

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Dalam penelitian ini dilakukan manipulasi terhadap objek penelitian disertai dengan adanya kontrol (Nazir, 1988:74).

B. Desain Eksperimen

Desain eksperimen penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain tersebut sering digunakan pada percobaan yang unit percobaannya homogen dan biasa dilakukan di laboratorium atau dalam rumah kaca (Nazir, 1988:301). Banyaknya pengulangan untuk setiap kelompok diperoleh berdasarkan rumus pengulangan Gomez dan Gomez (1985:242), dengan rumus sebagai berikut:

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

Ket :

T = jumlah beda kelompok perlakuan terhadap binatang coba

r = jumlah ulangan

Karena beda kelompok perlakuan adalah 5 (T = 5), maka :

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

$$5r-5 \geq 20$$

$$5r \geq 25$$

$$r = 5$$

Jadi, jumlah mencit yang diperlukan dalam setiap kelompok adalah 5 ekor.

Setiap kotak dan mencit diberi nomor. 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

Tabel 3.2. Peta Kandang

Kandang	No mencit				
A	2	4	12	18	25
B	5	7	10	14	20
C	1	3	6	8	21
D	11	16	17	22	23
E	9	13	15	19	24

Keterangan :

Kandang A : 0 % (kontrol); B : 5 %; C : 10 %; D : 15 %; E : 20 %

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan adalah seluruh kadar kolesterol darah dan berat organ hati mencit (*Mus musculus L.*) Swiss Webster betina dara berumur delapan minggu dengan kisaran berat badan 25 – 30 gram. Sampel yang digunakan adalah

kadar kolesterol darah dan berat organ hati 25 ekor mencit (*Mus musculus L.*) Swiss Webster betina dara yang berumur delapan minggu dengan kisaran berat badan 25 – 30 gram.

D. Lokasi Penelitian

Pembuatan tepung pektin dilakukan di Laboratorium Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Pemeliharaan mencit, pemberian perlakuan, serta pengambilan sampel darah dilakukan di rumah kaca kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Pengukuran kadar kolesterol darah mencit dilakukan di Laboratorium FKH Institut Pertanian Bogor (IPB) dan penimbangan berat organ hati mencit dilakukan di rumah kaca kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

E. Prosedur Kerja

1. Tahap Persiapan

a. Pembuatan Pakan Berlemak

Lemak daging sapi sebanyak 250 gram dan air dipanaskan kemudian dicampurkan dengan bahan dasar pakan mencit standar laboratorium (Komposisi telampir) berasal dari PT. Charoen Pokhpand Indonesia (anak babi no.cp551) sebanyak 1 kg. Lalu ditambah air sampai homogen sehingga adonan dapat dibentuk pelet. Setelah itu, dikeringkan menggunakan oven.

b. Pembuatan Ekstrak Pektin Kulit Pisang

Bahan yang digunakan untuk pembuatan pektin adalah kulit pisang bagian *mesokarp*. Cara pembuatan pektin yang digunakan menggunakan metode dari Esti dan Kemal (2001:1-4). Tahap pembuatan pektin kulit pisang meliputi tahap pengeringan, penggilingan, pembuburan, ekstraksi, pengentalan, pengendapan pektin, pencucian pektin masam, pengeringan, dan penggilingan.

