

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap morfologi dan histologi hepar mencit betina (*Mus musculus*) yang diinduksi 7,12 dimetilbenz (α) antrasen secara in vivo ini merupakan 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 4 Februari 2013 sampai tanggal 3 April 2013.
2. Variabel terikat : Morfologi hepar mencit dan histologi hepar mencit yang meliputi sel hepatosit yang telah mengalami nekrosis tahap akhir, sel hasil *treatment* dan diameter inti sel.
3. Variabel kendali : Strain mencit, jenis kelamin betina, berumur 40 hari dan berat badan awal 16- 18 gram, makanan berupa pellet, minum secara *ad libitum* dan DMBA.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L) terhadap anatomi dan histologi hepar yang diinduksi 7, 12 dimetilbenz (α) antrasen ini dilakukan pada bulan Januari - April 2013 di Laboratorium Fisiologi Hewan, Biosistem, Optik 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*) jenis kelamin betina, umur 40 hari dan berat badan 16-18 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 adalah rotary evaporator, *syringe* 1 mL dan 3 mL, *vortex*, spatula, timbangan hewan, *vortex*, pinset, alat bedah, alat kebersihan, kantong sampah, botol minum mencit, tempat pakan mencit, karung, neraca analitik (ketelitian 0.0001 g), *hot plate* dengan *magnetic stirrer*, masker (sekali pakai), sarung tangan karet (sekali pakai), kandang mencit, rak kandang, sonde lambung, jerigen, pompa vakum, botol flakon, komputer, alat-alat gelas dan

pengaduk, kaca preparat, kaca penutup dan mikrotom serta hand counter, mikroskop komputer.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan meliputi 30 ekor mencit (*Mus musculus*) jenis kelamin betina yang berumur 40 hari dengan berat badan 16-18 gram diperoleh dari Laboratorium Biosistem UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, Senyawa DMBA (7, 12 dimetilbenz (α) antrasen), ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.), minyak jagung, serbuk gergaji, pakan mencit (pelet) , kertas label, tisu, aquades, aquabides, NaOH, etanol destilat 70%, ether , 90%, formalin 100%, alkohol 50%, 70%, 80%, dan 100 %, xilol, pewarna HE, paraffin, dan etellan.

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. Selanjutnya mencit diaklimatisasi selama 2 minggu, diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

3.6.2. Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Penimbangan hewan coba dilakukan setiap seminggu sekali di hari Senin pada awal sebelum diinduksi DMBA (aklimatisasi), pemberian ekstrak Daun

Sirsak (*Annona muricata* L.) (sebelum perlakuan) dan setelah diinduksi DMBA dan pemberian ekstrak daun Sirsak (*Annona muricata* L.) (setelah perlakuan).

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

Ekstrak etanol daun sirsak diperoleh dari serbuk halus daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang dibeli dari "Materia Medica". Serbuk daun sirsak sebanyak 150 mg direndam dengan larutan ethanol sebanyak 750 ml sampai semua serbuk terlarut dalam larutan ethanol (perbandingan 1: 5) dan dilakukan perendaman sampai perbandingan 1: 1. Sediaan tersebut disaring dengan menggunakan vacuum buchner, sehingga didapatkan filtratnya. Filtrat tersebut, diuapkan dengan rotari evaporator selama 6 jam pada suhu 50°C (d disesuaikan suhu dan tekanannya), dan dihentikan ketika warna sudah berubah menjadi hijau kecoklatan, sehingga ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi adalah sediaan ekstrak murni 100 %.

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 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. Jadi stok sediaan Na CMC 0,5 % yang dibutuhkan selama 5 hari untuk 20 mencit adalah sekitar 60 ml.

- 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 : $378 \text{ mg} \times 1 \text{ ml} = 9 \text{ x}$

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

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 DMBA

DMBA diencerkan dengan minyak jagung dengan perbandingan 3:

1 yaitu dengan cara mengencerkan 3 mg DMBA kedalam 1 ml minyak

jagung pada tabung eppendorf. Penyediaan 7, 12 dimetilbenz (α) antrasen diberikan pada dosis 20 mg/BB dua belas kali, yaitu seminggu 2 kali pada setiap mencit, kecuali kontrol negatif.

Dosis DMBA:

Larutan DMBA konsentrasi 3 mg DMBA/mL = 180 mg DMBA . 60 mL minyak jagung

Dosis pemberian DMBA (setiap induksi) = 20 mg DMBA/kg BB.

Perhitungan:

Asumsi BB mencit = 20 g = 0.02 kg

Volume induksi DMBA = 0.02 kg x (20 mg DMBA/kg BB) x (1 mL/3 mg DMBA) = 0.1 mL larutan DMBA

3.6.6 Kegiatan Penelitian

3.6.6.1 Pembagian Kelompok Sampel

Hewan coba yang berjumlah 24 ekor sebelumnya diaklimasi 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 0,1 mL 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan pelarut ekstrak sebanyak 0,5 mL setiap hari.
- b. Kelompok 2 sebagai kontrol positif: kelompok mencit yang diberi DMBA 0,1 mL 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan pelarut ekstrak sebanyak 0,5 mL setiap hari.

