

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan ini adalah eksperimen karena dalam penelitian ini terdapat perlakuan terhadap objek yang diteliti dan kontrol sebagai pembanding.

B. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena percobaan yang dilakukan bersifat homogen seperti pada percobaan yang dilakukan dalam laboratorium (Nazir, 2003: 235-236). Mencit yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak dengan jenis kelamin betina. Sebanyak 20 ekor mencit diberikan perlakuan berupa pemberian pektin dari kulit pisang ambon dengan dosis 5%, 10%, 15% dan 20%, sedangkan lima ekor lainnya sebagai kontrol. Pemberian pektin kulit pisang ambon kepada hewan uji (mencit) dilakukan dengan cara oral atau *gavage* selama tujuh hari.

Masing-masing kelompok tersebut dilakukan replikasi sebanyak lima ekor mencit didapatkan berdasarkan Gomez (1995) adalah sebagai berikut:

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

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

$$r \geq 5$$

Keterangan :

T : Jumlah perlakuan

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

Tabel 3.2. Penempatan Perlakuan pada Setiap Kandang

Kandang	Nomor 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

Selama pemeliharaan mencit yang dikelompokkan sebagai kelompok perlakuan diberikan pakan yang mengandung lemak tinggi, sedangkan untuk mencit kelompok kontrol juga diberikan pakan berlemak. Hal tersebut dilakukan selama tujuh hari.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus* L.) betina galur Swiss Webster, sedangkan yang akan dijadikan sampel adalah organ hati pada mencit tersebut.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai bulan Juli 2008 di Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Struktur Hewan, Laboratorium Struktur Tumbuhan dan Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi, FPIMPA, UPI.

E. Prosedur Kerja

1. Pembuatan Ekstrak Pektin

Cara pembuatan pektin dari kulit pisang ambon (*Musa spp.*) menurut Esti dan Kemal (2001) yang telah dimodifikasi sebagai berikut: pertama-tama melakukan tahap pencucian yang dilakukan dengan cara mencuci (dibilas) kulit-kulit pisang ambon menggunakan air biasa yang bertujuan untuk membersihkan kulit pisang ambon dari kotoran. Selanjutnya tahap pengambilan yang dilakukan dengan cara mengambil bagian putih (paling dalam) dari kulit pisang ambon dengan cara dikerok menggunakan sendok kemudian bagian yang telah dikerok tersebut disimpan di atas baki atau nampan stainless. Kemudian tahap pengeringan yang dilakukan dengan cara bagian putih dari kulit pisang ambon yang telah dikerok tadi lalu dikeringkan (dijemur) selama tiga sampai empat hari di bawah terik matahari sampai kulit pisang ambon menjadi benar-benar kering.

Proses berikutnya, yakni tahap penggilingan yang dilakukan dengan cara bagian putih dari kulit pisang ambon yang telah dikeringkan selanjutnya digiling menggunakan blender hingga halus menjadi tepung. Hasil penggilingan kulit pisang ambon ini bisa disebut tepung kulit pisang. Kemudian tahap pembuburan yang dilakukan dengan cara tepung kulit pisang tersebut selanjutnya ditambahkan air sebanyak dua kali berat tepung kulit pisang, lalu diblender kembali hingga tercampur secara merata menjadi bubur kulit pisang. Selanjutnya tahap ekstraksi yang dilakukan dengan cara bubur kulit pisang tadi kemudian ditambahkan lagi dengan air sebanyak 15 kali berat tepung kulit pisang kemudian diaduk-aduk hingga merata. Bubur kulit pisang yang telah diencerkan tersebut kemudian ditambahkan HCl 1% agar pH-nya menjadi turun sekitar 1,5. Hasil setelah pemberian HCl disebut dengan bubur asam. Bubur asam selanjutnya dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* pada suhu $\pm 75^{\circ}\text{C}$ sambil diaduk-aduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama ± 80 menit. Setelah itu, bubur asam kemudian disaring menggunakan kain saring yang rapat untuk memisahkan filtratnya dan hasil akhirnya disebut dengan filtrat pektin. Berikutnya tahap pengentalan yang dilakukan dengan cara filtrat pektin tersebut dipanaskan pada suhu $\pm 96^{\circ}\text{C}$ sambil diaduk-aduk sampai volumenya menjadi setengah dari volume semula sebelumnya. Pada tahap ini hasilnya dapat disebut dengan filtrat pekat.