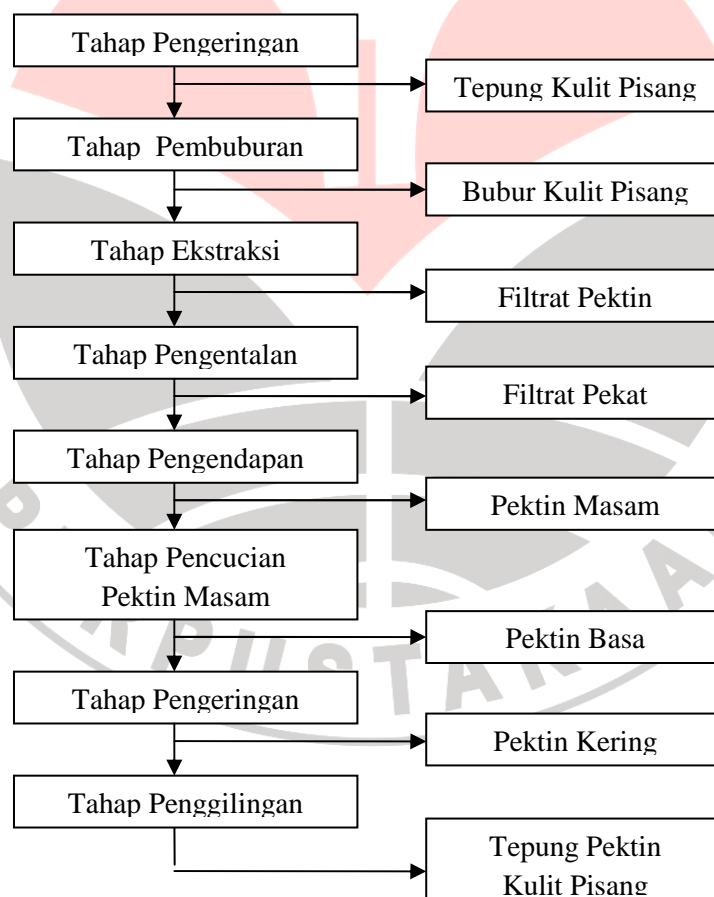
Kulit pisang bagian *mesokarp* dikerok, kemudian dikeringkan dibawah terik matahari selama 3 – 4 hari, sampai kulit pisang benar-benar kering. Kulit yang telah kering kemudian digiling. Hasil penggilingan tersebut dinamakan tepung kulit. Tepung ini kemudian ditambah dengan air sebanyak dua kali berat tepung kulit, kemudian diblender menjadi "bubur kulit" pisang.

Bubur kulit ini siap untuk diekstraksi dengan cara ditambah lagi dengan air sebanyak 15 kali berat tepung kulit pisang dan diaduk sampai merata. Kemudian ditambahkan HCl 1% sampai pH nya menjadi 1,5. Hasilnya disebut "bubur asam", kemudian dipanaskan pada suhu 75°C selama 80 menit. Selanjutnya bubur ini disaring dengan menggunakan kain saring rapat untuk memisahkan filtratnya. Hasil akhirnya disebut "filtrat pektin". Filtrat ini selanjutnya dipanaskan lagi pada suhu 96°C sambil diaduk sampai volumenya menjadi setengah dari volume semula kemudian didinginkan. Hasilnya disebut "filtrat pekat".

Filtrat pekat ini ditambahkan dengan alkohol asam, (Larutan etanol diasamkan dengan menggunakan 2 ml HCl pekat), dengan perbandingan volumenya 1 liter filtrat pekat : 1.5 liter alkohol asam. Kemudian filtrat tersebut didiamkan selama 12 jam sambil ditutup dengan aluminium foil. Endapan dari

pektin tersebut kemudian dipisahkan dari filtratnya dengan kain saring. Hasil ini disebut sebagai "pektin masam". Pektin masam tersebut kemudian ditambahkan dengan alkohol 96% dan diaduk. Pencucian ini dilakukan beberapa kali sampai warnanya tidak berubah menjadi merah setelah ditambahkan dengan indikator phenophtalaein. Hasil ini disebut "pektin basa".

Pektin basa ini diperas kemudian dijemur dibawah sinar matahari sampai benar-benar kering. Hasil ini disebut "pektin kering". Pektin kering kemudian digiling sampai halus dan hasilnya disebut "tepung pektin" dan siap untuk digunakan. Berikut bagan pembuatan tahap pembuatan pektin kulit pisang.



