

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan ini adalah eksperimen karena dalam penelitian ini diadakan manipulasi terhadap obyek penelitian serta diadakan kontrol terhadap variabel tertentu sebagai pembanding (Nadzir, 2003).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada penelitian yang dilakukan adalah dengan cara memberikan jus buah pare pada mencit betina. Pemberian jus buah pare dilakukan secara gavage selama 10 hari, dengan tempo sehari sekali. Selama tahap perlakuan, seluruh mencit diberi pakan tinggi karbohidrat yang diberikan setiap hari selama 10 hari.

Jumlah sampel ditentukan menurut rumus Federer (1955) :

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

jika $t=5$

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

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

$$n \geq 5$$

ket: t = jumlah perlakuan
 n = jumlah ulangan

Mencit yang digunakan dibagi menjadi lima kelompok dosis pemberian jus buah pare yaitu kontrol negatif, kontrol positif, dosis 0,5 ml/40 gram bb, 1ml/40 gram bb, 1,5 ml/40 gram bb. Sebelum ke dalam tahap pemberian pakan tinggi karbohidrat dan perlakuan, terlebih dahulu seluruh hewan percobaan

diaklimatisasi selama dua minggu. Penimbangan berat badan dilakukan sebelum dan selama perlakuan. Parameter yang diukur dalam penelitian yaitu berat badan dan kadar glukosa darah.

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus* L.) betina galur Swiss Webster usia sepuluh bulan, sedangkan yang akan dijadikan sampel adalah serum darah mencit betina tersebut.

D. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan Laboratorium Struktur Hewan Jurusan Pendidikan Biologi, Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia, dan Laboratorium Fisiologi FKH IPB.

E. Prosedur Penelitian

1. Pemeliharaan Hewan Uji

Pemeliharaan hewan uji ini telah dilakukan selama dua minggu. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian yang akan dilakukan yaitu mencit (*Mus musculus* L.) betina galur Swiss Webster yang berusia sepuluh bulan. Mencit terlebih dahulu diaklimatisasi selama dua minggu dengan pemberian pakan biasa secara *ad libitum*. Pemeliharaan mencit berlokasi di rumah hewan Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi UPI. Mencit-mencit tersebut dipelihara di dalam kandang mencit yang terbuat dari bak plastik dengan ukuran 30x20x12 (cm) yang telah dialasi oleh sekam dengan masing-masing kandang berisikan lima ekor mencit betina dan diberi pakan CP551 serta air minum yang disediakan.

Hewan uji dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yaitu: (1) Kelompok kontrol negatif, pada kelompok kontrol negatif mencit diberi makan CP551 tanpa pemberian pakan tinggi karbohidrat dan jus buah pare, (2) kelompok kontrol positif, mencit diberi pakan tinggi karbohidrat tanpa pemberian jus buah pare, (3) kelompok dosis I, kelompok mencit diberi pakan tinggi karbohidrat dan jus buah pare sebanyak 0,5 ml/40 gram bb/ hari, (4) kelompok dosis II, mencit diberi pakan tinggi karbohidrat dan jus buah pare sebanyak 1 ml/40 gram bb/ hari, (5) kelompok dosis III, mencit diberi pakan tinggi karbohidrat dan jus buah pare sebanyak 1,5 ml/40 gram bb/ hari.

Aklimatisasi dilakukan selama dua minggu sebelum dilakukan perlakuan. Tujuan aklimatisasi agar mencit betina tersebut mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang akan ditempati selama penelitian berlangsung.

2. Pembuatan Pakan Tinggi Karbohidrat

Pembuatan pakan tinggi karbohidrat ini dilakukan dengan cara mencampurkan pakan CP551 PT. Charoen Pokhpand dengan Singkong. Komposisi kandungan senyawa pada pakan CP551 PT. Charoen Pokhpand dapat dilihat lebih jelas pada Lampiran 3. Perbandingan yang digunakan dalam pencampuran pakan ini adalah 50:50. Langkah pertama yang dilakukan adalah pakan CP551 dan singkong terlebih dahulu ditimbang. Dalam memudahkan pencampuran, pakan CP551 direndam dengan air secukupnya, didiamkan selama lima menit kemudian diaduk sehingga akan didapatkan pakan CP551 yang halus. Pengolahan singkong berbeda dengan pakan CP551. Singkong yang telah dikupas kulitnya dan dibersihkan kemudian ditimbang sesuai berat yang telah ditentukan

