

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu penelitian *true experimental* untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak terhadap kadar SGPT pada tikus wistar yang diinduksi DMBA. Tikus wistar tersebut diberikan perlakuan selama 6 minggu. Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 taraf perlakuan. Masing-masing taraf perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali.

Tabel 2. Rancangan Acak Lengkap

Taraf Perlakuan	Replikasi					
	1	2	3	4	5	6
K-	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆
K+	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆
P ₁	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄	X ₃₅	X ₃₆
P ₂	X ₄₁	X ₄₂	X ₄₃	X ₄₄	X ₄₅	X ₄₆
P ₃	X ₅₁	X ₅₂	X ₅₃	X ₅₄	X ₅₅	X ₅₆

Keterangan:

K- : Air 30 ml (Kontrol negatif)

K+ : Air 30 ml + DMBA 20 mg/kgBB (Kontrol positif)

P₁ : Air 30 ml + DMBA 20 mg/kgBB + 1000 mg ekstrak daun sirsak

P₂ : Air 30 ml + DMBA 20 mg/kgBB + 1500 mg ekstrak daun sirsak

P₃ : Air 30 ml + DMBA 20 mg/kgBB + 3000 mg ekstrak daun sirsak

X₁₁, X₁₂, X₁₃.....X₅₆ unit percobaan.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli – September 2024.

2. Tempat Penelitian

- a. Laboratorium IBM/ITP Politeknik Kesehatan Malang untuk proses pembuatan ekstrak daun sirsak.

- b. Laboratorium Sentral Mineral dan Material Maju Universitas Negeri Malang untuk proses uji aktivitas antioksidan ekstrak daun sirsak.
- c. Laboratorium Materia Medica Kota Batu untuk proses uji kuersetin ekstrak daun sirsak.
- d. Laboratorium Pemeliharaan Hewan Coba Politeknik Kesehatan Malang untuk pemeliharaan hewan coba.
- e. Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Malang untuk analisis kadar SGPT serum.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi penelitian ini yaitu 40 ekor tikus wistar jantan. Besar sampel dalam penelitian ini menggunakan 5 taraf perlakuan. Masing-masing taraf perlakuan dibutuhkan 6 ekor tikus dengan jumlah sampel 30 ekor tikus.

2. Sampel

Sampel yang digunakan adalah 30 ekor tikus wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

- Jenis kelamin jantan
- Sehat
- Umur 45 – 75 hari
- Berat tikus 50 – 75 g
- Sudah dapat memakan makanan kering

b. Kriteria Eksklusi

- Terlihat sakit atau infeksi selama masa adaptasi 7 hari
- Gerak tidak aktif (lemas)
- Tidak mau makan selama 2-3 hari berturut-turut
- Mati ketika penelitian berlangsung
- Kabur ketika penelitian berlangsung

3. Besar Sampel

Penentuan besar sampel menggunakan rumus Federer (1963) :

$$(t - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$4(n - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) \geq 3,75$$

$$n \geq 4,75 \text{ (dibulatkan)}$$

$$n \geq 5$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah pengulangan/jumlah sampel tiap kelompok

Berdasarkan rumus diatas, besar sampel yang dibutuhkan untuk masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan adalah $n = 5$ responden. Untuk mengantisipasi dropout dalam penelitian, maka dilakukan penambahan jumlah sampel sehingga ukuran sampel tetap terpenuhi dengan Rumus :

$$n' = \frac{n}{(1-f)}$$

$$= \frac{5}{(1-0,1)}$$

$$= \frac{5}{0,9}$$

$$= 5,5 \text{ (dibulatkan)}$$

$$= 6$$

Keterangan:

n' = jumlah sampel mengantisipasi drop out

n = jumlah sampel

f = perkiraan proporsi drop out

Sehingga didapatkan jumlah total sampel ($\sum n$) yang dibutuhkan yaitu :

$$\sum n = t \times n'$$

$$= 5 \times 6$$

$$= 30 \text{ ekor tikus}$$

D. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : sendok, baskom, timbangan elektrik, blender, pisau, talenan, oven, kompor, panci, gelas ukur, botol laboratorium plastik, spektrofotometer, tabung reaksi, inkubator, labu ukur, sentrifuge, jarum suntik 1-1/2 inchi, spuit 1 ml, spuit 3 ml, meja bedah, pinset,

gunting bedah, toples anestesi, *sprit disposable*, jarum suntik, tabung *ependorf* untuk penyimpanan serum, tabung vacutainer warna merah, spuit 5 ml, kapas, alkohol swab, dan tabung EDTA.

2. Bahan Penelitian

a. Pakan tikus

Tabel 3. Kebutuhan pakan tikus dalam sehari

Bahan	%	Berat Bahan Pakan/kg (kg)
Tepung Jagung	75	0.75
Tepung Ikan	5	0.05
Tepung Tulang	1	0.01
Tepung Kedelai	10	0.10
Tepung Kacang Tanah	5	0.05
Mineral Mix	0.2	0.002
Vitamin B Kompleks	1 blr/hari	1 blr
Minyak Kelapa Sawit	1	0.01
Garam	0.2	0.002

Keterangan : pakan diberikan sebanyak 30 gram/tikus

b. Ekstrak daun sirsak

- 1) Serbuk daun sirsak
- 2) Air

c. Pengukuran kadar flavonoid ekstrak daun sirsak

- 1) Simplisia ekstrak daun sirsak
- 2) Air

d. Pemeliharaan tikus

- 1) Air
- 2) Sekam

e. Pembedahan tikus

- 1) Kloroform

f. Bahan pengukuran kadar SGPT serum

- 1) Reagen SGPT
- 2) Sampel darah tikus

E. Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini meliputi :

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu pemberian ekstrak daun sirsak.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu kadar SGPT.

