

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003).

B. Desain Eksperimen

Desain eksperimen ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain ini sering digunakan jika percobaan bersifat homogen, seperti percobaan dalam laboratorium atau rumah kaca (Nazir, 2003). Secara acak mencit-mencit dikelompokkan pada setiap kelompok kontrol dan perlakuan. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari Gomez (1995) yaitu:

$$T(r-1) \geq 20$$

$$5(r-1) \geq 20$$

$$r \geq 5$$

Keterangan : T = jumlah perlakuan = 5

r = jumlah replikasi

Setiap kotak diberi tanda dan nomor untuk mencit. Penempatan perlakuan pada setiap kandang dilakukan randomisasi. Setelah dirandom, maka didapatkan penempatan perlakuan pada setiap kandang sebagai berikut:

Tabel 3.1 Pengaturan Randomisasi Mencit

1C	2A	3C	4A	5B
6C	7B	8C	9E	10B
11D	12A	13E	14B	15E
16D	17D	18A	19E	20B
21C	22D	23D	24E	25A

Kandang	Perlakuan (konsentrasi bekatul)	No. Mencit				
		A	0%	2	7	15
B	3,3%	13	16	17	20	22
C	6,6%	3	4	8	10	12
D	10%	1	5	11	21	23
E	13,3%	6	9	14	24	25

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan adalah darah mencit (*Mus musculus*. L.) Swiss Webster jantan berumur 3 bulan. Sampel yang digunakan adalah kadar kolesterol darah 25 ekor mencit (*Mus musculus*. L.) Swiss Webster jantan yang berumur 3 bulan.

D. Lokasi Penelitian

Pembuatan campuran pakan bekatul dilakukan di Laboratorium Ekologi, Jurusan Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI. Pemeliharaan mencit, pemberian

perlakuan, serta pengambilan sampel darah dilakukan di rumah kaca Kebun Botani FPMIPA UPI. Pengukuran kadar kolesterol mencit dilakukan di Laboratorium Institut Pertanian Bogor.

E. Alat dan Bahan

Tabel 3.2 Alat dan bahan

No.	Alat-alat	Bahan	Jumlah
1	Oven		1 unit
2	Neraca timbangan analitik		1 unit
3	Gelas Beaker		2 buah
4	Gelas ukur 1000 ml		1 buah
5	Kantung plastic		100 buah
6	Tempat makan dan minum mencit		25 unit
7	Timerswitch		1 unit
8	Magnetic stirrer		1 unit
9	Kertas label		2 lembar
10	Termometer		1 buah
11	Saringan		5 buah
12	Alat penggiling		1 unit

13	Kit		25 buah
14	Kuvet		25 buah
15		Mencit	25 ekor
16		Bekatul	1 kg
17		Lemak daging sapi	5 kg
18		Etanol	50 ml
19		Pakan mencit biasa	30 kg
20		Aquades	200 ml
21		Sekam	25 kg

F. PROSEDUR KERJA

1. Tahap persiapan

a. Aklimatisasi Mencit

Pemeliharaan dilakukan di *green house* Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi UPI. Sebelum diberi perlakuan, mencit-mencit diaklimatisasi pada suhu ruangan rata-rata 23-27°C, periode ini dilaksanakan selama seminggu dengan tujuan agar hewan uji teradaptasi dengan kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Mencit-mencit berada dalam kandang berukuran 30 cm x 20 cm x 12 cm. Mencit dikandangkan satu ekor tiap kandangnya.

Selama aklimatisasi, mencit-mencit tersebut hanya diberi pakan biasa dan air minum secara *ad libitum*. Komposisi pakan standar ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

Makanan diberikan 6 gram setiap hari dan botol minuman dibersihkan tiap tiga hari sekali dan diganti airnya atau diisi ulang dengan air apabila air sudah habis. Kandang dibersihkan dan diganti serbuk gergajinya setiap satu minggu sekali.

Aklimatisasi biasanya digunakan untuk menghadapi faktor-faktor yang terjadi dalam lingkungan lebih terkontrol di laboratorium.

b. Pembuatan Pakan Berlemak

Lemak daging sapi sebanyak 250 gram dan air dipanaskan kemudian dicampurkan dengan bahan dasar pakan standar laboratorium, berasal dari PT. Charoen Pokhpand Indonesia hingga mencapai berat satu kg lalu ditambah air sampai homogen sehingga adonan dapat dibentuk pelet. Setelah itu, dikeringkan menggunakan oven.

c. Penentuan Dosis

Pada penelitian ini, bahan yang diuji adalah bekatul. Konsentrasi bekatul yang digunakan adalah 0%, 3,3%, 6,6%, 10%, dan 13,3% dari banyaknya pakan yang diberikan (6 gram/ekor/hari) dapat dilihat pada Tabel 3.3. Penentuan dosis berdasarkan penelitian sebelumnya (Kahlon, 2003).

