



## BAHAN DAN METODE PENELITIAN

### Bahan dan Alat Penelitian

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley (SD) berumur 2 minggu sebanyak 162 ekor yang pengaturan jumlah setiap perlakuan disesuaikan dengan protokol penelitian dan ditempatkan dalam kandang individu. Tikus galur Sprague-Dawley (SD) memiliki ciri-ciri antara lain: warna albino putih, ukuran kepala kecil, panjang ekor lebih panjang dibandingkan dengan badan. Adapun data fisiologisnya antara lain: bobot badan dewasa jantan 300 – 800 g dan betina 250 – 450 g, bobot lahir 6 – 6 g, bobot pubertas 150 – 200 g, dan umur pubertas 7 - 8 minggu (Pass dan Creeth 1993).

Tikus dibiasakan untuk hidup di kandang percobaan dengan pemberian pakan dan air serta pemeliharaan yang sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan. Pakan yang disuguhkan adalah pakan komersil berupa butiran dengan kode 594 buatan dari PT Charoen Pokphand yang diberikan secara bertahap agar terbiasa hingga mencapai jumlah yang sesuai dengan kebutuhannya.

Hormon yang digunakan dalam penelitian ini adalah bovine somatotropin (bST) dan untuk penyuntikan tikus kontrol digunakan minyak wijen (*sesame oil*).

Alat-alat bantu yang digunakan pada penelitian ini antara lain: alat timbang, alat Rontgen dan Fluoroskopi Siremobile (Siemens), alat ukur panjang, dan alat-alat bantu lainnya yang dipergunakan sesuai dengan fungsinya.

### Metode Penelitian

Penelitian penyuntikan somatotropin, analisis fisik, dan analisis kandungan kimiawi karkas dan tulang dimulai bulan Agustus 2005 sampai dengan Agustus 2006 yang dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, Rumah Sakit Hewan Fakultas Kedokteran Hewan, dan Laboratorium Kimia Pusat Antar Universitas (PAU) Institut Pertanian Bogor.

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama terdiri atas tiga dosis penyuntikan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.  
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

somatotropin: 0, 3, dan 9 mg/kg bobot badan/ekor/hari dan faktor kedua adalah periode penyuntikan yang tersarang di dalam faktor dosis yang terdiri atas tiga periode penyuntikan mulai hari penelitian ke 1 – 14, ke 1 – 28, dan ke 15 – 28. Data yang dikumpulkan dianalisis dengan menggunakan model persamaan matematika sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = m + a_i + b_j(i) + e_{ijk}$$

Keterangan:  $Y_{ijk}$  = respons ke-I, waktu ke-j, dan ulangan ke-k  
 $m$  = rata-rata populasi  
 $a_i$  = dosis ke-i  
 $b_j(i)$  = waktu ke-j dalam dosis ke-i  
 $e_{ijk}$  = pengaruh galat

Data yang diperoleh dari pengukuran dianalisis dengan menggunakan program Computer Minitab (version 13.20).

Mula-mula tikus diadaptasikan dengan lingkungan selama 1 minggu. Pakan dan minum disediakan *ad libitum*. Penyuntikan somatotropin dilakukan pada saat tikus mulai berumur 3 minggu secara intramuskuler pada bagian paha belakang.

Seluruh tikus (sebanyak 162 ekor) dibagi ke dalam tiga kelompok dosis somatotropin, yaitu 0 (kontrol disuntik sesame oil sebanyak 1 mL/ekor/hari), 3 mg, dan 9 mg masing-masing sebanyak 54 ekor. Setiap kelompok dosis dibagi tiga sesuai dengan periode penyuntikan, yaitu hari ke 1 – 14, hari ke 1 – 28, dan hari ke 15 – 28 masing-masing sebanyak 18 ekor. Penyuntikan somatotropin sesuai dengan rancangan percobaan yang dilakukan selama periode 28 hari. Setelah periode penyuntikan, sebagian tikus percobaan dipelihara tanpa penyuntikan somatotropin selama 28 hari berikutnya. Protokol penelitian penyuntikan somatotropin disajikan pada Gambar 5.

