

BAB III

MATERI DAN METODE

Kegiatan penelitian dilaksanakan pada tanggal 10 Maret – 31 Mei 2016 di usaha penangkaran Rusa Timor milik Bapak H. Yusuf Wartono, Dusun Pelang, Desa Margorejo, Kecamatan Dawe, Kabupaten Kudus, Provinsi Jawa Tengah. Analisis mineral dalam pakan dilakukan di Laboratorium Balai Besar Teknologi Pencegahan Pencemaran Industri (BBTPPI), Semarang.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan adalah rusa Timor (*Rusa timorensis*) betina sebanyak 10 ekor, *poel* 2 dan BCS 2 - 3,25 dengan kriteria penampilan fisik sehat dan sudah pernah partus.

Alat yang digunakan dalam proses pembuatan mineral blok adalah alat press mineral untuk mencetak bahan baku mineral blok, ember untuk mencampur bahan pakan, kuas untuk mengoleskan minyak pada permukaan alat press, gelas untuk mencampur air, garam, vitamin dan mineral, tongkat penekan berfungsi sebagai alat untuk menekan bahan pakan yang dimasukkan kedalam alat press, gelas ukur volume 1 liter untuk mencampur molasses dengan bahan yang larut air, timbangan analitik untuk menimbang bahan pakan dengan jumlah sedikit, timbangan kapasitas 5 kg untuk menimbang bahan dalam jumlah banyak, oven sebagai alat untuk mengeringkan mineral yang sudah tercetak, blender untuk menghaluskan garam, sendok untuk mengaduk bahan pakan larut air, dan kertas minyak sebagai alas mineral blok yang akan dicetak. Bahan yang digunakan

adalah bekatul, onggok kering, bungkil kedelai, premix, garam, molases, vitamin ADEK, mikro mineral berupa zinc (Zn), Selenium (Se) dan makromineral Magnesium (Mg), minyak sayur, sabun cair dan air.

Alat yang digunakan untuk membuat *sprit* modifikasi meliputi *sprit* 3 cc, benang wol untuk membuat rumbai-rumbai sebagai penyeimbang *sprit*, jarum 18G, kikir untuk melubangi jarum, lem perekat untuk menutup lubang asli jarum, ban karet untuk menutup lubang buatan pada jarum supaya kondisi *sprit* tulup dalam keadaan vakum, pinset untuk meratakan lem perekat, gas jorek api sebagai pemberi tekanan pada *sprit* tulup. Alat yang digunakan saat proses pelaksanaan penulupan adalah tulup, dan *sprit* tulup sebagai tempat untuk menyuntikkan *Acepromazine* (ACP). Bahan yang digunakan adalah ACP sebanyak 0,4 – 0,5 ml/ekor, dan alkohol untuk mensterilkan jarum.

Alat yang digunakan saat pelaksanaan sinkronisasi adalah pencetak spons untuk mencetak spons, jarum untuk memasang benang pada spons, benang sebagai pengikat spons supaya spons tidak hilang saat dipasang pada rusa, *sprit* 10 cc untuk mengambil metanol dan *Medroxy Progesterone Acetat* (MPA), mangkok sebagai tempat untuk meletakkan campuran metanol dan MPA yang akan dibalutkan ke spons vagina, ember sebagai tempat untuk mencuci spons yang akan diberi MPA, box pengering untuk mengeringkan spons yang sudah dicuci dan sudah diberi MPA, sarung tangan untuk melindungi tangan kontak langsung dengan spons vagina yang sudah dibaluti MPA, dan aplikator sinkronisasi untuk memasukan spons pada vagina rusa. Bahan yang digunakan adalah MPA sebagai hormon yang digunakan untuk memicu berahi rusa, metanol sebagai pengencer

MPA, sabun cair untuk mencuci spons, aquabidest, tissue untuk membersihkan peralatan, alkohol untuk mensterilkan alat, betadin salep sebagai antiseptik dan KY gel sebagai pelicin aplikator sinkronisasi.

Alat yang digunakan untuk pembuatan preparat apus vagina yaitu speculum untuk membuka vulva, *cotton swab* untuk mengulas sel epitel vagina, *object glass* untuk membuat preparat apus vagina, *slide box* untuk menyimpan preparat apus vagina, kertas label untuk memberi kode setiap preparat, *sprit* 10 cc untuk menyemprotkan metanol dan giemsa pada preparat, dan mikroskop untuk mengamati sel epitel vagina pada preparat. Bahan yang digunakan yaitu KY gel sebagai pelumas speculum, metanol untuk memfiksasi sel pada preparat, dan giemsa sebagai pewarna preparat.

3.2. Metode Penelitian

3.2.1. Prosedur penelitian

Kandang pengamatan dibersihkan terlebih dahulu dan bak air minum diisi hingga penuh, kemudian 10 ekor rusa ditempatkan di kandang pengamatan seluas 50 m². Tempat pengamatan tingkah laku rusa Timor dibuat berjarak 15 m dari kandang pengamatan untuk meminimalisir stress pada rusa. *Gang way* dibersihkan dan diberi atap dari terpal untuk tempat pengambilan sampel.

