

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pepaya yang diperoleh di kabupaten Boyolali, Jawa Tengah.

Sampel daun pepaya (*Carica papaya* L.) diambil daun berwarna hijau tidak terlalu tua yang diperoleh di kabupaten Boyolali, Jawa Tengah

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah pengaruh pemberian ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L.) 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.** Variabel bebas dalam penelitian adalah dosis ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.).

**2.2. Variabel tergantung.** Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah trombosit dan waktu pembekuan darah pada hewan uji dengan pemberian ekstrak etanol daun pepaya.

**2.3. Variabel kendali.** 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, daun pepaya adalah daun pepaya yang diperoleh dari tanaman pepaya yang berwarna hijau tidak terlalu tua yang berasal dari daerah Boyolali.

Kedua, ekstrak etanol daun pepaya adalah ekstrak yang dihasilkan dari daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan cara maserasi dengan pelarut etanol 70%.

Ketiga, aspirin adalah obat yang digunakan untuk menginduksi terjadinya penurunan trombosit akibat pemberian dosis 13 mg/Kg BB tikus selama empat hari.

Keempat, jumlah trombosit adalah trombosit yang dihitung menggunakan alat hemositometer *Improved Neubauer*.

Kelima, waktu pembekuan darah adalah waktu dari tetes pertama darah di objek glass hingga terbentuknya benang fibrin pada tetes kedua darah yang dicatat sebagai waktu pembekuan darah.

## C. Bahan, Alat, dan Hewan Percobaan

### 1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pepaya (*Carica papaya* L.) diperoleh dari kabupaten Boyolali, Jawa Tengah. Pelarut yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol daun pepaya adalah etanol 70%. Bahan untuk identifikasi senyawa adalah serbuk Mg, asam klorida, amil alkohol, aquadesilata. Bahan yang digunakan untuk uji peningkatan jumlah trombosit adalah reagen *Reese-Ecker*, EDTA, CMC 0,5% sebagai pensuspensi ekstrak. Untuk kontrol negatif digunakan Aspirin<sup>®</sup> dan untuk kontrol positif digunakan PSIDII.

### 2. Alat

Alat yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak daun pepaya adalah wadah maserasi dan *rotary evaporator*, untuk mengukur jumlah trombosit mencit menggunakan alat hemositometer *Improved Neubauer* dengan menerapkan metode kamar hitung. Alat lain yaitu *moisture balance*, mikropipet, timbangan tikus, neraca analitik, jarum suntik, kaca objek, dan alat-alat gelas.

### **3. Hewan percobaan**

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

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi daun pepaya**

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah ditetapkan kebenaran sampel yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman secara makroskopis dari daun pepaya.

### **2. Pembuatan serbuk daun pepaya**

Daun pepaya dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 50°C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh.

### **3. Penetapan susut pengeringan**

Penetapan susut pengeringan serbuk daun pepaya dilakukan dengan cara serbuk ditimbang 2 gram, kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan menggunakan alat *moisture balance Ohaus MB 23*. Ditunggu hingga bobot akhir konstan alat akan secara otomatis berhenti dan muncul angka (dalam satuan %).

### **4. Pembuatan ekstrak etanol daun pepaya**

Sebanyak 500 gram serbuk daun pepaya dimaserasi dengan etanol 70% sebanyak 5000 ml di dalam botol kaca gelap. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk dan didiamkan selama 18 jam. Maserasi yang telah didiamkan disaring dengan kain flanel, ampas dilakukan maserasi kembali dengan cara yang sama yaitu ditambah 2500 ml pelarut etanol 70%. Semua maserat dikumpulkan, kemudian dipekatkan dengan menggunakan evaporator sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes RI 2013).

### **5. Uji bebas alkohol ekstrak etanol daun pepaya**

Pemeriksaan bebas alkohol pada ekstrak dimaksudkan untuk memastikan ekstrak bebas dari etanol. Prosedur dilakukan dengan menambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat ke dalam tabung reaksi yang berisi ekstrak kemudian

dipanaskan. Jika tercium bau ester khas dari alkohol maka ekstrak masih mengandung etanol (Sayuti 2015).

