

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: 63).

B. Desain Eksperimen

Desain penelitian yang digunakan adalah 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. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari rumus berikut (Gomez, 1995: 242).

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

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

$$r \geq 5$$

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 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 %

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan adalah seluruh berat badan dan kadar kolesterol darah mencit (*Mus musculus. L*) Swiss Webster betina dara berumur delapan minggu. Sampel yang digunakan adalah kadar kolesterol dan berat badan 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 Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

E. Prosedur Kerja

1. Tahap Persiapan

a. Pembuatan Ekstrak Pektin Kulit Pisang

Bahan yang digunakan untuk pembuatan pektin adalah kulit pisang bagian *mesokarp*. Cara pembuatan pektin yang digunakan menggunakan metode dari Esti dan Kemal (2001: 1-4). Tahap pembuatan pektin kulit pisang meliputi tahap pengeringan, penggilingan, pembuburan, ekstraksi, pengentalan, pengendapan pektin, pencucian pektin masak, pengeringan, dan penggilingan.

Kulit pisang (*Musa paradisiaca*) bagian *mesokarpnya* dikerok, kemudian dikeringkan dibawah terik matahari selama 3-4 hari, sampai kulit pisang benar-benar kering. Kulit pisang yang telah kering kemudian digiling dan disebut dengan tepung kulit pisang. Tepung ini kemudian ditambah dengan air sebanyak dua kali berat tepung kulit pisang, kemudian diblender menjadi "bubur kulit" pisang.

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

b. Pembuatan Pakan Berlemak

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

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) dan adanya suatu penelitian 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. Mencit-mencit diaklimatisasi pada suhu ruangan rata-rata 23°C-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.

Selama aklimatisasi, mencit diberi pakan berupa butiran yang diproduksi oleh P.T Charoen Popkhan Indonesia dan air PDAM sebagai air minumnya. Pakan mencit ditempatkan pada masing-masing kandang sebanyak 25 gram setiap hari dan botol minuman dibersihkan tiap tiga hari sekali serta diganti airnya atau diisi ulang apabila air sudah habis. Aklimatisasi biasanya digunakan untuk menghadapi faktor-faktor yang terjadi dalam lingkungan lebih terkontrol di laboratorium.

2. Tahap Perlakuan

Mencit diberi pakan berlemak selama satu minggu sebelum perlakuan pektin dengan tujuan untuk menaikkan berat badan dan kadar kolesterol mencit. Pakan berlemak ditempatkan pada masing-masing kandang sebanyak 25 gram setiap hari. Dengan demikian berat badan dan kadar kolesterol darah mencit akan meningkat.

Selama perlakuan, mencit tetap diberi pakan berlemak. berikut adalah Tabel pemberian dosis pektin:

Tabel 3.2 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

Pemberian pektin kulit pisang dilaksanakan selama satu minggu. Mencit diberi larutan pektin secara oral dengan menggunakan jarum *gavage*. Penimbangan dilakukan setiap dua hari sekali dari awal penelitian sampai hari terakhir perlakuan dengan menggunakan neraca *Ohaus*. Pada saat penimbangan, mencit ditempatkan dalam plastik untuk memudahkan membaca skala pada timbangan.

Data berat badan mencit yang diambil mulai tahap awal sampai perlakuan merupakan data tambahan. Sedangkan data yang akan diolah untuk diketahui korelasinya dengan kadar kolesterol adalah data badan setiap ekornya pada saat pengambilan sampel darah.

Setelah satu minggu mencit diberi perlakuan pektin, selanjutnya mencit dipuaskan terlebih dahulu. Pada hari berikutnya mencit dibunuh lalu dilakukan pengambilan sampel darah mencit dari abdominal aorta (Terpstra *et al*, 1998: 87; Garcia-Diez *et al*, 1995: 1776) dan jantung (Hassel, 1996: 1149).

3. Pengukuran Kadar Kolesterol Total Darah

Kadar kolesterol darah mencit diukur 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 cara sentrifugasi 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 absorbansinya terhadap blanko (*reagen*) murni yang nantinya didapat ΔA . Pengujian dilakukan dua kali (duplo).

