2. Memberikan label pada masing-masing bahan dimana T_0 sebagai control, sedangkan T_1 dan T_2 diberikan perlakuan.
3. Masing-masing pati ubi kayu dan jagung dibuat dengan konsentrasi 10% (b/v) dalam larutan buffer asetat pH 5 dalam volume 300 ml. Kemudian dipanaskan pada suhu 110°C selama 15 menit (*autoclave*).
4. Pati yang tergelatinisasi kemudian dibiarkan mendingin sampai suhunya 40°C .
5. Ditambahkan enzim pullulanase sebanyak 2% (v/b pati) kemudian diinkubasi dalam *Shaker Incubator* pada suhu optimal enzim pullulanase (40°C), 150 rpm dimana masing-masing perlakuan diinkubasi dalam waktu 12 dan 24 jam.
6. Reaksi dihentikan (inaktifasi enzim) dengan memanaskan suspensi pati pada suhu 85°C selama 5 menit, kemudian didinginkan.
7. Pati yang dihasilkan dikeringkan dengan oven pada 50°C selama 24 jam.

3.6.2 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dilakukan, tempat pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang, sekam, tempat makan dan minum tikus, serta pakan tikus disiapkan. Kandang pemeliharaan dibutuhkan sebanyak 24 dan masing-masing diisi dengan 1 ekor tikus.

Seleksi hewan coba dengan memilih hewan berjenis kelamin jantan dimana metabolismanya lebih sedikit dipengaruhi oleh hormon dibandingkan

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian pengaruh pemberian pati jagung dan ubi kayu hasil modifikasi dengan enzim pullulanase terhadap kadar glukosa darah tikus wistar (*Rattus novergicus*) ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang melibatkan 6 kelompok perlakuan tikus wistar dengan 4 kali ulangan.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Variabel bebas : pemberian pati hasil modifikasi dengan variasi lama inkubasi
- b. Variabel terikat : perbedaan peningkatan kadar glukosa darah tikus selama selang waktu 30, 60, 90, dan 120 menit setelah pemberian pati

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2010 - Januari 2011 yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Populasi dan Sampel

Pati jagung yang digunakan dalam penelitian ini adalah merk Maizena, sedangkan pati ubi kayu yang digunakan adalah merk Pak Tani. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar berjenis kelamin jantan yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 200-250 gram.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi erlenmeyer, karet hisap, timbangan digital, mikropipet, pipet ukur, pipet tetes, *aluminium foil*, gelas ukur, gelas arloji, spatula, corong, termometer, *vortex*, *hotplate*, *beaker glass*, tabung reaksi, *water shaker bath*, pH meter, oven, *centrifuge*, *spectrofotometer uv-vis*, kandang hewan coba (bak plastik) dengan tempat makan dan minum, glukotest, dan gunting. Sedangkan bahan yang dipergunakan adalah pati jagung dan pati ubi kayu.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Modifikasi Pati Dengan Enzim Pullulanase

Pada tahap ini, modifikasi pada pati jagung dan ubi kayu secara enzimatik dengan enzim pullulanase. Adapun langkah-langkah kerjanya adalah sebagai berikut :

1. Menyiapkan pati jagung dan ubi kayu masing-masing dalam 3 buah erlemmeyer.

tikus betina. Selanjutnya tikus diaklimasi selama 1 bulan, diberi makan dan minum secara ad libitum.

3.6.3 Perlakuan Pada Hewan Coba

Setelah pati tinggi amilosa hasil modifikasi sudah tersedia, selanjutnya diujikan efek fisiologisnya pada tikus wistar. Hewan coba yang berjumlah 24 ekor sebelumnya diaklimasi selama 1 bulan, selanjutnya dipilih secara acak dan dikelompokkan menjadi 6 kelompok masing-masing berjumlah 4 ekor, dimana perlakuannya sebagai berikut:

JT₀ = diberikan pati jagung kontrol

JT₁ = diberikan pati jagung termodifikasi dengan inkubasi 12 jam

JT₂ = diberikan pati jagung termodifikasi dengan inkubasi 24 jam

KT₀ = diberikan pati ubi kayu kontrol

KT₁ = diberikan pati ubi kayu termodifikasi dengan inkubasi 12 jam

KT₂ = diberikan pati ubi kayu termodifikasi dengan inkubasi 24 jam

Selanjutnya, langkah-langkah pengujian efek fisiologis pati yang dilakukan pada tikus wistar mengacu pada penelitian oleh Anggraeni dan Suhardjono (2006) adalah sebagai berikut :

- 1) Sebelum diberikan pati tikus dipuasakan selama kurang lebih 12 jam, hal ini dilakukan untuk menghilangkan efek fisiologis dari makanan lain sehingga dapat mempengaruhi kadar glukosa darah tikus.
- 2) Hewan coba terlebih dahulu diukur kadar glukosa darah awalnya (dalam keadaan puasa).

- 3) Pati diberikan secara oral lewat pencekokan, hal ini untuk memastikan semua pati masuk dalam tubuh tikus. Perhitungan dosis pati didapat dari dosis glukosa pada tes glukosa oral manusia dewasa yang dikonversikan pada tikus berdasarkan rumus konversi Laurence and Bacharach = $75 \text{ g} \times 0,018 = 1,35 \text{ g} / 200 \text{ g} = 6,75 \text{ g/kgBB}$.
- 4) Selanjutnya, pengukuran kadar glukosa dilakukan pada menit ke-30, 60, 90, dan 120 setelah perlakuan.

3.7.3 Analisis Data

Data yang terkumpul selanjutnya dianalisis dengan *Two Way ANOVA* untuk mengetahui pengaruh modifikasi pati jagung dan ubi kayu terhadap perbedaan kadar glukosa darah tikus wistar. Apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan uji BNT dengan taraf signifikansi 5% untuk mengetahui kenaikan kadar glukosa darah yang tertinggi maupun yang terendah.