

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona Muricata* L.) terhadap kadar enzim transaminase (SGPT dan SGOT) pada mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi dengan 7, 12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antrasen (DMBA) secara in vivo ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 kali ulangan.

#### 3.2 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini meliputi :

1. Variabel bebas : Ekstrak etanol 70% daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan dosis yang berbeda yaitu 100 mg/kg BB, 150 mg/kg BB, 200mg/kg BB dan 250 mg/kg BB diberikan setiap hari selama 8 minggu.
2. Variabel terikat : Kadar enzim transaminase (SGPT dan SGOT) Pada mencit (*Mus musculus*).
3. Variabel kendali : Jenis mencit yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) balb/c jenis kelamin betina yang berumur 40 hari dengan berat badan  $\pm 18$  gram yang diinduksi DMBA sebanyak 0.02 mg/BB selama 6 minggu.

### **3.3 Waktu Dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2013 sampai April 2013, bertempat di Laboratorium Biosistem, Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains Dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Pengujian kadar enzim transaminase (SGPT dan SGOT) dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Muhammadiyah (UMM) Malang.

### **3.4 Populasi Dan Sampel Penelitian**

Hewan uji yang digunakan yaitu mencit (*Mus musculus*) balb/c jenis kelamin betina, umur 40 hari dan berat badan  $\pm 18$  gram. Besar sampel yang digunakan adalah 24 ekor mencit betina (*Mus musculus*) yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor mencit betina (*Mus musculus*) sebagai ulangan.

### **3.5 Alat Dan Bahan**

#### **3.5.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi: kandang hewan coba, spuit 3 ml, timbangan analitik, corong buncher, perangkat rotary evaporator, hot plate, pipet tetes, peralatan bedah, ependorf, vortex, mikropipet, blue tip, yellow tip, sentrifuge, spektrofotometer, kuvet, beake glass, tissue, alumunium foil.

#### **3.5.1 Bahan**

Adapun bahan-bahan yang digunakan antara lain: Hewan Percobaan yang digunakan adalah Mencit (*Musmusculus*) jenis kelamin betina yang berumur 40 hari dengan berat badan  $\pm 18$  gram sebanyak 24 ekor,, Senyawa DMBA

(dimetilbenz ( $\alpha$ ) antrasen), Ekstrak Etanol 70%, daun sirsak (*Annona Muricata* L.), Minyak jagung, Serbuk gergaji, Pakan mencit, Aquades, Na CMC 0,5 %, SGPT reagen kit, SGOT reagen kit, Alkohol 70%, Eter.

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Persiapan Hewan Coba**

Sebelum penelitian dilakukan, terlebih dahulu mempersiapkan tempat untuk pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang, sekam atau serbuk gergaji, tempat makan, minum mencit dan pakan mencit. Mencit yang akan dijadikan sebagai objek penelitian berjumlah 24 ekor dengan usia 40 hari dan berat  $\pm 18$  gram. Selanjutnya mencit diaklimatisasi selama 2 minggu, diberi makan dan minum secara ad libitum.

Sebelum dilakukan perlakuan, mencit dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan yang terdiri dari kontrol positif dan kontrol negatif, serta 4 perlakuan dosis yang diberikan ekstrak etanol 70% daun sirsak (*Annona Muricata* L.) sebanyak 0,5 ml dengan 4 dosis yang berbeda pada minggu ke-3 hingga ke-10 setiap harinya. Sedangkan DMBA diberikan sebanyak 0,1 ml pada minggu ke-5 hingga ke-10 selama 6 minggu dengan pemberian 2x selama 1 minggu pada hari senin dan kamis dengan total 1x pemberian.

#### **3.6.2 Penimbangan Berat Badan Hewan Coba**

Penimbangan berat badan hewan coba dilakukan setiap minggu mulai dari aklimatisasi, pemberian ekstrak daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan larutan DMBA setiap minggu selama 10 minggu.

