

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Metode Penelitian

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

#### B. Desain Penelitian

Desain eksperimen penelitian 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-mencit dikelompokkan pada setiap kelompok kontrol dan perlakuan. Replikasi dilakukan sebanyak lima kali untuk masing-masing perlakuan. Banyaknya pengulangan yang dilakukan diperoleh dari Gomez (1995) yaitu :

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

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

$$r \geq 5$$

keterangan : T = jumlah perlakuan = 5

n = 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) :

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 %

Larutan tepung pektin kulit jeruk bali yang digunakan adalah dosis 0%, 5%, 10%, 15%, 20% per 30 gram bb/1ml/hari. Penentuan dosis berdasarkan penelitian sebelumnya (Wells *et al.* 1960 : 88-89) dan hasil konversi tikus ke mencit sebesar 0,14. Misalnya pemberian dosis 5 % dibuat dengan cara melarutkan tepung pektin kulit jeruk bali sebanyak 0,007 gram kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 1 ml. Demikian pula untuk dosis 10 %, 15% dan 20 % menggunakan cara yang sama.

Tabel 3.2 Penentuan Dosis

No.	Dosis (%/g bb)	Jumlah serbuk tepung pektin jeruk bali (gram)
1	0 %	0
2	5 %	0,007
3	10 %	0,014
4	15 %	0,021
5	20 %	0,028

### C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan adalah semua kadar kolesterol total darah mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster betina berumur delapan minggu. Sampel yang diambil adalah kadar kolesterol total darah 25 ekor mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster betina berumur delapan minggu.

### D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Juli 2008. Berikut ini adalah tempat berlangsungnya penelitian :

- Pembuatan tepung pektin dilakukan laboratorium struktur hewan dan fisiologi jurusan Biologi FPMIPA UPI.
- Pemeliharaan mencit dilakukan di *green house* Kebun Botani FPMIPA UPI.
- Pengukuran kadar kolesterol darah dilakukan di laboratorium fisiologi hewan FKH IPB.

## **E. Prosedur Penelitian**

### **1. Tahap Persiapan**

#### **a. Pembuatan Pakan**

Proses pembuatan pakan berlemak terlebih dahulu menyiapkan 250 gram lemak daging sapi dipanaskan dengan dicampur air kemudian dicampurkan dengan bahan dasar pakan standar laboratorium (Komposisi lampiran 1.3) berasal dari PT. Charoen Pokhpand Indonesia (anak babi no.cp551) sebanyak 1 kg lalu ditambah air sampai homogen sehingga adonan dapat dibentuk pelet. Setelah itu, dikeringkan menggunakan oven.

#### **b. Ekstraksi Pektin dari Kulit Jeruk Bali**

Ekstraksi pektin kulit jeruk bali dilakukan berdasarkan ekstraksi yang dilakukan oleh Esti *et al.* (2001 : 1-4). Tahap pertama untuk mengekstraksi pektin dari kulit jeruk bali adalah 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. Selanjutnya dilakukan pengeringan kulit jeruk bali yang telah diperas 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 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.

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara menambah air sebanyak 15 kali berat tepung pada bubur kulit jeruk bali kemudian diaduk hingga 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 selama 80 menit. Bubur kemudian disaring menggunakan kain saring rapat untuk memisahkan filtratnya. Hasil akhirnya disebut filtrat pektin.

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. Tahap berikutnya adalah pengendapan pektin dilakukan dengan cara menyiapkan 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). Hal ini dilakukan berdasarkan pada penelitian Purbianti (2005) yang melaporkan pengendapan pektin dengan alkohol 96% menghasilkan kemurnian pektin yang lebih banyak.

Tahap selanjutnya ialah pencucian pektin masam, pektin masam lalu ditambahkan dengan dengan alkohol 96 % kemudian diaduk (tiap 1 liter pektin masam

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). Hasilnya disebut pektin basa.

Tahap terakhir adalah tahap pengeringan, 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.

