

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimen karena penelitian ini dilakukan dengan membuat manipulasi yang diatur kondisinya terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003: 63).

B. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Struktur Hewan Jurusan Pendidikan Biologi, Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia dan laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Selama penelitian ini, pemeliharaan hewan uji dilaksanakan di rumah mencit kebun botani, sedangkan Laboratorium Struktur Hewan untuk pembedahan dan pengambilan sampel darah hewan uji serta persiapan alat dan bahan di laboratorium fisiologi. Sampel darah yang akan diukur, dianalisis di laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Penelitian dilaksanakan selama 2 bulan.

C. Populasi dan sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina galur Swiss Webster usia 10 bulan yang diperoleh dari Sekolah Ilmu dan

Teknologi Hayati ITB, sedangkan yang akan dijadikan sampel adalah serum darah mencit betina usia 10 bulan.

Jumlah mencit setiap kelompok uji ditentukan menurut rumus Federer (1955) dalam Adimunca dan Nainggolan (2009) :

$$(t - 1) (n - 1) \geq 15$$

Jadi, bila jumlah kelompok uji ($t=5$)

$$(5 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$4(n - 1) \geq 15$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

T = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan

D. Prosedur kerja

1. Tahap persiapan

a. Persiapan hewan uji

Memilih hewan uji (mencit betina) sejumlah 25 individu, umur 10 bulan, berat badan awal 25-30 gram. Mencit betina tersebut merupakan indukan yang pernah mengalami kehamilan. Kandang mencit disiapkan lengkap berikut tempat pakan dan minum. Kandang tersebut terbuat dari plastik dengan ukuran 30x20x12 cm yang telah dialasi sekam padi.

b. Aklimatisasi hewan uji

Seluruh kelompok hewan uji tersebut terlebih dahulu diaklimatisasi selama kurang lebih satu minggu, dengan tujuan

supaya hewan uji tersebut mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang akan ditempati selama penelitian berlangsung. Mencit dipelihara dalam kandang dengan kepadatan lima individu/kandang dengan diberi pakan standar CP551 dan air minum secara *ad libitum*.

c. Pemeliharaan hewan uji

Hewan percobaan yang digunakan dikelompokkan secara acak menjadi lima kelompok, yaitu : kontrol negatif, kontrol positif dan tiga kelompok perlakuan. Kontrol negatif hanya diberi pakan standar CP551, air minum *ad libitum*, dengan tanpa perlakuan jus buah pare. Kontrol positif diberi pakan induksi dan air minum, tanpa perlakuan jus buah pare. Sedangkan tiga kelompok lain diberi pakan induksi, air minum dan perlakuan jus buah pare dengan dosis jus yang bervariasi (0,5 ml/40 gram BB, 1,0 ml dan 1,5 ml pada 40 gram BB mencit) .

Rincian pengelompokan hewan uji, antara lain :

Kelompok I : kontrol negatif , pakan normal dan tanpa diberi jus buah pare

Kelompok II : kontrol positif, pakan induksi dan tanpa diberi jus buah pare

Kelompok III : pakan induksi dan diberi jus buah pare dengan dosis 0,5 ml/40 gram BB

Kelompok IV : pakan induksi dan diberi jus buah pare dengan dosis 1 ml/40 gram BB/hari

Kelompok V : pakan induksi dan diberi jus buah pare dengan dosis 1,5 ml/40 gram BB/hari

d. Pembuatan pakan induksi (pakan berlemak tinggi)

Pakan induksi yang dimaksud adalah campuran pakan standar CP551 dan lemak/gajih sapi yang dibuat supaya pakan tersebut memiliki kadar lemak yang berlebih daripada kadar pakan standar (Lampiran 3). Pakan induksi tersebut dibuat dengan resep perbandingan pakan dan gajih sapi sebesar 7 : 3 (Mulyadi, 2008).