- c. Kelompok 3: kelompok mencit yang diinjeksi DMBA 0,1 mL 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis I
- d. Kelompok 4: yaitu kelompok mencit yang diinjeksi DMBA 0,1 mL 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis II
- e. Kelompok 5: kelompok mencit yang diinjeksi DMBA 0,1 mL 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis III
- f. Kelompok 6: kelompok mencit yang diinjeksi DMBA 0,1 mL 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan diberi ekstrak daun sirsak dosis IV

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

Menurut Retnani (2011), pemberian ekstrak *Annona muricata* dengan dosis 200 mg/kg BB berpotensi menghambat karsinogenesis pada tikus, tepatnya untuk kanker payudara. 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 $(70/50) \times 3 \text{ gram} = 4,2 \text{ gram}$. 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

3.6.6.3 Perlakuan Pada Hewan Coba

Pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) ini dimulai pada minggu ke 2 setelah mencit diaklimatisasikan selama 2 minggu . Kemudian ekstrak daun sirsak ini diberikan 2 minggu sebelum pemberian DMBA, selanjutnya pemberian ekstrak pada mencit setiap hari bersama dengan DMBA 2 kali seminggu selama 6 minggu, diberi pakan pellet dan minum secara ad libitum.

3.6.6.4 Pembuatan Preparat

Mencit kelompok kontrol (-), kontrol (+) dan hasil perlakuan Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) pada minggu ke 8 dilakukan anestesi dengan menggunakan ether, kemudian diambil organ hepar dan dilakukan pembuatan preparat sebagai berikut:

- Disiapkan alat dan bahan
- Dicuci organ menggunakan PBS
- Dimasukkan organ kedalam botol flakon
- Difiksasi menggunakan formalin selama 24 jam
- Diambil organ, diletakkan ke dalam cawan petri
- Dipotong organ $\pm 0,5$ cm
- Didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (50%,70%, 80%, 100%, dan 100%) masing-masing selama 30 menit

- Ditetesi alkohol: xylol bertingkat (3:1, 1:1, dan 1:3) masing-masing selama 30 menit
- Ditetesi xylol murni 1 selama 30 menit
- Ditetesi xylol murni 2 selama 30 menit
- Ditetesi xylol: parafin (1:9) selama 24 jam (diletakkan dalam oven suhu 60°C)
- Diganti dengan parafin murni selama 1 jam dalam oven
- Dibiarkan sampai mengeras
- Dilakukan pengirisan menggunakan mikrotom
- Dihilangkan sisa-sisa parafin yang terdapat dalam organ dengan cara merendam menggunakan air panas yang telah dipanasi dengan hot plate
- Diletakkan hasil irisan organ keatas kaca benda
- Ditetesi xylol 1 selama 3 menit
- Ditetesi xylol 2 selama 3 menit
- Ditetesi campuran alkohol:xylol bertingkat (1:3, 1:1, 3:1) masing-masing selama 3 menit
- Didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (100%, 100%, 80%, dan 70%) masing-masing selama 3 menit
- Dicuci dengan aquades selama 10 menit
- Tahap pewarnaan yaitu:
 - Pewarnaan HE: preparat ditetesi dengan hematoxylin selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan dibilas dengan aquades selama

5 menit. Setelah itu preparat dimasukkan dalam pewarna eosin alkohol selama 30 menit

- Dicuci menggunakan aquades selama 5 menit
- Didehidrasi kembali menggunakan alkohol bertingkat (70%, 80%, 100%, dan 100%) masing-masing selama 3 menit
- Ditetesi campuran alkohol: xylol (3:1, 1:1, dan 1:3) masing-masing selama 3 menit
- Ditetesi xylol murni 1 selama 3 menit
- Ditetesi xylol murni 2, dan sebelum kering ditambahkan enthelen kemudian langsung ditutup menggunakan kaca penutup
- Diamati dibawah mikroskop komputer dan dideskripsikan sel yang mengalami nekrosis, dan dilihat diameter inti selnya, kemudian diambil gambar hasil pengamatan

3.6.7.5 Pengamatan Struktur Histologis Hepar

Histologis hepar mencit dengan pewarnaan HE selanjutnya diamati di bawah mikroskop komputer dengan menggunakan perbesaran 40x10 mm untuk melihat histologi sel hepar yang mengalami nekrosis tahap akhir dengan memperlihatkan ciri yaitu sebagai berikut:

1. Sel lebih renggang dan sitoplasma membesar
2. Inti sel tidak terwarnai atau sel kosong (kariolisis)

Sedangkan sel hepatosit yang tidak mengalami nekrosis memperlihatkan ciri yaitu sebagai berikut:

1. Sel lebih rapat (homogen) dan sitoplasma yang lebih kecil akibat fragmentasi inti akibat apoptosis
2. Sel hepar mulai tersusun homogen dan sel penuh (tidak kosong).

Untuk mengetahui besar kerusakan sel hepar dilakukan melalui penghitungan kerusakan sel hepar pada tiga luas bidang pandang setiap satu ekor mencit. Perhitungan ini dilakukan dengan cara mempersentase jumlah kerusakan dengan menggunakan millimeter block. Cara menghitung persentase kerusakan sel hepar:

$$x = \frac{\text{jumlah kotak milimeter block pada sel nekrosis}}{\text{jumlah seluruh kotak pada milimeter block}} \times 100\%$$

Sedangkan pengamatan diameter inti sel dilihat dengan mikroskop komputer perbesaran 40x10 mm dengan menghitung diameter inti sel hepar dengan menggunakan kalibrasi pada mikroskop dengan tiga luas bidang pandang.

3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) terhadap histologi sel hepar mencit betina yang diinduksi DMBA, data hasil pengamatan kemudian diuji statistik dengan menggunakan ANOVA. Apabila terdapat pengaruh, dilanjutkan dengan Uji Duncan 1%.

Data hasil penelitian berupa persentase sel nekrosis dan diameter inti sel hepar ini diuji homogenitas dan normalitasnya, jika data yang didapat menunjukkan hasil yang homogen dan normal, maka data kemudian di analisis menggunakan One Way Anova dan apabila terdapat perbedaan maka diuji lanjut menggunakan Duncan dengan taraf signifikansi 1%, jika tidak terdapat perbedaan maka dicoba dengan menggunakan taraf signifikansi 5%.