Selanjutnya tahap pengendapan pektin yang dilakukan dengan cara melarutkan etanol 96% dengan menggunakan 2 ml HCl pekat (larutan ini disebut sebagai alkohol asam) sesuai yang dibutuhkan. Filtrat pekat yang sudah dingin

kemudian ditambahkan dengan alkohol asam (untuk setiap 1 liter filtrat pekat ditambah dengan 1,5 liter alkohol asam), lalu didiamkan selama 12 jam hingga terjadi endapan. Endapan pektin tersebut kemudian dipisahkan dari filtratnya dengan menggunakan kain saring yang rapat dan hasil ini disebut sebagai pektin masam. Berikutnya pencucian pektin masam yang dilakukan dengan cara pektin masam tersebut ditambahkan dengan alkohol 96% kemudian diaduk-aduk (untuk tiap 1 liter pektin asam ditambahkan dengan 1,5 alkohol 96%) dan setelah itu 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 fenolptalaein). Hasil pada tahap ini disebut pektin basa. Proses berikutnya, yakni tahap pengeringan yang dilakukan dengan cara pektin basa dijemur selama \pm delapan jam hingga keadaannya kering. Hasil ini disebut pektin kering. Terakhir tahap penggilingan yang dilakukan dengan cara pektin kering tersebut kemudian digiling sampai halus menjadi tepung dengan menggunakan blender. Pada tahap ini hasil yang diperoleh berupa tepung pektin yang siap digunakan.

2. Pembuatan Pakan Berlemak

Pembuatan pakan berlemak dilakukan dengan cara mencampurkan 250 gram lemak daging sapi dengan air. Selanjutnya campuran tersebut dipanaskan dan ditambahkan bahan dasar pakan yang berasal dari PT. Charoen Pokhpanid Indonesia (no.cp551) hingga mencapai berat 1 kg. Bahan yang masuk diaduk sampai homogen, setelah itu dibentuk butiran-butiran pelet dan dikeringkan di

dalam oven. Pakan yang sudah kering dapat diberikan pada mencit (Soesilawaty dan Hernawati, 2007: 10).

3. Pemeliharaan Hewan Uji

Pada tahap ini terlebih dahulu dilakukan proses aklimatisasi dengan tujuan agar mencit (*Mus musculus* L.) betina galur Swiss Webster yang akan diuji dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang akan ditempati selama penelitian berlangsung. Proses aklimatisasi dilakukan selama tujuh hari. Mencit dipelihara dalam kandang yang terbuat dari plastik dengan ukuran 30 cm x 20 cm x 12 cm (Gambar 3.1.) yang telah dialasi menggunakan sekam dengan kepadatan lima ekor per kandang. Selanjutnya, selama tujuh hari mencit yang akan diberikan perlakuan terlebih dahulu diberikan pakan yang mengandung lemak tinggi dengan tujuan agar mencit mengalami *hiperkolesterolemia*.



Gambar 3.1. Kandang Mencit
(Sumber: Dokumentasi Penelitian 4, 2008)

4. Pembuatan Dosis

Dalam penelitian ini, bahan yang akan diuji adalah larutan tepung pektin kulit pisang ambon dengan pemberian dosis 5%, 10%, 15% dan 20% per 25 gram bb/1 ml/1 hari. Berdasarkan penelitian Wells dan Benjamin (1960), pemberian dosis pektin untuk 5% adalah 5 gram pektin dalam 100 ml akuades. Angka konversi dari tikus ke mencit menurut Kusmiyati (2003) adalah 0,14, sehingga pembuatan dosis untuk hewan uji mencit dalam penelitian yang dilakukan sebagai berikut, misalnya pemberian dosis 5% dapat dihitung adalah $0,14 \times 5 = 0,7$ gram/100 ml. Jumlah volume yang dibutuhkan dalam pemberian dosis pada hewan uji adalah 1 ml, maka jumlah gram untuk dosis 5% adalah 0,007 gram pektin dilarutkan dalam 1 ml akuades. Demikian pula untuk dosis 10%, 15% dan 20% menggunakan cara yang sama.

Hasil perhitungan jumlah tepung pektin kulit pisang ambon (gram) dapat dilihat pada tabel 3.3. di bawah ini.

