BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kadar *Superoksida Dismutase* (SOD) dan *Malondialdehyde* (MDA) hepar mencit betina (*Mus musculus*) yang diinduksi dimetilbenz (α) antrasen 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 dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 100 mg/kgBB, 150 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 250 mg/kgBB, diberikan setiap hari selama 8 minggu sejak tanggal 21 Januari 2013 sampai tanggal 31 Maret 2013.
2. Variabel terikat: Kadar *Superoksida Dismutase* (SOD) dan kadar *Malondialdehyde* (MDA) hepar mencit betina (*Mus musculus*)
3. Variabel kendali : jenis kelamin mencit yaitu betina, makanan berupa pellet, minum secara *ad libitum*, DMBA

3.3 Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai April 2013, bertempat 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 Populasi Dan Sampel Penelitian

Hewan uji yang digunakan yaitu mencit (*Mus musculus*) galur Balb/c jenis kelamin betina, umur 1 bulan dan berat badan 16-18 gram. Besar sampel yang digunakan sebanyak 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 pemeliharaan, disposable syringe 1 ml, sonde lambung hasil modifikasi dari spuit 3 ml, timbangan analitik, corong bunchner, perangkat rotary evaporator vacum, alat gelas, hot plate, pipet tetes, dissecting set, papan seksi, botol organ, waterbath, ependorf, vortex, mikropipet, blue tip, yellow tip, inkubator, sentrifus, spektrofotometer, dan kuvet.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan meliputi 24 mencit (*Mus musculus*) jenis kelamin betina yang berumur 1 bulan dengan berat badan 16-18 gram diperoleh dari Laboratorium Biosistem UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, Senyawa DMBA (dimetilbenz (α) antrasen), ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.), minyak jagung, serbuk gergaji, pakan mencit, kertas label, tissue, aquades, air minum isi ulang, Na CMC 0,5 %, NaCl fisiologis 0,9%, aquades, eter, etanol 70 %, organ hepar, PBS, xantine, xantine oksidase, dan Na-Thio.

3.6 Pelaksanaan 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 agar dapat beradaptasi dengan tempat yang baru, diberi makan dan minum secara ad libitum.

3.6.2. Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Penimbangan hewan coba dilakukan pada awal penelitian dan akhir penelitian. Penimbangan juga dilakukan setelah pemberian ekstrak etanol daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

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

Ekstrak daun sirsak diperoleh dari serbuk daun sirsak 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 40°C sampai diperoleh sampel ekstrak etanol daun sirsak.

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

Sediaan larutan Na CMC 0,5 % dibuat dengan menaburkan 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 %.

- Menghitung Konsentrasi

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi I} &= 100 \text{ mg/kg BB} = 100 \text{ mg} \times 18 \text{ g (BB mencit)} / 1000 \text{ g} \\ &= 1,8 \text{ mg/ekor} = 3,6 \text{ mg/ml} = 54 \text{ mg/15ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi II} &= 150 \text{ mg/kg BB} = 150 \text{ mg} \times 18 \text{ g (BB mencit)} / 1000 \text{ g} \\ &= 2,7 \text{ mg/ekor} = 5,4 \text{ mg/ml} = 81 \text{ mg/15ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi III} &= 200 \text{ mg/kg BB} = 200 \text{ mg} \times 18 \text{ g (BB mencit)} / 1000 \text{ g} \\ &= 3,6 \text{ mg/ekor} = 7,2 \text{ mg/ml} = 108 \text{ mg/15ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi IV} &= 250 \text{ mg/kg BB} = 250 \text{ mg} \times 18 \text{ g (BB mencit)} / 1000 \text{ g} \\ &= 4,5 \text{ mg/ekor} = 9 \text{ mg/ml} = 135 \text{ mg/15ml}\end{aligned}$$

a. Dosis IV

$$\begin{aligned}\text{Menghitung Konsentrasi total} &= 54 \text{ mg} + 81 \text{ mg} + 108 \text{ mg} + 135 \text{ mg} \\ &= 378 \text{ mg}\end{aligned}$$

Larutan Na CMC 0,5 % yang dibutuhkan untuk melarutkan 86,4 mg ekstrak daun sirsak untuk mendapatkan dosis IV adalah : $378 \text{ mg} \times 1 \text{ ml} = 9 \times$

$$42 \text{ ml} = x$$

Jadi, 378 mg ekstrak daun sirsak dilarutkan dengan Na CMC 0,5% sampai volumenya menjadi 42 ml. Diambil 15 ml untuk perlakuan dosis IV, sehingga sisa larutan ekstrak menjadi 27 ml.

b. Dosis III

$$\text{Konsentrasi IV} \times 27 \text{ ml} = \text{konsentrasi III} \times V_3$$

$$9 \times 27 = 7,2 V_3$$

$$33,75 \text{ ml} = V_3$$

Sisa larutan ekstrak daun sirsak pada dosis IV sebanyak 27 ml diencerkan hingga volumenya menjadi 33,75 ml. Diambil 15 ml untuk perlakuan dengan dosis III, sehingga sisa larutan ekstrak menjadi 18,75 ml.