## Peubah yang Diamati dan Teknik Pengukurannya

### Penampilan Tubuh

#### 1. Bobot Badan

Penimbangan bobot badan dilakukan setiap minggu dengan cara memasukkan tikus ke dalam kandang khusus yang selanjutnya ditimbang. Pengukuran bobot badan tikus = bobot tikus dan kandang timbang – bobot kandang timbang yang diukur dalam satuan gram.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

## 2. Konsumsi Pakan

Konsumsi pakan didapat dari jumlah pakan yang diberikan dikurangi dengan pakan sisa yang diukur dalam satuan gram per hari.

## 3. Pertambahan Bobot Badan (PBB)

Tujuan pengamatan ini adalah untuk mengetahui pengaruh penyuntikan somatotropin pada pertambahan bobot badan hewan percobaan dalam satuan waktu (hari). Cara pengamatannya adalah bobot badan tikus ditimbang pada hari ke a ( $B_a$ ), selanjutnya ditimbang lagi pada hari ke b ( $B_b$ ), pertambahan bobot badan didapat dari selisih antara  $B_b$  dengan  $B_a$  dibagi dengan lama waktu dari hari penimbangan  $B_a$  ke hari penimbangan  $B_b$  yang diukur dalam satuan gram per hari.

## 4. Efisiensi Penggunaan Pakan

Efisiensi penggunaan pakan didapat dengan cara membagi pertambahan bobot badan dengan konsumsi pakan.

## 5. Laju Pertumbuhan Relatif

Tujuan pengamatan ini adalah untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan hewan percobaan akibat dari penyuntikan somatotropin. Hasilnya didapat dengan cara membagi pertambahan bobot badan dengan bobot badan pada waktu itu dikalikan 100% yang diukur dalam satuan persen.

## Karkas dan Kandungan Kimiawi Karkas

### 1. Bobot Karkas

Tujuan pengamatan ini adalah untuk mengetahui bobot karkas akibat dari penyuntikan somatotropin. Hasilnya didapat dengan cara menguliti terlebih dahulu, selanjutnya memotong bagian kepala, kaki depan dan belakang, ekor, dan mengeluarkan organ dalamnya, kemudian bobot karkasnya ditimbang dalam satuan gram.

### 2. Kandungan Protein Karkas

Pengukuran kandungan protein karkas dilakukan dengan cara menimbang 5 g karkas yang sudah dihaluskan dan memasukkannya ke dalam labu Kjeldahl 100 mL. Kemudian ditambahkan 1 g campuran selenium dan 10 mL  $H_2SO_4$  pekat dan labu Kjeldahl digoyang sampai semua terbasahi oleh  $H_2SO_4$ . Setelah itu, sampel didestruksi dalam lemari asam sampai jernih dan dibiarkan sampai dingin lalu dituang ke dalam labu ukur 100 mL, sambil dibilas dengan air suling.



Larutan didinginkan kemudian volumenya dipenuhi sampai tanda garis dengan air suling. Setelah itu, disiapkan penampung yang terdiri atas 10 mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2% dan 4 tetes larutan indikator campuran dalam Erlenmeyer 100 mL. Sebanyak 5 mL NaOH 30% dan 100 mL air suling dicampurkan dan disuling hingga volume penampung menjadi kurang lebih 50 mL. Ujung penyuling dibilas dengan air suling selanjutnya penampung beserta isinya dititrasi dengan larutan HCl atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.0222 N.

Perhitungan :

$$\text{Kandungan protein} = \frac{V1 \times N \times 0.014 \times 6.25 \times P}{\text{g contoh}} \times 100\%$$

Keterangan : V1 = volume titrasi contoh  
N = normalitas larutan HCl atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.0222 N  
P = faktor pengencer (100/S)

