

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah akar alang-alang yang berusia 3 bulan diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Akar alang-alang berusia 3 bulan diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Februari 2019 yang mempunyai akar beruas-ruas, berwarna kuning kecoklatan, dalam keadaan basah dan tidak busuk.

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

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

Variabel utama dari penelitian ini adalah akar alang-alang dalam berbagai macam dosis varian. Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas hemostasis ekstrak etanol akar alang-alang yang meliputi waktu thromboplastin parsial teraktivasi dan jumlah trombosit. Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah hewan uji mencit putih jantan.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

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

Variabel bebas adalah variabel yang dengan sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol akar alang-alang dengan berbagai variasi dosis.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel

terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman, mencit putih jantan, kondisi lingkungan kandang, pakan, pengelompokkan hewan uji yang seragam, metode uji, dan pengamatan.

Variabel tergantung adalah pusat permasalahan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas hemostasis ekstrak etanol akar alang-alang terhadap mencit putih galur *swiss-webster*.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, hemostatis adalah suatu mekanisme untuk menghentikan dan mencegah terjadinya perdarahan.

Kedua, akar alang-alang adalah bagian tanaman alang-alang yang berada di atas tanah yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Februari 2019 dalam keadaan bersih, dan tidak busuk.

Ketiga, ekstrak etanol akar alang-alang adalah sediaan pekat hasil ekstraksi dari akar alang-alang menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% yang selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator*.

Keempat, mencit putih jantan adalah hewan uji yang digunakan pada penelitian ini dengan kisaran berat badan 20-25 gram dalam keadaan sehat.

Kelima, heparin adalah obat golongan antikoagulan yang digunakan sebagai induksi pada penelitian ini dengan dosis 650 mg/kg BB mencit.

Keenam, waktu thromboplastin parsial teraktivasi adalah waktu terbentuknya kabut dalam detik setelah ditambah kalsium.

Ketujuh, jumlah trombosit adalah jumlah yang dihitung dengan menggunakan metode Rees Ecker menggunakan kamar hitung.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis terkecil yang dapat memberikan efek.

## **C. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan**

**1.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan meliputi ekstrak etanol akar alang-alang (*Imperata cylindrica* L).

**1.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan meliputi etanol 70%, pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%, HCl pekat, serbuk magnesium, pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer,  $\text{CaCl}_2$ , reagen *TEClot ATP-S*, *Lieberman Bourchard*, asam sulfat pekat, asam asetat anhidrat, asam klorida 2N, amil alkohol, akuadest, asam traneksamat, CMC 0,5%, dan heparin sebagai penginduksi.

## **2. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau atau gunting untuk merajang, oven dengan suhu  $50^\circ\text{C}$ , mesin penggiling, ayakan nomor 40, botol maserasi, batang pengaduk, corong glass, kain flanel, *rotary evaporator*, beaker glass, erlenmeyer, gelas ukur dan timbangan elektrik Ohaus-PA 214, dan *centrifuge T121, sterling bidwell*. Alat yang digunakan untuk perlakuan antara lain timbangan, spuit oral, pipa kapiler, tabung reaksi, dan kandang mencit, untuk pengamatan darah yaitu water bath, spuit 1cc, kapas, pinset, deck glass, objek glass, mikroskop, tabung reaksi, rak tabung reaksi, stopwatch, mikropipet dan pipet tetes.

## **3. Hewan uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan berumur 2-4 bulan dengan berat badan berkisar 20-25 g.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tumbuhan**

Determinasi tumbuhan dalam tahap penelitian adalah menetapkan kebenaran sampel tumbuhan akar alang-alang yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mencocokkan morfologis yang ada dalam tumbuhan yang akan diteliti dengan kunci determinasi. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

### **2. Pengambilan bahan**

Akar alang-alang diambil dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Februari 2019 dalam keadaan segar dan masih berwarna kecoklatan, tidak terkontaminasi hama penyakit kemudian dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan.