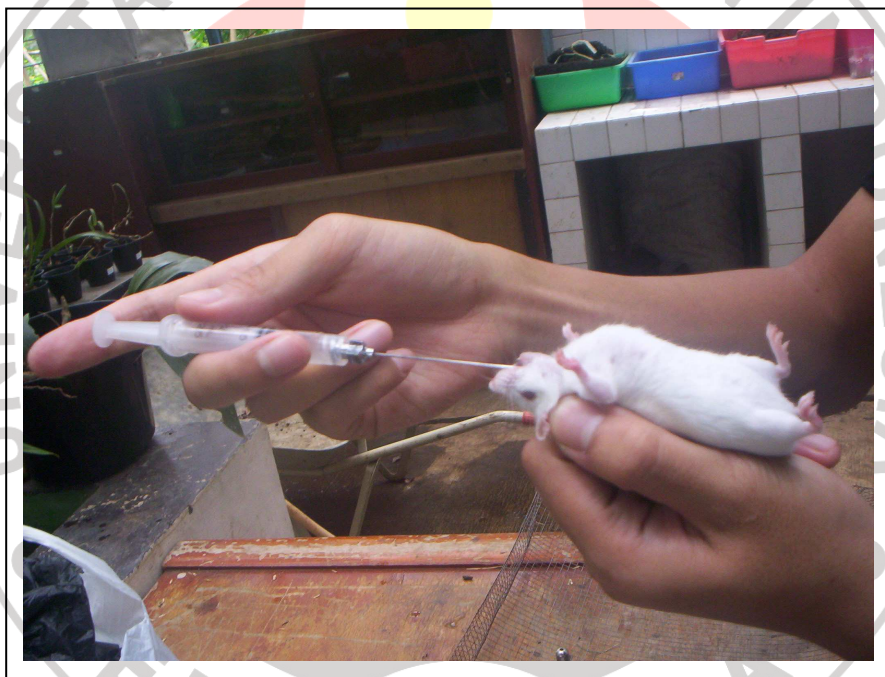
Tabel 3.3. Penentuan Dosis

No.	Dosis (%/ gram bb)	Jumlah Tepung Pektin Kulit Pisang Ambon (gram/1 ml/hari)
1.	5	0,007
2.	10	0,014
3.	15	0,021
4.	20	0,028

Hasil perhitungan setelah dikonversi.

4. Tahap Pelaksanaan Perlakuan

Setelah melalui masa pemeliharaan selama tujuh hari. Selanjutnya dalam tahapan pelaksanaan perlakuan ini mencit yang digolongkan ke dalam kelompok perlakuan diberikan pektin dengan dosis yang telah ditentukan (5%, 10%, 15% dan 20%) dengan cara *gavage* (Gambar 3.2.) dan dosis yang diberikan masing-masing sebanyak 1 ml selama tujuh hari. Selama tahap penelitian, seluruh kelompok mencit diberikan pakan biasa (normal).



Gambar 3.2. Pemberian Pektin Secara Oral dengan Menggunakan *Gavage*
(Sumber: Dokumentasi Penelitian 5, 2008)

5. 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

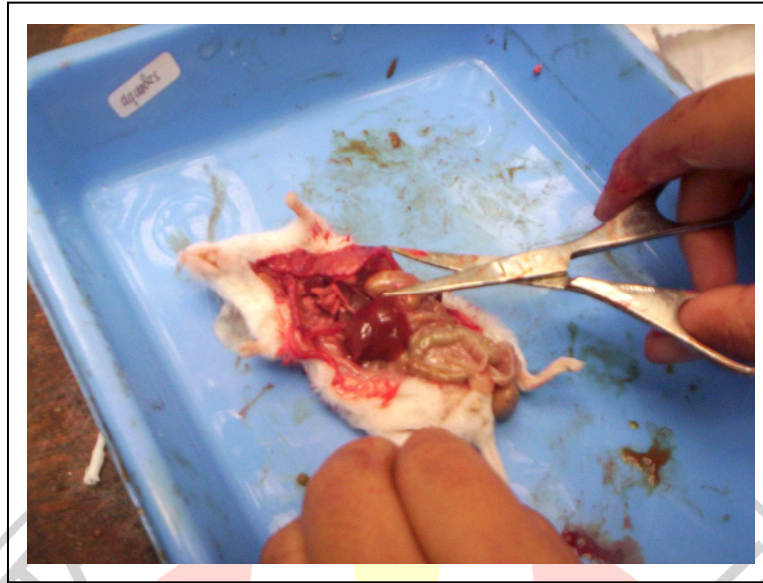
kemudian ditambahkan 1000 μL reagen lalu dihomogenisasi dengan vortex. Serum dipisahkan dari darah dengan mensentrifuganya selama 20 menit kecepatan 1500 rpm.