### 3.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.)

Prosedur pembuatan ekstrak daun sirsak dilakukan sebagai berikut:

- a. Sebanyak 150 gr sampel daun sirsak (*Annona Muricata* L.) dilarutkan dengan 200 ml etanol 70 % atau hingga terendam
- b. Larutan dikocok dengan shaker selama 2 jam kemudian didiamkan.
- c. Larutan disaring dengan vakum Buchner. Filtrat ditampung dalam Erlenmeyer dan residu dimaserasi kembali sebanyak 2 kali.
- d. Filtrat hasil maserasi digabung, kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator suhu 60°C hingga tidak ada filtrat yang menetes.
- e. Diperoleh ekstrak dan dilarutkan sesuai volume dan konsentrasi dosis yang dibutuhkan.

### 3.6.4 Pembuatan Sediaan Larutan Na CMC 0,5 % Dan Penyiapan Larutan Ekstrak Etanol 70% Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.)

Sediaan larutan Na CMC 0,5 % dibuat dengan menlarutkan 500 mg Na CMC ke dalam 10 ml aquades panas, kemudian dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai jel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen dan diencerkan dalam labu ukur dengan aquades hingga volume 100 ml. Stok sediaan larutan Na CMC 0,5 % yang dibuat tersebut selalu dibuat baru setiap 5 hari sekali. Untuk setiap perlakuan dibutuhkan 15 ml Na CMC 0,5 %.

### 3.6.5 Pembuatan sediaan larutan DMBA

Pemberian Dimetilbenz( $\alpha$ ) Antrasen (DMBA) diencerkan menggunakan minyak jagung dengan perbandingan 3:1. DMBA diberikan secara oral dengan dosis 20 mg/kgBB sebanyak dua belas kali selama 6 minggu, yaitu satu minggu 2 kali (senin dan kamis) pada setiap mencit kecuali kontrol negatif.

Adapun perhitungan DMBA diperoleh dari perhitungan sebagai berikut:  
Dosis = 20 mg/kgBB, Konversi ke BB mencit menjadi 0.02 mg/grBB. Rata-rata BB mencit : 20 gram.

Volume Induksi DMBA

$$= 20 \text{ gr} \times (20 \text{ mg DMBA/kgBB}) \times (1 \text{ ml}/3 \text{ mg DMBA})$$

$$= 0.4 \text{ mg DMBA/kgBB} \times 1 \text{ ml}/3 \text{ mg DMBA}$$

$$= 0.14 \text{ ml}$$

### 3.6.6 Persiapan Perlakuan

#### 3.6.1.1 Pembagian Kelompok Perlakuan

Hewan coba yang berjumlah 20 ekor sebelumnya diaklimasi selama 2 minggu, selanjutnya dipilih secara acak dan dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok perlakuan berjumlah 4 ekor mencit.

Pembagian kelompok tersebut terdiri dari: (1). Kontrol negatif adalah mencit yang hanya diinduksi dengan CMC Na 0,5 ml selama 10 minggu. Kontrol positif adalah mencit yang diinduksi dengan DMBA 0.1 ml 2 kali dalam seminggu pada minggu ke-5 sampai minggu ke-10 selama 6 minggu tanpa pemberian ekstrak daun sirsak. (3). Kelompok perlakuan 1 adalah mencit yang

diinduksi DMBA 0.1 ml 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dengan dosis 100 mg/kgBB. (4). Kelompok perlakuan 2 adalah mencit yang diinduksi DMBA 0.1 ml 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dengan dosis 150 mg/kgBB. (5). Kelompok perlakuan 3 adalah mencit yang diinduksi DMBA 0.1 ml 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dengan dosis 200 mg/kgBB (6). Kelompok perlakuan 4 adalah mencit yang diinduksi DMBA 0.1 ml 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dengan dosis 250 mg/kgBB.

### **3.6.1.2 Perhitungan Dosis Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona Muricata L.*)**

Wijaya (2012), pada manusia dosis yang tepat untuk penyakit kanker dalam bentuk seduhan daun sirsak (serbuk) sebanyak 3-5 gram atau setara dengan rebusan 10 daun sirsak per hari. Jika dosis tersebut digunakan pada manusia dengan BB 70 kg, maka dosis seduhan daun sirsak menjadi  $(70/50) \times 3 \text{ gram} = 4,2 \text{ gram}$ . Kusumawati (2004) menyatakan bahwa faktor konversi dari manusia ke mencit dengan berat badan untuk manusia 70 kg dan berat mencit 20 gram adalah 0,0026. Maka dosis mencit menjadi  $0,0026 \times 4,2 \text{ g} = 0,01092 \text{ g} = 10,92 \text{ mg}$ . Dosis rendah yang diambil adalah 100 mg/kg BB.