Tabel 3.3. Penentuan Konsentrasi

No.	Kelompok Perlakuan	Persentase Konsentrasi Bekatul dalam Pakan	Jumlah Bekatul (g/6g/ekor/hari)
1	Kontrol	0%	0
2	I	3,3%	0,2
3	II	6,6%	0,4
4	III	10%	0,6
5	IV	13,3%	0,8

d. Pembuatan Pakan dengan Tambahan Bekatul

Bekatul dengan dosis tiap kelompok perlakuan dicampurkan dengan air dipanaskan kemudian dicampurkan dengan bahan dasar pakan standar laboratorium, berasal dari PT. Charoen Pokhpand Indonesia hingga mencapai berat 6 mg untuk tiap individu mencit sampai homogen sehingga adonan dapat dibentuk pelet. Setelah itu, dikeringkan menggunakan oven.

2. Tahap Perlakuan

a. Pemberian Pakan Berlemak

Pemberian pakan berlemak dilakukan selama seminggu, mencit diberi makan berlemak dengan komposisi pakan dan lemak sapi (1:4). Tahap ini bertujuan untuk

meningkatkan kadar kolesterol darah mencit, sehingga mencit mengalami *hiperkolesterolemia*. Pada tahapan ini mencit diberi air minum seperti biasa.

b. Pemberian Pakan dengan Penambahan Bekatul

Perlakuan dilaksanakan selama dua minggu, mencit diberi makan dan minum setiap hari seperti biasa. Pemberian dosis dilakukan secara oral. Dosis bekatul yang diberikan secara rinci ditunjukkan pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4 Pemberian Bekatul

Nama Kelompok	Perlakuan	Jumlah Tikus
Kontrol	Tidak diberi bekatul	5
I	3,3% bekatul / hari	5
II	6,6% bekatul / hari	5
III	10% bekatul / hari	5
IV	13,3% bekatul / hari	5

c. Pengambilan Sampel Darah

Sampel darah mencit diambil dari bagian abdominal aorta (Terpstra *et al.*, 1998 ; Garcia-Diez *et al.*, 1995), dan jantung (Hassel, 1996).

d. Pengukuran Kadar Kolesterol Total Darah

Kadar kolesterol diukur dengan metode CHOD-PAP *Enzymatic Colorimeter Test for Cholesterol with lipid Clearing Factor* (LCF) dengan cara mengambil

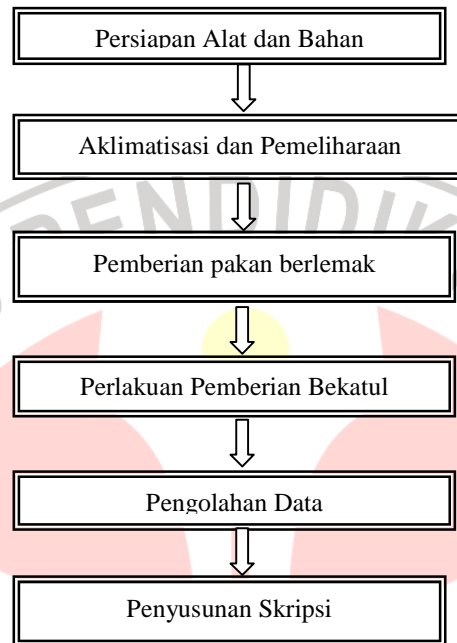
sampel darah mencit sebanyak 10 μL dipipet ke dalam kuvet kemudian ditambahkan 1000 μL reagen lalu dihomogenisasi dengan *vortex*. Serum dipisahkan dari darah dengan mensentrifugasinya selama 20 menit kecepatan 1500 rpm. Sampel dan standar diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20-25° C kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 493 nm, membaca hasilnya pada spektrofotometer dalam bentuk *absorbance*. Sampel dan standar diukur absorbannya terhadap blanko (reagen) murni yang nantinya didapat ΔA . Pengujian dilakukan dua kali (duplo).

$$C = \frac{\text{Konsentrasi Standar} \times (\Delta A \text{ sampel})}{\Delta \text{ standar}}$$

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistika menggunakan program SPSS 16.0 Sebelumnya dilakukan uji kenormalan dan homogenitas. Uji kenormalan dilakukan uji kolmogorov-Smirnov, uji homogenitas dengan uji leven's. Pengujian dilanjutkan dengan uji *Analisis Variance* (ANOVA), sehingga dapat diketahui perbedaan rata-rata dari masing-masing perlakuan, untuk pengamatan lebih lanjut maka analisis dilanjutkan dengan uji Duncan.

H. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian