

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 10 Maret sampai dengan 31 Mei 2016 di Penangkaran rusa Timor milik Bapak H. Yusuf Wartono di desa Margorejo, kecamatan Dawe, kabupaten Kudus sekaligus dilakukan penghitungan data total leukosit dan diferensial leukosit. Analisis kandungan mineral darah dilakukan di Laboratorium Gizi Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.2. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sepuluh ekor Rusa Timor betina dewasa dan darah yang dari masing-masing rusa tersebut. Rusa yang digunakan memiliki kriteria sehat, tidak cacat, kondisi reproduksi sudah pernah melahirkan dengan *Body Condition Score* (BCS) 2-3,25 (Lampiran 2) dan *poel 2*. BCS merupakan metode untuk memberi nilai skor tubuh ternak melalui penilaian visual dan perabaan pada timbunan lemak tubuh di bawah kulit pada bagian pangkal ekor, tulang punggung dan pinggul (Budiawan *et al.*, 2015). Kriteria lengkap setiap nilai BCS disajikan pada Lampiran 1.

Alat yang digunakan dalam analisis mineral pakan adalah timbangan, oven, tanur, lemari asam, dan *beaker glass* 50 ml. Bahan yang digunakan adalah kertas

saring, pipet HNO₃, aquademin, HNO₃, amplop besar, singkong, rumput gajah, rumput lapang, mineral blok.

Alat-alat dalam pembuatan mineral blok adalah alat pencetak, ember, kuas, gelas, tongkat penekan, sendok, gelas ukur 1000 ml, timbangan kapasitas 5 kg, timbangan analitik, oven, *blender*, dan sendok pengaduk. Bahan yang digunakan adalah kertas minyak, air, minyak sayur, sabun cair, bekatul, molases, onggok, garam, bungkil kedelai, vitamin (A, D, E dan K), dan mineral (Mg, Zn dan Se).

Alat yang digunakan untuk pemberian obat penenang adalah tulup, gas korek, *sputit* 3cc, kikir, pinset, karet, serta jarum suntik ukuran 18 G. Bahan yang digunakan adalah alkohol, *Acepromazine* (ACP), lem, ban karet, dan benang wol.

Alat yang digunakan dalam pengambilan sampel darah adalah penutup mata, tali, *sputit* 10 cc, tabung EDTA, tabung non-EDTA, *cooling box*, serta *ice pack*. Bahan yang digunakan adalah kapas dan alkohol 70%.

Alat-alat dalam sinkronisasi estrus adalah pencetak spon, jarum, benang, mangkok, kotak pengering, spekulum, dan aplikator sinkronisasi. Bahan yang digunakan adalah sabun cair, *Medroxy Progesterone Acetat* (MPA), tisu, etanol, *aquabidest*, *sputit* 10 cc, spon, alkohol 70%, *gloves*, betadin salep, dan KY jell.

Alat-alat untuk pengambilan serum darah adalah sentrifuge, tabung EDTA, tabung non-EDTA, *sputit* 3 cc, eppendorf 1,5cc, plastik klip, *cooling box*, *ice pack*, dan *freezer*. Bahan yang digunakan adalah kertas label dan sampel darah.

Alat yang digunakan dalam penghitungan total leukosit adalah tabung EDTA, *cooling box*, *ice pack*, pipet hisap darah, bilik hitung *haemocytometer*

neubauer, *cover glass*, mikroskop, alat tulis, dan lembar pengamatan. Bahan yang digunakan adalah sampel darah, dan larutan *Turk*.

Alat yang digunakan dalam penghitungan diferensial leukosit adalah tabung EDTA, *cooling box*, *ice pack*, *object glass*, *slide box*, mikroskop, stik kecil, alat tulis dan lembar pengamatan. Bahan yang digunakan adalah kertas label, sampel darah, metanol, giemsa, *aquadest*, tisu, dan minyak imersi.