**Kandungan lemak karkas**

Pengukuran kandungan lemak karkas dilakukan dengan cara menimbang 5 g karkas yang sudah dihaluskan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi berskala 10 mL. Kemudian ditambahkan khloroform mendekati skala, kemudian ditutup rapat lalu dikocok dan dibiarkan bermalam. Volume larutan disamakan pada tanda skala 10 mL dengan pelarut lemak yang sama kemudian dikocok hingga homogen, selanjutnya disaring dengan kertas tisu/kertas saring ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 5 mL larutan tersebut dipipet ke dalam cawan yang telah diketahui beratnya (a g) dan dipanaskan dengan oven pada suhu 100°C selama 3 jam atau dibiarkan bermalam. Setelah itu, cawan yang berisi sampel dimasukkan ke dalam eksikator kurang lebih 30 menit lalu ditimbang (b g)

Perhitungan :

$$\text{Kandungan lemak} = \frac{P (b - a)}{\text{berat contoh}} \times 100\%$$

Keterangan : P = pengenceran = 10/5  
a = berat cawan  
b = berat cawan yang berisi sampel

**Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang**

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

**Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang**

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

#### 4. Kandungan Mineral Karkas

Pengukuran kandungan mineral karkas dilakukan dengan cara mencuci bersih cawan porselen dengan air kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam, selanjutnya didinginkan dalam eksikator selama 15 menit dan menimbang beratnya (X). Sebanyak 3 g karkas yang sudah dihaluskan dimasukkan ke dalam porselen (Y). Cawan beserta isinya dipijarkan di atas nyala bunsen sampai tidak berasap lagi. Kemudian cawan ini dimasukkan ke dalam anur listrik untuk dibakar atau diabukan pada suhu 400-800 °C. Sesudah abu menjadi putih, seluruhnya diangkat dan didinginkan dengan cara memasukkannya ke dalam dessikator. Setelah 1 jam cawan ditimbang kembali dengan berat (Z).

Perhitungan :

$$\text{Kandungan mineral} = \frac{(Z - X) \times 100\%}{Y}$$

Penerangan : Z = berat cawan dengan sampel karkas setelah proses  
X = berat cawan kosong

#### Kandungan Glikogen Karkas

Pengukuran kandungan glikogen karkas dilakukan dengan cara mempersiapkan bahan yang digunakan antara lain asam sulfat 95% (95 mL asam sulfat + 5 mL H<sub>2</sub>O) yang dibuat dalam ruang asam, antrone 0.2% (0.2 g anthrone dalam 100 mL asam sulfat 95% yang dibuat dalam kondisi segar, KOH 30% (30 g KOH dalam 100 mL H<sub>2</sub>O), ethanol 95%, glikogen standar [100mg/10mL H<sub>2</sub>O = 1 µg/ 1 µL (H<sub>2</sub>O)]. Adapun cara kerjanya adalah sebagai berikut. Sampel karkas yang telah dihaluskan diekstraksi sebanyak 25 mg dalam 1 mL KOH 30%, selanjutnya campuran tersebut diinkubasi dalam penangas air mendidih selama 20 menit (disebut ekstrak sampel). Kemudian ditambahkan 1.5 mL etanol dan disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 20 menit. Selanjutnya didekantasi yang hasilnya glikogen akan menempel di dinding tabung. Kemudian ditambahkan 1 mL H<sub>2</sub>O, selanjutnya ditambahkan 3 mL antrone. Absorbans larutan dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 620 nm.



## Bobot Organ

Organ yang diamati pada penelitian ini antara lain hati, jantung, testis, dan saluran pencernaan. Sebelum dilakukan penimbangan bobot organ, terlebih dahulu tikus dimatikan selanjutnya dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan untuk mengamati beberapa bagian organ untuk mengetahui pertumbuhan atau penambahan bobot dari organ-organ tikus yang disuntik somatotropin. Masing-masing organ dibersihkan dan dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis dan selanjutnya ditimbang dengan menggunakan alat timbang elektronik yang diukur dalam satuan gram.

## Panjang dan Kandungan Kimiawi Tulang

### 1. Panjang Tulang

Pengukuran panjang tulang dilakukan dengan cara terlebih dahulu tikus dipingsankan kemudian dirontgen dengan menggunakan alat Rontgen dan fluoroskopi Siremobile (Siemens). Selanjutnya dilakukan pengukuran panjang tulang yang meliputi tulang kaki depan, tulang kaki belakang, dan tulang punggung dengan melihat dan mengukur hasil rontgen. Pengukuran tulang kaki depan maupun belakang diukur dari tapak kaki sampai penonjolan tulang dan panjang tulang punggung dimulai dari pangkal batang leher sampai pangkal tulang ekor. Pengukuran panjang tulang menggunakan alat ukur dengan skala milimeter (mm).