Rusa diadaptasikan selama delapan minggu pada kandang pengamatan dengan dipisahkan menjadi dua kelompok sesuai perlakuan yang akan diberikan dimana setiap kelompok terdiri dari lima ekor. Perlakuan yang diberikan adalah T0 (tanpa suplementasi mineral) dan T1 (dengan suplementasi mineral). Kedua

kelompok ternak diberi pakan rumput gajah, rumput lapang, singkong dan diberi minum secara *ad libitum*. Kelompok T1 diberi suplementasi mineral blok dengan kandungan mineral magnesium (Mg) 1,25 gr/kg, zinc (Zn) 0,075 gr/kg dan selenium (Se) 0,00025 gr/kg.

Pembuatan mineral blok dilakukan dengan cara menyiapkan bahan baku yang terdiri atas bekatul, bungkil kedelai, molases, onggok, garam, mineral mix, vitamin A,D,E,K, magnesium, selenium, dan zinc. Bahan ditimbang sesuai formulasi, kemudian dicampur dimulai dari bahan yang jumlahnya paling besar hingga terkecil menggunakan ember. Sebanyak 70 ml air ditambahkan dalam campuran. Seluruh permukaan alat press diolesi dengan minyak sayur sembari mengaduk rata semua bahan hingga homogen, kemudian campuran dimasukkan ke dalam alat press. Campuran mineral blok dipress selama ± 15 menit, setelah itu mineral blok diangkat dari alat press dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 59° C selama 48 jam hingga mineral blok mengeras. Berikut adalah formulasi mineral blok yang digunakan :

Tabel 1. Formulasi Mineral Blok

No.	Bahan	Persentase (%)
1.	Molases	35
2.	Bekatul	40
3.	Bungkil Kedelai	10
4.	Garam	6
5.	Vitamin A D E K	0,04699
6.	Onggok	6,9
7.	Mineral mix	2
8.	Mineral	
	- Mg	0,05
	- Zn	0,003
	- Se	0,00001
Total		100

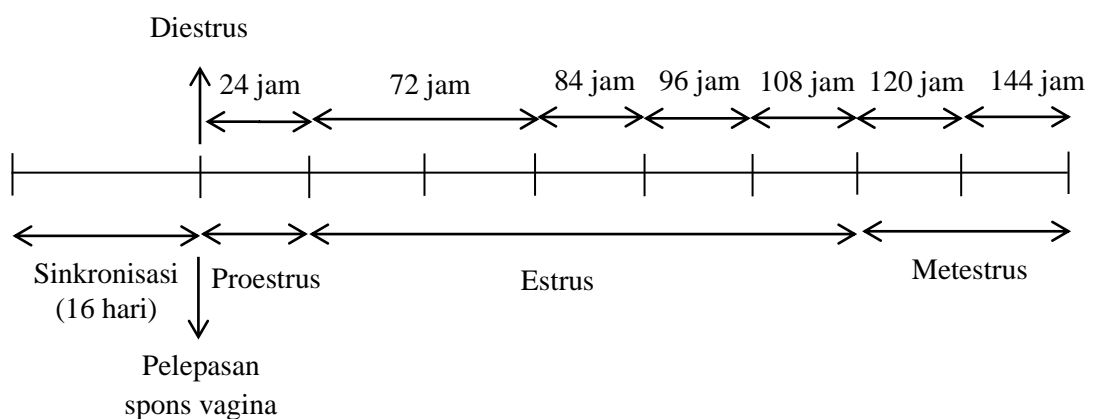
Spuit modifikasi dibuat dengan bahan-bahan yang terdiri dari *spuit* 3 ml, jarum 18G, lem kaca, ban bekas, dan kikir. Bantalan pendorong pada *spuit* disusun sebanyak 3 buah secara sejajar. Bantalan paling luar dikunci menggunakan jarum 24G. Rumbai-rumbai dari benang wool dibuat sebagai penyeimbang gerakan *spuit*, kemudian dipasang di bantalan paling luar. Jarum 18G dipasang di bagian ujung *spuit*, kemudian bagian tengah jarum 18G dikikir hingga terbentuk lubang kecil, kemudian bagian ujung jarum 18G dilem menggunakan lem kaca dan lubang yang sudah dikikir ditutup dengan potongan ban bekas. Uji kebocoran dilakukan pada jarum 18G sebelum digunakan. Setelah uji kebocoran selesai, jarum 18G dipasangkan dengan *spuit* modifikasi.

Pembuatan spons vagina diawali dengan mencetak spons menggunakan cetakan berbentuk silinder dengan tinggi 4 cm dan diameter 3 cm. Spons diikat dengan benang nilon sepanjang 60 cm menggunakan jarum. Spons yang sudah jadi dicuci dengan sabun cair kemudian dibilas dengan air mengalir. Spons dikeringkan dalam kotak pengering selama 48 jam. Bagian permukaan spons dicelupkan dalam larutan *Medroxy Progesterone Acetate* (MPA) yang telah diencerkan dengan metanol sebanyak 20 mg/ml. Spons dikeringkan kembali di dalam box pengering selama 48 jam sampai spons benar-benar kering.

