

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kadar *Superoksida dismutase* (SOD) dan *Malondialdehyde* (MDA) mammae mencit (*Mus musculus*) betina yang diinduksi 7,12-Dimetilbenz (α) 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 daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan dosis yang berbeda yaitu 100 mg/kg BB, 150 mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 250 mg/kg BB, diberikan pada kontrol positif dan kontrol negatif setiap hari selama 8 minggu (mulai minggu ke-3 sampai minggu ke-10 setelah aklimatisasi selama 2 minggu).
2. Variabel terikat: Kadar *Superoksida dismutase* (SOD) dan *Malondialdehyde* (MDA) mammae mencit (*Mus musculus*) betina.
3. Variabel kendali: Jenis kelamin mencit betina dari strain Balb/c yang berumur 2 bulan, makan pellet, minum secara ad libitum, dan DMBA.

3.3 Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-April 2013 di Laboratorium Biosistem, Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Alat Dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi: kandang pemeliharaan, rak kandang, disposable syringe 1 ml dan 3 mL, sonde lambung hasil modifikasi dari spuit 3 ml, timbangan analitik (ketelitian 0.0001 g), corong buchner, perangkat rotary evaporator vacuum, Erlenmeyer vacuum, alat gelas, hot plate dengan *magnetic stirrer*, magnet (untuk pengaduk), masker (sekali pakai), kacamata, sarung tangan karet (sekali pakai), autoklaf, pipet tetes, dissecting set, papan seksi, botol organ, tissue processor, tissue embedding, waterbath, endorf, vortex, spatula, mikropipet, blue tip, yellow tip, white tip, inkubator, sentrifuge, spektrofotometer, dan kuvet.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan meliputi 24 mencit (*Mus musculus*) jenis kelamin betina yang berumur 1 bulan dengan berat badan 18-20 gram diperoleh dari Laboratorium Biosistem UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, Senyawa 7,12-Dimetilbenz (α) Antrasen (DMBA), ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.), minyak jagung, serbuk gergaji, pakan mencit, kertas label, tisyu, aquades, air

minum isi ulang, NaCl fisiologis 0,9%, aquades, eter, formalin 10%, ethanol (80%, 90%, 96% dan absolut), organ mammae, PBS, xantine, xantine oksidase, dan NBT .

3.5 Populasi Dan Sampel

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina Balb/c jenis kelamin betina yang berumur 1 bulan dengan berat badan 18-20 gram.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dilakukan, terlebih dahulu mempersiapkan tempat pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang, sekam kayu, tempat makan dan minum mencit, pakan mencit. Mencit yang akan dijadikan sebagai objek penelitian berjumlah 24 ekor dengan usia 1 bulan. Selanjutnya mencit diaklimatisasi selama 2 minggu, diberi makan setiap hari sebanyak 5 gram untuk 1 mencit dan minum secara *ad libitum*, pada pagi hari jam 8.00 WIB.

3.6.2 Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Penimbangan hewan coba seminggu sekali pada awal penelitian sampai akhir penelitian.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata L.*)

Ekstrak etanol daun sirsak diperoleh dari serbuk daun sirsak (*Annona muricata L.*) yang dibeli dari Materia Medika. Serbuk daun sirsak direndam di dalam etanol 70% sampai terendam seluruhnya. Sediaan tersebut disaring dengan menggunakan corong bunchner sampai terpisah dari ampasnya, sehingga didapatkan filtrat. Filtrat kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C sampai diperoleh sampel ekstrak etanol daun sirsak. Untuk memperoleh ekstrak sesuai dengan konsentrasi perlakuan, maka dilakukan pengenceran.

3.6.4 Pembuatan Sediaan Larutan Na CMC 0,5% dan Penyiapan Larutan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata L.*)

Sediaan larutan Na CMC 0,5% dibuat dengan diberi 500 mg Na CMC ke dalam 10 ml aquades panas, kemudian dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel. 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% (lampiran 2).

1.6.5 Pembuatan sediaan larutan 7,12-Dimetilbenz (α) Antrasen (DMBA)

Penyediaan 7,12-Dimetilbenz (α) Antrasen (DMBA) diencerkan menggunakan minyak jagung dengan perbandingan 3:1. DMBA diberikan pada dosis 20 mg/kg BB sebanyak sepuluh kali, yaitu seminggu 2 kali selama 6 minggu, sejak minggu ke-5 sampai minggu ke-10 pada setiap mencit kecuali

kontrol negatif. Sejak tanggal 19 Februari 2013 sampai tanggal 2 April 2013, pada siang hari jam 12.00-13.00 WIB.

3.6.7 Kegiatan Penelitian

3.6.7.1. Perhitungan Dosis Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

Menurut 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 $(70/50) \times 3$ gram = 4,2 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 10 mg/kg BB.