F. Definisi Operasional Variabel

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Metode dan Alat Ukur	Skala Ukur
Pemberian ekstrak daun sirsak	Pemberian ekstrak daun sirsak pada 3 kelompok perlakuan yaitu, P ₁ , P ₂ , dan P ₃ diberikan selama 5 minggu.	Mengukur pemberian ekstrak daun sirsak (P ₁ = serbuk ekstrak daun sirsak 1000 mg/kgBB + Air 30 ml, P ₂ = serbuk ekstrak daun sirsak 1500 mg/kgBB + Air 30 ml, P ₃ = serbuk ekstrak daun sirsak 3000 mg/kgBB + Air 30 ml) dalam satuan ml dengan menggunakan gelas ukur dan spuit 12 ml.	
Kadar SGPT	Perubahan kadar SGPT tikus wistar jantan, dapat digunakan sebagai biomarker	Jumlah SGPT di dalam serum (U/L) yang diuji menggunakan spektrofotometer.	Rasio

G. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Pra-Perlakuan

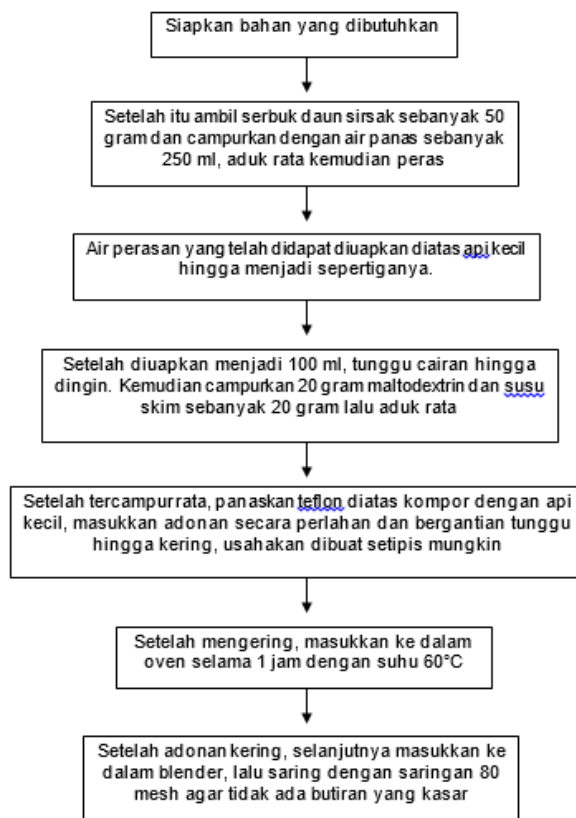
1.1. Pembuatan Simplisia Daun Sirsak (*Annona muricata L.*)

Daun sirsak diperoleh dari daerah jember. Setelah didapat daun sirsak langkah selanjutnya adalah proses pembuatan simplisia daun sirsak. Pembuatan simplisia daun sirsak dilakukan di Laboratorium IBM/ITP Poltekkes Malang. Proses ini dilakukan oleh peneliti yang didampingi oleh dosen PLP laboratorium

IBM/ITP Poltekkes Malang. Prosedur pembuatan simplisia daun sirsak dilakukan seperti berikut :

- a. Pengumpulan daun sirsak segar yang diperoleh dari daerah Jember kemudian ditimbang
- b. Daun sirsak dibersihkan menggunakan air bersih dengan 2 kali pembilasan
- c. Daun sirsak diangin-anginkan tanpa terkena cahaya matahari langsung hingga tidak terlihat basah
- d. Daun sirsak dipotong menjadi kecil 3 – 5 cm untuk panjang dan lebarnya
- e. Daun sirsak dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60⁰C selama 70 menit
- f. Daun sirsak diblender hingga setengah halus
- g. Diperoleh sampel daun sirsak

1.2. Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata L.*)



Gambar 9. Alur pembuatan ekstrak daun sirsak

1.3. Pembuatan Larutan DMBA

Pembuatan larutan Dimetilbenz Antrasen (DMBA) dibuat dengan melarutkan DMBA pada minyak jagung dengan perbandingan 3 : 1 (Ariyanti,

2013). DMBA diberikan secara injeksi oleh PLP laboratorium biokimia menggunakan spuit 3 ml dan jarum suntik 1-1/2 inchi. Dosis DMBA yang digunakan yaitu sebanyak 20 mg/kgBB dengan frekuensi pemberian sebanyak 2 kali seminggu (hari senin dan kamis) selama 5 minggu pada setiap mencit kecuali kontrol negatif.

Perhitungan volume induksi DMBA diperoleh dari rumus Ariyanti (2013) yaitu berat tikus (m) dikali dengan dosis (d) dikali dengan perbandingan pelarut dan agen karsinogen (r). Berat tikus (m) adalah 50 gram, dosis DMBA (d) adalah 20 mg/kgBB, dan perbandingan minyak jagung dengan DMBA (r) adalah 1 ml / 3 mg. Sehingga diperoleh perhitungan berikut :

$$\begin{aligned} \text{Volume induksi DMBA} \\ &= m \times d \times r \\ &= 50 \text{ gr} \times 20 \text{ mg/kgBB} \times (1 \text{ ml} / 3 \text{ mg}) \\ &= 1 \text{ mg} \times (1 \text{ ml} / 3 \text{ mg}) \\ &= 0,34 \text{ ml} \end{aligned}$$

Volume induksi tersebut digunakan untuk tikus dengan berat 50 gram. Seiring bertambahnya waktu berat tikus bertambah dan volume induksi DMBA juga bertambah. Volume induksi DMBA disesuaikan oleh rumus di atas.

