

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam jenis penelitian eksperimental karena memberikan perlakuan kepada populasi dan sampel. Menurut Nazir (2003) penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol.

#### B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu terdapat mencit kelompok perlakuan dan mencit kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Terdapat dua kontrol pada penelitian ini yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yaitu kelompok mencit yang diberi pakan berlemak namun tidak diberi pektin buah jeruk. Kontrol negatif adalah kelompok mencit yang tidak diberi pakan berlemak dan tidak diberi pektin buah.

Kelompok perlakuan terdiri dari empat kelompok yang masing-masing kelompok diberi kadar pektin berbeda yaitu 1,5 g, 3 g, 4,5 g dan 6 g yang dicampurkan dalam pakan berlemak sebesar 100 g. Banyaknya pengulangan yang dilakukan sebanyak lima kali untuk setiap kelompok perlakuan diperoleh dari Gomez (1995) yaitu:

$$\begin{aligned}
 t-(r-1) &\geq 20 \\
 6(r-1) &\geq 20 \\
 6r-6 &\geq 20 \\
 6r &\geq 20+6 \\
 6r &\geq 26 \\
 r &\geq 4,33 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}
 \end{aligned}$$

Keterangan :  $t$  = Perlakuan

$r$  = ulangan

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan ialah  $n \geq 5$ , mencit yang digunakan dibagi

R. Mia Ersa Puspa Endah, 2015

*Pengaruh Pektin Buah Jeruk Medan (Citrus sinensis cv. Medan) Terhadap Perbaikan Kadar Lipid Serum Darah Mencit (Mus musculus L.) Swiss Webster Jantan Hiperlipidemia*  
 Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

menjadi enam kelompok. Pengacakan dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 1995).

Tabel 3.1 Hasil Pengocokan Mencit dan Jenis Perlakuan

Kandang	Nomor Mencit				
A	16	7	15	19	12
B	5	20	2	11	27
C	21	25	6	22	28
D	4	1	14	18	10
E	24	26	9	23	30
F	13	3	29	8	17

Keterangan:

A : Kontrol Negatif

B : Kontrol Positif

C : Diberi pektin dengan dosis 1,5g/100g pakan berlemak

D : Diberi pektin dengan dosis 3g/100g pakan berlemak

E : Diberi pektin dengan dosis 4,5g/100g pakan berlemak

F : Diberi pektin dengan dosis 6g/100g pakan berlemak

1,2,3,.. : Nomor Mencit

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit jantan dengan umur empat bulan dan memiliki rentang berat badan 30 gram sampai dengan 35 gram. Sebelum tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimasi selama 7 hari. Setelah semua hewan percobaan diaklimasi, diberi pakan berlemak selama 14 hari yang bertujuan untuk meningkatkan kadar lipid darah mencit hingga hiperlipidemia. Parameter yang diukur adalah kadar lipid darah yang meliputi kadar kolesterol total, HDL, LDL dan trigliserida dari hewan uji dengan menggunakan metode *Cholesterol Oxidase Para-aminophenazone* (CHOD-PAP), *Glycerol Phosphate Oxidase Para-aminophenazone* (GPO-PAP), Formula *Friedwald* (Tangka, 2003).

Pengukuran parameter dilakukan sebanyak dua kali yaitu setelah pemberian pakan berlemak atau sebelum pemberian pektin dan setelah pemberian pektin buah jeruk selama 30 hari. Setelah pemberian pakan berlemak lipid darah akan diukur, guna mengetahui kadar lipid sudah tinggi atau hiperlipidemia kemudian dilakukan pemberian pektin selama 30 hari dan diakhiri dengan pengecekan lipid darah kembali. Semua hewan percobaan diambil sampel darahnya melalui vena caudalis (ekor).

### C. Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian melibatkan beberapa tempat yang berbeda. Pembuatan pektin dilakukan di laboratorium Struktur Hewan FPMIPA UPI. Pengukuran kolesterol total, trigliserida, LDL dan HDL bertempat di laboratorium mikrobiologi FPMIPA UPI. Lokasi lainnya untuk pemeliharaan, aklimasi mencit dan pemberian perlakuan dilakukan di Rumah Mencit Kebun Botani FPMIPA UPI.

