

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap SOD, dan histologi hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi oleh aloksan ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah tikus kontrol negatif (tanpa perlakuan), tikus kontrol positif (diabetes tanpa pemberian ekstrak daun sirsak) dan tikus diabetes yang diberi ekstrak daun sirsak dengan 3 dosis yang berbeda.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juni sampai Desember 2014, di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini meliputi:

- a. Variabel bebas : ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan dosis yang berbeda 0, 50, 100 dan 150 mg/kgBB.
- b. Variabel terikat : variabel yang diukur adalah kadar *superoksida dismutase* (SOD), dan histologi hepar tikus.
- c. Variabel kendali : jenis tikus yang digunakan adalah tikus putih jantan putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) berumur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 200 g dan dikondisikan

menjadi diabetes dengan menginduksi aloksan 120 mg/kgBB.

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) jenis kelamin jantan, umur 2 bulan dengan berat badan rata – rata 200 gram sebanyak 15 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), blender, alat pencekok oral (*gavage*), gelas ukur, timbangan digital, gelas arloji, spatula, spektrofotometer, spuit, seperangkat alat bedah, tabung *apendorf*, sentrifuge, glukometer, strip glukotest, rotari evaporator, oven, *obyek glass*, *freezer*, mikrotom, dan hotplate.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*), ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.), aquades, kapas, tissue, alkohol 70 %, formalin, etanol absolut, xylol, parafin, gelatin, *hematoxylin*, *eosin*, etilen, aloksandengan kadar 120 mg/kg berat badan, xantin, NaCL 0,9%, buffer fosfat 50 mM, EDTA 0,1 mM, dan NaOH.

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dimulai, terlebih dahulu dipersiapkan tempat pemeliharaan hewan coba, yaitu kandang (bak plastik), sekam, tempat makan, minum dan pakan tikus. Setelah itu dilakukan aklimatisasi di laboratorium selama

1 minggu. Mencit dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif tikus normal (tidak diabetes), kelompok tikus kontrol positif (diabetes) dan kelompok diabetes diobati ekstrak daun sirsak. Untuk menjadi diabetes, tikus diinduksi dengan aloksan dengan dosis 120 mg/kgBB, diberikan seminggu 3kali selama 1minggu, dimulai 2 minggu setelah diaklimatisasi.

3.6.2 Pembuatan Perlakuan

3.6.2.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) 1 kg yang masih segar dikeringkan, kemudian ditumbuk dan dimasukkan ke dalam blender. Bubuk halus dicampur dengan aquades dan diekstraksi 2 kali dengan 2,5 liter aquades pada suhu kamar selama 48 jam. Kemudian dihasilkan ekstrak daun sirsak sebanyak 36,23 g. Selanjutnya dapat diberikan kepada hewan coba untuk perlakuan (Adewole, 2009).

3.6.2.2 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Sebelum perlakuan pemberian ekstrak daun sirsak, dilakukan pengukuran glukosa darah untuk memastikan bahwa 9 tikus telah mengidap diabetes. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan cara mengambil darah tikus melalui ekor yang terlebih dahulu dibersihkan dengan alkohol. Kemudian diteteskan pada strip glukometer lalu dimasukkan ke dalam glukometer dan di baca kadar glukosanya. Jika kadar glukosa >300 mg/dl maka tikus dalam keadaan diabetes (oktaviani, 2012). Namun, apabila belum mencapai angka tersebut tikus diinjeksi dengan aloksan sampai diabetes.

1.6.2.3 Penentuan dosis ekstrak daun sirsak

Gambaran atau model penentuan dosis ekstrak daun sirsak pada perlakuan dengan hasil modifikasi penelitian Adewole (2009), yaitu 3 dosis yang berbeda 50, 100 dan 150 mg/kg BB. Jika dosis tersebut diberikan pada tikus dengan berat badan rata-rata 200 g, maka dosis ekstrak daun sirsak dapat dihitung menjadi $(200/1000) \times 150 \text{ ml} = 30 \text{ ml/ekor}$, $(200/1000) \times 100 = 20 \text{ ml/ekor}$ dan $(200/1000) \times 50 \text{ ml} = 10 \text{ ml/ekor}$. Malole (1989), ekstrak yang dapat dimasukkan pada lambung tikus adalah 2,5 ml.