1.4. Persiapan Kandang Hewan Coba

Sebelum dilakukannya penelitian, peneliti terlebih dahulu mempersiapkan tempat untuk pemeliharaan tikus wistar berupa kandang yang berukuran 40 x 30 cm berbahan plastik dan diberi penutup yang terbuat dari kawat. Kemudian kandang tersebut diberi alas berupa sekam. Setiap minggu sekam diganti dua kali. Hal ini ditujukan agar tikus terhindar dari penyakit yang dapat mengancam kesehatannya.

Sebelum menempatkan kandang hewan coba dilakukan pembersihan ruangan laboratorium hewan coba terlebih dahulu. Ketika penelitian berlangsung pembersihan ruangan hewan coba dilakukan oleh *cleaning service* yang ditugaskan khusus untuk membersihkan ruangan laboratorium hewan coba. Proses pembersihan laboratorium hewan coba dilakukan setiap hari di waktu sore. Ruangan laboratorium hewan coba diatur pada suhu ruang yaitu 20 – 25°C. Hal ini ditujukan agar hewan coba mampu beradaptasi di lingkungan laboratorium dengan cepat.

2. Proses Perlakuan

2.1. Pemilihan Hewan Coba

Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus wistar yang diperoleh dari supplier daerah Singosari, kabupaten Malang. Tikus Wistar berjenis kelamin jantan dipilih sebagai objek percobaan penelitian ini. Sebelum tikus Wistar diterima, dilakukan proses pengecekan kesehatan yang dilakukan oleh dokter hewan tersertifikasi. Hal ini dilakukan untuk mencegah penularan penyakit ketika penelitian berlangsung. Setelah dinyatakan sehat selanjutnya dilakukan tawar menawar harga. Kemudian terpilih 40 ekor tikus sebagai populasi hewan coba penelitian ini. Tikus Wistar dikirim menuju laboratorium hewan coba secara hati-hati. Langkah selanjutnya setelah tikus datang di laboratorium hewan coba adalah dilakukannya penimbangan berat badan tikus satu per satu oleh tim peneliti.

2.2. Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Proses penimbangan berat badan tikus dilakukan oleh tim peneliti setiap minggu selama 6 minggu. Penimbangan berat badan tikus pada awal penelitian dilakukan untuk menyeleksi tikus yang sesuai kriteria inklusi dan eksklusi. Kemudian penimbangan berat tikus pada minggu berikutnya ditujukan untuk memantau kesehatan tikus serta untuk menentukan volume induksi DMBA dan volume pemberian ekstrak daun sirsak. Proses penimbangan berat tikus dilakukan di laboratorium pemeliharaan hewan coba Poltekkes Malang. Penimbangan berat badan tikus dilakukan oleh peneliti menggunakan timbangan digital. Data berat badan tikus dicatat dalam data karakteristik pada tiap kelompok perlakuan.

Prosedur penimbangan berat badan tikus adalah sebagai berikut :

- a. Peneliti menyiapkan timbangan digital yang digunakan untuk menimbang berat badan tikus
- b. Peneliti mengkalibrasi timbangan digital tersebut dengan menggunakan botol air mineral tanggung 1,5 L yang telah diisi air
- c. Untuk menghindari tikus kabur ketika penimbangan dilakukan maka dilakukan menimbang sebuah kotak untuk wadah penimbangan terlebih dahulu kemudian menekan tombol tare
- d. Selanjutnya tikus dimasukkan wadah penimbangan untuk ditimbang
- e. Hasil berat tikus dicatat di buku tulis dan di aplikasi excel
- f. Penimbangan dilakukan berkala setiap minggu.

2.3. Adaptasi Hewan Coba

Proses adaptasi hewan dilakukan agar hewan coba dapat menyesuaikan diri dengan lingkungannya dan menghindari stres yang dapat mengakibatkan tikus mati seketika. Proses adaptasi dimulai setelah proses penimbangan awal tikus selesai. Adaptasi dilakukan selama 7 hari penuh. Pada masa adaptasi, tikus dipisah untuk 1 kandang diberi 1 ekor tikus. Tikus ditempatkan dalam 1 ruangan yang telah disiapkan suhu dan kelembabannya. Suhu ruangan diatur pada suhu ruang yaitu 20-25°C.

Pada masa adaptasi tikus masih dalam satu golongan, artinya pemberian pakan dan minum diberikan sama merata. Penempatan kandang tikus satu dengan lainnya didekatkan agar tikus mampu berinteraksi satu sama lain. Setelah penempatan posisi kandang tikus dilakukan, selanjutnya memberi label nomor secara acak. Label nomor ditulis dan ditempelkan di setiap kandang untuk mempermudah proses pencatatan. Setelah masa adaptasi selesai selanjutnya dilakukan masa perlakuan.

2.4. Pemberian Pakan

Pemberian pakan tikus dilakukan oleh peneliti setiap pagi hari. Pakan tikus diberikan sama rata untuk seluruh kelompok hewan coba. Pemberian pakan tikus dilakukan secara bertahap dimulai dari masa adaptasi hingga masa perlakuan. Pada masa adaptasi tikus diberi makan sentrat tikus sebanyak 10 gram untuk setiap ekor tikus. Selanjutnya pada masa perlakuan yaitu hari ke-8 dimulai peningkatan pemberian pakan yaitu sebanyak 30 gram untuk setiap ekor tikus.