Rentang waktu pemberian perlakuan selama satu bulan, yaitu bulan Desember 2014 sampai dengan Januari 2015. Tahap persiapan hingga selesai mencapai waktu selama enam bulan.

### D. Populasi dan Sampel Penelitian

Menurut Arikunto (2010), populasi adalah keseluruhan subjek penelitian, maka populasi merupakan semua elemen yang ada dalam penelitian yang akan dilakukan. Dari populasi diharapkan peneliti dapat memperoleh informasi yang dapat membantu memecahkan masalah yang akan diteliti. Populasi penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus L.*) Swiss Webster jantan hiperlipidemia dan sampel pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus L.*) Swiss Webster jantan hiperlipidemia yang diberi pektin.

### E. Prosedur Penelitian

Tahap awal yang perlu dilakukan adalah study pustaka sehingga tahapan selanjutnya dapat terencana. Prosedur kerja meliputi tiga tahap utama yaitu tahap pra-penelitian, tahap penelitian, tahap pasca penelitian.

#### 1. Tahap Pra-penelitian

##### a. Penyiapan Alat dan Bahan

Tahap awal atau tahap pra-penelitian sangat penting dilakukan guna mendukung berjalannya penelitian dengan maksimal. Alat dan bahan yang akan digunakan pada saat aklimasi, pembuatan ekstrak pektin, tahap penelitian dan pengukuran parameter di paparkan pada Lampiran 2.

#### b. Persiapan Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus L.*) Swiss Webster jantan. Hewan percobaan yang digunakan berumur empat bulan dan memiliki rentang berat badan 30 gram sampai dengan 35 gram. Pengukuran berat badan awal perlu dilakukan untuk mengetahui kondisi awal mencit. Penimbangan berat badan dilakukan kepada semua mencit untuk mendapatkan mencit dengan rentang berat yang diinginkan. Pengelompokan mencit dilakukan secara acak sehingga setiap kelompok memiliki berat beragam dengan rentang berat yang sudah ditentukan.

Hewan percobaan yang digunakan adalah 30 ekor mencit (*Mus musculus L.*) yang dipelihara dalam enam kandang yang terbuat dari bak plastik berukuran 28 cm x 30 cm x 12 cm dengan ditutupi kawat pada bagian atas. Keadaan selama aklimasi dan perlakuan dikontrol pada kisaran lingkungan yang tetap, yaitu pada ruangan yang memiliki kondisi pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap dengan suhu ruangan berkisar 23°-26°C dengan tujuan hewan uji dapat beradaptasi sesuai dengan waktu biologis hewan tersebut serta kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Suhu, pemberian minum, jumlah mencit didalam kandang, pergantian sekam semua dilakukan secara sama untuk semua kelompok mencit.

#### c. Pembuatan Ekstrak Pektin Buah Jeruk Medan (*Citrus sinensis cv. Medan*)

Bahan utama pembuatan ekstrak pektin adalah buah jeruk medan (*Citrus sinensis cv. Medan*). Buah yang digunakan dipastikan satu spesies dan tidak ada pencampuran spesies jeruk lainnya. Bagian yang digunakan adalah buah dari jeruk tersebut tanpa menggunakan biji dan kulit.

Pembuatan pektin buah jeruk yang digunakan menggunakan metode dari Esti dan Kemal (2001). Tahap pembuatan pektin buah jeruk medan (*Citrus sinensis cv. Medan*) meliputi tahap pengeringan, penggilingan, pembuburan, ekstraksi, pengentalan, pengendapan pektin, pencucian pektin masam, pengeringan, dan penggilingan. Pembuatan pektin dengan menggunakan metode Esti dan Kemal (2001), menghasilkan pektin tanpa campuran senyawa lainnya

dengan kadar metoksil sebesar 4,35%. Berikut ini tahapan pembuatan ekstraksi pektin buah jeruk medan (*Citrus sinensis* cv. Medan):