#### c. Aklimatisasi Mencit

Mencit diperoleh dari *green house* Kebun 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 delapan minggu dilakukan karena adanya suatu kondisi bahwa penurunan estrogen dapat menyebabkan naiknya kadar total lipid, kolesterol LDL serta penurunan kadar HDL (Mu'minah, 2007 : 1) dan adanya penelitian lain yang melaporkan bahwa pemberian lemak dan kolesterol yang berlebihan pada mencit jantan dapat mempengaruhi keagresifan (Clarke *et al.* 1996 : 1653) 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, periode ini dilaksanakan selama seminggu 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, setiap kandang diberi pakan standar  $\pm 25$  gram setiap hari berlemak dan air minum secara *ad libitum*. 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, dalam waktu seminggu mencit diberi makan pakan berlemak  $\pm 25$  gram setiap hari/kandang agar mencit mengalami hiperkolesterolemia dan air minum secara *ad libitum*. Pemberian pektin secara oral dengan menggunakan jarum gavage dilakukan pada minggu berikutnya. Prinsip kerja jarum gavage adalah larutan yang dimasukkan ke dalam mulut mencit secara perlahan-lahan kemudian diluncurkan melalui langit-langit ke belakang sampai esofagus sehingga larutan berakhir di lambung.

Kelompok pertama sebagai kontrol (0%) diberi 1 ml aquades/hari/ 30 gram bb. Kelompok perlakuan diiiberi larutan pektin 5%, 10%, 15%, 20% /1 ml/ hari / 30 gram bb. Selama perlakuan mencit tetap diberi pakan berlemak. Setelah seminggu

diberi perlakuan, pada hari ke-tujuh mencit dipuasakan. Pada hari terakhir pengamatan mencit ditimbang berat badannya. Kemudian sampel darah diambil dari abdominal aorta (Terpstra *et al*, 1998 : 1946; Garcia-Diez *et al*, 1995 : 1767) dan jantung (Hassel, 1996 : 1149). Selanjutnya mencit dibedah untuk mengambil organ hati dan sekum kemudian ditimbang.

### 3. 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  $\mu$ L dipipet ke dalam kuvet kemudian ditambahkan 1000  $\mu$ L 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<sup>o</sup> kemudian dimasukkan kedalam 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  $\Delta A$ . Pengujian dilakukan dua kali (duplo). Berikut ini adalah rumus pengukuran kadar kolesterol darah :