## **6. Identifikasi senyawa kimia pada ekstrak etanol daun pepaya**

Identifikasi kandungan senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan keberadaan senyawa kimia dalam ekstrak etanol daun pepaya. Identifikasi kandungan senyawa kimia meliputi senyawa alkaloid, saponin dan flavonoid.

**5.1. Alkaloid.** Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 0,5 g ekstrak ditimbang kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat diuji dengan pereaksi reagent *Mayer*, *Wagner*, dan *Dragendroff*. Hasil positif *Mayer* ditandai dengan endapan putih atau kuning. Hasil positif *Dragendroff* ditandai dengan endapan merah jingga dan hasil positif *Wagner* ditandai dengan endapan coklat. Sampel menunjukkan hasil positif mengandung senyawa alkaloid apabila terjadi endapan paling sedikit dua dari tiga percobaan di atas, akan tetapi apabila endapan tersebut tidak muncul, maka sampel menunjukkan hasil negatif untuk senyawa alkaloid (Depkes RI 1995).

**5.2. Saponin.** Pemeriksaan saponin dengan cara ditimbang sebanyak 0,05 g ekstrak ditambah air kemudian dididihkan selama beberapa menit. Larutan disaring dan filtratnya dikocok kuat-kuat. Timbulnya buih yang stabil selama 15 menit setelah pengocokan menunjukkan terdapatnya saponin (Depkes RI 1995).

**5.3. Flavonoid.** Pemeriksaan flavonoid dengan cara ditimbang sejumlah tertentu ekstrak ditambahkan dengan 100 ml air panas kemudian dididihkan selama 5 menit, disaring dan diambil filtratnya 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, 1 ml asam klorida dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan positif flavonoid (Sarker *et al.* 2006).

**5.4. Tanin.** Pemeriksaan tanin dengan cara ditimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL air panas kemudian ditetesi menggunakan besi (III) klorida. Terbentuknya warna biru atau kehitaman menunjukkan positif keberadaan tanin dalam sampel (Sarker *et al.* 2006).

## 7. Penetapan dosis

**6.1. Dosis Aspirin®.** Dosis yang digunakan sebagai trombositopenia adalah 100 mg. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke mencit dengan berat badan 20 g adalah 0,0026. Dosis Aspirin® untuk mencit sebesar 0,26 mg/20 g BB atau 13 mg/Kg 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 atau 65 mg/kg BB.

**6.3. Dosis ekstrak etanol daun pepaya.** Dosis yang diberikan kepada mencit kelompok IV, V dan VI berturut-turut adalah sebesar 150 mg; 300 mg; 600 mg/kg BB.

## 8. Pembuatan larutan uji

**7.1. Larutan suspensi Na CMC 0,5%.** Larutan suspensi Na CMC dibuat dengan menimbang serbuk Na CMC sebanyak 500 mg kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala dan ditambah sedikit aquadest, kemudian dipanaskan hingga mengembang dan dimasukkan ke dalam mortir dan ditambahkan aquadest sedikit demi sedikit sampai 100 ml, diaduk hingga homogen.

**7.2. Larutan Aspirin®.** Larutan Aspirin® untuk dosis 13 mg/kg BB dibuat dengan menimbang 52 mg Aspirin® kemudian dilarutkan dengan 100 ml Na CMC 0,5%.

**7.3. Larutan PSIDII®.** Larutan PSIDII® untuk dosis 65 mg/kg BB dibuat dengan menimbang 260 mg PSIDII® kemudian dilarutkan dengan 100 ml Na CMC 0,5%.

**7.4. Pembuatan sediaan uji.** Ekstrak daun pepaya ditimbang 0,6 g, 1,2 g, 2,4 g, masing-masing kemudian dilarutkan dengan 100 ml Na CMC 0,5%.