lalu dipotong kecil-kecil atau tipis-tipis masukan dalam juser yang ditambahkan sedikit air. Singkong yang telah halus dicampurkan ke dalam bubuk pakan tadi, diaduk rata sehingga menjadi adonan pakan yang kental. Adonan tersebut kemudian dicetak dalam loyang dan dijemur atau dioven hingga benar-benar kering. Pakan berkarbohidrat tinggi sudah jadi siap diberikan pada hewan uji. Pemberian pakan disesuaikan dengan kebutuhan pakan mencit yang biasanya, yakni 15 gram / 100 gram berat badan atau 5 gram / individu (Nursidah, 2004).

Tabel 3.1. Hasil analisis proksimat

No	Parameter		Kode sampel pakan		
			Pakan KA	Pakan KB	Pakan KC
1	Kadar air		1.20	8.93	19.27
2	Abu	B.segar (%)	4.39	3.95	3.81
		B.kering (%)	4.44	4.34	4.72
3	Lemak	B.segar (%)	13.23	13.07	11.56
		B.kering (%)	13.39	14.35	14.32
4	Protein	B.segar (%)	13.23	13.07	11.56
		B.kering (%)	13.39	14.35	14.32
5	Serat kasar	B.segar (%)	2.00	2.01	1.74
		B.kering (%)	2.02	2.21	2.16

Keterangan:

- Pakan KA = Pakan Karbohidrat A
- Pakan KB = Pakan Karbohidrat B
- Pakan KC = Pakan Karbohidrat C
- B.Segar = Berat segar
- B.Kering = Berat kering
- *) Data selengkapnya ada pada Lampiran 4.

Analisis pakan proksimat, pakan karbohidrat tinggi yang akan digunakan sebagai konsumsi diet mencit, dianalisis proksimat di laboratorium fisiologi IPB. Hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah kadar karbohidrat pakan tersebut sudah melebihi dari kadar yang diharapkan. Apabila sudah melebihi kadar

karbohidrat standar, maka pakan induksi tersebut bisa digunakan untuk konsumsi diet hewan uji.

3. Pembuatan Dosis

Dosis jus buah pare ditentukan berdasarkan penelitian pendahulu yaitu dengan menggunakan 200 gram buah pare (Inggriani, 1990). Sedangkan dosis pemberian dilihat dari penggunaan dosis aman jus segar buah pare yang biasa dikonsumsi manusia yaitu, 50 ml – 100 ml (Raman dan Lau, 1996) dengan menggunakan tabel perbandingan luas permukaan tubuh hewan untuk konversi dosis manusia ke mencit. Nilai konversi didapatkan sebesar 0.0026 (Lauren dan Bacharac, 1964). Nilai konversi dapat dilihat lebih jelas pada Lampiran 5.

Dosis yang diambil adalah dosis tertinggi yaitu 100 ml untuk manusia, dengan demikian perhitungan konversi dosis jus buah pare untuk mencit adalah 0.26 ml/ 20 gram bb. Apabila rata-rata berat badan mencit sebesar 40 gram, maka dosis yang diambil adalah 0.5 ml/ 40 gram bb. Dosis kemudian dimodifikasi menjadi dosis 0,5 ml/40 gram bb, 1ml/40 gram bb, 1,5 ml/40 gram bb yang disesuaikan dengan kapasitas lambung mencit

Pemberian Jus buah pare ini dilakukan bersamaan dengan pemberian pakan tinggi karbohidrat selama sepuluh hari, kelompok mencit diberi jus buah pare dengan dosis yang telah ditentukan dan diberikan secara gavage setiap hari sekali selama sepuluh hari. Selama tahap pelaksanaan perlakuan, seluruh kelompok mencit diukur berat badannya.

4. Pembuatan Jus Buah Pare (*Momordica charantina*)

Pembuatan jus buah pare ini dilakukan setiap pagi ketika akan menggavage mencit selama sepuluh hari. Langkah pertama dimulai dengan mempersiapkan buah pare terlebih dulu, buah pare dicuci hingga bersih, kemudian biji buah pare dibuang. Kulit dan daging buah pare ditimbang hingga mencapai berat 200 gram. Setelah dilakukan penimbangan seberat 200 gram, buah pare kemudian dimasukan kedalam juser, sehingga secara otomatis akan terpisah air jus dengan ampas buah pare. Air jus yang didapat kemudian dimasukan ke dalam botol plastik untuk dibawa ke rumah hewan dan siap dilakukan gavage terhadap mencit.