Pemberian pakan ditingkatkan kembali apabila ditemukan banyak tikus yang memakan habis pakannya setiap hari selama seminggu penuh. Hal ini dilakukan untuk memastikan tikus mendapatkan cukup nutrisi untuk mendukung pertumbuhannya. Namun, jika tidak ditemukan sisa pakan habis, maka dosis pakan tetap sesuai dengan pemberian sebelumnya. Proses untuk mengetahui apakah sisa pakan habis atau tidak ditentukan dengan menimbang sisa pakan tikus setiap hari setelah waktu makan. Pengukuran ini dilakukan secara rutin untuk memastikan dosis pakan yang diberikan tetap optimal bagi kondisi tikus.

2.5. Penimbangan Sisa Pakan

Penimbangan sisa makan tikus dilakukan oleh peneliti setiap hari sebelum memberi pakan untuk hari berikutnya. Prosedur penimbangan sisa pakan tikus yaitu :

- a. Peneliti menyiapkan timbangan digital yang digunakan untuk menimbang sisa pakan tikus
- b. Peneliti mengkalibrasi timbangan digital tersebut dengan menggunakan botol air mineral tanggung 1,5 L yang telah diisi air
- c. Peneliti menyiapkan wadah untuk alas menimbang kemudian klik tombol tare
- d. Pakan ditimbang dan dicatat di buku tulis dan di aplikasi excel
- e. Penimbangan dilakukan berkala setiap hari sebelum memberi pakan yang baru

Setelah sisa pakan ditimbang dan dicatat, sisa pakan dibuang ke tempat pembuangan khusus organik. Tikus diberikan pakan yang baru dengan berat 10 gram per tikus ketika proses adaptasi dan 30 gram per tikus ketika proses perlakuan dimulai. Langkah tersebut dilakukan setiap hari hingga penelitian selesai.

2.6. Pemberian Minum Tikus

Pemberian minum tikus dilakukan oleh tim peneliti setiap pagi hari. Air minum yang digunakan adalah air mineral siap minum. Minuman tikus ditempatkan pada tempat minum tikus yang berbentuk seperti dot bayi berbahan plastik kaca. Setiap hari minuman tikus diganti setelah dilakukan penimbangan sisa minum tikus. Wadah minum tikus dibersihkan dengan sikat setiap hari.

Dosis pemberian minum tikus yaitu 30 ml per ekor tikus. Pada masa adaptasi semua kelompok percobaan hanya diberikan air mineral saja. Pada masa perlakuan dimulai diberikan beberapa dosis tertentu sebagai perlakuan pada hewan coba. Pada masa ini kelompok kontrol baik positif maupun negatif tetap diberi 30 ml air mineral untuk 1 ekor tikus. Kelompok perlakuan P1 diberi 30 ml air mineral yang telah dicampur dengan 1000 mg/kgBB ekstrak daun sirsak. Kelompok perlakuan P2 diberi 30 ml air mineral yang telah dicampur dengan 1500 mg/kgBB ekstrak daun sirsak. Kelompok perlakuan P3 diberi 30 ml air mineral yang telah dicampur dengan 3000 mg/kgBB ekstrak daun sirsak. Proses ini dilakukan pada minggu ke-2 hingga minggu ke-6.

2.7. Penimbangan Sisa Minum

Penimbangan sisa minum tikus dilakukan oleh peneliti setiap hari sebelum memberi minum untuk hari berikutnya. Prosedur penimbangan sisa pakan tikus yaitu :

- a. Peneliti menyiapkan timbangan digital yang digunakan untuk menimbang sisa minum tikus
- b. Peneliti mengkalibrasi timbangan digital tersebut dengan menggunakan botol air mineral tanggung 1,5 L yang telah diisi air
- c. Peneliti menyiapkan wadah untuk alas menimbang kemudian klik tombol tare
- d. Minuman tikus ditimbang dan dicatat di buku tulis dan di aplikasi excel
- e. Penimbangan dilakukan berkala setiap hari sebelum memberi minum yang baru

Setelah sisa minum tikus ditimbang dan dicatat, sisa minum dibuang ke tempat pembuangan. Tikus diberikan minuman yang baru dengan berat 30 mL per tikus. Langkah tersebut dilakukan setiap hari hingga penelitian selesai.

2.8. Pembagian Kelompok Hewan Coba

Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 ekor. Tikus dimasukkan ke dalam kandang dengan kapasitas 1 ekor tikus mendapat 1 kandang. Tiap kandang diberikan kode berupa nomor. Kemudian seluruh tikus tersebut diaklimatisasi selama 7 hari. Selanjutnya tikus dipilih secara acak dan dikelompokkan menjadi 5 kelompok. Masing-masing kelompok perlakuan berjumlah 6 ekor tikus wistar dengan nomor acak.

Pembagian kelompok pada penelitian ini terdiri dari : (1). Kelompok kontrol negatif atau K- adalah tikus yang tidak diberi perlakuan apapun hingga minggu ke-6. (2). Kelompok kontrol positif atau K+ yaitu tikus yang hanya diinduksi DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB yang diberikan 2 kali seminggu mulai dari minggu ke-2 hingga ke-6 tanpa pemberian ekstrak daun sirsak. (3). Kelompok perlakuan 1 atau P1 adalah tikus yang diinduksi DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB yang diberikan 2 kali seminggu mulai dari minggu ke-2 hingga ke-6 kemudian diberikan ekstrak daun sirsak sebanyak 1000 mg/kgBB setiap hari mulai dari minggu ke-2 hingga ke-6. (4). Kelompok perlakuan 2 atau P2 adalah tikus yang diinduksi DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB yang diberikan 2 kali seminggu mulai dari minggu ke-2 hingga ke-6 kemudian diberikan ekstrak daun sirsak sebanyak 1500 mg/kgBB setiap hari mulai dari minggu ke-2 hingga ke-6. (5). Kelompok perlakuan 3 atau P3 adalah tikus yang diinduksi DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB yang diberikan 2 kali seminggu mulai dari minggu ke-2 hingga ke-6 kemudian diberikan ekstrak daun sirsak sebanyak 3000 mg/kgBB setiap hari mulai dari minggu ke-2 hingga ke-6.