c. Dosis II

$$\text{Konsentrasi III} \times 18,75 \text{ ml} = \text{konsentrasi II} \times V_2$$

$$7,2 \times 18,75 = 5,4 V_2$$

$$25 \text{ ml} = V_2$$

Sisa larutan ekstrak daun sirsak pada dosis III sebanyak 18,75 ml diencerkan hingga volumenya menjadi 25 ml. Diambil 15 ml untuk perlakuan dengan dosis II, sehingga sisa larutan ekstrak menjadi 10 ml.

d. Dosis I

$$\text{Konsentrasi II} \times 10 \text{ ml} = \text{konsentrasi I} \times V_1$$

$$5,4 \times 10 = 3,6 V_1$$

$$15 \text{ ml} = V_1$$

Sisa larutan ekstrak daun sirsak pada dosis II sebanyak 10 ml diencerkan hingga volumenya menjadi 15 ml. Dan larutan ekstrak daun sirsak sebanyak 15 ml ini diberikan untuk perlakuan mencit kelompok III

3.6.5. Pembuatan sediaan larutan Dimetilbenz (α) Antrasen (DMBA)

DMBA diencerkan menggunakan minyak jagung dengan perbandingan 3:1. DMBA diberikan pada dosis 20 mg/kgBB sebanyak sepuluh kali, yaitu seminggu 2 kali pada setiap mencit kecuali mencit pada kelompok kontrol negatif. Sejak tanggal 21 Januari 2013 sampai tanggal 31 Maret 2013.

3.6.6. Kegiatan Penelitian

3.6.6.1. Dosis Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

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

3.6.6.2. Perlakuan Pada Hewan Coba

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

- a. Kelompok 1 sebagai kontrol negatif: kelompok mencit yang diberi pelarut DMBA 0,5 ml 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan pelarut ekstrak sebanyak 0,5 mL setiap hari selama 8 minggu. Tujuannya untuk mengontrol pelarut.
- b. Kelompok 2 sebagai kontrol positif: kelompok mencit yang diberi Dimetilbenz (α) Antrasen 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan pelarut ekstrak sebanyak 0,5 mL setiap hari selama 8 minggu. Tujuannya untuk mengontrol DMBA dan pelarut.
- c. Kelompok 3: kelompok mencit yang diinjeksi Dimetilbenz (α) Antrasen 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis I setiap hari selama 8 minggu
- d. Kelompok 4: yaitu kelompok mencit yang diinjeksi Dimetilbenz (α) Antrasen 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis II setiap hari selama 8 minggu
- e. Kelompok 5: kelompok mencit yang diinjeksi Dimetilbenz (α) Antrasen 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis III setiap hari selama 8 minggu

- f. Kelompok 6: kelompok mencit yang diinjeksi Dimetilbenz (α) Antrasen 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis IV setiap hari selama 8 minggu

3.6.6.3. Pengukuran Kadar Superoksida dismutase (SOD) dan Manodialdehide (MDA)

3.6.6.3.1. Pengukuran Kadar *Superoksida dismutase* (SOD)

Aktivitas SOD diuji dengan menggunakan sampel berupa organ (hepar) mencit (*Mus musculus*) Betina. Pada tahap yang pertama, mencit dibius menggunakan eter, kemudian diambil organ (hepar) sebanyak 100 mg. Ditambahkan 1 ml PBS kemudian hasilnya ditampung kedalam ependorf. Kemudian 150 μ l lisat hepar divorteks selama tiga detik dan disentrifus pada kecepatan 4400 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Sebanyak 2,9 ml larutan A (campuran larutan xantin) ditambah 50 μ l larutan baku (kontrol) atau sampel dan divorteks secara perlahan. Reaksi dimulai dengan menambahkan 50 μ l larutan B (xantin oksidase) dan divorteks secara perlahan. Kemudian diletakkan di dalam kuvet. Jumlah chromogen yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer dengan kecepatan 522 nm (Wresdiyati, 2007).

3.6.6.3.2 Pengukuran Kadar *Malondialdehida* (MDA)

Hepar dicuci dengan menggunakan larutan PBS 10 mM. Hepar ditimbang seberat 0,3125 gram, kemudian digerus dalam mortal dan ditambahkan dengan 10x volume NaCl 0,9% dan dihomogenkan sampai rata. Homogenat hepar disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipisahkan dengan pelet dan diletakkan pada tabung eppendorf. Supernatan ditambah dengan

Na-Thio 100 μ l, kemudian divortex dan dipanaskan dalam *water bath* dengan suhu 100°C selama satu jam. Setelah satu jam, supernatan diangkat dan dibiarkan dalam suhu ruangan selama kurang lebih 30 menit. Lalu sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 522 nm (Ceska, 2000 dalam Aylindania, 2007).

3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kadar superoksida dismutase (SOD) dan malondialdehyde (MDA) hepar mencit betina (*Mus musculus*) yang diinduksi dimetilbenz (α) antrasen secara *in vivo*, data yang diperoleh akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat, yaitu uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov (K-S) dan uji homogenitas Levene. Bila data sudah homogen dan terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji ANOVA (*Analysis Of variance*). Jika hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji lanjut BNT dengan parameter $\alpha = 1\%$. Tujuannya adalah untuk mengetahui dosis yang paling efektif dalam meningkatkan kadar superoksida dismutase (SOD) maupun menurunkan kadar malondialdehyde (MDA) hepar mencit betina yang diinduksi dimetilbenz (α) antrasen secara *in vivo*.