Dipeloreh 3 konsentrasi yang berbeda:

1. Konsentrasi I = $12 \text{ mg/ml} \times 2,5 \text{ ml} = 30 \text{ mg/ekor}$
2. Konsentrasi II = $8 \text{ mg/ml} \times 2,5 \text{ ml} = 20 \text{ mg/ekor}$
3. Konsentrasi III = $4 \text{ mg/ml} \times 2,5 \text{ ml} = 10 \text{ mg/ekor}$

3.6.2.4 Pembagian Kelompok Sampel

Setelah 9 tikus positif diabetes, tikus dibagi menjadi 3 kelompok, yang terdiri dari:

- a. K- (Kontrol negatif) : Tikus normal tanpa diberi ekstrak daun sirsak dan tanpa diinduksi aloksan untuk diabetes.
- b. K+ (Kontrol positif) : Tikus diabetes dengan induksi aloksan 120 mg/kgBB tanpa diberi ekstrak daun sirsak.
- c. P1 (Perlakuan 1) : Tikus diabetes dengan induksi aloksan 120 mg/kgBB dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 50 mg/kgBB selama 30 hari.
- d. P2 (Perlakuan 2) : Tikus diabetes dengan induksi aloksan 120 mg/kgBB dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 100 mg/kgBB selama 30 hari.
- e. P3 (Perlakuan 3) : Tikus diabetes dengan induksi aloksan 120 mg/kgBB dan diberi ekstrak daun sirsak 150 mg/kgBB dosis III selama 30 hari.

3.6.3 Kegiatan Penelitian

3.6.3.1 Perlakuan Pemberian Ekstrak daun sirsak

Daun sirsak yang sudah kering dihaluskan dengan blender menjadi serbuk. Kemudian dicampur dengan aquades dengan volume yang telah ditentukan. Ekstrak daun sirsak diberikan pada kelompok I, II dan III selama 30 hari dengan dosis yang telah ditentukan.

3.6.3.2 Pengukuran Kadar Radikal Bebas

3.6.3.2.1 Pembuatan Kurva Standart SOD

Larutan yang dipersiapkan adalah buffer fosfat 50 mM yang mengandung EDTA 0,1 mM pH 7,8 (balanko), larutan xantin, dengan melarutkan xantin 0,76 mg ke dalam 10 ml 0,001 M NaOH kemudian ditambahkan 100 ml larutan sitokrom c ke dalamnya dan larutan xantin oksidase, dengan melarutkan xantin oksidase ke dalam bufer fosfat mengandung EDTA pH 7,8 dengan aktivitas 0,2 U/ml, dan disimpan pada suhu 4oC. Larutan xantin oksidase harus tetap dalam keadaan dingin (didinginkan selama 15 menit) sebelum digunakan (Suarsana, 2013).

3.6.3.2.2 Pengukuran SOD

Tikus dibedah dan diperfusi pada bagian vena porta hepatica, kemudian hepar dicuci dengan menggunakan larutan PBS 10 mM. Hepar ditimbang seberat 0,3125 gram, kemudian digerus dalam mortar dan ditambahkan dengan 10x volume NaCL 0,9% dan dihomogenkan sampai rata. Supernatandipisahkan dengan pelet dan diletakkan pada tabung appendorf. Supernatan ditambah dengan xantin oksidase 100 µl. Kemudian divortex dan dipanaskan dalam *water bath* dengan suhu 100°C selama 1 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 580 nm. Kadar SOD diperoleh dengan memasukkan data absorbansi ke dalam persamaan yang telah dibuat dari kurva standart (Suarsana, 2013).