Gambar 3.1. Bagan Tahap Pembuatan Pektin Kulit Pisang

2. Tahap Aklimatisasi Mencit

Mencit diperoleh dari rumah kaca kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI (Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit putih dengan galur, umur, jenis kelamin, dan kondisi lingkungan yang relatif sama untuk menghindari perbedaan aktivitas biologi). Mencit yang digunakan adalah mencit yang sehat yaitu dengan memperhatikan tanda-tanda mata yang jernih, bulu yang tidak berdiri dan berat badan bertambah setiap hari. Pemilihan mencit jenis kelamin betina berumur delapan minggu dilakukan karena adanya suatu penelitian yang melaporkan bahwa pemberian lemak dan kolesterol yang berlebihan pada mencit jantan dapat mempengaruhi keagresifan (Clarke *et al.* 1996:1657) sehingga akan membuat data menjadi bias.

Pemeliharaan dilakukan di rumah kaca kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Sebelum diberi perlakuan, mencit-mencit diaklimatisasi selama satu minggu (Marounek *et al.*, 2005:4) di ruangan yang memiliki pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap dengan suhu ruangan berkisar antara 23°C – 26°C dengan tujuan agar hewan uji teradaptasi dengan kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Mencit-mencit dikelompokkan dalam kandang berukuran 30 cm x 20 cm x 12 cm berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan lima ekor setiap kandang.

Selama masa aklimatisasi, tiap kelompok mencit baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan diberikan pakan biasa sebanyak 25 gram yang ditempatkan pada tempat makan pada masing-masing kandang. Air minum berasal dari air ledeng yang diberikan secara *ad libitum*.

3. Tahap Penggemukan Mencit

Setelah mencit pada tiap kelompok diaklimatisasi selama satu minggu, mencit diberi pakan berlemak tinggi selama satu minggu berikutnya. Selama masa penggemukan, tiap kelompok mencit baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan diberikan pakan berlemak tinggi sebanyak 25 gram yang ditempatkan pada tempat makan pada masing-masing kandang. Air minum berasal dari air ledeng yang diberikan secara *ad libitum*. Pada masa ini dilakukan penimbangan mencit setiap dua hari sekali. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui pertambahan berat badan yang diakibatkan oleh pemberian pakan berlemak tinggi. Dimana meningkatnya berat badan diharapkan akan meningkatkan kadar kolesterol darah.

5. Tahap Perlakuan

Tahap perlakuan dilaksanakan selama 7 hari. Kelompok pertama yakni kelompok kontrol diberi 1 ml aquades/hari. Kelompok perlakuan diberikan larutan pektin kulit pisang sesuai dengan kadar yang telah ditentukan sebanyak 1 ml/hari (Lampiran 3.3) dengan cara *gavage*. Setiap hari mencit pada tiap kelompok diberi makan dan minum berupa pakan berlemak tinggi dan air ledeng secara *ad libitum*. Kecuali pada hari ketujuh, mencit pada tiap kelompok dipuaskan.

3. Tahap Pengambilan Sampel, Pengukuran Kadar Kolesterol Darah dan Penimbangan Berat Organ Hati Mencit

Pada hari kedelapan, dilakukan pembedahan mencit. Kemudian dilakukan pengambilan organ hati mencit. Setelah itu organ hati tiap mencit ditimbang dengan menggunakan neraca *Ohaus*, lalu disimpan ke dalam tabung yang telah diisi larutan formalin 5%. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel darah mencit dari abdominal aorta (Terpstra *et al.*, 1998:1946; Garcia-Diez *et al.*, 1995:1767) dan jantung (Hassel *et al.*, 1997:1149).

Kadar kolesterol diukur dengan metode CHOD-PAP *Enzymatic Colorimeter Test for Cholesterol with lipid Clearing Factor* (LCF). Tahapan dari metode ini dimulai dengan pengambilan sampel darah mencit sebanyak 10 μL dan dipipet ke dalam *cuvette* dan ditambahkan 1000 μL reagen kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*.