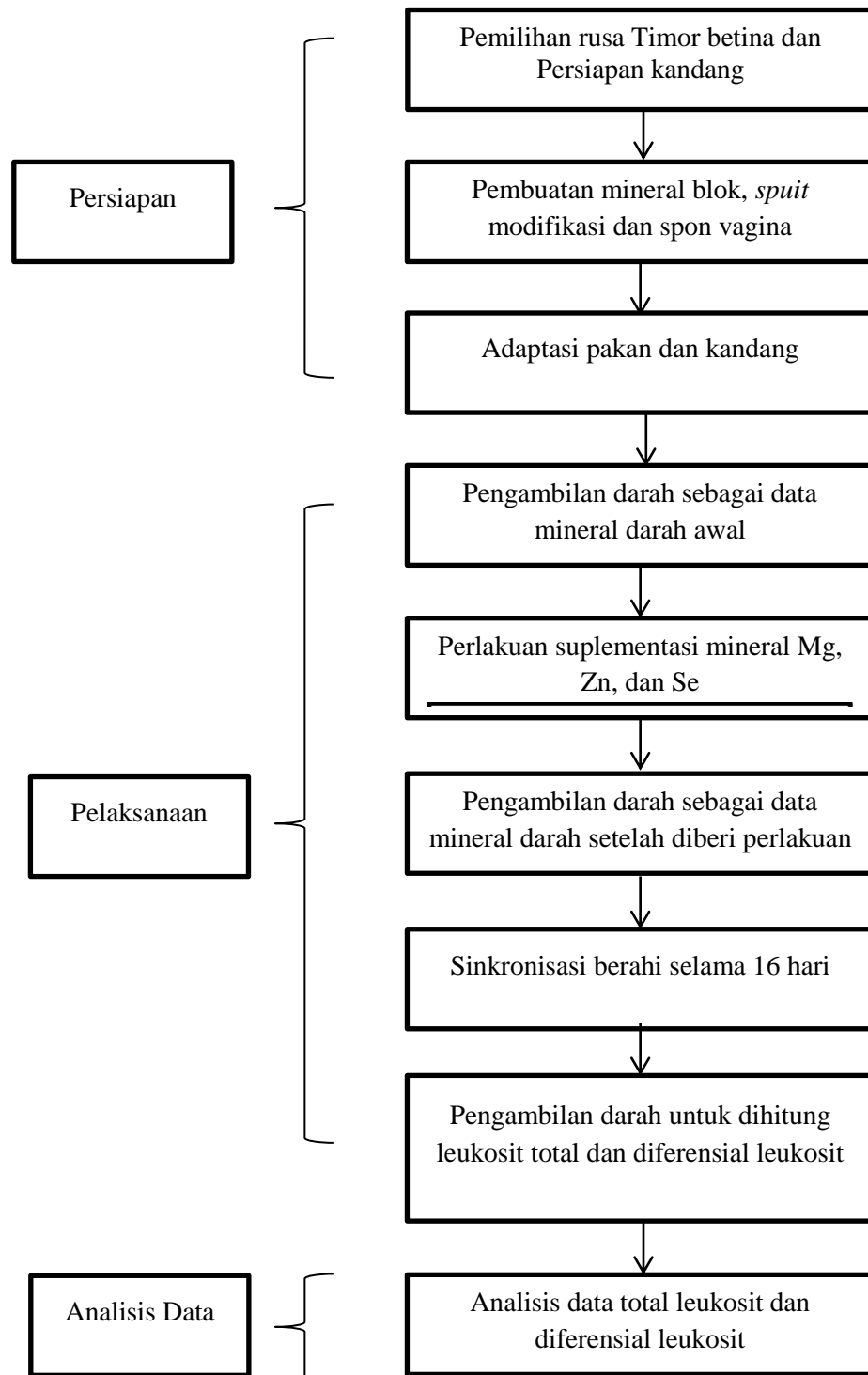
3.3. Metode

3.3.1. Persiapan

Tahap persiapan terdiri dari analisis kandungan mineral pakan, persiapan kandang pengamatan, pemilihan unit percobaan, serta pembuatan mineral blok, *sput* modifikasi, dan spon vagina.

Kandang pengamatan disiapkan sebanyak dua unit. Kemudian dilanjutkan dengan memilih rusa sebanyak sepuluh ekor sesuai kriteria yang telah ditentukan, lalu dipindahkan ke kandang pengamatan dengan pembagian lima ekor setiap kandang.

Komposisi mineral blok terdiri dari bahan utama, bahan pengisi dan bahan tambahan. Bahan utama yang digunakan adalah molases dan bahan pengisi terdiri dari bekatul, onggok dan bungkil kedelai. Bahan tambahan terdiri dari garam, vitamin dan mineral yang terdiri dari mineral *premix*, Mg, Zn serta Se. Formulasi lengkap mineral blok yang akan digunakan disajikan dalam Tabel 1.