Penelitian ini menggunakan empat dosis yang berbeda yaitu :

Dosis I : 100 mg/kg BB per hari

Dosis II : 150 mg/kg BB per hari

Dosis III : 200 mg/kg BB per hari

Dosis IV : 250 mg/kg BB per hari

3.6.7.2 Perlakuan Pada Hewan Coba

Hewan coba yang berjumlah 24 ekor yang telah diaklimatisasi selama 2 minggu, selanjutnya dipilih secara acak dan dikelompokkan menjadi 6 kelompok masing-masing berjumlah 4 ekor.

1. Kelompok K- (kontrol): kelompok mencit yang diberi pelarut ekstrak etanol daun sirsak sebanyak 0,5 mL setiap hari selama 8 minggu dan diinduksi pelarut *7,12-Dimetilbenz (α) Antrasen* (DMBA) 0,1 ml 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu.
2. Kelompok K+ (kontrol): kelompok mencit yang diberi pelarut ekstrak etanol daun sirsak sebanyak 0,5 mL setiap hari selama 8 minggu dan diinduksi *7,12-Dimetilbenz (α) Antrasen* (DMBA) 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu.
3. Kelompok P1: kelompok mencit yang diberi ekstrak etanol daun sirsak dosis I setiap hari selama 8 minggu dan diinduksi *7,12-Dimetilbenz (α) Antrasen* (DMBA) 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu.
4. Kelompok P2: kelompok mencit yang diberi ekstrak etanol daun sirsak dosis II setiap hari selama 8 minggu dan diinduksi *7,12-Dimetilbenz (α) Antrasen* (DMBA) 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu.
5. Kelompok P3: kelompok mencit yang diberi ekstrak etanol daun sirsak dosis III setiap hari selama 8 minggu dan diinduksi *7,12-Dimetilbenz (α) Antrasen* (DMBA) 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu.
6. Kelompok P4: kelompok mencit yang diberi ekstrak etanol daun sirsak dosis IV setiap hari selama 8 minggu dan diinduksi *7,12-Dimetilbenz (α) Antrasen* (DMBA) 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu.

3.6.7.3. Pengukuran Kadar *Superoksida dismutase* (SOD) dan *Malondialdehida* (MDA)

3.6.7.3.1. Pengukuran Kadar *Superoksida dismutase* (SOD)

Aktivitas SOD diuji dengan menggunakan sampel berupa organ (mammary) mencit (*Mus musculus*) betina. Pada tahap yang pertama, mencit dibius menggunakan kloroform, kemudian diambil organ (mammary) sebanyak 20 ul dihomogenkan hingga tercampur. Ditambahkan 1 ml PBS kemudian hasilnya ditampung kedalam ependorf. Ditambahkan bahan campuran penguat reaksi agar terdeteksi ketika di spektro berupa Xantine sebanyak 100 µl, Xantine Oksidase sebanyak 100 µl dan 100 µl NBT. Ketika larutan tersebut sudah terhomogenkan selanjutnya diinkubasi (dengan tekanan suhu 30°C selama 30 menit dan disentrifus dengan tekanan 3500 rpm selama 10 menit), kemudian diambil supernatannya dengan menggunakan mikropipet dan ditambahkan larutan PBS hingga 3500 ml. Kemudian diletakkan di dalam kuvet. Jumlah chromogen yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer kecepatan maksimal (500-600 nm).

3.6.7.3.2. Pengukuran Kadar *Malondialdehida* (MDA)

Pengukuran MDA dengan menggunakan sampel organ mammary mencit (*Mus musculus*) betina. Dihomogenkan 200 µl organ mammary, ditambahkan 1 ml aquades yang ditampung di dalam ependorf dengan menggunakan mikropipet. Campurkan dengan beberapa reaksi larutan (TCA 100% sebanyak 100 µl, Na Thio 1% sebanyak 100 µl dan HCL 1N sebanyak 250µl). Sebelum disentrifus dengan tekanan 3500 rpm selama 10 menit terlebih dahulu dipanaskan dengan tekanan 100° C selama 20 menit. Selanjutnya diambil supernatannya dengan

menggunakan mikropipet dan ditambahkan aquades sampai dengan 3500 μ l, kemudian diletakkan di dalam kuvet. Jumlah chromogen yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer kecepatan maksimal (500-600 nm).

3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kadar *Superoksida dismutase* (SOD) dan *Malondialdehyde* (MDA) mammae mencit (*Mus musculus*) betina yang diinduksi 7,12- dimetilbenz (α) antrasen (DMBA) secara in vivo (kadar SOD dan MDA), data yang diperoleh akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji ANOVA (*Analysis Of varians*) one way. Jika $F_{hitung} > F_{tabel (0,01)}$ maka H_0 ditolak. Apabila menunjukkan perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan menggunakan program SPSS uji lanjut Duncan dengan taraf signifikan 1%.