### 2. Kandungan Kolagen Tulang

Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui besarnya konsentrasi kolagen atau kadar kolagen pada tulang tikus percobaan akibat penyuntikan somatotropin. Sampel yang digunakan adalah tulang bagian tibia tikus. Pengukuran kandungan kolagen tulang dilakukan setelah tulang yang sudah dikeringkan dan dihaluskan diekstraksi dengan cara menimbang 25 mg ke dalam tabung reaksi dan menambahkan sebanyak 5 mL HCl 6 N pada setiap sampel. Semua tabung diletakkan pada penangas air 130 °C selama 3 jam (air mendidih  $\pm$  5 jam) sampai larutan homogen kuning muda. Jika terjadi penguapan selama pemanasan ditambahkan lagi HCl 6 N sebanyak 5 mL. Isinya dituangkan dan dibaca pada pH  $\approx$  7 (seragam) dengan menambahkan NaOH 2 N jika keasaman atau HCl 6 N

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



jika kebiasaan, dan tetap menghitung pelarutannya. Selanjutnya tabung reaksi disiapkan kemudian dilabel untuk blank, standar, dan sampel yang masing-masing dibuat duplo. Masing-masing tabung diisi reagen sehingga akan berwarna kuning, setelah itu pada setiap tabung ditambahkan 1 mL Chloramin-T dan dikocok dengan vorteks. Larutan dibiarkan selama 20 menit pada suhu kamar. Setiap tabung ditambahkan 1 mL asam perklorat (kocok dengan vorteks) dan dibiarkan selama 5 menit. Setiap tabung ditambahkan 1 mL p-dimetilaminobenzaldehyde dan dikocok kemudian diletakkan pada penangas air 60 °C selama 20 menit. Larutan didinginkan pada kran air mengalir (tabung direndam dalam wadah berisi air dingin) selama 5 menit. Absorbans larutan dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 557 nm, yang dilakukan dalam jangka waktu 1 jam.

### **Kandungan Kalsium Tulang**

Prinsip dari percobaan penentuan kandungan kalsium adalah asam etilenediamintetraasetat (EDTA) dalam larutan basa membentuk suatu senyawa yang dapat larut dan kompleks yang sedikit terionisasi oleh kalsium dan magnesium serta ion-ion logam lain. Bila ion magnesium ada, suatu titik akhir dapat terlihat dengan indikator Eriochrome Black T. Suatu larutan kalsium yang tidak diketahui berisi sejumlah magnesium dapat dititrasi dengan EDTA untuk menentukan adanya kalsium. Peralatan yang digunakan adalah mikro buret dan pereaksinya antara lain: larutan buffer (campuran 87.5 g ammonium khlorida dengan 570 mL ammonium hidroksida pekat dan diencerkan menjadi 1 liter), indikator (0.25 g Eriochrome Black T dilarutkan dalam 50 mL diethanolamin), larutan magnesium sulfat, larutan EDTA, ammonium oksalat jenuh, asam khlorida pekat, indikator merah metil, standar kalsium, dan ammonium hidroksida. Cara kerjanya adalah sebagai berikut. Aliquot dari larutan abu yang berisi 0.05 mg hingga 1.5 mg kalsium dipipet ke dalam tabung sentrifus berujung bulat 15 mL yang berisi 3 mL amonium oksalat jenuh. Setelah itu, ditambahkan 1 tetes indikator merah metil dan disesuaikan pH menjadi 5.0 – 5.5 (warna faint pink dari indikator) menggunakan larutan encer asam hidroklorida atau amonium hidroksida. Isinya dicampurkan sampai merata dan dibiarkan selama satu jam dan disentrifus selama 5 menit pada kecepatan 3000 rpm. Cairan supernatan dibuang dengan hati-hati, endapannya disuspensikan dan tabung dicuci dengan sekitar

