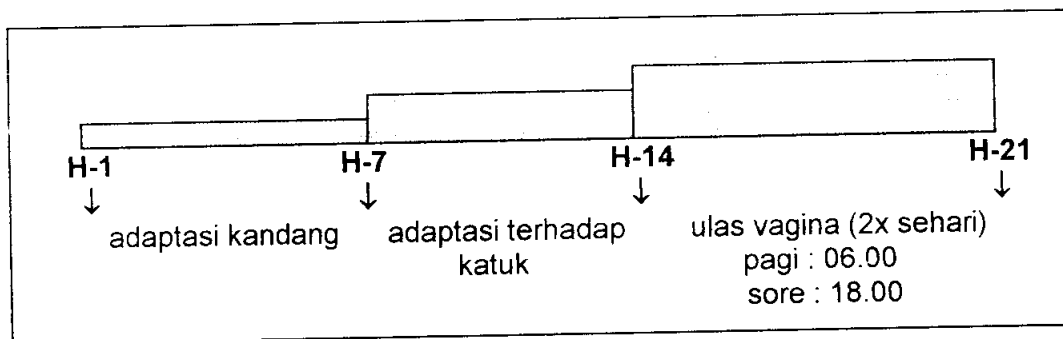
Sebelum penelitian, kandang, tempat pakan dan minum dibersihkan dan didesinfeksi menggunakan formalin 3%. Kandang yang digunakan adalah kotak plastik berukuran 40x30x15 cm dengan tutup terbuat dari kawat, dan dialasi dengan sekam padi yang diganti setiap hari. Tiap kandang berisi 3 ekor mencit.

Pakan yang diberikan adalah pakan komersial HI-PRO-VITE 789[®]. Pakan tersebut mempunyai kandungan, antara lain protein kasar 26-28%, lemak

kasar 3-5%, serat kasar 4-6%, abu 5-8%, dan kadar air 11-13%. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Suhu dan kelembaban ruangan kandang diukur setiap hari menggunakan termohigrometer. Rataan harian kondisi bioklimat ruang kandang selama penelitian berlangsung adalah $26.88\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.75$ dengan kelembaban $78.20\% \pm 11.21$. Setelah proses adaptasi selesai, dilakukan pengambilan sampel (ulas vagina) (Gambar 11).

III.4 Protokol Penelitian

Sebelum penelitian dimulai, mencit diadaptasikan terhadap lingkungan yang baru. Adaptasi tersebut meliputi, 7 hari adaptasi terhadap kandang dan makanan. 7 hari berikutnya adaptasi terhadap perlakuan (minuman ekstrak daun katuk). Setelah masa adaptasi selesai, maka dilanjutkan dengan pengambilan sampel ulas vagina. Ulas vagina dilakukan 2 kali sehari, pagi dan sore hari.



Gambar 11. Protokol Penelitian

III.5 Teknik Persiapan Ulas Vagina

Ulas vagina dilakukan setiap 12 jam selama 7 hari, karena siklus estrus mencit berlangsung selama 4-5 hari. Pembuatan preparat ulas vagina dilakukan dengan mengusapkan kapas bertangkai (cotton bud) yang telah dibasahi dengan

dengan mengusapkan kapas bertangkai (cotton bud) yang telah dibasahi dengan NaCl 0,9% ke dalam vagina mencit, kemudian diulaskan pada gelas obyek. Preparat difiksasi dengan metanol selama 15 menit. Preparat yang telah dikeringudarkan diwarnai dengan cara direndam dalam bak berisi Giemsa selama 30 menit dan dibilas pada air yang mengalir. Pemeriksaan preparat ulas vagina dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya.

III.6 Pemeriksaan Preparat Ulas Vagina

Pengamatan preparat ulas vagina menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X. Penentuan fase siklus reproduksi (proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus) diidentifikasi dari peluruhan sel-sel epitel vagina dan perbandingan jumlah masing-masing jenis sel, seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Perbandingan jenis-jenis sel pada preparat ulas vagina

Fase Siklus Estrus	Ulasan Vagina
Proestrus	Sel berinti \pm 75% Sel tanduk (kornifikasi) \pm 25%
Estrus	Sel tanduk \pm 75% Sel pavement (menumpuk) \pm 25%
Metestrus	Sel pavement 100% Sel pavement dan Leukosit
Diestrus	Leukosit 100% Leukosit dan sel berinti mulai muncul

Sumber : Baker, 1979

III.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis menggunakan Uji Sidik Ragam (ANOVA) dengan Rancangan Acak Kelompok, dan jika terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan uji lanjut (*Duncan Test*) (Steel dan Torrie, 1993).