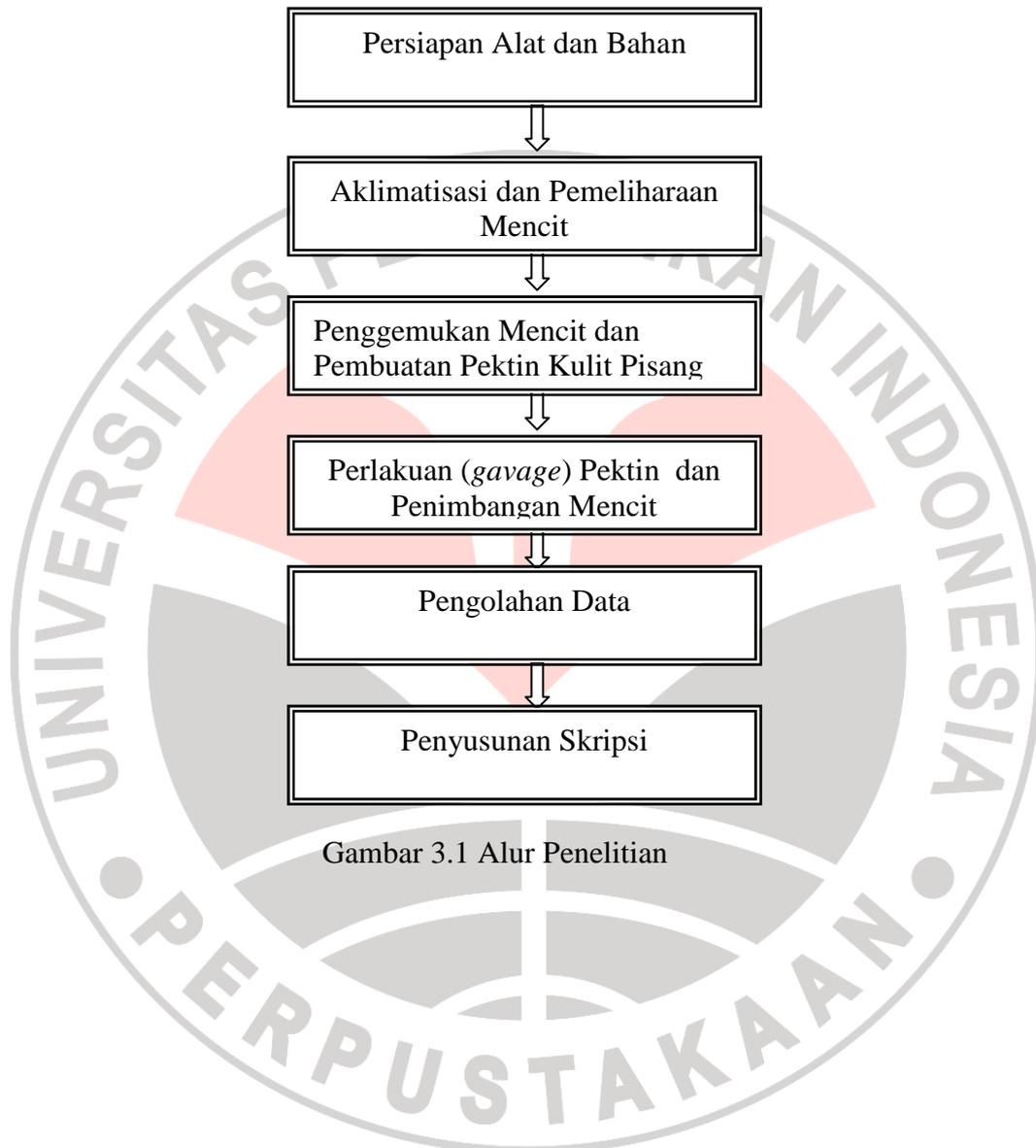
$$C = \text{konsentrasi standar} \times \frac{(\Delta A \text{ sampel})}{\Delta \text{ standar}}$$

F. Analisis Data

Data berat badan dan kadar kolesterol mencit yang diperoleh dianalisis secara statistika menggunakan program SPSS 12. Sebelumnya dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov*, uji homogenitas dengan uji *Leven's*. Data yang diperoleh homogen dan berdistribusi normal, sehingga pengujian dilanjutkan dengan analisis variansi *Anova* satu arah untuk mengetahui perbedaan rata-rata berat badan dan kadar kolesterol darah mencit dari tiap perlakuan. Pengujian dilanjutkan dengan uji korelasi *moment product Pearson* untuk mengetahui korelasi berat badan dengan kadar kolesterol darah mencit setelah pemberian pektin kulit pisang (Nazir, 2003: 522). Makna nilai korelasi yang digunakan adalah menurut Fowler dan Cohen (1990: 132).

G. Alur Penelitian

Tahap-tahap dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Alur Penelitian