5. Tahap Perlakuan

Perlakuan pemberian jus buah pare bersamaan dengan pemberian pakan tinggi karbohidrat selama 10 hari. Perlakuan dan pemberian pakan dilakukan setiap hari mulai pukul 09.00 pagi hingga selesai. Sebelum dimulai perlakuan, berat badan masing-masing mencit diukur terlebih dahulu. Pengukuran dilakukan selama perlakuan untuk dapat melihat perubahan berat badan. Setelah pengukuran berat badan, mencit kemudian diberi jus buah pare secara gavage sesuai dengan kelompok dosis yang telah ditentukan secara hati-hati.

6. Tahap Pengambilan Sampel Darah

Mencit yang telah diberi perlakuan jus buah pare dan pakan tinggi karbohidrat selama sepuluh hari dipindahkan ke laboratorium. Selanjutnya dilakukan penimbangan berat badan mencit sebelumnya dimasukkan ke dalam sebuah wadah yang telah diberi kapas yang telah ditetesi larutan eter. Hal ini

bertujuan agar mencit terbius dan pingsan. Mencit yang pingsan kemudian disimpan pada bak bedah dengan posisi ditelentangkan. Untuk mempermudah pembedahan, bagian tangan dan kaki mencit di rentangkan menggunakan jarum sehingga bagian dada dapat terlihat dan mudah untuk disayat. Bagian dada mencit dibedah lalu pada bagian vena cava inferior dipotong, sehingga akan mengeluarkan banyak darah. Darah yang keluar kemudian diambil menggunakan spuit 1 ml secara hati-hati dan cepat. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari darah mencit cepat lisis dan membeku.

Darah yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam tabung eppendorf sebanyak $\pm 0,5$ ml dan didiamkan selama 2 jam untuk mendapatkan lapisan serum. Apabila lapisan serum yang diperoleh hanya sedikit, dapat dilakukan sentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm (Dachriyanus *et al.*, 2007).

7. Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan di Lab. Fisiologi FKH IPB. Kadar glukosa darah diukur dengan menggunakan metode GOD-PAP Method (*Glucose Oxidase-Phenol 4-Aminoantipirin*). Prinsip metode ini adalah oksidasi enzimatik glukosa dengan adanya glukosa oksidase, hydrogen peroksida yang terbentuk akan bereaksi dengan peroksida, phenol dan 4-aminophenazone menjadi warna *quinoneimine* yang berwarna merah violet. Hal ini terjadi setelah serum dicampur dengan reagen *glucose liquiqolor* dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20°C – 25°C atau selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian mengukur absorbansi standar dan absorbansi sampel menggunakan spektrofotometer dengan

panjang gelombang 546 nm. Adapun perhitungan kadar glukosa darah dengan metoda GOD-PAP (Komala, 2001).

$$C \text{ (mg/dl)} = 100 \times \frac{d \text{ Asp}}{d \text{ Astd}}$$

atau

$$C \text{ (mmol/L)} = 100 \times \frac{d \text{ Asp}}{d \text{ Astd}}$$

Keterangan:

C = kadar glukosa darah dalam mg/dl atau mmol/L

d Asp = absorbansi sampel

d Astd = absorbansi standar

8. Analisis Data

Data yang diperoleh diuji normalitas dan homogenitasnya. Uji normalitas menggunakan metode distribusi frekuensi dan uji homogenitas menggunakan metode Barlett. Jika data terdistribusi normal dan bervarian homogen, maka dianalisis secara statistik parametrik yaitu, analisis varian dua faktor (Anova dua faktor). Dilanjutkan dengan uji berganda beda nyata terkecil (*Least Significant Difference*) atau uji wilayah berganda Duncan (Trihendradi, 2008). Jika data tidak terdistribusi normal atau tidak bervarian homogen, maka dilakukan transformasi data dan diuji kembali kenormalan dan homogenitasnya. Bila data berdistribusi normal dan bervarian homogen, data dianalisis secara parametrik (seperti di atas). Bila tidak berdistribusi normal dan atau bervarian homogen, maka data dianalisis secara non parametrik yaitu analisis Friedman. Dilanjutkan dengan uji berganda. Derajat kepercayaan untuk menerima hipotesis adalah 95%.

9. Alur Penelitian

Alur penelitian pada penelitian sebagai berikut :