Serum dipisahkan dari darah dengan cara sentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Sampel dan standar diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20-25°C. Kemudian sampel dan standar dimasukkan kedalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 493 nm. Hasilnya dibaca pada spektrofotometer dalam bentuk *absorbance*. Sampel dan standar diukur absorbansinya terhadap blanko (*reagen*) murni yang nantinya didapat ΔA . Pengujian dilakukan dua kali (*duplo*).

$$C = \text{konsentrasi standar} \times \left(\frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ standar}} \right)$$

Δ standar

F. Analisis Data

Data kadar kolesterol darah dan berat organ hati mencit yang didapat dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS 15. Untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian pektin kulit pisang terhadap kadar kolesterol darah dan berat organ hati mencit, maka terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas terhadap kedua kelompok data tersebut. Uji normalitas yang digunakan adalah uji Kolmogorov-Smirnov (Nugroho, 2005:107) sedangkan uji homogenitas yang digunakan adalah uji Levene's. Data yang diperoleh homogen dan berdistribusi normal jika $\text{sig. hitung} > \text{sig. } \alpha$ 0.05, sehingga analisis data dilanjutkan dengan uji one-way ANOVA untuk mengetahui perbedaan rata-rata data kadar kolesterol darah dan berat organ hati mencit dari tiap perlakuan atau kelompok uji. Hipotesis pada uji tersebut adalah,

1. H_0 : data berat organ hati mencit antar kelompok uji tidak berbeda secara signifikan
 2. H_1 : data berat organ hati mencit antar kelompok uji berbeda secara signifikan
- Selanjutnya dilakukan uji Tukey untuk mengetahui kadar pektin yang paling efektif terhadap kadar kolesterol darah dan berat organ hati mencit (Cohen dan Fowler, 1995:180-181).

Kemudian dilakukan analisis secara statistik untuk mengetahui korelasi kadar kolesterol darah dengan berat organ hati mencit. Terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov terhadap kedua kelompok data tersebut. Kemudian analisis data dilanjutkan dengan uji regresi untuk mengetahui pengaruh kadar kolesterol darah terhadap berat organ hati

mencit. Selanjutnya dilakukan uji linearitas regresi untuk mengetahui data kadar kolesterol darah dan berat organ hati mencit berhubungan secara linier atau tidak. Kemudian dilanjutkan dengan uji korelasi *Product Moment Pearson* untuk mengetahui ada tidaknya korelasi dan kekuatan korelasi antara kadar kolesterol darah dengan berat organ hati mencit setelah pemberian pektin kulit pisang. Interpretasi koefisien korelasi dapat dilihat pada Tabel 3.3. di bawah ini :