Sampel dan standar diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20-25°C, kemudian dimasukkan kedalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 493 nm. Hasilnya pada spektrofotometer dalam bentuk *absorbance*. Sampel dan standar diukur absorbannya terhadap blanko (reagen) murni yang nantinya didapat ΔA . Pengujian dilakukan dua kali (duplo).

$$C = \text{Konsentrasi standar} \times \frac{(\Delta A \text{ sampel})}{\Delta s \text{ standar}} [\text{mg} / \text{dl}]$$

6. Tahap Pengambilan Organ

Setelah melewati masa perlakuan (*treatment*) dengan cara pemberian asupan pektin kulit pisang ambon selama tujuh hari. Selanjutnya, dilakukan tahap pengambilan organ dengan cara pembedahan hewan uji (Gambar 3.3.). Mencit yang telah dibedah kemudian mengambil bagian-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-organ yang akan diuji tidak rusak. Kemudian organ-organ tersebut ditimbang, lalu disimpan ke dalam tabung yang telah diisi larutan formalin 5% (Gambar 3.4.).



Gambar 3.3. Proses Pembedahan untuk Pengambilan Sampel Organ
(Sumber: Dokumentasi Penelitian 6, 2008)



Gambar 3.4. Organ Hati yang Disimpan Dalam Tabung Berisi Formalin 5%
(Sumber: Dokumentasi Penelitian 7, 2008)

7. Tahap Pembuatan Preparat

Pada tahap pembuatan preparat dilakukan dengan menggunakan dua metode yakni metode beku (*freezing microtome*) dan metode parafin. Metode beku adalah salah satu 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 menyempatkan gas N₂ (Nitrogen cair) pada jaringan tersebut (Suntoro, 1983: 42). Metode ini lebih baik daripada menggunakan metode parafin dikarenakan dengan menggunakan metode beku jaringan hanya mengalami sedikit pengkerutan dan hampir setiap metode perwarnaan dapat dikerjakan bila menggunakan metode beku (Suntoro, 1983: 42). Tetapi kelemahan dari menggunakan metode beku menurut Suntoro (1983: 42) bahwa hampir tidak mungkin untuk dapat melihat elemen-elemen struktural dalam kedudukan yang asli, sangat sukar untuk dapat memperoleh irisan yang seri dan irisan yang tipis juga sulit diperoleh.

Metode yang selanjutnya digunakan adalah metode parafin. Walaupun menurut Suntoro (1983: 42) metode ini kurang begitu baik dalam pembuatan preparat jaringan organ hewan. Namun, metode tersebut masih dapat digunakan dalam pembuatan preparat jaringan organ hewan (Soetjipto, 1968: 8). Alasan lain menggunakan metode parafin adalah sebagai pembanding untuk melihat keadaan gambaran histologi organ yang diteliti. Pembuatan preparat organ hewan dengan menggunakan metode ini dilakukan dalam beberapa tahap, yakni: *narcose*, *sectio*, *labelling*, *fixasi*, *washing*, dehidrasi, *clearing*, *impregnasi*, *embedding*, *affixing* dan *staining* (Soetjipta, 1968: 8-17).

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

diwarnai terlebih dahulu dicelupkan dalam reagen A (hidrogen peroksida 3%) selama tiga menit, kemudian dicuci dengan akuades dan setelah itu diletakkan di atas kaca objek hingga agak mengering. Selanjutnya, irisan tersebut ditetesi dengan reagen B (asam asetat glasial), kemudian ditutup dengan kaca objek dan diamati. Hasil pewarnaan dengan menggunakan metode *Schultz-Smith* ini ialah kolesterol dan ester-esternya akan berwarna hijau untuk beberapa saat, kemudian berwarna coklat setelah 30 menit (Suntoro, 1983: 179).

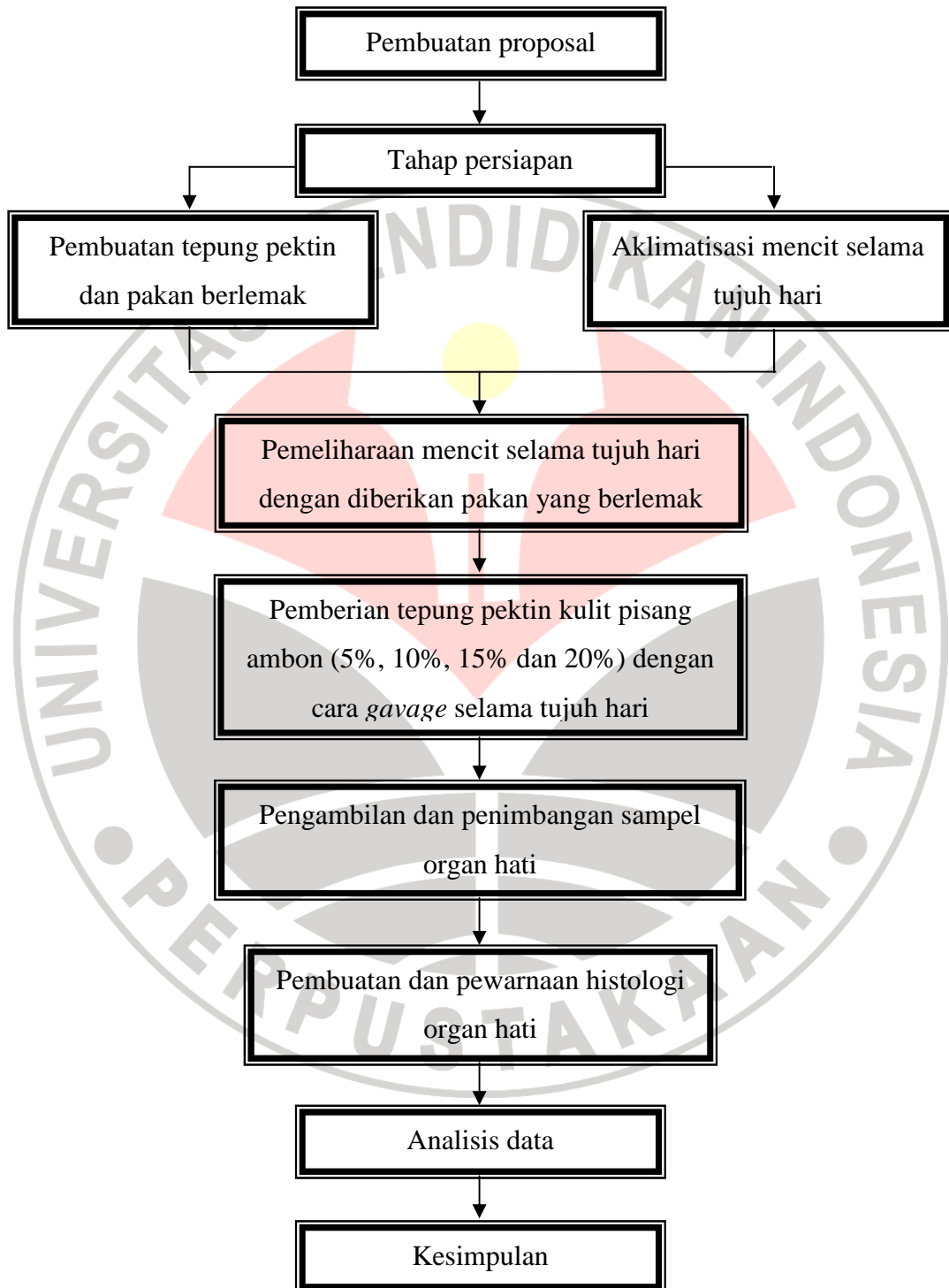
Sedangkan untuk proses pewarnaan dengan metode *Haematoxylin Ehrlich-Eosin* atau biasa dikenal dengan sebutan metode HE dilakukan dengan beberapa tahapan, seperti: (1) dilakukan deparafinisasi dengan *xylol* selama 30 menit; (2) tahapan hidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat (96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%) selama ± 10 detik; (3) setelah itu dicuci dengan akuades; (4) dicelupkan ke dalam larutan *Haematoxylin Ehrlich-Eosin*; (5) kemudian dicuci kembali dengan air kran selama 10 menit; (6) dicelupkan ke dalam akuades; (7) diferensiasi dengan cara preparat dicelupkan ke dalam larutan alkohol asam 1% selama tiga detik; (8) dicuci kembali dengan air kran selama lima menit; (9) dicelupkan kembali ke dalam akuades; (10) dicelupkan ke dalam alkohol bertingkat (30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %) selama ± 10 detik; (11) dicelupkan ke dalam larutan *Eosin* 1% selama tiga menit; (12) dicuci kembali dengan air kran; (13) dibilas dengan akuades; (14) dicelupkan ke dalam alkohol bertingkat kembali (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) selama ± 10 detik ; (15) difilter dengan menggunakan kertas saring isap; (16) di-*mounting* dengan menggunakan entelan. Hasil dari pewarnaan metode HE ini adalah biru

kehitaman adalah inti (sel hepatika) dan sitoplasma berwarna agak kemerah-merahan (Disbrey *et al.* 1970).

8. Teknik Pengolahan Data

Data dalam penelitian ini dianalisis secara kualitatif. Analisis secara kualitatif dilakukan dengan cara melihat, membandingkan dan mendeskriptifkan gambaran histologis organ hati dari setiap dosis dengan kontrol.



F. Alur Penelitian

Gambar 3.5. Diagram Alur Penelitian