2.9. Perhitungan Dosis Ekstrak Daun Sirsak

Dosis yang tepat untuk penyakit kanker pada manusia dalam bentuk serbuk daun sirsak sebanyak 3 – 5 gram atau sama dengan 10 lembar rebusan daun sirsak per hari (Wijaya, 2012). Apabila dosis tersebut diterapkan pada manusia dengan berat badan 70 kg, maka diperoleh dosis serbuk daun sirsak untuk manusia (D_M) menjadi $(70/50) \times 3 \text{ gram} = 4,2 \text{ gram}$. Pada penelitian ini serbuk daun sirsak diberikan pada tikus dengan berat 50 gram (m_1). Perhitungan dosis serbuk daun sirsak pada tikus (D_T) menggunakan rumus Suhardjono (1995) dengan penetapan faktor konversi (FK) dari manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat 200 gram (m) yaitu 0,018. Kemudian didapat hasil sebagai berikut :

$$D_T = D_M \times FK$$

$$D_T = 4,2 \text{ gram} \times 0,018$$

$$D_T = 0,0756 \text{ gram}$$

Hasil tersebut menggunakan tikus dengan berat 200 gram, kemudian dicari dosis khusus tikus dengan berat 50 gram dari rumus Suhardjono (1995) sebagai berikut :

$$D_T' = \frac{m_1}{m} \times D_T$$

$$D_T' = \frac{50}{200} \times 0,0756 \text{ gram}$$

$$D_T' = 0,0189 \text{ gram}$$

Maka didapat dosis minimal serbuk daun sirsak untuk tikus dengan berat 50 gram ialah sebanyak 18,9 mg. Berbagai penelitian terdahulu menggunakan dosis terendah ekstrak etanol daun sirsak yaitu sebanyak 100 mg/kgBB terbukti mampu mencegah proliferasi sel kanker (Adelina dkk., 2014) dan menurunkan SGPT tikus (Ariyanti, 2013). Pada penelitian tersebut menggunakan etanol sebagai pelarut ekstrak daun sirsak. Pada penelitian ini digunakan air sebagai pelarut dalam ekstrak daun sirsak. Dosis rendah yang digunakan adalah 1000 mg.

Pada penelitian ini menggunakan tiga dosis yang berbeda yaitu :

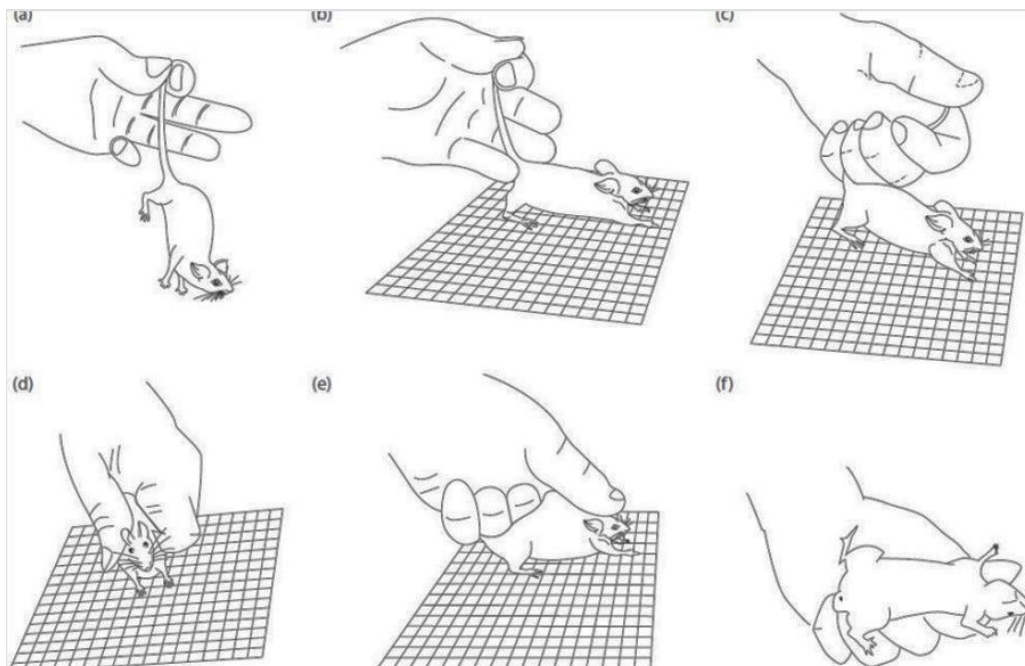
- a. Dosis I : 1000 mg per hari
- b. Dosis II : 1500 mg per hari
- c. Dosis III : 3000 mg per hari.

2.10. Penginduksian DMBA

Adaptasi tikus diberikan selama 7 hari, setelah itu tikus pada perlakuan K+, P1, P2, dan P3 diinduksi DMBA oleh PLP laboratorium biokimia di laboratorium pemeliharaan hewan coba. Penyuntikan DMBA diberikan dosis yang diberikan yaitu 20 mg/kgBB secara intraperitoneal. Penyuntikan DMBA dilakukan dengan prosedur penanganan tikus.