- 1) Tahap mengeringan dilakukan dengan mengupas kulit jeruk, buah jeruk diperas oleh kain saring hingga bulir pecah kemudian memisahkan biji dari dalamnya. Buah jeruk yang telah diperas dan terpisah dari bijinya ini dijemur oleh sinar matahari dengan rentang waktu 3-4 hari. Buah jeruk yang sudah kering kemudian di haluskan dengan bantuan blender, buah yang sudah halus disebut tepung buah jeruk. Tepung buah jeruk ini kemudian ditambahkan dengan air sebanyak dua kali lipat berat kering tepung buah jeruk hingga menjadi bubur buah jeruk.
- 2) Pembuatan bubur buah jeruk ditambahkan air kembali sebesar 17 kali lipat berat kering. Penambahan air digunakan sebagai pelarut karena pektin memiliki sifat dapat larut di dalam air.
- 3) Tahap selanjutnya adalah menambahkan HCL 1% hingga diperoleh pH 1,5 maka menjadi bubur masam. Menurut Kertesz (1951), keadaan pH yang asam saat ekstraksi dapat memisahkan ion polivelan dan memutus ikatan asam pektinan dengan selulosa.
- 4) Bubur masam direbus didalam panci berukuran besar dengan suhu 75<sup>0</sup>C selama 80 menit. Kemudian ampas buah jeruk dipisahkan dengan bantuan kain saring, ampas tersebut dibuang dan yang digunakan hanya air hasil perebusan saja atau filtrat masam. Suhu ditinggi akan mempengaruhi ikatan antara molekul-molekul protopektin dan memudahkan pektin larut di dalam air.
- 5) Perebusan dilanjutkan dengan suhu didih 96<sup>0</sup>C hingga volumenya menjadi ½ volume awal. Setengah volume yang didapatkan disebut filtrat pektin. Filtrat pektin didinginkan kemudian dicampur dengan etanol masam dengan komposisi 1 : 1,5 diaduk hingga merata dan didiamkan selama 12-14 jam sambil ditutup oleh almunium foil. Setelah didiamkan selama 12-14 jam filtrat pektin diperas dengan bantuan kain saring hingga mendapatkan pektin masam.
- 6) Pektin masam dicuci oleh alkohol 97% hingga airnya bening dan dilakukan pengecekan pH. Alkohol berfungsi sebagai pendehidrasi ketika dicampurkan dengan alkohol maka pektin akan mengendap dan memisahkan dengan

kandungan lainnya. Pencucian ini dilakukan terus hingga mencapai pH 5 maka menjadi pektin basa. Pektin basa dikeringkan dan diblender hingga halus.

#### d. Pembuatan Pakan Berlemak dan Pakan Tidak Berlemak

Pembuatan pakan berlemak dan tidak berlemak dilakukan dengan mencampurkan beberapa bahan dengan komposisi tertentu. Pembuatan pakan mengacu pada metode Hernawati (2013), dengan komposisi sebagai dedak, tepung jagung, tepung ikan, tepung kedelai, premix, CaCo<sub>3</sub>, garam dan minyak kelapa (Lampiran 1). Pakan berlemak diberi tambahan kuning telur ayam sebagai sumber lemak.

Pembuatan pakan dilakukan dengan cara mencampurkan semua bahan secara merata dengan komposisi yang sudah ditentukan. Dedak, tepung jagung, tepung ikan dan tepung kedelai diukur terlebih dahulu dengan bantuan timbangan dan kemudian dicampurkan secara merata. Bahan selanjutnya yang akan dicampurkan adalah premix, CaCo<sub>3</sub> dan garam. Dengan bantuan sendok pastikan semua bahan tercampur secara merata. Bahan yang dicampurkan terakhir ialah minyak dan kuning telur. Kuning telur digunakan hanya untuk pakan berlemak saja, sedangkan pakan tidak berlemak tidak ditambahkan kuning telur. Lemak pada pakan berlemak berasal dari kuning telur, karena kuning telur mengandung 275 mg/ons kolesterol (Odelia, 2011). Penambahan lemak pada pakan bertujuan untuk menginduksi lipid darah mencit. Penambahan pektin dimasukkan ke dalam pakan berlemak. Pakan kontrol negatif diberi pakan tidak berlemak maka tidak ditambahkan kuning telur ke dalam komponen pakan tersebut

#### e. Aklimasi Hewan Percobaan

Aklimasi mencit dilakukan selama satu minggu dengan pemberian makan dan minum secara sama untuk semua kelompok mencit. Aklimasi bertujuan sebagai bentuk adaptasi mencit terhadap lingkungan yang akan digunakan dalam penelitian.

