

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, karena pada penelitian ini diberikan perlakuan untuk memanipulasi objek penelitian disertai dengan adanya kontrol (Nazir, 2003: 63).

#### **B. Desain Penelitian**

Desain penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain ini sering digunakan jika percobaan bersifat homogen seperti percobaan dalam laboratorium atau rumah kaca (Nazir, 2003: 235-236). Secara acak mencit dikelompokkan pada setiap kelompok kontrol dan perlakuan, setiap kandang terdiri dari lima ekor mencit, kemudian diberi pakan yang berkolesterol tinggi. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) didapat dengan menggunakan rumus Gomez dan Arturo (1995) yaitu :

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

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

$$r \geq 5$$

Keterangan

t = jumlah perlakuan

r = jumlah replikasi

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan yang dilakukan ialah lima

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 Penempatan hasil randomisasi mencit pada kandang

<b>Kandang</b>	<b>No mencit</b>				
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 :

Perlakuan A : 0 %; B : 5 %; C : 10 %; D : 15 %; E : 20 %



### **C. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan adalah seluruh organ hati mencit (*Mus musculus*. L) Swiss Webster betina dara berumur delapan minggu. Sampel yang diambil 25 organ hati mencit (*Mus musculus*. L) Swiss Webster betina dara yang berumur delapan minggu.

### **D. Lokasi dan Tempat Penelitian**

Lokasi penelitian dilakukan di laboratorium struktur hewan, fisiologi hewan dan botani jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia

### **E. Prosedur**

#### **1 . Tahap Persiapan**

##### **a. Pakan Berlemak**

Pembuatan pakan berlemak dengan cara mencampurkan 250 gram lemak daging sapi dengan air. Selanjutnya capuran tersebut dipanaskan, kemudian ditambahkan bahan dasar pakan berasal dari PT. Charoen Pokhpand Indonesia (anak babi no.cp551) hingga mencapai berat 1 kg. Bahan yang masuk diaduk samapai homogen, setelah itu dibentuk butiran-butiran pelet kemudian dikeringkan di dalam oven. Pakan yang sudah kering dapat diberikan pada mencit.

## b. Ekstraksi Pektin dari Kulit Jeruk Bali

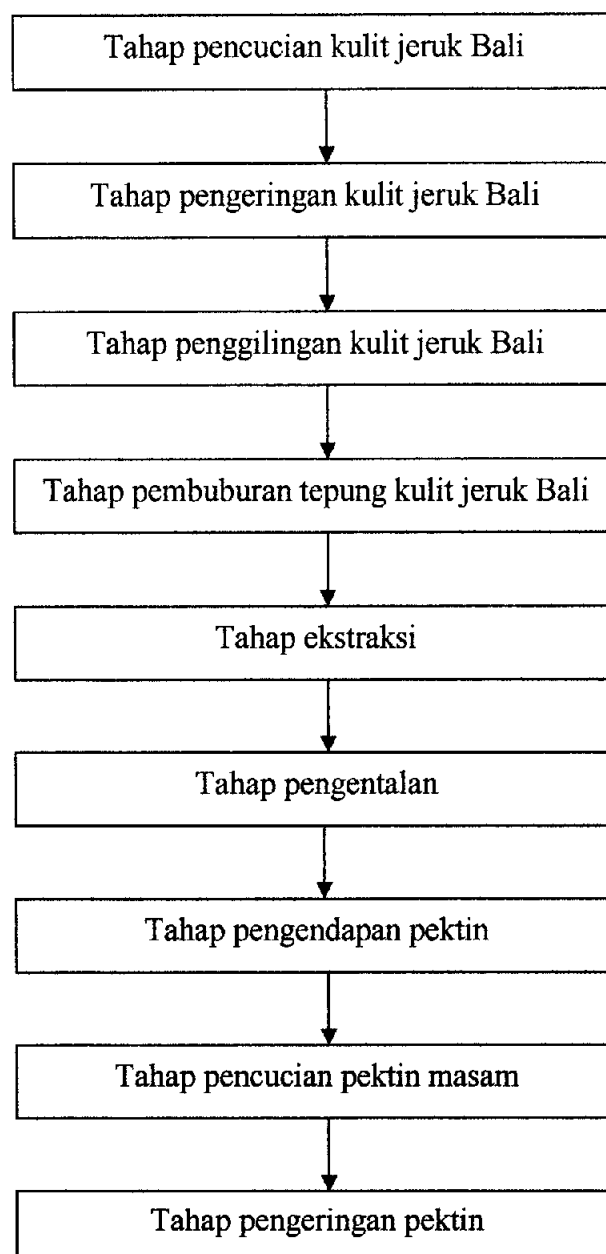
Proses ekstraksi pektin kulit jeruk bali merujuk pada proses ekstraksi pektin yang dilakukan oleh Esti dan Kemal (2001). Pertama, mengiris kulit jeruk bali yang berwarna putih dengan pisau kemudian dicuci sampai bersih lalu ditiriskan sampai agak kering. Kulit jeruk bali kemudian diperas sehingga kadar air dalam kulit jeruk tersebut sedikit berkurang. Kulit jeruk bali yang telah diperas lalu dikeringkan dengan cara menjemurnya selama tiga sampai empat hari dibawah terik matahari. Pengeringan ini dilakukan sampai kulit jeruk bali menjadi benar-benar kering. Kulit jeruk bali yang telah kering selanjutnya digiling menggunakan *blender* hingga halus seperti tepung. Hasilnya disebut tepung kulit, kemudian dilakukan tahap pembuburan.