1.6.3.3 Pembuatan Sayatan Hepar

Tahap-tahap pembuatan sayatan hepar sebagai berikut(Dewi, 2013):

1. Tahap pertama adalah *coating*, dimulai dengan menandai *obyek glass* yang akan digunakan dengan kikir kaca pada bagian tepi, kemudian direndam dalam alkohol 70% minimal semalam. Kemudian obyek glass dikeringkan dengan tissue dan dilakukan perendaman dalam larutan gelatin 0,5% selama 30-40 detik/slide, lalu dikeringkan dengan posisi disandarkan hingga gelatin yang melapisi kaca dapat merata
2. Tahap kedua, organ hepar yang telah disimpan dalam larutan formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 2 jam, dan dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat dengan alkohol yaitu dengan alkohol 90%, 95%, etanol absolut (3 kali), xylol (3 kali), masing-masing selama 20 menit
3. Tahap ketiga, adalah proses *infiltrasi* yaitu dengan menambahkan parafin sebanyak 3 kali selama 30 menit
4. Tahap keempat, *embedding*. Bahan beserta parafin dituangkan kedalam kotak karton atau wadah yang telah disiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap didekat bahan. Blok parafin dibiarkan semalam dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam *freezer* sehingga blok benar-benar keras
5. Tahap pemotongan dengan mikrotom. *Cutter* dipanaskan dan ditempelkan pada dasar blok sehingga parafin sedikit meleleh. *Holder* dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan mata pisau mikrotom. Pengirisan atau penyayatan diawali dengan mengatur ketebalan irisan. Untuk hepar dipotong dengan ukuran 2-5 μm , kemudian pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dan

dimasukkan air dingin untuk membuka lipatan lalu dimasukkan air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik. Irisan yang terpilih diambil dengan gelas obyek yang sudah dicoating kemudian dikeringkan diatas *hot plate*.

6. Tahap deparafinasi, yaitu preparat dimasukkan dalam xylol sebanyak 2 kali 5 menit.
7. Tahap rehidrasi, preparat dimasukkan dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut (2 kali), etanol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam aquadest selama 10 menit.
8. Tahap pewarnaan, preparat ditetesi dengan *hematoxylin* selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquadest selama 5 menit. Setelah itu preparat dimasukkan dalam pewarna eosin alkohol selama 30 menit dan dibilas dengan aquadest selama 5 menit.
9. Tahap dehidrasi, preparat direndam dalam etanol bertingkat 80%, 90%, 95% dan etanol absolut (2 kali) masing-masing selama 5 menit.
10. Tahap *clearing*, dalam larutan xylol 2 kali selama 5 menit, kemudian dikeringkan. Tahap mounting dengan etilen. Hasil akhir yaitu histologi hepar yang berupa sel hepatosit, sinusoid dan vena sentralis. Sel hepatosit normal mempunyai ciri-ciri: sel tersusun secara radier terhadap vena sentralis, bentuk sel bulat dan oval dan terdapat lempeng-lempeng hepatosit. Sel terlihat memiliki satu nukleus, namun ada juga yang memiliki lebih dari satu nucleus (binukleat) yang terdapat di tengah sel (Fajariyah, 2010). Sinusoid hepar adalah saluran darah yang berliku-liku dan melebar, dengan diameter tidak teratur, dilapisi sel endotel

bertingkap tidak utuh, yang dipisahkan dari hepatosit di bawahnya oleh ruang perisinusoidal (dari Disse). Sedangkan vena sentralis merupakan pusat yang berada di tengah, dimana darah dari vena porta dan vena hepatica membawa darah menuju vena sentralis (Daglia, 2000).

11. Diamati dibawah mikroskop dan diambil gambar kemudian dicatat luas vena sentralis dengan cara mengukur diameter jarak dekat dan jarak jauh vena sentralis hepar.
12. Diamati dibawah mikroskop dan diambil gambar kemudian dihitung persentase kerusakan struktur sel hepatosit normal dan abnormal (piknosis, karioreksis, kariolisis dan nekrosis)

3.7 Analisis Data

Data yang telah diperoleh yaitu kadar SOD dan luas vena sentralis dianalisis menggunakan uji statistik Anova dengan taraf signifikan 5%.