### **3. Pembuatan serbuk akar alang-alang**

Pertama bagian akar alang-alang yang masih segar kemudian dicuci bersih dengan air yang mengalir dengan tujuan untuk menghilangkan sisa kotoran yang menempel pada tanaman. Akar alang-alang dirajang dengan tujuan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan, penggilingan, dan penyimpanan, kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C selama beberapa hari sampai kering (Gunawan & Mulyani 2004).

Simplisia yang kering dihaluskan dengan menggunakan mesin penggiling, setelah digiling simplisia diayak dengan menggunakan ayakan bernomor mesh 40. Simplisia dibuat serbuk bertujuan untuk memperbesar luas permukaan kontak serbuk dengan pelarut pada saat ekstraksi, sehingga senyawa aktif akan terekstrak lebih banyak dan prosesnya lebih cepat.

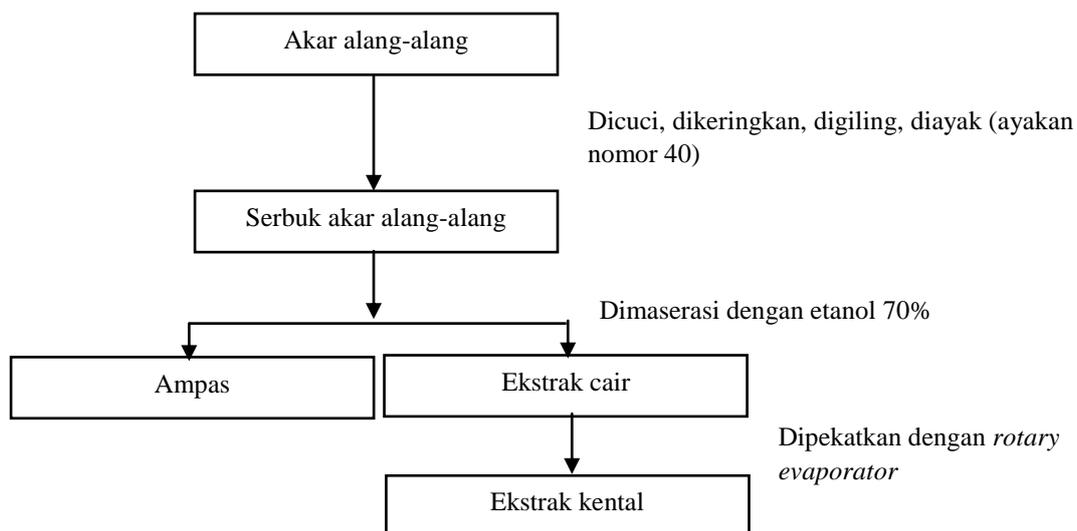
### **4. Penetapan kadar air**

Penetapan kadar air dengan cara menghitung kadar air ekstrak etanol akar alang-alang menggunakan alat *sterling-bidwell*. Alat tersebut digunakan dengan cara serbuk akar alang-alang sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam labu alas bulat ditambahkan dengan 200 ml toluen jenuh air. Kemudian dilakukan pemanasan dan pemanasan dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi, kemudian dibaca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Hasil dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Kadar air dihitung dalam % v/b. Kadar air yang memenuhi persyaratan adalah kurang dari 10% (Kemenkes RI 2003)

### **5. Pembuatan ekstrak etanol akar alang-alang**

Pembuatan ekstrak etanol akar alang-alang menggunakan metode maserasi. Serbuk akar alang-alang diekstraksi dengan pelarut etanol 70% dengan cara: 1 bagian simplisia dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap, kemudian dituangi dengan cairan penyari yaitu 1:10 menggunakan etanol 70%. Rendam selama 6 jam pertama sekali-kali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam sambil sering diaduk dan pengocokan berulang. Setelah 18 jam, filtrat disaring menggunakan kain flanel. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan menggunakan jumlah dan jenis pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat yang didapatkan, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap

dengan menggunakan tekanan tinggi hingga memperoleh ekstrak kental. Persen rendemen dihitung berdasarkan presentasi bobot per bobot (b/b) antara rendemen yang diupkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan untuk pembuatan ekstrak (Kepmenkes 2009).