Ilustrasi 2. Alur Penelitian.

Tabel 1. Formulasi Mineral Blok

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

Mineral, vitamin dan garam dilarutkan ke dalam molases dan diaduk hingga homogen. Sementara itu, bahan utama dan bahan pengisi juga diaduk rata. Kemudian kedua campuran bahan disatukan dan diaduk homogen hingga membentuk adonan berwarna kecokelatan yang lembab dan lengket. Adonan dimasukkan ke dalam alat pencetak sedikit demi sedikit sambil ditekan hingga padat dan membentuk blok. Mineral blok selanjutnya dimasukkan ke dalam oven dan dikeringkan pada suhu 59⁰C selama 48 jam.

Pembuatan *sprit* modifikasi dilakukan dengan menambahkan tiga karet pada bagian dalam tabung *sprit* 3cc untuk mengkondisikan tabung *sprit vacuum* dan untaian benang wol pada bagian belakang sebagai pemberat saat *sprit* ditembakkan. Kemudian mengisikan gas pada bagian belakang tabung *sprit* untuk memberikan tekanan otomatis saat *sprit* tertancap. Bagian depan *sprit* diisi 0,5 ml larutan *Acepromazine* (ACP) dan *sprit* modifikasi dimasukkan ke pipa tulup.

Spon vagina dibentuk menggunakan alat pencetak berbentuk tabung. Selanjutnya spon diberi benang yang dijahitkan dari sisi dalam spon yang berfungsi sebagai pegangan ketika spon akan dilepas. Spon kemudian dicuci dengan sabun hingga bersih dan dikeringkan di kotak pengering bersuhu 30⁰C selama 48 jam. Setelah spon kering, bagian sisi selimut spon dilumuri dengan larutan campuran MPA dan methanol yang sebelumnya sudah disiapkan, kemudian dikeringkan kembali dan dibungkus satu per satu.

3.3.2. Pelaksanaan penelitian

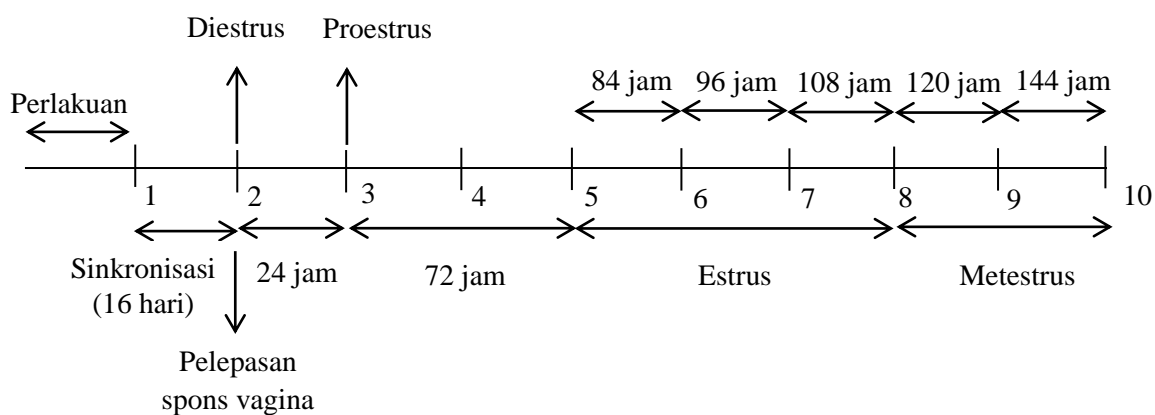
Penelitian diawali dengan mengadaptasikan rusa dan diberi perlakuan pakan pada setiap kelompok, kemudian diberikan obat penenang untuk mengurangi keagresifannya. Sampel darah diambil guna memperoleh serum, serta menghitung total leukosit dan diferensial selnya. Rusa diadaptasikan selama dua hari pada kandang pengamatan dengan dipisahkan menjadi dua kelompok sesuai perlakuan yang akan diberikan di mana setiap kelompok terdiri dari lima ekor. Perlakuan yang diberikan adalah T0 (tanpa penambahan mineral blok) dan T1 (dengan penambahan mineral blok). Sementara ternak diadaptasikan, selain kedua kelompok diberikan pakan berupa rumput gajah, rumput lapang dan singkong, kelompok dengan perlakuan T1 sekaligus mulai diterapkan penambahan mineral blok dengan komposisi Mg 1,25 gr/2,5 kg ; Zn 0,075 gr/2,5 kg; serta Se sebesar 0,00025 gr/2,5 kg.