#### f. Pemberian Pakan Berlemak

Sebelum pemberian pektin semua kelompok mencit diinduksi lemak dengan cara pemberian pakan berlemak selama dua minggu, kecuali kelompok mencit yang menjadi kontrol negatif. Pemberian pakan berlemak dilakukan dua kali sehari yaitu pada pagi dan sore hari. Pada pagi hari diberi 25 gram pakan berlemak dan pada sore hari diberi 25 gram pakan berlemak kembali. Jadi, dalam satu hari selama dua minggu diberi 50 gram pakan berlemak untuk satu kandang atau satu kelompok mencit. Pemberian pakan berlemak ini bertujuan untuk menginduksi lipid ke dalam tubuh mencit sehingga membuat mencit menjadi hiperlipidemia.

Pakan berlemak yang diberi sebelum pemberian pektin dilakukan untuk meningkatkan kadar lipid darah mencit (*Mus musculus* L.) sehingga semua mencit hiperlipidemia. Hal tersebut terjadi karena konsumsi lemak berlebih sama halnya dengan konsumsi kalori yang tinggi. Menurut Linder (1992), kalori ini akan diubah menjadi asam lemak monogliserida. Keadaan mencit (*Mus musculus* L.) yang telah hiperlipidemia kemudian akan diberi pektin dengan kadar berbeda, yaitu kadar 1,5 g/100 g pakan berlemak, 3 g/100 g pakan berlemak, 4,5g/100g pakan berlemak dan 6 g/100 g pakan berlemak selama 30 hari.

## 2. Tahap Penelitian

Tahap penelitian berlangsung selama satu bulan lamanya, namun sebelumnya dilakukan penambahan lipid darah kepada semua kelompok mencit. Selama empat belas hari semua kelompok mencit kecuali kelompok kontrol negatif diberi pakan berlemak. Hal ini bertujuan untuk menginduksi lipid pada darah mencit.

Perlakuan dilakukan dengan cara penambahan pektin buah jeruk ke dalam pakan berlemak. Pemberian pektin diberi dengan perbedaan kadar yaitu 1,5 g, 3 g, 4,5 g dan 6 g yang dicampurkan ke dalam pakan berlemak dalam berat 100 g. Sedangkan kelompok kontrol negatif diberi pakan biasa tanpa penambahan lemak dan pektin. Kelompok kontrol positif diberi pakan berlemak tanpa pektin.

Pemberian pakan dilakukan setiap hari, setiap harinya semua mencit mendapatkan dua kali pemberian pakan, pada pagi hari seberat 25 gram dan sore

hari 25 gram. Maka dalam satu hari pemberian pakan sebesar 50 gram untuk setiap kandangnya. Perlakuan lain seperti pemberian minum dan penggantian sekam dilakukan secara sama untuk semua kelompok mencit.

Jumlah mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor jantan galur Swiss Webster yang terbagi menjadi enam kelompok. Dalam kelompok ini masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor tikus. Adapun kelompok-kelompok tersebut adalah:

- 1) Kelompok pertama adalah kelompok hewan kontrol negatif yaitu mencit yang diberi pakan biasa atau tidak berlemak.
- 2) Kelompok kedua adalah kelompok hewan kontrol positif yaitu mencit yang diberi pakan berlemak tanpa menambahkan pektin.
- 3) Kelompok ketiga adalah kelompok mencit yang diberi pakan berlemak dan pektin sebesar 1,5 gram pektin dalam 100 gram pakan berlemak.
- 4) Kelompok keempat adalah kelompok mencit yang diberi pakan berlemak dan pektin sebesar 3 gram pektin dalam 100 gram pakan berlemak.
- 5) Kelompok kelima adalah kelompok mencit yang diberi pakan berlemak dan pektin sebesar 4,5 gram pektin dalam 100 gram pakan berlemak.
- 6) Kelompok keenam adalah kelompok mencit yang diberi pakan berlemak dan pektin sebesar 6 gram pektin dalam 100 gram pakan berlemak.