Langkah yang dilakukan antara lain pakan CP551 dan lemak sapi terlebih dahulu ditimbang dengan takaran sesuai resep. Upaya memudahkan pencampuran dengan gajih, pakan ditambahkan air secukupnya, diaduk kemudian dibiarkan beberapa jam atau sambil ditumbuk sehingga akhirnya pakan menjadi bubuk halus.

Gajih sapi yang padat diparut halus lalu direbus dengan air panas sehingga menjadi lemak cair. Lemak cair tersebut kemudian dicampurkan ke dalam bubuk pakan tadi, diaduk rata sehingga menjadi adonan pakan lemak yang kental. Adonan tersebut langsung dicetak dalam loyang dan dijemur/dioven hingga benar-benar kering. Pakan berlemak yang sudah jadi siap diberikan pada hewan uji.

Tujuan dari pemberian pakan induksi ini adalah diharapkan akan meningkatkan kadar lipid darah mencit percobaan lebih optimum. Sehingga dengan peningkatan tersebut akan tampak bagaimana pengaruh perlakuan terhadap perubahan lipid darah mencit sesuai yang diharapkan.

e. Analisis pakan proksimat

Pakan berlemak tinggi yang akan digunakan sebagai konsumsi diet mencit, dianalisis proksimat di Laboratorium Fisiologi IPB. Hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah kadar lemak tersebut sudah melebihi dari kadar yang diharapkan. Apabila sudah melebihi kadar lemak standar, maka pakan induksi tersebut bisa digunakan untuk konsumsi diet hewan uji.

Berikut rincian hasil analisis proksimat pakan induksi yang digunakan :

Tabel 3.1. Hasil analisis proksimat *)

Parameter		Replikasi			\bar{x}
		1	2	3	
Kadar air		9,89	9,98	9,34	9,74
Abu	BS (%)	3,19	3,48	3,55	3,41
	BK (%)	3,54	3,87	3,92	3,78
Lemak	BS (%)	12,01	12,44	11,97	12,14
	BK (%)	13,33	13,82	13,20	13,45
Protein	BS (%)	12,01	12,44	11,97	12,14
	BK (%)	13,33	13,82	13,20	13,45
Serat kasar	BS (%)	3,78	3,49	4,29	3,85
	BK (%)	4,19	3,88	4,73	4,27

Keterangan :

Pakan 1, 2 dan 3 sebagai replikasi pengujian, sehingga data yang diperoleh adalah rata-rata keseluruhan dari ketiga replikasi tersebut. Analisis proksimat ini hanya dilakukan sekali di awal pra penelitian.

BS : B. segar (%)

BK : B. kering (%)

*) : data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 4

Berdasarkan Tabel di atas, bila dibandingkan dengan kandungan pakan standar (Lampiran 3) maka, kandungan pakan induksi tersebut memiliki kadar melebihi dari pakan standar yang diharapkan, dalam hal ini kadar air, abu, lemak, protein dan serat kasar. Hasil analisis proksimat dari pakan induksi yang dibuat menunjukkan bahwa dengan adonan pakan standar dan gajih sapi sebanyak 7 : 3, sudah mengandung kadar lemak yang melebihi dari kadar lemak standar yang dibutuhkan.

Persentase lemak tersebut sebanyak 12,14% (BS) dan 13,45% (BK) atau sekitar 2,7-1,7 (BS) dan 2,98-1,92 (BK) kali lipatnya dari kadar normal yang seharusnya (Lampiran 3).

Sehingga pakan induksi tersebut sudah bisa digunakan untuk penelitian ini. Adapun perubahan kandungan serat relatif tetap atau hanya sedikit sekali meningkat (0,01%) pada serat kering.

f. Pembuatan jus buah pare

Buah pare gajah yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari pasar inpres Gegerkalong Tengah, Sukasari. Sedangkan lemak sapi (gajah) dari dari pasar Sederhana, Sukajadi.