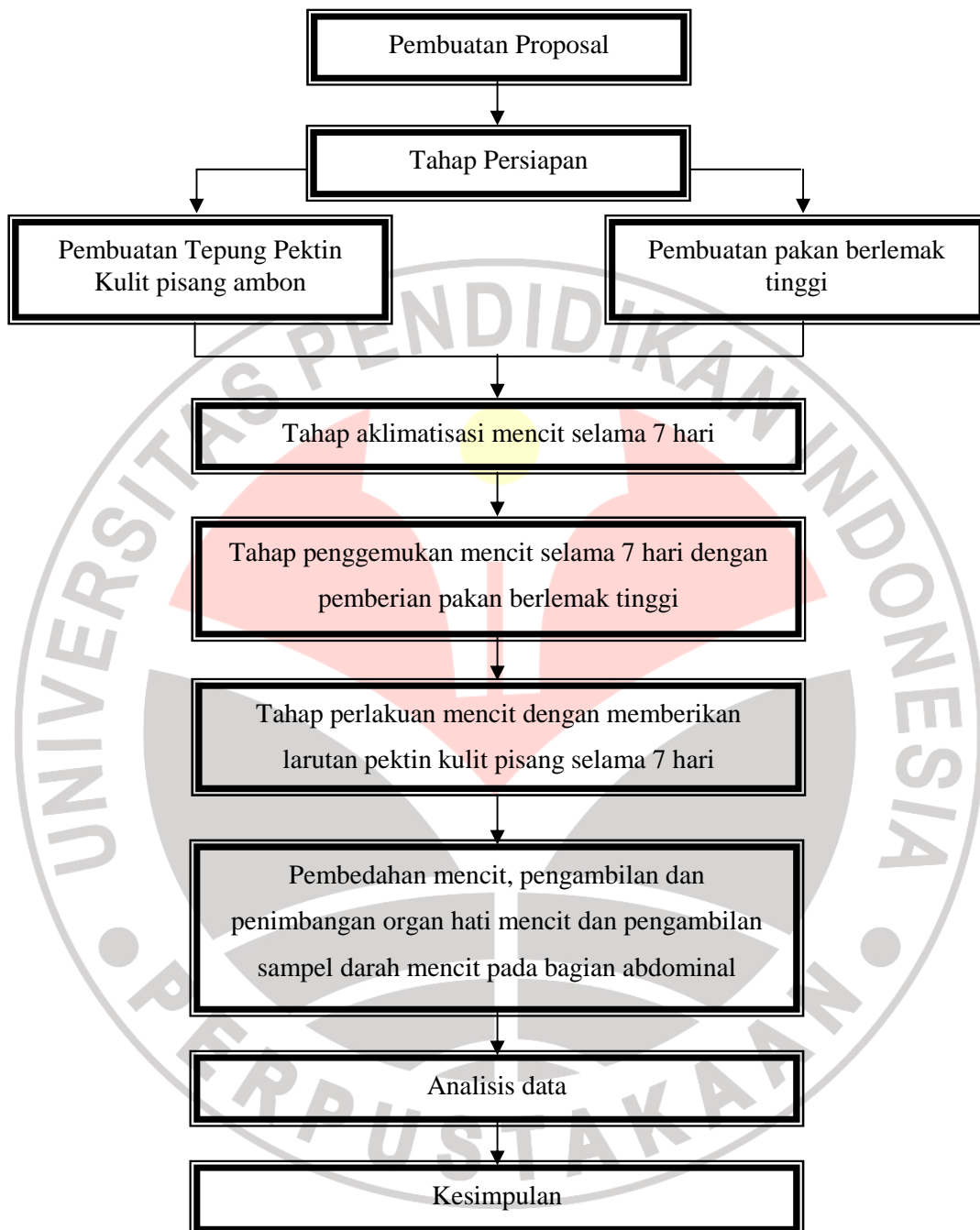
Tabel 3.3. Pedoman untuk Memberikan Interpretasi terhadap Koefisien Korelasi

Interval Koefisien	Tingkat Korelasi
0.00 – 0.199	Sangat rendah
0.20 – 0.399	Rendah
0.40 – 0.599	Sedang
0.60 – 0.799	Kuat
0.80 – 1.000	Sangat kuat

Kemudian dilanjutkan uji signifikansi dengan membandingkan harga r_{hitung} dengan r_{tabel} yang didapatkan dari uji korelasi *product moment pearson* terhadap data kadar kolesterol darah dengan berat organ hati mencit setelah pemberian pektin kulit pisang. Kriterianya jika $r_{hitung} > r_{tabel}$ maka hubungan variabel yang dikorelasikan signifikan (Sugiyono, 2007:224-230). Selanjutnya dilakukan perhitungan koefisien determinasi untuk mengetahui besarnya kontribusi data kadar kolesterol darah terhadap berat organ hati mencit setelah pemberian pektin kulit pisang. Koefisien determinasi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$KD = r^2 \times 100\%$$

Ket : $r^2 = \text{Adjusted R Square}$

G. Alur Penelitian**Gambar 3.2. Bagan Alur Penelitian**