#### **Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang**

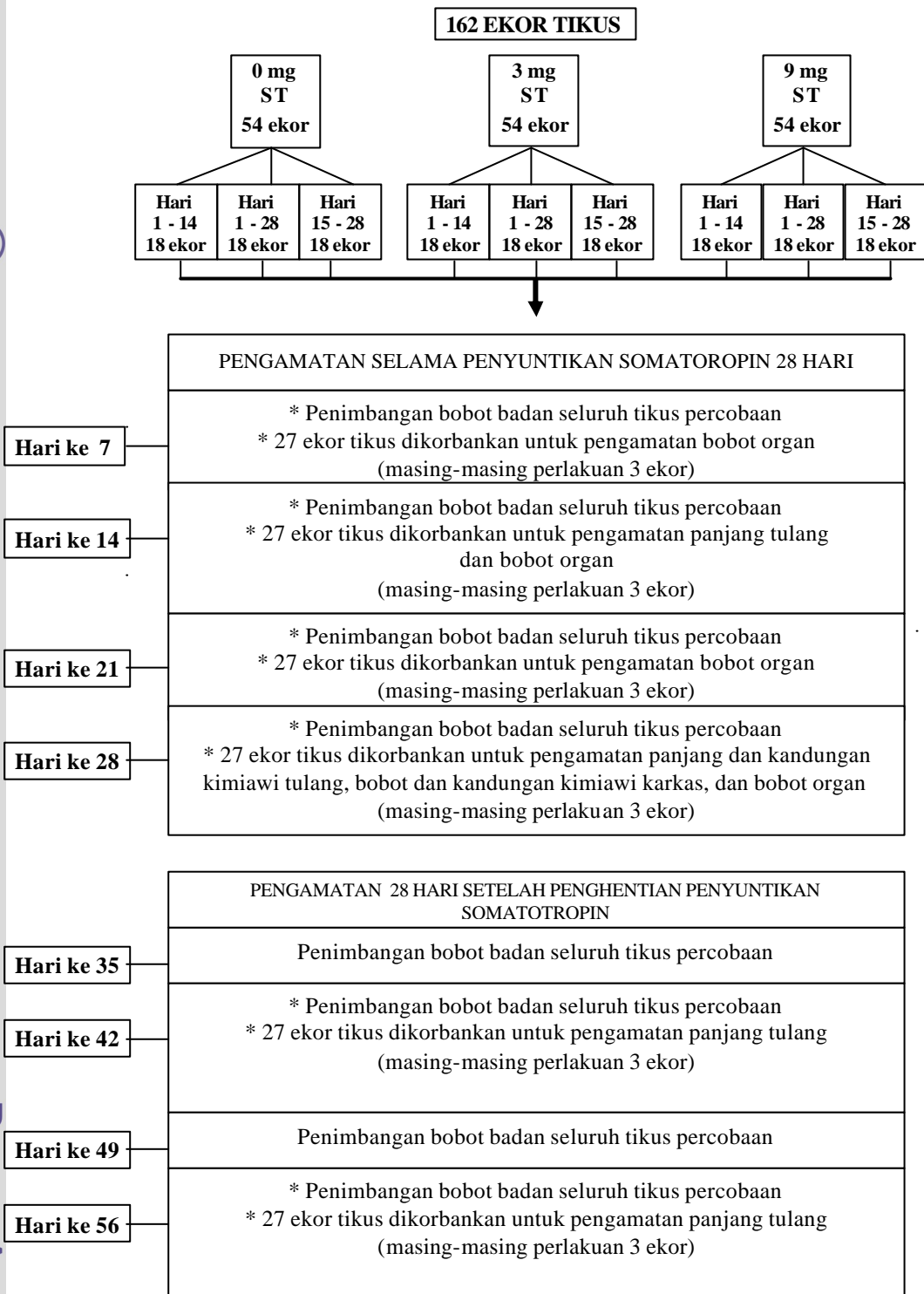
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritikan atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.





Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 4. Protokol penelitian