Penelitian ini menggunakan empat dosis yang berbeda yaitu :

- a. Dosis I : 100 mg/kg BB per hari
- b. Dosis II : 150 mg/kg BB per hari
- c. Dosis III : 200 mg/kg BB per hari
- d. Dosis IV : 250 mg/kg BB per hari

### **3.6.7 Perlakuan Pada Hewan Coba**

#### **3.6.7.1 Perlakuan Pemberian Ekstrak Etanol 70 % Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.)**

Ekstrak daun sirsak yang telah dibuat, diberikan pada mencit sesuai dengan dosis yang telah ditentukan pada volume yang tidak melebihi inrtagastrik mencit (1 ml). Ekstrak tersebut diberikan pada minggu ke- 3 hingga minggu ke-10 setiap hari sebanyak 0.5 ml.

#### **3.6.7.2 Pengambilan Serum**

Pengambilan serum dilakukan melalui jantung (intra cardial) dengan alat suntik sebanyak  $\pm$  1 ml. Darah yang telah diambil dimasukkan dalam tabung tube yang bersih dan kering, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang terpisah dimbil dan dimasukkan dalam tabung lainnya yang bersih dan kering dan ditutup. Jika serum tidak langsung diperiksa, maka harus disimpan pada lemari es suhu 2°C -8°C selama maksimal 4 hari, karena jika lebih dari 4 hari akanmengalami degradasi aktivitas sebesar 10% (Rafika, *et al.*, 2005).

#### **3.6.7.3 Pengukuran Kadar Serum SGPT dan SGOT**

Pengukuran aktivitas SGPT dan SGOT dilakukan pada masing-masing kelompok perlakuan setelah pemberina ekstrak daun sirsak selama 7 minggu. Pembuatan Larutan Pereaksi dengan melarutkan tablet reagen SGPT dalam

larutan buffer dengan perbandingan 1:10. Pengukuran Aktivitas Enzim SGPT dilakukan dengan mengambil serum sebanyak 50  $\mu$ l dan ditambahkan 500  $\mu$ l larutan pereaksi kemudian dihomogenkan dan tunggu selama 1 menit sebelum diukur. Setelah 1 menit, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340nm, dan dicatat penurunan absorbansinya setiap menitnya selama 3 menit.

#### 3.6.7.4 Data dan Teknik Pengumpulan Data

Data dalam penelitian ini berupa kadar SGOT dan SGPT mencit. Data diperoleh dengan cara mengukur kadar SGOT dan SGPT menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 340 nm pada masing-masing kelompok. Kemudian data yang diperoleh dimasukkan dalam tabel berikut:

**Tabel 3.1 Kadar SGPT pada mencit**

Perlakuan	Kadar SGPT (U/l)			
	I	II	III	IV
K-				
K+				
P 1				
P2				
P 3				
P 4				

Tabel 3.2 Kadar SGOT pada mencit

Perlakuan	Kadar SGOT (U/D)			
	I	II	III	IV
K-				
K+				
P 1				
P2				
P 3				
P 4				

### 3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona Muricata* L.) terhadap Enzim Transaminase (SGPT dan SGOT) pada mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi dimetilbenz ( $\alpha$ ) antrasen secara in vivo, data yang diperoleh akan dianalisis terlebih dahulu, yaitu uji Normalitas Kolmogrov-Smirnov (K-S) dan uji homogenitas Levene. Apabila data sudah homogen dan terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji ANOVA (*Analysis Of variance*) yaitu uji ANOVA satu arah. Jika hasil uji ANOVA menunjukkan ada pengaruh, maka dilanjutkan dengan uji lanjut BNT dengan signifikansi  $\alpha = 1\%$ .