Tepung kulit jeruk bali ini ditambah air sebanyak dua kali berat tepung kulit, kemudian diblender kembali hingga menjadi bubur kulit jeruk bali. Bubur kulit jeruk bali ditambah dengan air sebanyak 15 kali berat tepung kulit jeruk bali kemudian diaduk agar merata. Bubur encer tersebut kemudian ditambahkan HCL 1% agar pHnya menjadi 1,5 (diukur menggunakan pH meter). Hasil ini disebut bubur asam. Selanjutnya, bubur asam ini dipanaskan menggunakan *hot plate* dan *mechanical stirer* dengan suhu  $\pm 75^{\circ}$  C sambil diaduk dengan stirer selama 80 menit. Bubur kemudian disaring menggunakan kain saring rapat untuk memisahkan filtratnya. Hasil akhirnya disebut filtrat pektin.

Tahap berikutnya ialah tahap pengentalan, filtrat pektin dipanaskan pada suhu  $\pm 96^{\circ}$  C sambil diaduk sampai volumenya menjadi setengah volume semula. Hasil ini disebut filtrat pekat. Filtrat ini lalu didinginkan. Selanjutnya, Larutan etanol 96 % diasamkan dengan menggunakan 2 mL HCL pekat (larutan ini disebut sebagai alkohol asam). Filtrat pekat kemudian ditambahkan dengan alkohol asam (setiap 1 liter filtrat pekat ditambah dengan 1,5 liter alkohol asam). Lalu didiamkan selama 12 jam. Endapan pektin tersebut kemudian dipisahkan dari filtratnya menggunakan kain saring rapat (hasil ini disebut sebagai pektin masam). Pengendapan pektin dengan menggunakan alkohol 96 % berdasarkan pada penelitian Purbianti (2005: 1).

Setelah tahap pengendapan dilakukan pencucian pektin masam, pektin masam lalu ditambahkan dengan dengan alkohol 96 % kemudian diaduk (tiap 1 liter pektin asam ditambahkan dengan 1,5 liter alkohol 96 %). Hasilnya lalu disaring kembali beberapa kali agar pektin tidak bereaksi asam lagi (pektin yang tidak bereaksi asam ialah pektin yang tidak berubah warna menjadi merah ketika ditambahkan indikator phenophtalaein). Hasil ini disebut pektin basa.

Tahap akhir pembuatan pektin adalah pektin basa dijemur sampai kering selama kurang lebih delapan jam. Hasil ini disebut pektin kering. Tahap Penggilingan, pektin kering kemudian digiling sampai halus seperti tepung. Hasil yang diperoleh berupa tepung pektin yang siap digunakan.



Gambar 3.1. Bagan proses pembuatan pektin

### c. Aklimatisasi Mencit

Mencit (*Mus musculus*. L) Swiss Webster diperoleh dari *green house* Botani 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).

Pemilihan jenis kelamin betina berumur dua bulan dilakukan karena adanya suatu kondisi bahwa penurunan estrogen dapat menyebabkan naiknya kadar total lipid, kolesterol LDL serta penurunan kadar HDL (Mu'minah, 2007:1). Selanjutnya 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 *green house* Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi UPI. Sebelum diberi perlakuan, mencit-mencit diaklimatisasi pada suhu ruangan rata-rata 23 C-26 °C, pada periode ini dilaksanakan selama satu minggu agar hewan uji teradaptasi dengan kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Mencit-mencit dikelompokkan dalam kandang berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan lima ekor setiap kandang. Kandang yang digunakan terbuat dari pvc berukuran 30 cm x 20 cm x 12 cm transparan dan ditutupi oleh penutup yang terbuat dari besi dan tempat air minum (botol).

Selama aklimatisasi, mencit-mencit tersebut hanya diberi pakan biasa dan air minum secara *ad libitum*. Makanan diberikan  $\pm$  25 gram setiap hari

dan botol minuman dibersihkan tiap tiga hari sekali dan diganti airnya atau diisi ulang dengan air apabila air sudah habis. Aklimatisasi biasanya digunakan untuk menghadapi faktor-faktor yang terjadi dalam lingkungan lebih terkontrol di laboratorium.