Pemberian obat penenang dilakukan dengan cara menyiapkan obat penenang yang akan diberikan yaitu *Acepromazine* (ACP), tulup, gas korek api, dan *spuit* 3 ml yang telah dimodifikasi. Sebanyak 0,4 ml ACP dimasukkan ke dalam *spuit*, kemudian mengisi *spuit* yang telah diisi ACP dengan gas korek api. *Sput* yang sudah berisi gas dimasukkan ke dalam lubang tulup, kemudian *spuit*

yang berisi ACP ditembakkan menggunakan tulup pada rusa yang dijadikan sasaran.

Sinkronisasi berahi dilakukan dengan sterilisasi aplikator dan vulva rusa dengan alkohol 70%. Aplikator diolesi dengan KY gel dan spons vagina diolesi betadine salep untuk menghindari terjadinya infeksi pada bagian dalam vagina. Spons vagina yang telah diberi MPA dimasukkan ke dalam aplikator, kemudian diimplantasikan ke dalam vagina rusa selama 16 hari. Setelah spons berhasil diimplantasikan, aplikator dikeluarkan secara perlahan dari lubang vagina rusa, kemudian aplikator disterilisasi ulang dengan alkohol agar dapat digunakan kembali. Berikut adalah rentang waktu penentuan siklus estrus mulai dari sinkronisasi berahi :



Ilustrasi 1. Rentang Waktu Penentuan Siklus Estrus

Pembuatan preparat apus vagina dilakukan dengan cara membuka vulva rusa dengan *speculum* yang sudah diolesi dengan KY gel, kemudian sampel ulasan vagina diambil kira-kira 2 cm dari vulva menggunakan *cotton swab*. Hasil ulasan dioleskan pada *object glass* sebanyak 5 preparat ulasan dan dibiarkan

kering udara. Preparat ulas vagina disiram dengan metanol kemudian diwarnai dengan pewarna Giemsa, kemudian dikeringudarkan kembali selama kurang lebih 1 jam. Sel epitel vagina diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Perhitungan dilakukan minimum 200 sel pada setiap sampel ulasan vagina yang diamati (Najamudin *et al.*, 2010). Hasil pengamatan tiap preparat pada setiap fase dijumlahkan dan ditabulasikan ke dalam bentuk persentase. Kriteria penentuan siklus estrus berdasarkan gambaran sel epitel vagina disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Kriteria Penentuan Siklus Estrus Berdasarkan Gambaran Bentuk Sel Epitel

Sel epitel	Bentuk sel	Fase
Sel parabasal	Sel kecil, bulat dengan inti besar	Diestrus
Sel intermediet	Sel lebih besar daripada sel parabasal dengan inti yang lebih kecil	Diestrus-proestrus
Sel superfisial	Sel besar, berbentuk poligonal inti yang sangat kecil atau tanpa inti	Proestrus-estrus

Sumber : Nalley *et al.* (2011)

Pengambilan data dilakukan sebanyak 8 kali setelah pelepasan implan spons vagina yaitu :

- Setelah pelepasan implan MPA (diasumsikan fase diestrus)
- 24 jam setelah pelepasan implan MPA (diasumsikan fase proestrus)
- 72 jam, 84 jam, 96 jam, dan 108 jam setelah pelepasan implan MPA (diasumsikan fase estrus)
- 120 jam dan 144 jam setelah pelepasan implan MPA (diasumsikan fase metestrus)

3.2.2. Parameter

Parameter yang diamati dalam penelitian adalah persentase sel epitel parabasal, sel superfisial, dan sel intermediet pada setiap fase. Preparat yang diamati sebanyak 5 preparat apusan vagina, kemudian sel-sel tersebut dihitung sebanyak 200 sel pada setiap preparat dan persentase sel pada setiap fase estrus dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Nalley, 2006).

$$\% \text{ sel epitel vagina} = \frac{\text{jumlah sel teramati}}{\text{jumlah sel yang diharapkan}} \times 100\%$$

3.2.3. Analisis data

Data sel epitel parabasal, sel superfisial dan sel intermediet untuk membandingkan perbedaan tampilan sel epitel vagina antara kelompok dengan perlakuan suplementasi mineral dan tanpa perlakuan suplementasi, dilakukan uji statistik pada sampel menggunakan *independent t test* dengan rumus (Park, 2005).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sp \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

Hipotesis penelitiannya adalah:

H₀ : $\tau_1 = \tau_2$ (tidak terdapat perbedaan tampilan sitologi vagina antara kelompok rusa Timor dengan suplementasi mineral dan tanpa suplementasi mineral blok)

H₁ : $\tau_1 \neq \tau_2$ (terdapat perbedaan tampilan sitologi vagina antara kelompok rusa Timor dengan suplementasi mineral dan tanpa suplementasi mineral blok)