## 9. Perlakuan hewan uji

Perlakuan hewan uji diadaptasikan dengan lingkungan selama satu minggu. Hewan uji kemudian ditimbang, lalu ditempatkan ke dalam kandang. Mencit digunakan sebanyak 30 ekor secara acak dibagi menjadi 6 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 20 g.

Kelompok 1 sebagai kontrol normal diberikan air minum dan pakan standar BR II. Kelompok II sebagai kontrol negatif diberikan sediaan tunggal aspirin 13 mg/Kg BB mencit dan kelompok III sebagai kontrol positif diberikan suspensi PSIDII sebesar 65 mg/kg BB. Kelompok IV, V dan VI diberikan ekstrak daun pepaya masing-masing 150 mg; 300 mg; 600 mg/kg BB.

#### **10. Penggunaan metode kamar hitung**

Larutan *Rees-Ecker* dipipet sebanyak 1990  $\mu$ l dengan menggunakan mikropipet, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel darah yang telah dicampurkan EDTA dipipet sebanyak 10  $\mu$ l dengan menggunakan mikropipet, masukkan ke dalam tabung yang berisi larutan Rees-Ecker. Larutan dihomogenkan selama 3 menit. Kamar hitung diisi dengan sentuhkan ujung pipet pada permukaan kamar hitung dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Kamar hitung yang telah diisi dibiarkan selama 10 menit. Trombosit dihitung dalam seluruh bidang besar ditengah kamar hitung dengan perbesaran lensa objektif 40x. Jumlah trombosit yang dihitung dikali 2000 menghasilkan jumlah trombosit per  $\mu$ l darah (Gandasoebrata 1984).

#### **11. Penentuan waktu pembekuan darah**

Darah ditetaskan sebanyak 2 tetes diatas objek glass yang kering dan bersih dan saat awal penetesan stopwatch dijalankan. Tiap 30 detik gerakan ujung jarum sampai terlihat adanya benang fibrin, setelah itu dilakukan hal yang sama pada tetesan yang kedua secara bersamaan. Kemudian hentikan stopwatch setelah terlihat adanya benang fibrin pada tetesan kedua (Gandasoebrata 1984).