Gambar 6. Skema pembuatan ekstrak etanol akar alang-alang.

## 6. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol akar alang-alang

**6.1 Identifikasi Alkaloid.** Serbuk dan ekstrak akar alang-alang sebanyak 2 gram ditimbang, kemudian yang telah dihaluskan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 5 ml kloroform dan 5 ml larutan amoniak. Setelah itu campuran dipanaskan, dikocok, dan disaring. Larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N sebanyak 5 tetes ditambahkan ke dalam filtrat dan dikocok. Setelah itu bagian atas dari filtrat diambil dan diuji dengan reagent Meyer, Wagner, dan Dragendorff. Jika terdapat endapan putih dengan pereaksi Meyer, endapan merah jingga dengan pereaksi Dragendorff, dan endapan coklat dengan pereaksi Wagner, maka positif terdapat alkaloid (Tiwari *et al.* 2011)

**6.2 Identifikasi Saponin.** Ampas sisa identifikasi alkaloid dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 1 ml akuades hangat. Setelah itu campuran dikocok dan dibiarkan selama 15 menit. Hasil diamati untuk pembentukan busa atau tidak (Serker 2006).

**6.3 Identifikasi Tanin.** Identifikasi tanin dapat dilakukan dengan cara 1 g serbuk dan ekstrak dilarutkan dengan 100 ml air panas dididihkan selama 5 menit kemudian didinginkan, disaring dan diambil filtratnya sebanyak 5 ml. Filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Tanin dapat dikatakan positif apabila terbentuk warna violet atau hijau kehitaman (Sarker *et al.* 2006)

**6.4 Identifikasi Flavonoid.** Serbuk dan ekstrak akar alang-alang sebanyak 1 gram ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan logam (serbuk) Mg, 0,2 ml HCl pekat, dan beberapa tetes amil alkohol. Larutan dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah coklat pada lapisan amil alkohol (Serker 2006).

**6.5 Identifikasi Steroid dan Triterpenoid.** Serbuk dan ekstrak akar alang-alang sebanyak 1 gram ditimbang dan dihaluskan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, sebanyak 2 mL larutan ekstrak ditambahkan dengan pereaksi *Liebermann-Burchard* dengan cara larutan ekstrak sebanyak 2 ml ditambahkan dengan 5 tetes asam asetat anhidrat lalu dikocok. Kemudian ditambahkan 2 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, kocok dan amati. Uji positif steroid menghasilkan warna hijau atau biru dan terpenoid menghasilkan warna merah atau violet (Illing *et al.* 2017).

## 7. Pembuatan Larutan dan Suspensi Bahan Uji

Pembuatan bahan uji mencakup pembuatan, larutan CMC-Na 0,5%, larutan heparin 5000 IU/ml, larutan asam traneksamat dan pembuatan larutan ekstrak etanol akar alang-alang dengan dosis 5,6 mg/20 g BB mencit, 11,2 mg/20 g BB mencit, dan 22,4 mg/20 g BB mencit.

**7.1 Larutan CMC-Na 0,5%.** Sebanyak 0,5 g CMC-Na ditaburkan dalam lumpang yang berisi  $\pm 20$  mL air suling panas. Didiamkan selama 15 menit lalu digerus hingga diperoleh massa yang transparan, lalu digerus sampai homogen, diencerkan dengan air suling, dihomogenkan dan dimasukkan ke labu tentukur 100 ml, dicukupkan volumenya dengan air suling hingga 100 ml.