Buah pare terlebih dahulu dicuci bersih dengan air, kemudian tiriskan supaya keberadaan air bekas pencucian tidak mengkontaminasi dalam pembuatan jus. Sebanyak 200 gram buah pare ditimbang, bagian biji dibuang kemudian dijus dengan menggunakan jusser, ampas yang dihasilkan dibuang. Sari jus tersebut siap digunakan untuk perlakuan.

g. Penentuan dosis

Penentuan dosis jus buah pare berdasarkan dosis aman jus segar buah pare yang dikonsumsi manusia, yaitu 50 ml-100 ml (Raman dan Lau, 1996). Pemberian dosis jus buah pare untuk mencit dengan menggunakan tabel perbandingan luas permukaan tubuh hewan percobaan untuk konversi dosis manusia dengan berat badan (BB) manusia 70 kg ke berat badan mencit 20 gram (Donatus, 1994) adalah 0,0026. Dalam penelitian ini akan digunakan dosis tertinggi yaitu 100 ml.

Penghitungan konversi dosis jus buah pare adalah sebagai berikut : $100 \text{ ml} \times 0,0026 = 0,26 \text{ ml}$. Apabila berat badan 40 gram, maka dosis tersebut adalah 0,52 ml atau $\approx 0,5 \text{ ml}/40 \text{ gram BB}$. Kemudian kami mencoba untuk memodifikasi dosis yang akan digunakan yaitu 1,0 ml dan 1,5 ml. Telah diketahui bahwa kebutuhan minum mencit adalah sebanyak 15 ml/100 gram BB/hari (Nursidah, 2004) atau sebanyak 3-4,5 ml/hari. Sehingga diperoleh dosis yang akan digunakan untuk perlakuan adalah 0,5 ml/40 gram BB/40 gram BB/hari, 1 ml/40 gram BB/hari dan 1,5 ml/40 gram BB/hari. Dalam penelitian ini perlakuan jus buah pare yang digunakan berdasarkan volume yang diberikan.

2. Tahap praperlakuan

Sebelum perlakuan dilakukan pemberian pakan induksi secara terkontrol (bukan *ad libitum*) setiap hari selama 7 hari (Mulyadi, 2008), masing-masing hewan percobaan diberi pakan tersebut sebanyak $\pm 5 \text{ gram/individu/hari}$, kecuali kelompok kontrol negatif. Adapun kelompok kontrol negatif hanya diberi pakan standar dan air minum *ad libitum* dengan takaran sama yang diberikan selama penelitian berlangsung. Banyaknya pemberian pakan disesuaikan dengan kebutuhan pakan mencit yang biasanya, yakni 15 gram/100 gram berat badan/hari (Nursidah, 2004). Selama pemberian pakan induksi, setiap kelompok hewan uji ditimbang berat badannya.

3. Tahap perlakuan

a. Pemberian jus buah pare

Setelah proses pemberian pakan induksi selama satu minggu penuh, setiap kelompok perlakuan diberi jus buah pare dengan cara gavaged dengan dosis yang telah ditentukan. Jus tersebut diberikan sebanyak 10 kali, 1kali setiap hari selama 10 hari, pada waktu pagi hari sekitar pukul 09.00. Selama tahap pelaksanaan perlakuan, seluruh kelompok mencit masih diberikan pakan induksi dengan takaran yang biasanya serta ditimbang berat badannya setiap hari.

