

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	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:

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

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan adalah seluruh kadar kolesterol mencit (*Mus musculus*. L.) Swiss Webster betina dara berumur delapan minggu. Sampel yang digunakan adalah kadar kolesterol 25 ekor mencit (*Mus musculus*. L) Swiss Webster betina dara yang berumur delapan minggu.

D. Lokasi Penelitian

Pembuatan tepung pektin dilakukan Laboratorium Fisiologi, Jurusan 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

Terlampir pada lampiran 1.1.

F. Prosedur Kerja

a) Tahap persiapan

1. Aklimatisasi Mencit

Pemeliharaan dilakukan di *green house* Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi UPI. Sebelum diberi perlakuan, mencit-mencit diaklimatisasi pada suhu ruangan rata-rata 23-26°C, periode ini dilaksanakan selama seminggu 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.

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). Dan adanya suatu penelitian yang melaporkan bahwa pemberian lemak dan kolesterol yang berlebihan pada mencit jantan dapat mempengaruhi keagresifan (Clarce *et al.*, 1996) sehingga akan membuat data menjadi bias.

Selama aklimatisasi, mencit-mencit tersebut hanya diberi pakan biasa dan air minum secara *ad libitum*. Makanan diberikan 5 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. Pembuatan Pakan Berlemak

Lemak daging sapi sebanyak 200 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.

3. Pembuatan Ekstrak Pektin Kulit Pisang

Ekstraksi pektin kulit pisang ambon mengacu pada penelitian Hasbullah (2001), Berikut tahap-tahap ekstraksi pektin kulit pisang ambon:

1) Pengerinan

Bagian *mesokarp* kulit pisang ambon dikeringkan dengan cara menjemurnya selama tiga sampai empat hari di bawah terik matahari. Pengerinan ini dilakukan sampai kulit pisang menjadi benar-benar kering.

2) Penggilingan

Kulit pisang yang telah kering selanjutnya digiling menggunakan *blender* hingga halus seperti tepung. Hasil penggilingan kulit pisang ini disebut tepung kulit.

3) Pembuburan

Tepung kulit pisang ditambah air sebanyak dua kali berat tepung kulit, kemudian di *blender* hingga menjadi bubur kulit pisang.

4) Ekstraksi

Bubur kulit pisang ditambah dengan air sebanyak 15 kali berat tepung kulit pisang kemudian diaduk agar merata. Bubur encer tersebut kemudian ditambahkan HCL 1% agar pH nya menjadi 1,5. Hasilnya disebut bubur asam. Bubur asam dipanaskan menggunakan *hot plate* dengan suhu $\pm 75^{\circ}\text{C}$ sambil diaduk dengan *stirer* selama 80 menit. Bubur kemudian disaring menggunakan

kain saring rapat untuk memisahkan filtratnya. Hasil akhirnya disebut filtrat pektin.

5) Pengentalan

Filtrat pektin dipanaskan pada suhu $\pm 96^{\circ}\text{C}$ sambil diaduk sampai volumenya menjadi setengah volume semula. Hasil ini disebut filtrat pekat. Filtrat ini lalu didinginkan.

6) Pengendapan pektin

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.

7) Pencucian pektin masam

Pektin masam ditambahkan dengan dengan alkohol 96% kemudian diaduk (tiap 1 liter pektin asam ditambahkan dengan 1,5 alkohol 96%). Hasilnya lalu disaring 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.

8) Pengeringan

Pektin basa dijemur sampai kering selama kurang lebih delapan jam. Hasil ini disebut pektin kering.

9) Penggilingan

Pektin kering kemudian digiling sampai halus seperti tepung. Hasil yang diperoleh berupa tepung pektin yang siap digunakan.

4. Penentuan Dosis

Bahan yang diuji adalah larutan tepung pektin kulit pisang dengan dosis 0%, 5%, 15%, 10 %, 20% sebanyak 1 ml per hari. Penentuan dosis berdasarkan penelitian sebelumnya (Wellls, 1960) dan hasil konversi dari tikus ke mencit sebesar 0.14.