## **2. Tahap Perlakuan**

Perlakuan ini dilaksanakan selama dua minggu, satu minggu pertama mencit diberi makan pakan berlemak  $\pm$  25 gram setiap hari/kandang dan air minum secara *ad libitum* agar mencit mengalami *hiperkolesterolemia*. Selanjutnya pada minggu kedua dilakukan pemberian pektin secara oral, mencit diberi pakan berlemak dan minum setiap hari seperti biasa, pada hari ketujuh mencit dipuaskan. Mencit dikelompokkan menjadi lima kelompok. Setiap satu kelompok berjumlah lima ekor mencit sebagai ulangan perlakuan. Selama perlakuan mencit diberi pektin dengan dosis yang berbeda yaitu 5 %, 10 %, 15 % dan 20 % pemberian pektin dilakukan setiap hari sebanyak 1 ml/30 gram berat badan.

Setelah melewati masa perlakuan dengan cara pemberian asupan pektin kulit jeruk bali selama tujuh hari. Selanjutnya, dilakukan tahap pengambilan organ dengan cara pembedahan hewan uji. Mencit yang telah dibedah kemudian akan diambil bagian organ yang akan diuji, yakni organ hati dengan cara digunting atau dipotong menggunakan alat-alat bedah. Hal tersebut dilakukan dengan hati-hati agar organ hati yang akan diuji tidak rusak. Kemudian organ-organ tersebut ditimbang, lalu disimpan ke dalam tabung yang telah diisi larutan formalin 5 %.



### 3. Tahap Pembuatan Preparat

Pada tahap pembuatan preparat dilakukan dengan menggunakan metode beku (*freezing microtome*). Metode beku adalah suatu cara dalam membuat preparat irisan dengan teknik membekukan suatu jaringan tertentu, sehingga jaringan dapat menjadi keras dan mudah diiris. Cara membekukan jaringan ini adalah dengan menyemprotkan gas karbondioksida ( $\text{CO}_2$ ) pada jaringan tersebut (Suntoro, 1983 : 42). Metode ini lebih baik daripada menggunakan metode parafin dikarenakan dengan menggunakan metode beku jaringan hanya mengalami sedikit pengkerutan. Selain  $\text{CO}_2$ , untuk membekukan organ bisa menggunakan nitrogen cair

Setelah dilakukan proses irisan, selanjutnya dilakukan pewarnaan irisan dengan menggunakan metode Schultz – Smith (Gurr, 1960 dalam Suntoro, 1983 : 179). Alasan menggunakan metode ini karena gambaran histologi organ yang akan dilihat lebih diarahkan ke keadaan kolesterol pada organ tersebut.

Langkah-langkahnya dalam pembuatan preparat menggunakan metode pewarnaan Schultz – Smith ialah Jaringan yang sudah difiksasi dengan formalin, dipotong tipis dengan menggunakan metode beku. Selanjutnya dicelupkan ke dalam hidrogen peroksida 3% selama tiga menit. Kemudian dicuci dengan akuades. Setelah itu diletakan diatas *object glass*, kemudian dibiarkan kering. Terakhir, preparat ditetesi dengan asam asetat glasial. Hasilnya Kolesterol atau ester-esternya berwarna hijau untuk beberapa saat, kemudian menjadi coklat setelah 30 menit.

Selain dengan metode beku, akan menggunakan juga metode parafin dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (Soetjipta, 1968: 10-18). Metode tersebut digunakan untuk melihat sel-sel hati yang lebih jelas. Hal tersebut dilakukan karena dengan menggunakan metode beku hampir tidak mungkin untuk dapat melihat elemen-elemen struktural dalam kedudukan yang asli (Suntoro, 1983 : 42)

Langkah pertama pembuatan preparat dengan menggunakan metode parafin ialah organ yang sudah difiksasi dicelupkan pada alkohol bertingkat (alkohol dengan konsentrasi 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % dan alkohol absolut), masing-masing untuk setiap konsentrasi dicuci selama 30 menit dengan tiga kali pencucian. Proses pencucian dengan alkohol bertingkat disebut dehidrasi. Selanjutnya organ hati di rendam dalam Toluol sampai jernih (*Clearing*).

Tahap selanjutnya ialah infiltrasi, organ hati direndam dalam parafin dengan melting point 48-50 °C, 50-52 °C dan 52-55 °C secara bertahap, masing-masing direndam selama 1-2 jam di dalam oven. Kemudian organ hati di tanam dalam parafin (*Embedding*). Setelah di tanam dalam parafin, organ hati disayat menggunakan mikrotom dan ditempel pada *object glass* dengan menggunakan albumin.