Perlakuan dilakukan selama satu bulan lamanya, parameter yang diukur adalah kadar lipid dalam darah yang meliputi kolesterol total, trigliserida, LDL dan HDL. Pengukuran awal kadar lipid dalam darah dilakukan sebelum pemberian pektin. Kemudian setelah satu bulan perlakuan dilakukan kembali pengukuran kadar lipid dalam darah.

Darah diambil melalui vena caudalis pada ekor menggunakan gunting sebanyak kurang lebih 2ml dan ditampung pada tabung mikro. Agar mendapatkan serum darah yang diinginkan maka dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama lima belas menit. Serum (supernatan) diambil dengan menggunakan mikropipet berskala. Serum diperiksa dengan metode CHOD-PAP, GPO-PAP, Formula *Friedwald* untuk pemeriksaan kolesterol total, HDL, LDL dan trigliserida (Tangka, 2003). Berikut tahapan analisis parameter :

1) Uji kolesterol total

Memasukkan 500µl reagen kolesterol total dan 5µl serum darah ke dalam botol mikro. Kemudian dilanjutkan dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500nm untuk melihat hasil absorbansi. Hasil absorbansi dimasukkan ke dalam rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer} \times 200}{\text{Absorbansi standar}} = \text{Kolesterol total}$$

2) Uji Triglisierida

Memasukkan 500µl reagen triglisierida total dan 5µl serum darah ke dalam botol mikro. Kemudian dilanjutkan dengan spektrofotometer panjang gelombang 500nm untuk melihat absorbansi. Hasil absorbansi dimasukkan ke dalam rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer} \times 200}{\text{Absorbansi standar}} = \text{Triglisierida}$$

3) Uji HDL

Memasukkan 25µl reagen HDL dan 2,5µl serum darah ke dalam tabung mikro, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama lima belas menit. Hasil dari sentrifugasi didapatkan supernata dan pellet, supernata dimasukkan ke tabung mikro baru dan ditambahkan 500µl reagen kolesterol. Tabung tersebut di hitung absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500nm. Hasil absorbansi dimasukkan ke dalam rumus sebagai berikut :

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer} \times 100 \times 1,1}{\text{Absorbansi standar}} = \text{HDL}$$

4) Uji LDL

Pengukuran kadar LDL didapatkan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kolesterol total} - (\text{HDL} + \frac{1}{5} \text{ Triglisierida}) = \text{LDL}$$

### 3. Tahap Pasca Penelitian

Tahap pasca penelitian merupakan tahap pengolahan data. Setiap data yang telah diperoleh terlebih dahulu perlu diuji homogenitas dan normalitas. Uji

homogenitas yang digunakan adalah *Test of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)*, sedangkan uji normalitas menggunakan *Test of Normality (Kolmogorov-Smirnov)*. Data yang terdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis secara statistik parametrik yaitu, analisis varian (*ANOVA*). Data yang tidak terdistribusi normal dan tidak bervarian homogen menggunakan analisis *Kruskal Walls*. Data yang memiliki perbedaan signifikan untuk setiap perlakuan kemudian diuji lebih lanjut dengan uji *Tukey* dengan derajat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Apabila data tidak normal dan tidak homogen maka dianalisis dengan menggunakan pengolahan data non parametrik akan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Data yang tidak berbeda signifikan tidak diuji lebih lanjut dengan uji perbandingan berganda. Selanjutnya data awal sebelum pemberian pektin dibandingkan dengan data akhir setelah tiga puluh hari pemberian pektin dengan menggunakan uji *T*, Analisis data menggunakan *Software SPSS 18 for Windows*.

## F. Alur Penelitian