Pembuatan dosis untuk 5 % = 0,007 gram tepung pektin kulit pisang dalam 1 ml aquades. Jadi untuk membuat 1 mL larutan pektin diperlukan tepung pektin kulit pisang sebanyak 0,007 gram yang dilarutkan dalam aquades hingga mencapai 1 ml. Demikian juga dengan dosis 10%, 15%, dan 20% digunakan dengan cara yang sama. Hasil dari perhitungan adalah sebagai berikut:

Tabel 3.2: Penentuan dosis

No.	Kelompok Perlakuan	Dosis (%/g bb)	Jumlah Serbuk Tepung Pektin (gram)
1	Kontrol	0 %	0
2	I	5 %	0,007
3	II	10 %	0,014
4	III	15 %	0,021
5	IV	20 %	0,028

b) Tahap Perlakuan

1. Pemberian Pakan Berlemak

Pemberian pakan berlemak dilakukan selama seminggu, mencit diberi makan berlemak dengan komposisi pakan dan lemak sapi (1:4) dan minum setiap hari seperti biasa.

2. Pemberian Pektin Kulit Pisang

Perlakuan dilaksanakan selama seminggu, mencit diberi makan dan minum setiap hari seperti biasa. Pemberian dosis secara oral dengan menggunakan jarum *gavage*. Berikut tabel pemberian dosis pektin

Tabel 3.3. Pemberian Dosis Pektin

Nama Kelompok	Perlakuan	Jumlah Tikus
Kontrol	Diberi 1 ml aquades/hari	5
I	Larutan pektin 5% / 1 ml/ hari	5
II	Larutan pektin 10% / 1 ml/ hari	5
III	Larutan pektin 15%/1 ml/ hari	5
IV	Larutan pektin 20 %/1 ml/ hari	5

3. Pengambilan Sampel Darah

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

4. 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 $^{\circ}$ 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).

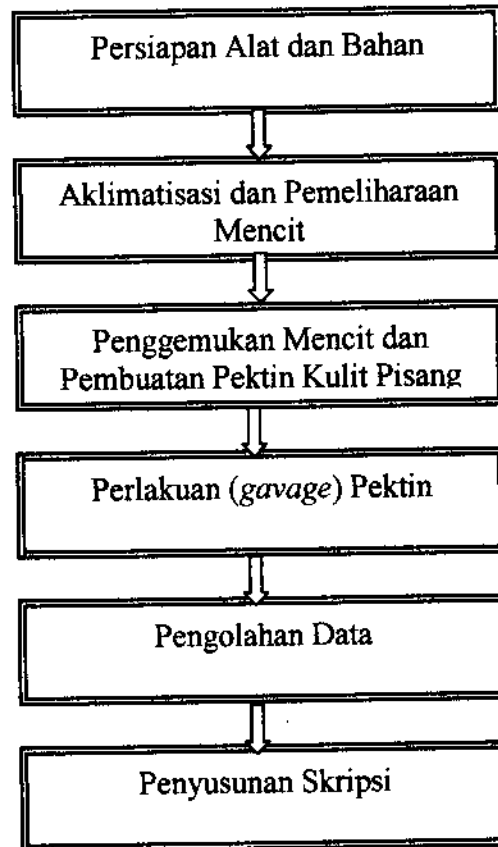
$C = \text{Konsentrasi Standar} \times \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta \text{ standar}}$

$\Delta \text{ standar}$

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistika menggunakan program SPSS 12. Sebelumnya dilakukan uji kenormalan dan homogenitas. Uji kenormalan dilakukan uji kolmogorov-Smirnov, uji homogenitas dengan uji leven's. Pengujian dilanjutkan dengan uji *Analysis 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



Gb. 4.1. Alur Penelitian