b. Pengambilan sampel darah

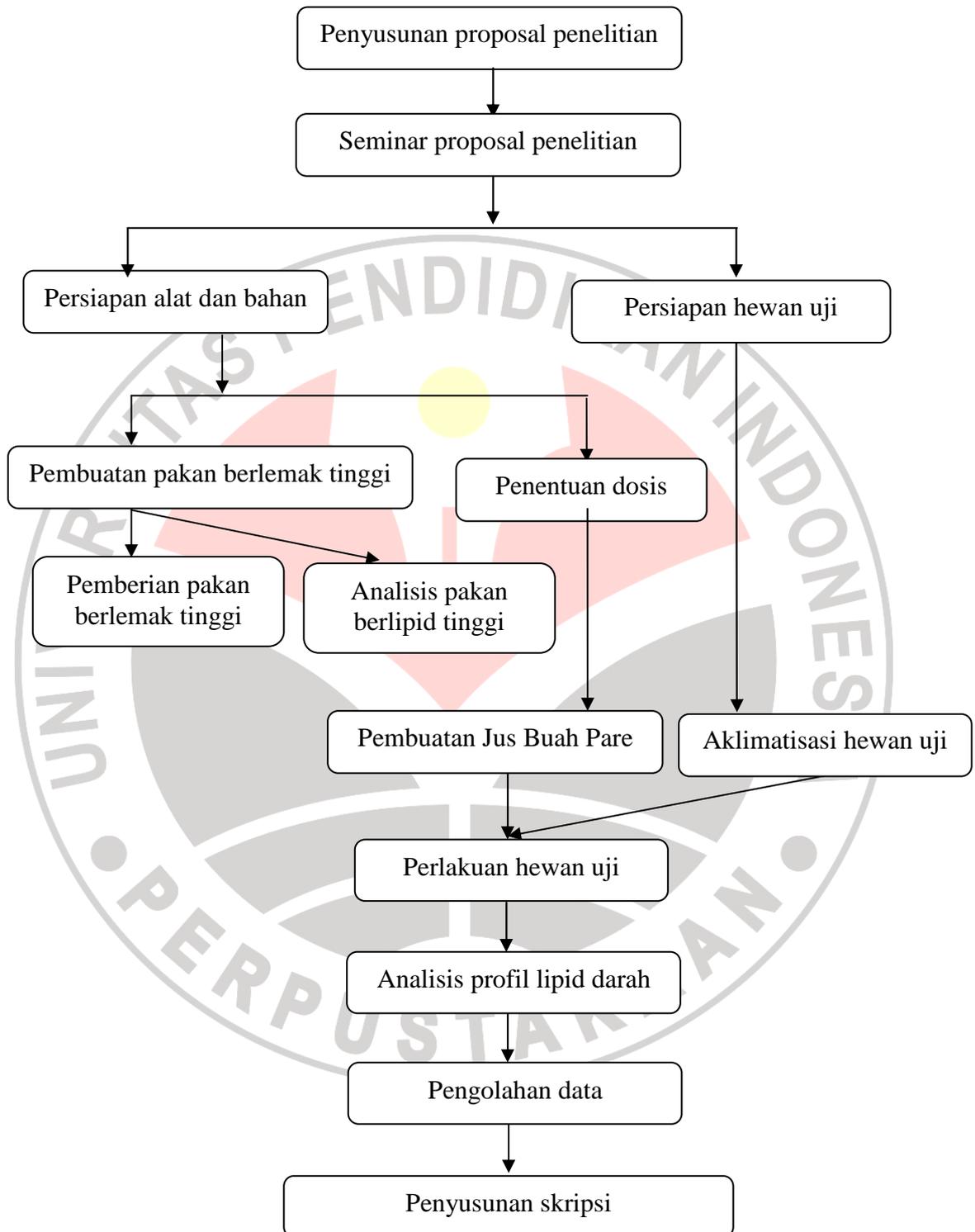
Setelah tahap perlakuan, dilakukan pengambilan sampel darah dengan cara mengambil darah dari jantung mencit yang telah dibius dengan eter. Darah ditampung dengan tabung sentrifug kemudian didiamkan selama 15 menit dan disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm (Dachriyanus *et al.*, 2007). Serum darah yang telah diperoleh kemudian dianalisis kadar lemaknya di laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan IPB.

E. Analisis data

Data yang diperoleh diuji kenormalan dan homogenitasnya. Uji kenormalan menggunakan metode distribusi frekuensi dan uji homogenitas menggunakan metode uji Barlett. Jika data terdistribusi normal dan bervarian homogen. Jika data berdistribusi normal dan

homogen dilakukan analisis varian satu arah (*One Way Anova*). Dilanjutkan dengan uji Wilayah Berganda Duncan. Akan tetapi, jika data tidak tidak berdistribusi normal dan atau bervarian homogen, maka data dianalisis dengan uji Kruskal Wallis Z (Sudjana, 2002).



F. Alur penelitian

Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian