

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian dasar dengan metode eksperimental karena adanya manipulasi terhadap objek penelitian dan adanya kontrol (Nazir, 2003 : 63).

B. Desain Penelitian

Desain eksperimen pada 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). Secara acak mencit-mencit dikelompokkan pada setiap kelompok kontrol dan perlakuan. Adapun replikasi sebanyak lima kali untuk masing-masing perlakuan. Banyaknya pengulangan (replikasi) diperoleh dari Gomez & Gomez (1983) 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 diperoleh

penempatan mencit pada kelompok perlakuan dalam 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	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

Keterangan :

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

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan adalah semua berat badan dan kadar kolesterol darah mencit (*Mus musculus L.*) Swiss Webster betina. Sampel yang diambil adalah berat badan dan kadar kolesterol darah 25 ekor mencit (*Mus musculus L.*) Swiss Webster betina.

D. Lokasi Penelitian

1. Pembuatan tepung pektin dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan dan Laboratorium Fisiologi Jurusan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).
2. Mencit dipelihara dan diberi perlakuan di *green house* kebun Botani Jurusan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).
3. Pengukuran kadar kolesterol darah dilakukan di laboratorium Fisiologi FKH Institut Pertanian Bogor (IPB).

E. Metode Kerja

1. Pembuatan Pektin

Bahan yang digunakan untuk pembuatan pektin adalah kulit jeruk bali bagian yang berwarna putih (albedo). Cara pembuatan pektin yang digunakan menggunakan metode dari Esti dan Kemal (2001). Prosedurnya cukup memakan waktu, dimulai dengan tahap pemerasan kulit sampai dengan penggilingan tepung pektin.

Kulit jeruk bali (*Citrus grandis*) bagian putihnya dikelupas, kemudian dicuci bersih dan ditiriskan. Kulit tersebut diperas sampai kadar airnya berkurang dan dikeringkan dibawah terik matahari selama 3-4 hari, sampai kulit jeruk benar-benar kering. Kulit yang telah kering kemudian digiling dan disebut dengan tepung kulit. Tepung ini kemudian ditambah dengan air sebanyak dua kali berat tepung kulit, kemudian diblender menjadi "bubur kulit" jeruk.

Bubur kulit ini siap untuk diekstraksi dengan cara ditambah lagi dengan air sebanyak 15 kali berat tepung kulit jeruk 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.

2. Pembuatan Pakan Berlemak

Pembuatan pakan berlemak dilakukan dengan mencampur lemak daging sapi dan pakan standar. Pakan standar laboratorium (Lampiran 1.2) berasal dari PT. Charoen Pokhpand Indonesia (anak babi no.cp551).

3. Aklimatisasi Mencit

Mencit diperoleh dari rumah kaca (*green house*) Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Dalam penelitian ini digunakan hewan uji mencit putih dengan galur, umur, jenis kelamin, dan kondisi lingkungan yang relatif sama untuk menghindari perbedaan aktivitas biologi. Mencit yang digunakan berusia delapan minggu.

Pemilihan jenis kelamin betina untuk hewan uji dilakukan karena adanya suatu kondisi bahwa hormon estrogen yang tinggi pada mencit betina berpengaruh terhadap tingginya kadar kolesterol darah. Dilain pihak, dari hasil suatu penelitian menunjukkan bahwa pemberian lemak dan kolesterol yang berlebihan pada mencit jantan dapat mempengaruhi keagresifan (Clarke *et al.* 1996).

Pemeliharaan hewan uji dilakukan di rumah kaca (*green house*) Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Sebelum diberi perlakuan, mencit-mencit diaklimatisasi pada suhu ruangan rata-rata 23°C-26°C selama satu minggu. Tahap ini bertujuan agar hewan uji beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang akan ditempati selama pelaksanaan penelitian.

Mencit dikelompokkan dalam kandang berukuran 30 cm x 20 cm x 12 cm berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan lima ekor untuk setiap kandang. Selama aklimatisasi, setiap mencit tersebut diberi pakan standar dan air

minum. Makanan yang diberikan sebanyak masing-masing 25 gram untuk setiap kandangnya. Botol minuman dibersihkan dan diganti airnya atau diisi ulang dengan air apabila air sudah habis. Aklimatisasi bertujuan untuk mengontrol faktor-faktor lingkungan dalam laboratorium.

4. Tahap Perlakuan

Perlakuan pertama mencit diberi pakan berlemak selama satu minggu. Kemudian mencit diberi larutan pektin secara oral dengan menggunakan jarum gavage selama satu minggu juga. Penimbangan dilakukan setiap dua hari sekali dari mulai tahap awal penelitian sampai hari terakhir perlakuan. Penimbangan dilakukan dengan menggunakan neraca Ohaus.

Data berat badan mencit (*Mus musculus* L. Swiss Webster) yang diambil mulai tahap awal sampai aklimatisasi merupakan data tambahan. Sedangkan data yang akan diolah adalah data rata-rata berat badan setiap ekornya mulai hari pertama perlakuan sampai selesai. Pada hari kedelapan perlakuan, mencit dipuasakan terlebih dahulu.

Pada hari kesembilan, dilakukan pengambilan sampel darah mencit dari bagian jantung dan abdominal aorta, sebelumnya mencit dibedah terlebih dahulu. Tahap akhir adalah pengukuran kadar kolesterol 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 mensentrifuganya 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 absorbannya terhadap blanko (reagen) murni yang nantinya didapat ΔA .

$$C = \text{konsentrasi standar} \times (\Delta A \text{ sampel} : \Delta \text{ standar})$$

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistika menggunakan program SPSS 12. Langkah awal dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov, sedangkan uji homogenitas dengan uji Leven's. Pengujian dilanjutkan dengan uji Analisis Variance (ANOVA) sehingga dapat diketahui perbedaan rata-rata dari masing-masing perlakuan dan uji Duncan untuk mengetahui dosis yang optimal. Selanjutnya dilakukan uji regresi untuk mengetahui linearitas dari data berat badan dan kadar kolesterol darah. Tahap akhir dilakukan uji korelasi moment product Pearson's, untuk mengetahui korelasi antara kedua data tersebut setelah pemberian pektin (Nazir, 2003 : 522).