Obat penenang berupa ACP diaplikasikan dengan meniupkan tulup pada sasaran paha kaki belakang rusa, kemudian menunggu reaksi ACP sekitar 30

menit untuk kemudian dapat ditangkap dan di-*handling* guna pelaksanaan sinkronisasi dan pengambilan data darah.

Sampel darah diambil pada bagian vena jugulari leher sebanyak 8 ml/ekor menggunakan *sprit* 10 cc sebanyak dua kali pengambilan. Bagian vena jugularis sebelumnya diberi alkohol 70% untuk mensterilkan area tersebut. Darah yang sudah diambil kemudian dipindahkan ke tabung EDTA dan digojog membentuk angka delapan selama 2 menit untuk menghindari koagulasi, kemudian dimasukkan ke dalam *cooling box* yang sudah dilengkapi *ice pack*. Sampel darah digunakan untuk menghitung total leukosit dan diferensial leukosit.

Sampel darah setiap ekor rusa diambil sebanyak sepuluh kali yang digambarkan pada Ilustrasi 3.



Ilustrasi3. Rentang Waktu Pengambilan Darah selama Siklus Estrus.

Berdasarkan ilustrasi tersebut dapat dijelaskan titik pengambilan darah sekaligus asumsi fase-fase berahi selama satu siklus estrus sebagai berikut:

- Sebelum perlakuan
- Sebelum pemasangan implan MPA

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

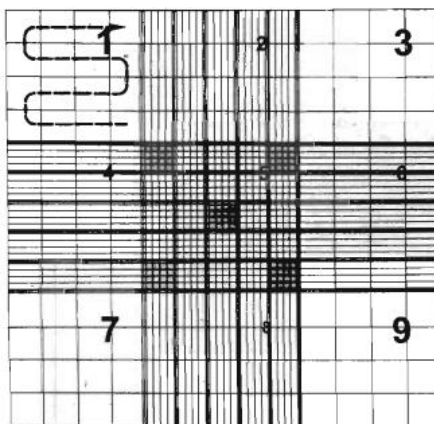
Sampel darah yang diperoleh kemudian disentrifugasi untuk memperoleh serum darah dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit hingga serum darah terpisah di bagian atas. Kemudian dipindahkan menggunakan *sprit* 3 cc ke dalam tabung eppendorf dan disimpan dengan suhu -20°C untuk mempertahankan kualitas darah hingga siap dianalisis. Serum darah ini digunakan untuk analisis kandungan mineral dalam darah.

Pelaksanaan sinkronisasi estrus dilakukan dengan cara spon dimasukkan ke dalam vagina rusa dengan memasang spekulum yang sudah diolesi KY jell pada vulva Rusa betina. Kemudian spon diolesi betadin salep terlebih dahulu untukantisipasi jika terjadi luka pada saat pemasangan. Spon dimasukkan menggunakan aplikator sinkronisasi kemudian aplikator dimasukkan ke dalam vagina melalui lubang spekulum. Selanjutnya spon didorong menggunakan pendorong aplikator hingga mencapai vagina bagian paling dalam, aplikator dan spekulum kemudian dilepaskan. Sinkronisasi dilakukan pada seluruh unit percobaan pada minggu ke-7 perlakuan selama 16 hari.