Prosedur penanganan tikus meliputi :

- a. Gunakan alat pelindung diri antara lain jas lab, masker, penutup kepala dan sarung tangan.
- b. Selalu mencuci tangan sebelum dan setelah melakukan praktikum.
- c. Cara memegangnya yaitu dengan mengangkat tikus dengan cara memegang ekornya kearah atas dengan tangan kiri, dimiringkan 45 derajat.
- d. Kemudian, tangan kiri, ibu jari dan jari telunjuk menjepit kulit tengkuk tikus seerat/setegang mungkin.
- e. Lalu, menjepit ekor diantara jari kelingking dan jari manis tangan kiri.
- f. Tikus telah terpegang oleh tangan kiri dan siap untuk diberi perlakuan (induksi DMBA).



Gambar 10. Prosedur Pemegangan Tikus Wistar (Stevani, 2016)

Pemberian DMBA dalam dosis 20 mg/kgBB tikus selama 5 minggu dapat menyebabkan perubahan fungsi hati dan terjadinya nekrosis sel hati (Alisah, dkk., 2014). Penyuntikan dilakukan oleh PLP laboratorium biokimia pada setiap hari senin dan kamis.

2.11. Pemberian Ekstrak Daun Sirsak

Pemberian ekstrak daun sirsak dilakukan pada minggu ke-2 hingga minggu ke-6 di laboratorium pemeliharaan hewan coba. Peneliti memberikan ekstrak daun sirsak ke tikus dalam bentuk minuman cair dalam dosis yang telah ditentukan. Sebelum memberikan minuman ekstrak daun sirsak ke tikus, minuman terlebih dahulu ditimbang. Penimbangan minuman dilakukan setiap sebelum dan sesudah diberikan ke tikus. Minuman tikus ditimbang setiap pagi hari menggunakan timbangan digital oleh peneliti. Minuman tikus diperbarui setiap hari sehingga tikus terhindar dari penyakit infeksi. Pemberian ekstrak daun sirsak dilakukan dengan mencampurkan air mineral dan ekstrak daun sirsak kemudian diberikan pada tikus sebagai minumannya.

Ekstrak daun sirsak diberikan pada kelompok P1, P2, dan P3 sesuai dosis masing-masing perlakuan. Pada kelompok P1 diberikan dosis air 30 ml dicampur dengan 1000 mg/kgBB ekstrak daun sirsak. Pada kelompok P2 diberikan dosis air 30 ml dicampur dengan 1500 mg/kgBB ekstrak daun sirsak. Pada kelompok P3 diberikan dosis air 30 ml dicampur dengan 3000 mg/kgBB ekstrak daun sirsak.

2.12. Prosedur Pembedahan

2.12.1. Anestesi Hewan Coba

Sebelum proses pembedahan dilakukan tikus wistar jantan dianestesi dengan metode anestesi inhalasi yaitu menggunakan bahan kimia berupa kloroform. Anestesi dilakukan oleh analis laboratorium di laboratorium pemeliharaan hewan coba. Proses anestesi dilakukan dengan cara memasukkan hewan coba ke dalam toples kaca yang berisi kapas yang sudah dicampur dengan kloroform (IACUC, 2015). Kloroform dituang pada kapas sebanyak 10 ml, dan dimasukkan dalam toples kaca. Pengamatan dilakukan terhadap pernafasan dan denyut jantung tikus ditambah 15 detik, apabila tikus sudah tidak agresif, maka sudah dapat dilakukan pembedahan dan pengambilan darah, dimana pada prinsipnya tikus harus terhindar dari rasa sakit (Ridwan, 2013). Setelah proses anestesi dilakukan, selanjutnya adalah proses pembedahan dan pengambilan sampel darah tikus.

2.12.2.Pembedahan dan Pengambilan Sampel Darah Tikus

Proses pembedahan dilakukan oleh PLP laboratorium dengan tim peneliti di laboratorium pemeliharaan hewan coba. Proses ini dilakukan pada minggu ke-6 ketika telah selesai pemberian perlakuan pada tikus untuk uji kadar SGPT tikus kanker setelah diberikan perlakuan ekstrak daun sirsak. Banyak tikus yang dibedah yaitu sebanyak 6 ekor tikus tiap kelompok dengan total 30 ekor tikus. Proses ini diawali dengan pengelompokan tikus mulai dari kelompok K- hingga P3. Kemudian dilanjutkan dengan proses pembedahan dan pengambilan sampel darah tikus.

Pada penelitian ini dilakukan prosedur pembedahan dan pengambilan sampel darah tikus wistar oleh PLP laboratorium menggunakan metode yang telah dipraktekkan oleh Mahyan, dkk. (2016). Prosedur dimulai dengan pengambilan tikus sesuai kelompok perlakuan. Tikus diberikan anestesi menggunakan kloroform hingga tikus pingsan. Kemudian, tikus ditelentangkan pada meja bedah dengan posisi kaki dan tangan dibuka selebar mungkin. Kaki dan tangan tikus dikunci dengan menggunakan jarum pentul. Bagian dada hingga perut tikus dibedah menggunakan alat bedah, kemudian diambil darahnya melalui jantung tikus menggunakan spuit. Darah yang diambil dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Sampel darah dikeluarkan dari sentrifugal, diambil serumnya dan dimasukkan ke dalam tabung vacutainer warna merah. Serum darah tikus disimpan dalam freezer dengan suhu -20°C . Serum darah tikus dikeluarkan dari freezer apabila ingin melakukan pengujian kadar SGPT.

2.12.3.Pengukuran Kadar SGPT

Pengukuran kadar SGPT dilakukan menggunakan metode IFCC (1980) kemudian dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 365 nm. Prosedur pengukuran dimulai dengan pemipetan serum darah tikus sebanyak 20 – 100 μL , kemudian dimasukkan pada tabung *ependorf*. Kemudian ditambahkan reagen SGPT sebanyak 1000 μL , dicampur dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit. Serapan dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 365 nm. Pembacaan dilakukan hingga tiga kali tepat setiap satu menit. Hasil selisih serapan pada tiap pengukuran dirata-rata, kemudian dihitung kadar SGPTnya (Andriani, 2008). Data hasil pengukuran SGPT pada tiap kelompok dicatat, kemudian diolah dan dianalisis hasilnya.

3. Prosedur Pasca Perlakuan

3.1. Pembersihan dan Pembuangan Alat

Setiap hari setelah selesai penimbangan sisa pakan dan minum, tim peneliti mencuci tempat pakan dan minum menggunakan air mengalir. Pada alat yang mempunyai noda membandel dibersihkan dengan sikat khusus. Sisa pakan dan minum dibuang pada plastik kresek hitam dan dibedakan di tempat sampah organik. Alat lain yang digunakan untuk menimbang dan mengukur sisa pakan dan minum seperti spuit dan timbangan dibersihkan juga. Spuit dicuci bersih dengan air mengalir kemudian dikeringkan untuk digunakan kembali di hari esok. Timbangan dibersihkan hanya dengan menggunakan lap dan tisu yang semi-basah.

Prosedur penanganan setelah pemberian perlakuan induksi DMBA adalah pembuangan alat. Setelah induksi DMBA dilakukan tikus dikembalikan ke kandang sesuai kode nomor masing-masing sedangkan alat yang digunakan untuk induksi DMBA dibuang ke tempat sampah khusus medis. Sampah khusus medis ini dikumpulkan oleh *cleaning service* ruangan laboratorium hewan coba untuk dibakar. Khusus untuk jarum suntik dan spuit yang digunakan untuk induksi DMBA dibedakan tempat pembuangannya. Sampah jenis ini dikubur di tempat khusus.

3.2. Penanganan Pasca Pembedahan

Tikus setelah dibedah perutnya dan diambil sampel darahnya langsung ditelungkupkan dengan posisi kepala menyentuh pangkal ekor. Hal ini dilakukan untuk mencegah isi perut tikus berceceran di lantai. Setelah itu bangkai tikus dikumpulkan ke plastik kresek warna hitam untuk mempermudah proses penguburannya. Setelah selesai pembedahan bangkai tikus dikubur di tempat khusus penguburan hewan coba. Tikus yang telah dikubur ditandai dengan penanda sederhana untuk memastikan lokasi penguburannya mudah ditemukan jika diperlukan pemeriksaan ulang.

Alat-alat yang digunakan untuk pembedahan dibedakan sesuai waktu pemakaian. Alat yang sekali pakai dibuang di tempat sampah khusus medis dan dikubur di tempat khusus. Sedangkan alat yang bisa digunakan kembali dicuci dan disterilkan kembali menggunakan alkohol swab. Setelah dicuci dan disterilkan, alat-alat tersebut disimpan di tempat tertutup untuk menjaga

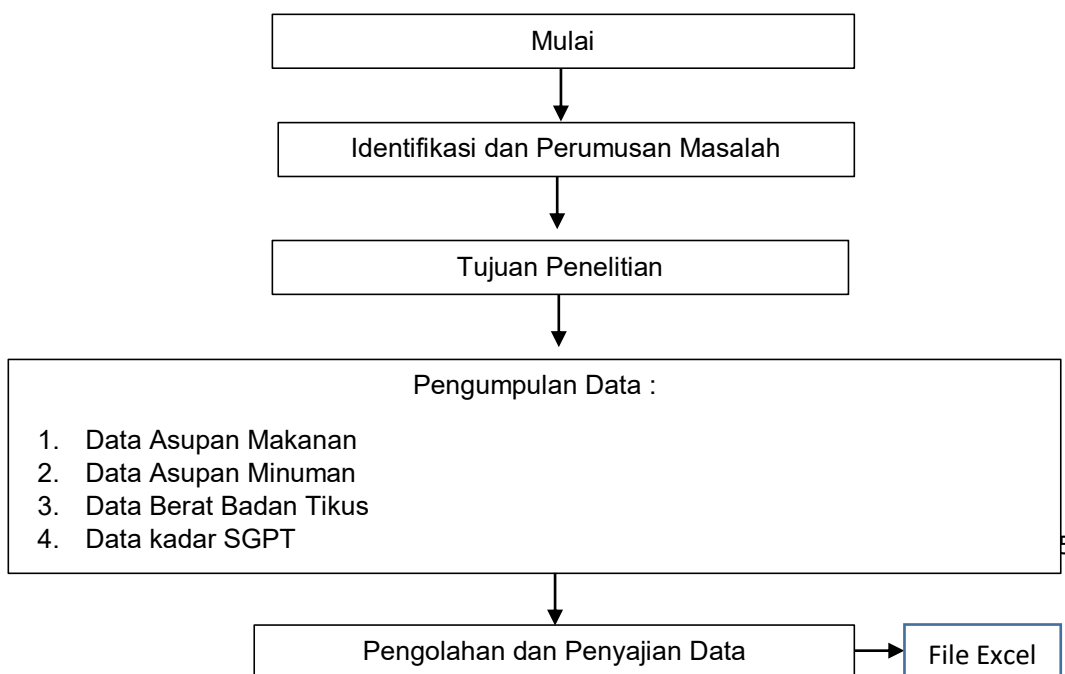
kebersihannya. Prosedur ini dilakukan untuk memastikan alat-alat tetap higienis dan siap digunakan pada penelitian selanjutnya.

Pada sisa darah yang menempel pada meja bedah dilap dengan tisu dan dibuang jika belum mengering. Jika noda darah telah mengering dikerik menggunakan *cutter* dan dibilas dengan sabun. Lantai yang kotor dengan bercak-bercak darah langsung dipel menggunakan alat pel dan sabun pel sehingga terjaga kebersihannya. Setelah semua permukaan dibersihkan, area kerja disemprot dengan disinfektan untuk memastikan tidak ada bakteri atau virus yang tersisa. Proses ini dilakukan secara menyeluruh agar ruangan tetap steril dan aman untuk digunakan kembali.

Prosedur selanjutnya yaitu pembuangan sisa darah setelah selesai analisis kadar SGPT darah tikus. Setelah selesai analisis kadar SGPT tikus, sampel darah dibuang beserta tabung reaksi yang telah digunakan. Tempat pembuangan juga dibedakan khusus tempat sampah medis. Sampah hasil analisis sampel darah tikus dikubur di tempat khusus. Proses pembuangan ini dilakukan sesuai dengan protokol pengelolaan limbah medis untuk mencegah kontaminasi dan menjaga lingkungan tetap aman.

Tempat khusus untuk penguburan bangkai tikus dan sampah-sampah medis diberi tanda agar terhindar dari hal-hal yang tidak diinginkan. Penguburan bangkai tikus dan sampah medis dilakukan sedalam 1/2 meter agar tidak terjamah hewan pemakan bangkai dan dari tangan-tangan yang tidak bertanggung-jawab. Setelah proses penguburan selesai maka penanganan pasca pembedahan selesai.

4. Diagram Alir Penelitian



H. Metode Pengumpulan Data

1. Asupan Makanan

Asupan makanan tikus diperoleh dari selisih berat makanan yang dihitung setiap hari sebelum pemberian makan dihari selanjutnya. Cara menghitungnya yaitu dengan melihat selisih berat makanan yang diberikan dengan berat makanan yang tersisa.

2. Asupan Minuman

Asupan minuman tikus dihitung setiap hari sebelum pemberian minuman dimulai pada hari kedua dengan cara menghitung selisih volume minuman yang diberikan dengan minuman yang tersisa.

3. Berat Badan Tikus

Berat badan tikus diperoleh dari hasil penimbangan tikus setiap minggu menggunakan timbangan.

4. Kadar SGPT

Data kadar SGPT serum diperoleh dari pemeriksaan laboratorium pada sampel serum tikus saat pembedahan. Penelitian data kadar SGPT dilakukan dengan metode spektrofotometri.

I. Metode Analisis Data

Data yang terkumpul dilakukan editing, coding, dan tabulasi. Semua data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk nilai rata-rata \pm standar deviasi (Mean \pm SD). Data diolah menggunakan program SPSS, kemudian dilakukan beberapa uji, antara lain :

1. Uji Normalitas Data

Hasil penelitian yang berdistribusi normal dengan uji *Saphiro Wilk* didapatkan data yang berdistribusi normal ($p > 0,05$) adalah data asupan minuman dan berat badan tikus, sedangkan data yang tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$) adalah data asupan makanan dan kadar SGPT.

2. Uji Varians

Uji varians (Leven's Test) digunakan untuk mengetahui homogenitas dari dua atau lebih kelompok. Apabila $p > 0,05$ maka homogenitas sama. Beberapa data yang memiliki data homogen yaitu data berat badan tikus dan asupan minum tikus.

3. Uji Hipotesis

Uji hipotesis kadar SGPT pada kelompok perlakuan yang terdistribusi normal dan varians data homogen menggunakan uji parametrik One Way ANOVA atau sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan. Beberapa data yang menggunakan uji One Way ANOVA yaitu data berat badan tikus dan asupan minum tikus. Sedangkan untuk data yang tidak berdistribusi normal digunakan uji Kruskal Wallis. Beberapa data yang menggunakan uji Kruskal Wallis yaitu data berat badan tikus dan data asupan minuman tikus.

4. Uji Post Hoc (Lanjutan)

Uji post hoc bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan, sehingga dapat diketahui kelompok perlakuan yang memiliki pengaruh terhadap data-data yang teruji (berat badan, asupan makan, asupan minum, dan kadar SGPT). Terdapat perbedaan nyata dari uji One Way ANOVA dengan hasil $p < 0,05$ dan dilanjutkan dengan uji beda Duncan Multiple Range Test (DMRT) yaitu pada data asupan minum tikus dan data berat badan tikus.

J. Hipotesis Statistika

Pada penelitian ini terdapat dua macam hipotesis penelitian yaitu :

H_0 : terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak terhadap penurunan kadar SGPT tikus wistar jantan yang diinduksi DMBA.

H_1 : tidak terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak terhadap penurunan kadar SGPT tikus wistar jantan yang diinduksi DMBA.

K. Instrumen Analisis Data Penelitian

Instrumen untuk analisis data antara lain kalkulator scientific, komputer dengan program Microsoft word, Microsoft excel, dan SPSS serta alat tulis.

L. Persetujuan Etik

Penelitian ini dilaksanakan atas persetujuan laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Politeknik Kesehatan Malang, tanggal 02 Agustus 2024, Reg. No. 809 / KEPK-POLKESMA/ 2024 (Lampiran 2).