Setelah dilakukan penempelan, agar jaringan bisa terwarnai dengan Hematoksilin Eosin, dilakukan proses deparafinisasi dengan menggunakan xylol selama setengah jam, kemudian dicelupkan pada alkohol bertingkat dari konsentrasi yang tinggi sampai konsentrasi rendah konsentrasi (96 %, 90

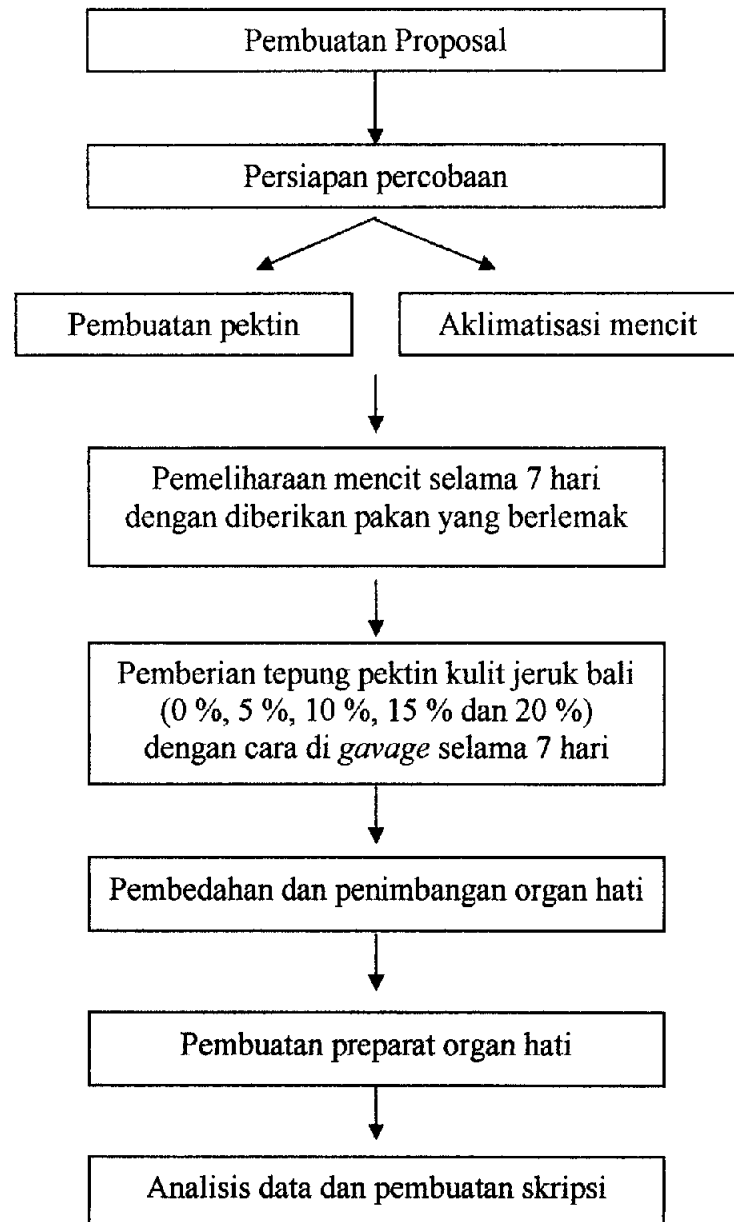
%, 80 %, 70 %, 60 %, 50 % dan 30 %). Setelah itu dicelupkan ke dalam akuades. Tahap selanjutnya, jaringan dicelupkan ke dalam Hematoksilin selama 7-10 detik, dan dicuci dengan air mengalir. Dilakukan proses diferensiasi dengan alkohol asam selama 2-3 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir. Jaringan kemudian dicelupkan kembali pada alkohol bertingkat mulai dari konsentrasi 30% sampai konsentrasi 70%. Kemudian dicelupkan ke dalam Eosin selama 2-3 menit. Setelah itu dibilas dengan air biasa dan akuades.

Selanjutnya, jaringan dicelupkan kembali ke dalam alkohol bertingkat mulai dari konsentrasi 30% hingga alkohol absolut, kemudian dikeringkan. Pada tahap akhir, jaringan pada *object glass* ditutup dengan menggunakan kaca penutup yang sudah ditetesi terlebih dahulu entelan. Setelah ditutup, jaringan siap diamati.

#### **F. Analisis Data**

Data di analisis secara kualitatif. Analisis secara kualitatif dilakukan dengan melihat dan membandingkan gambaran histologis hati dari setiap dosis dengan kontrol. Analisis dilakukan pada dua metode pembuatan histologi yaitu metode beku dengan pewarnaan Schlutz-Smith dan metode parafin dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin

### G. Alur Penelitian



Gambar 3.2 Diagram alur penelitian