Penghitungan total leukosit diawali dengan pengambilan sampel darah dari tabung EDTA menggunakan pipet darah sebanyak 0,5 ml kemudian mengambil larutan *Turk* yang terdiri dari 1 ml asam glasial, 1 ml asam gentian violet 1% dan 100 ml aquades (Maftuch *et al.*, 2012) hingga angka 1,1 pada pipet darah. Larutan

dihomogenkan dengan cara digojog membentuk angka 8 beraturan selama 2 menit sembari disiapkan kotak hitung *hemocytometer neubauer* yang sudah ditutupi *cover glass*, kemudian diteteskan dengan larutan yang sudah homogen. Pastikan tetesan larutan tidak melampaui garis batas kotak hitung. Diamkan kotak hitung selama 3 menit agar sel-sel darah mengendap. Amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x hingga ditemukan posisi kotak hitung, kemudian perbesaran ditambah menjadi 400x untuk menghitung jumlah leukosit. Hitung leukosit pada kotak pojok kiri atas, pojok kanan atas, pojok kiri bawah dan pojok kanan bawah (kotak 1, 3, 7, dan 9) dengan luas total 4 mm² seperti ilustrasi 3. Jumlah leukosit yang terhitung kemudian dikonversi untuk mengetahui jumlah leukosit per liter menggunakan rumus berikut:

$$\text{Jumlah leukosit per liter} = \text{Jumlah leukosit terhitung} \times 4 \times \frac{10}{4} \times 20$$



Ilustrasi 4. Gambar Kotak Hitung (Chairlan dan Lestari, 2002).

Penghitungan diferensial leukosit dilakukan dengan mengambil sampel darah kemudian dibuat menjadi ulasan darah dan dianginkan-anginkan, kemudian difiksasi menggunakan methanol selama \pm 3 menit. Selanjutnya dikeringkan dan

diwarnai dengan larutan giemsa 20% selama \pm 15 menit, lalu dikeringkan kembali. Selanjutnya dicuci dengan aquades dan dikering udarakan untuk selanjutnya dapat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Guna mempermudah pengamatan ditetaskan minyak imersi 1-2 tetes pada preparat. Pengamatan didasarkan kepada pendapat Mahasri (2011) yang mengklasifikan limfosit memiliki ciri-ciri berinti sel besar dan berbentuk bulat, sedangkan monosit berukuran besar dan tidak teratur. Neutrofil berbentuk oval dengan sitoplasma ganda dan inti sel eksentrik, eosinofil berbentuk bulat dengan inti sel eksentrik, serta basofil memiliki inti sel eksentrik yang jarang. Perhitungan dilakukan hingga terhitung sejumlah 100 sel diferensial leukosit kemudian tentukan persentase masing-masingnya.

3.3.3. Analisis data

Data yang diperoleh meliputi jumlah leukosit dan persentase sel neutrofil, eosinofil, basofil, monosit dan limfosit pada tiap fase berahi. Metode analisis data yang digunakan adalah analisis deskriptif untuk mengetahui dinamika total leukosit dan diferensialnya pada tiap fase estrus yang disajikan dalam bentuk grafik. Sebelum dianalisis dengan uji lanjutan, seluruh data yang diperoleh diuji normalitas dan homogenitasnya terlebih dahulu menggunakan aplikasi SPSS 16.0. Data yang tidak terdistribusi normal dan/atau tidak memiliki varian yang homogen, kemudian ditransformasi.

Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas, maka untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan total leukosit, persentase neutrofil, monosit, dan imfosit

antara kelompok rusa dengan dan tanpa suplementasi Mg, Zn, dan Se pada tiap fase estrus menggunakan metode T-test.

Hipotesis penelitiannya adalah:

H0 : tidak terdapat perbedaan rata-rata total leukosit/persentase neutrofil/basofil/monosit antara kelompok rusa Timor dengan penambahan mineral dan tanpa penambahan mineral Mg, Zn dan Se

H1 : terdapat perbedaan rata-rata total leukosit/persentase neutrofil/basofil/monosit antara kelompok rusa Timor dengan penambahan mineral dan tanpa penambahan mineral Mg, Zn dan Se.

Data persentase eosinofil dan limfosit yang tidak memenuhi syarat normal atau homogen diketahui perbedaan antara kelompok rusa dengan dan tanpa suplementasi mineral Mg, Zn, dan Se melalui metode Mann-Whitney U-Test.

Hipotesis penelitian adalah:

H0 : kedua kelompok identik (persentase eosinofil/limfosit kelompok rusa Timor dengan penambahan mineral dan tanpa penambahan mineral Mg, Zn, dan Se tidak berbeda secara signifikan)

H1 : kedua kelompok tidak identik/berbeda dalam data persentase eosinofil/limfosit kelompok rusa Timor dengan dan tanpa penambahan mineral Mg, Zn, dan Se.