#### **12. Prosedur uji**

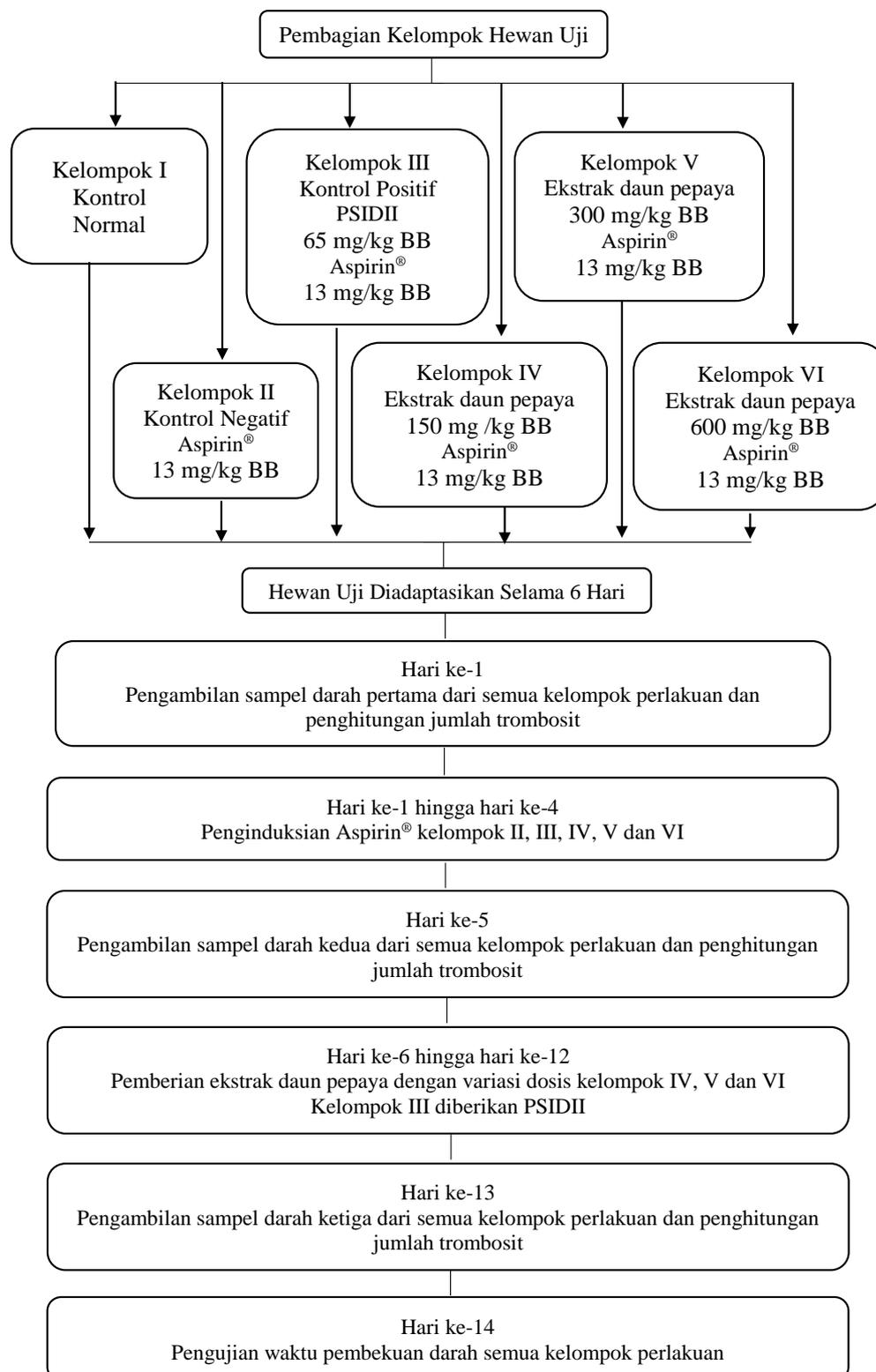
Hewan uji dilakukan adaptasi lingkungan selama 6 hari sebelum diberikan perlakuan. Hari ke-0 dilakukan pengambilan darah hewan uji dari semua kelompok perlakuan. Hari ke-1 sampai hari ke-4 mencit diberikan aspirin dengan dosis 13 mg/kg BB per hari kecuali kelompok 1 sebagai kontrol normal. Hari ke-5 dilakukan pengambilan darah hewan uji dari semua kelompok perlakuan. Hari ke-6 sampai hari ke-12 kelompok IV, V dan VI diberikan ekstrak daun pepaya masing-masing

150 mg; 300 mg; 600 mg/kg BB dan kelompok III diberikan suspensi PSIDII sebesar 65 mg/kg BB. Hari ke-13 dilakukan pengambilan darah hewan uji dari semua kelompok perlakuan. Perhitungan jumlah trombosit dengan menggunakan metode kamar hitung. Hari ke-14 dilakukan pengujian pembekuan darah.

#### **E. Analisis Data**

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini untuk melihat data terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji distribusi normal dengan uji *Saphiro Wilk*, mengingat jumlah data <50 dan uji homogenitas varians melalui uji *Levene*. Jika data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan adanya homogenitas varians ( $p > 0,05$ ), analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik (One Way ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji parametrik (*post hoc test*) yaitu uji *Tukey*. Namun, jika hasil uji distribusi tidak normal ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji non parametrik menggunakan uji Mann-Whitney U dilanjutkan dengan uji beda antar perlakuan dengan uji Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

## F. Skema Jalan Penelitian



**Gambar 5. Skema proses uji ekstrak daun pepaya.**