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

$\Delta$  standar

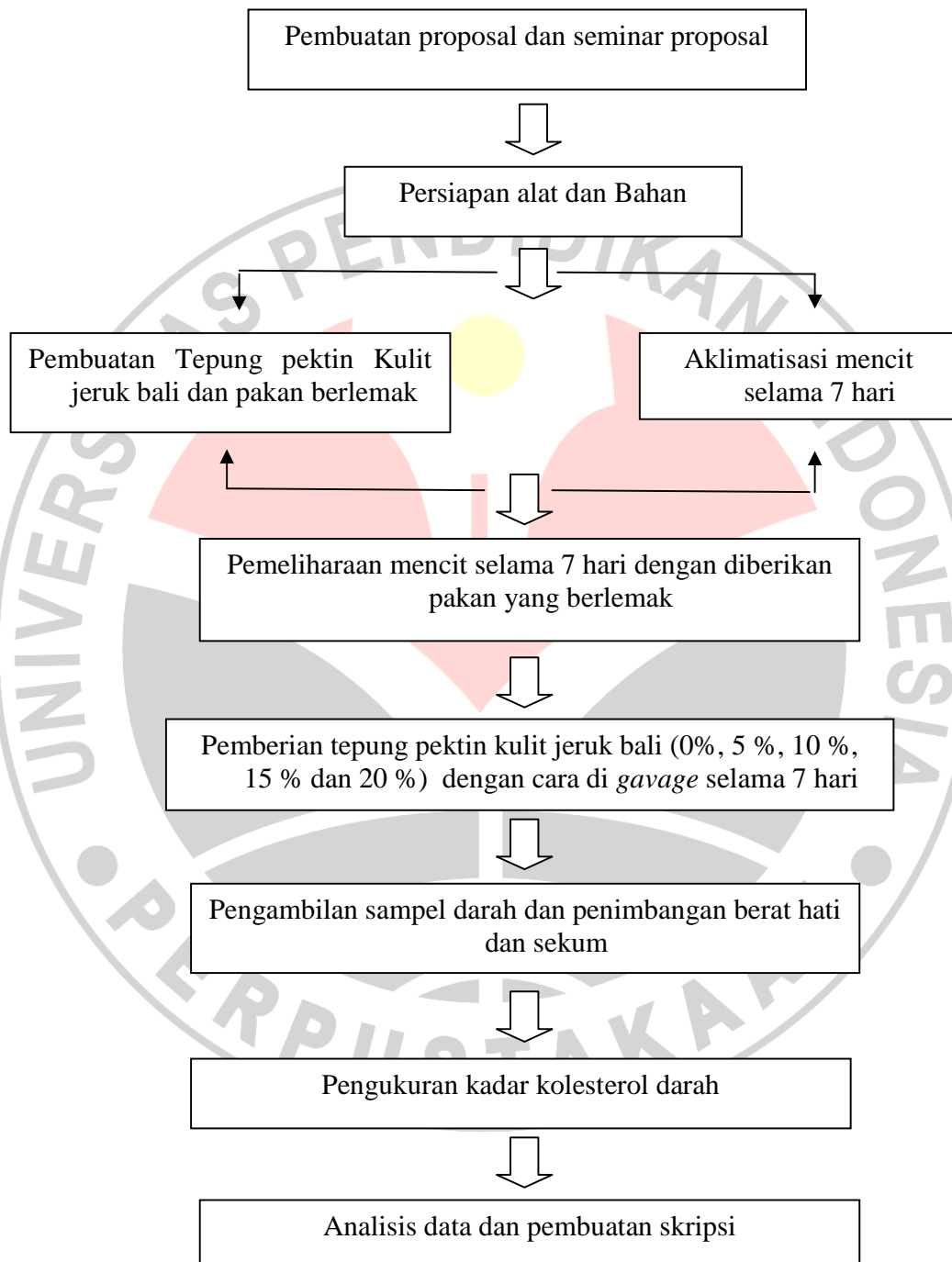


## F. Analisis Data

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 *One way* ANOVA sehingga dapat diketahui perbedaan rata-rata kadar kolesterol dari masing-masing perlakuan yaitu pengaruh pektin terhadap kadar kolesterol darah, berat hati dan sekum (Nazir, 2003 : 420). Untuk pengamatan lebih lanjut mengenai perbedaan rata-rata kadar kolesterol, berat hati dan berat sekum yang signifikan diantara perlakuan maka analisis dilanjutkan dengan uji Duncan. Selanjutnya dilakukan uji regresi untuk mengetahui hubungan kadar kolesterol darah terhadap berat organ hati serta kadar kolesterol darah terhadap berat sekum. Untuk mengetahui pola korelasinya (Kekuatan hubungan diantara dua variabel) maka dilakukan uji korelasi kadar kolesterol darah terhadap berat hati serta kadar kolesterol darah terhadap berat sekum dengan menggunakan uji korelasi *product momen* Pearson (Nugroho, 2005 : 35).

Nilai R square untuk uji regresi dikatakan baik jika di atas 0,5 karena nilai R square berkisar antar 0 sampai 1. Koefisien determinasi (R Square) ini bertujuan untuk mengetahui seberapa besar kemampuan variabel independen menjelaskan variabel dependen. Keeratan korelasi dapat dikelompokkan sebagai berikut : 0,00-0,20 keratan sangat lemah, 0,21-0,40 keeratan lemah, 0,41-1,70 keeratan kuat, 0,71-0,90 keeratan sangat kuat, 0,91-0,99 keeratan sangat kuat sekali, dan 1 berarti korelasi sempurna (Nugroho, 2005 : 36).

### G. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian