

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong yang diperoleh di daerah desa Wuryorejo kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah. Sampel daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) diambil daun yang berwarna hijau tidak terlalu tua, dari tanaman singkong yang diperoleh di daerah desa Wuryorejo kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah dan terbebas dari hama pada bulan Maret tahun 2013.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah pengaruh pemberian ekstrak etanol daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) terhadap peningkatan jumlah trombosit.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel kendali.

Variabel bebas yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung,

sedangkan variabel tergantung dalam penelitian ini adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat.

2.1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanolik daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.).

2.2. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah trombosit darah pada hewan uji setelah perlakuan, dengan pemberian ekstrak etanolik daun singkong.

2.3. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kondisi pengukur / peneliti, laboratorium dan kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi berat badan, usia, lingkungan tempat hidup, jenis kelamin, dan galur.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, dosis ekstrak etanolik daun singkong adalah variasi dosis ekstrak daun singkong yang diperoleh dari daun singkong yang berwarna hijau tidak terlalu tua (didapatkan di desa Wuryorejo kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah pada bulan Maret tahun 2013) yang akan diujikan ke hewan uji.

Kedua, jumlah trombosit dalam darah hewan uji setelah perlakuan merupakan perubahan jumlah trombosit dalam sampel darah mencit yang diperoleh melalui vena lateralis ekor mencit. Jumlah trombosit akan dihitung dengan metode kamar hitung.

Ketiga, hewan percobaan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan, berumur 1-2 bulan, berat badan 18-20 g

Keempat, ekstrak etanolik daun singkong adalah ekstrak hasil penarikan sari dari daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) dengan cara soxhletasi dengan pelarut etanol 70%.

Kelima, penurunan jumlah trombosit merupakan efek dari pemberian Aspirin[®].

Keenam, efek peningkatan jumlah trombosit setelah pemberian ekstrak etanolik daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) dapat dilihat dari adanya peningkatan jumlah trombosit dalam darah mencit yang dibagi dalam kelompok uji, kontrol negatif, dan kontrol positif.

C. Bahan, Alat dan Hewan Percobaan

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) diambil dari desa Wuryorejo kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah.

Bahan penyari adalah etanol 70% sebagai pelarut dalam soxhletasi.

Bahan untuk identifikasi senyawa adalah, serbuk Mg, ethanol:asam klorida (1:1), amil alkohol, *aquadestilata*.

Bahan yang digunakan untuk uji peningkatan jumlah trombosit adalah reagen *Reese-Ecker*, EDTA, CMC 0,5% sebagai pensuspensi ekstrak etanolik.

Untuk kontrol negatif digunakan Aspirin[®] dan untuk kontrol positif digunakan PSIDII.

2. Alat

Alat yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak etanolik daun singkong adalah alat soxhlet dan *Thermostatic waterbath* dhh-6, untuk mengukur jumlah trombosit mencit menggunakan alat hemositometer *Improved Neubauer* dengan menerapkan metode kamar hitung. Alat lain yaitu *Moisture Balance* Ohaus MB 23, timbangan tikus, neraca analitik, jarum suntik, dan alat- alat gelas.

3. Hewan Percobaan

Binatang percobaan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan galur *Balb/c* dengan berat 18–20 g yang diperoleh dari laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah..

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Daun Singkong (*Manihot utilissima* Pohl.)

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah ditetapkan kebenaran sampel yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman secara makroskopis dari daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) dengan acuan buku Flora (Steenis CGGJ 1992). Determinasi dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistematika Tumbuhan Universitas Setia Budi.

2. Pembuatan Serbuk Daun Singkong

Daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 40°C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh.

3. Penetapan Susut Pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk daun singkong dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta, dengan cara serbuk ditimbang 2 gram, kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan menggunakan alat *moisture balance* oHaus MB 23, waktu yang diperlukan dalam pengukuran adalah 4 menit dan ditunggu sampai muncul angka dalam persen.

4. Pembuatan Ekstrak Etanolik Daun Singkong (*Manihot utilissima* Pohl.)

Ekstrak etanolik daun singkong diperoleh dengan menggunakan metode soxhletasi dengan pelarut etanol 70 %. Serbuk daun singkong seberat 50 g dibungkus kertas saring lalu diikat tali, kemudian dimasukkan ke dalam tabung soxhlet dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 2 kali sirkulasi lalu dihubungkan dengan pendingin balik serta pipa air. Larutan penyari yang terkumpul dalam badan soxhlet dan telah mencapai tinggi maksimum, otomatis akan turun ke dalam labu alas bulat. Ekstraksi dilakukan sampai cairan penyari menjadi jernih, dari hasil ekstraksi tersebut didapat ampas dan filtrat. Kemudian ekstrak cair yang diperoleh dikentalkan dengan menggunakan alat *Thermostatic waterbath* dhh-6 dengan pengaturan suhu pemanasan 85° C hingga mengental (Voigt 1994).

5. Identifikasi Senyawa Kimia Pada Ekstrak Etanolik Daun Singkong

Identifikasi kandungan senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan keberadaan senyawa kimia dalam ekstrak daun singkong. Identifikasi kandungan senyawa kimia meliputi senyawa flavonoid dan saponin.

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara: ditimbang sejumlah 100 mg ekstrak etanolik daun singkong kental ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan serbuk magnesium, 2 mL larutan etanol:asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol, campuran ini dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif jika terjadi warna merah/ kuning/ jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI 1995).

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara: 10 mL ekstrak etanolik daun singkong dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 10 mL air panas, lalu didinginkan. Dikocok kuat-kuat selama 10 detik, reaksi positif jika terbentuk buih yang mantap \pm 10 menit, setinggi 1-10 cm dan dengan penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang (Depkes RI 1987).

6. Penetapan Dosis

Volume maksimal larutan uji yang dapat diberikan pada mencit dengan berat badan 20 g secara oral sebesar 1,0 mL.

6.1. Dosis Aspirin[®]. Dosis yang digunakan sebagai antitrombosit adalah 80 mg. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 Kg ke mencit dengan berat badan 20 g adalah 0,0026. Dosis Aspirin[®] untuk mencit sebesar 0,208 mg/20 g BB.

6.2. Dosis PSIDII. Dosis PSIDII yang diberikan adalah 500 mg/70 Kg BB sebagai kontrol positif kemudian diubah ke dosis mencit menjadi 1,3 mg/ 20 g BB.

6.3. Dosis uji ekstrak etanolik daun singkong. Dosis yang diberikan kepada mencit kelompok IV, V, VI, VII masing-masing diberi dosis 25, 50, 100, 125 dan 150 mg/70 Kg BB. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 Kg ke mencit dengan berat badan 20 g adalah 0,0026. Dosis ekstrak etanolik untuk mencit kelompok IV, V, VI dan VI berturut-turut adalah sebesar 0,13 mg; 0,26 mg; 0,39 mg; 0,52 mg/20 g BB.

6.4. Pembuatan larutan CMC 0,5%. Larutan CMC 0,5% dibuat dengan cara melarutkan ± 500 mg CMC yang telah ditimbang seksama ke dalam air 100 mL. Larutan ini digunakan sebagai suspensi Aspirin[®], PSIDII dan ekstrak etanolik daun singkong

7. Perlakuan Hewan Uji

Hewan uji diaadaptasikan dengan lingkungan selama satu minggu. kemudian masing-masing ditimbang, lalu ditempatkan ke dalam kandang. Mencit yang digunakan sebanyak 35 ekor secara acak dibagi menjadi 7 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor dan diberi tanda pengenal pada ekor. Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan *Balb/c* berumur 1-2 bulan dengan berat badan 18-20 g.

Kelompok I sebagai kontrol normal diberikan air minum dan pakan standar BR II. Kelompok II sebagai kontrol negatif diberikan sediaan tunggal suspensi Aspirin[®] 0,208 mg/20 g BB mencit dan kelompok III sebagai kontrol

positif diberikan suspensi PSIDII sebesar 1,3 mg/20 g BB. Kelompok III, IV, V dan VI diberikan ekstrak etanolik daun singkong masing-masing 0,13 mg; 0,26 mg; 0,39 mg dan 0,52 mg/20 g BB

8. Penggunaan Metode Kamar Hitung

8.1. Prosedur penggunaan. Dihisap darah yang telah dicampurkan EDTA dengan pipet eritrosit sampai garis tanda 1 tepat. Kemudian hapus kelebihan darah yang melekat pada ujung pipet. Masukkan ujung pipet ke dalam *Rees-Ecker* sambil menahan darah pada garis tadi. Pipet dipegang dengan sudut 45° dan larutan *Rees-Ecker* dihisap perlahan sampai garis tanda 101. Jangan sampai ada gelembung udara. Angkat pipet dari cairan; tutup ujung pipet dengan ujung jari lalu lepaskan karet penghisap. Kocok pipet itu selama 3 menit. Buang cairan dari pipet 3-4 tetes dan segera sentuhkan ujung pipet dengan sudut 30° pada permukaan kamar hitung dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Biarkan kamar hitung itu terisi cairan dengan daya kapilernya. Biarkan kamar hitung itu 2-3 menit pada cawan petri yang telah berisi kapas basah supaya leukosit mengendap. Hitung jumlah trombosit dengan menggunakan lensa objektif perbesaran 40x pada 5 bidang kecil.

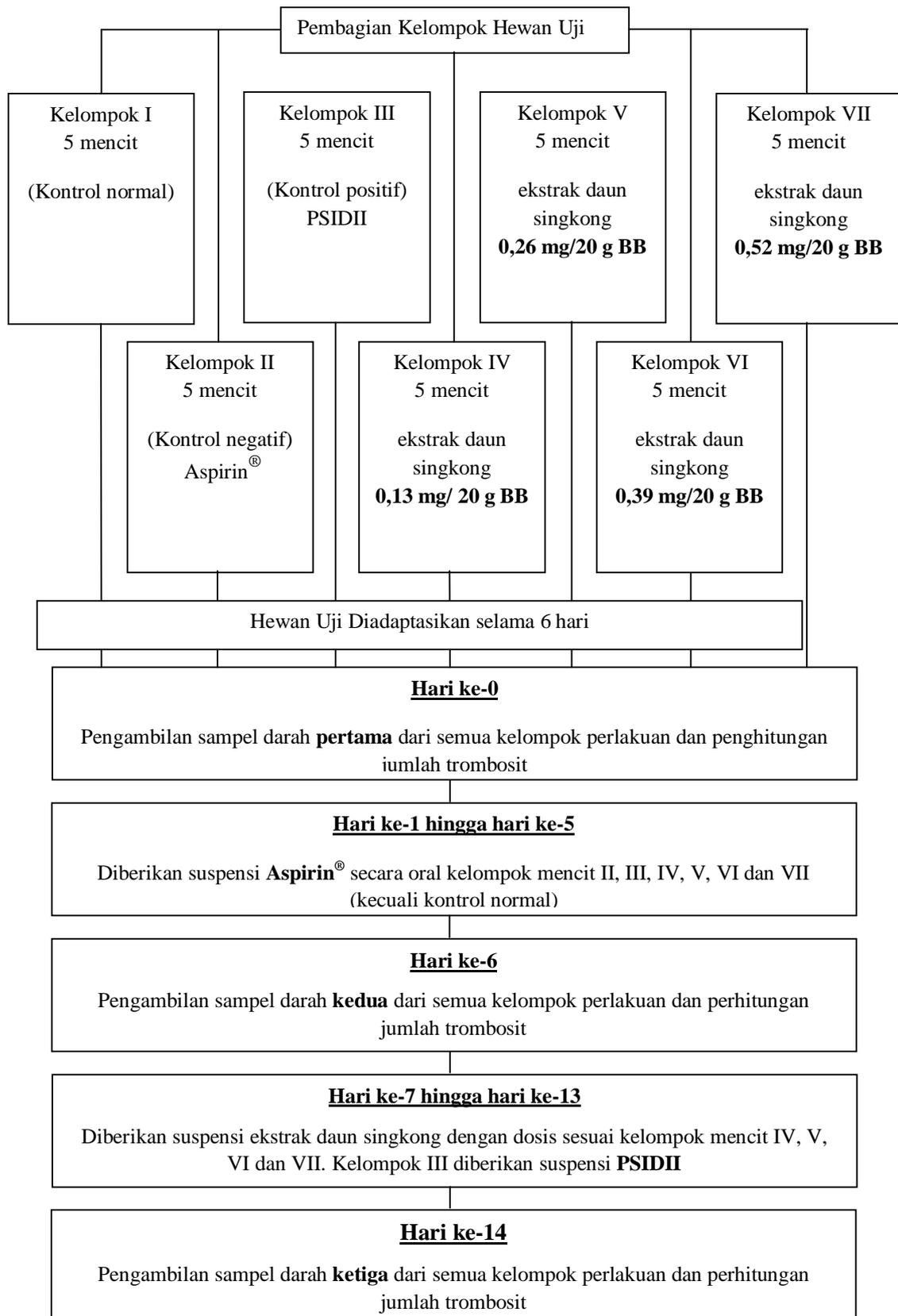
8.2. Prinsip Pengukuran. Darah diencerkan dalam pipet eritrosit, kemudian dimasukkan ke dalam kamar hitung. Jumlah trombosit dihitung dalam volume tertentu; dengan menggunakan faktor konversi jumlah trombosit per μL darah dapat diperhitungkan.

9. Prosedur Uji

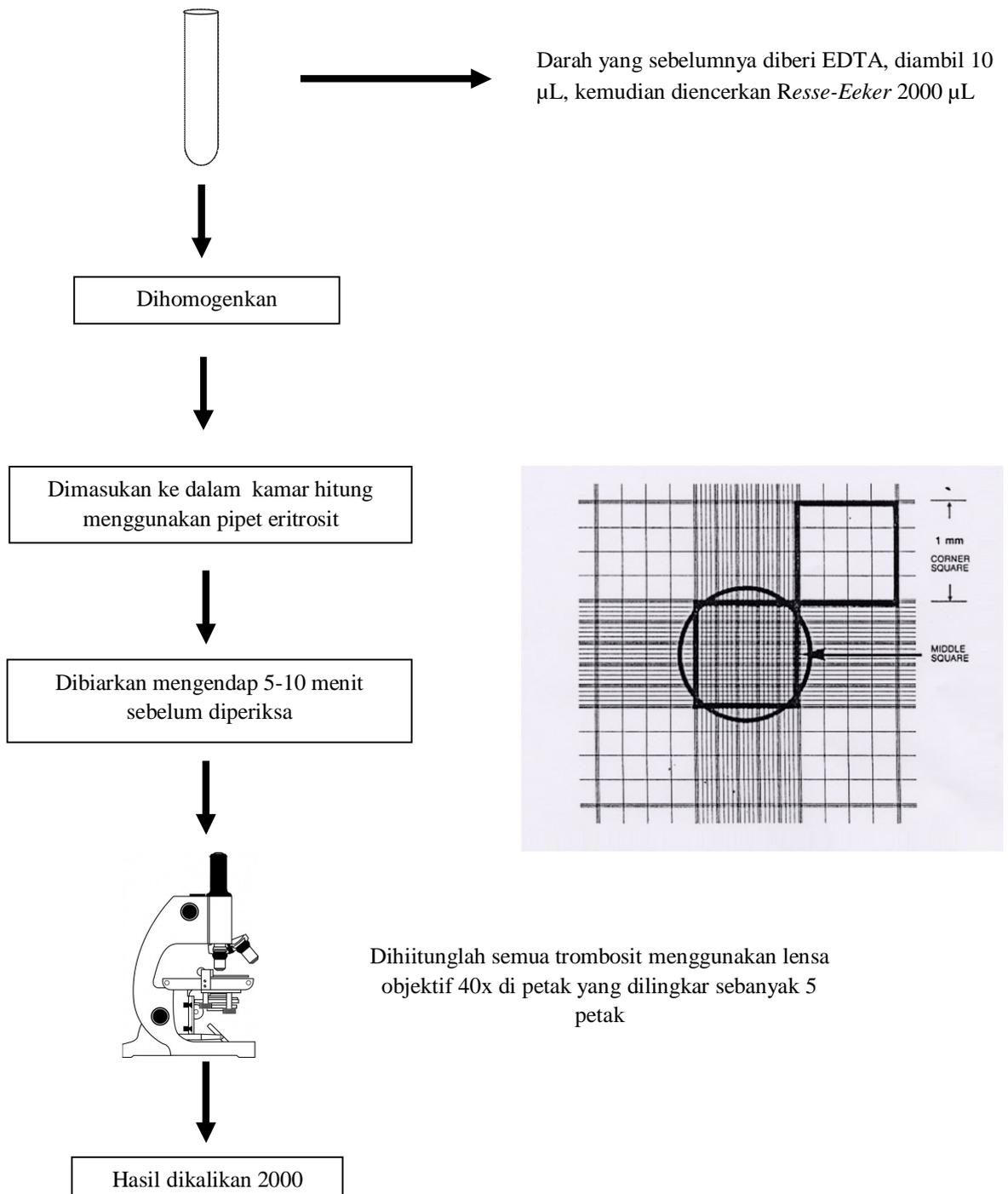
Pertama, dilakukan adaptasi untuk hewan uji selama 6 hari (belum dimulai hitungan hari penelitian). Hari ke-1 sampai hari ke-5 mencit diberikan Aspirin[®] dengan dosis 0,208 mg/20 g BB per hari kecuali kelompok I sebagai kontrol normal. Pada hari ke-13 dilakukan pengambilan darah hewan uji dari semua kelompok perlakuan. Hari ke-7 sampai hari ke-13 kelompok IV, V, VI dan VII diberi dosis ekstrak etanolik daun singkong masing-masing 0,13 mg; 0,26 mg; 0,39 mg dan 0,52 mg/20 g BB dan kelompok III diberi suspensi PSIDII sebesar 1,3 mg/ 20 g BB, kecuali kelompok I dan II. Ketiga, pada hari ke-14 diambil lagi darah semua kelompok hewan uji untuk dihitung jumlah trombositnya. Keempat, dilakukan penghitungan jumlah trombosit dengan menggunakan metode kamar hitung.

E. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini akan dipilih berdasarkan data yang diperoleh. Uji *Kruskal-Wallis* kemudian dilanjutkan uji *Pos-Hoet* digunakan sebagai metode statistik penganalisa data untuk pembuktian hipotesis dan penentuan dosis efektif ekstrak etanolik daun singkong.



Gambar 3. Skema proses uji ekstrak etanolik daun singkong



Gambar 4. Skema perhitungan jumlah trombosit