**7.2 Larutan heparin.** Dosis heparin 5000 IU/ml dikonversikan ke mencit dengan berat badan 20 g menggunakan faktor konversi 0,0026 sehingga didapat dosis untuk mencit yaitu 650 IU/kg BB.

**7.3 Larutan asam traneksamat.** Dosis asam traneksamat 500 mg/70 kg BB manusia dikonversi ke mencit dengan berat badan 20 g dengan menggunakan faktor konversi 0,0026 sehingga dosis yang digunakan untuk mencit adalah 65 mg/kg BB

**7.4 Larutan stok sediaan uji ekstrak etanol akar alang-alang 3%.** Ditimbang 3 gram ekstrak etanol akar alang-alang, kemudian dimasukkan ke dalam lumpang. Ditambahkan sedikit demi sedikit suspensi CMC-Na sambil digerus sampai homogen. Setelah homogen, dituangkan ke dalam labu ukur dan dicukupkan dengan suspensi CMC-Na hingga 100 ml.

## **8. Persiapan hewan uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi dengan berat badan berkisar 20-25 gram, berumur 2-4 bulan dan sehat. Jumlah hewan uji yang digunakan sebanyak 25 ekor mencit putih jantan yang dibagi menjadi 6 kelompok dimana tiap kelompok terdiri dari 1 ekor mencit putih jantan. Tiap mencit ditimbang dan diberikan tanda pengenal dan diadaptasi dengan lingkungan laboratorium selama satu minggu. Hewan uji dipuaskan terlebih dahulu sebelum digunakan selama 16 jam dengan diberi air minum. Hewan uji dapat segera dilakukan penelitian dengan pemberian bahan uji setelah semua telah dipersiapkan.

## **9. Penetapan dosis hewan uji**

Dosis yang digunakan berdasarkan penelitian sebelumnya adalah 400 mg/kg BB tikus (Oejha *et al.* 2010) maka dikonversikan dengan faktor konversi 0,14 dan diperoleh variasi dosis 280 mg/kg BB, 560 mg/kg<sup>2</sup> BB dan 1.120 mg/kg BB. Dosis asam traneksamat sebagai kontrol pembanding yang digunakan untuk mencit adalah 65 mg/kg BB mencit. Dosis heparin sebagai penginduksi yang digunakan adalah 650 mg/kg BB.

## **10. Cara kerja**

Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas hemostasis dari ekstrak etanol akar alang-alang terhadap penurunan waktu thromboplastin parsial teraktivasi serta jumlah trombosit. Hewan uji diadaptasi di lingkungan

laboratorium selama 1 minggu kemudian dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing 5 ekor mencit putih jantan. Mencit dipuaskan makan selama 16 jam tetapi tetap diberi minum, kemudian dilakukan pengukuran waktu pembekuan darah serta pengamatan morfologi sel darah dan setelah itu mencit diistirahatkan selama satu hari. Pengujian dilakukan dengan metode APTT untuk waktu thromboplastin parsial teraktivasi dan metode Rees Ecker untuk menghitung jumlah trombosit.

Pengujian dilakukan dengan memberikan suspensi, suspensi Na CMC sebagai kontrol negatif, heparin sebagai penginduksi, asam traneksamat sebagai kontrol pembandingan ekstrak etanol akar alang-alang secara peroral dengan menggunakan sonde 2 kali sehari selama 6 hari. Mencit yang sudah diberikan kelompok oral dimasukkan di kandang mencit sembari diberikan tanda di ekornya. Darah diperoleh dari vena orbital mata mencit dengan menggunakan pipa kapiler.

**10.1 Pengukuran APTT (*Activated Partial thromboplastin Time*).** Pengukuran waktu thromboplastin parsial teraktivasi dilakukan dengan darah diambil dari vena orbital mata mencit dengan menggunakan pipa kapiler kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi Na-citrat 3,2 % sebagai antikoagulan, kemudian darah dicentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan plasma darah sitrat. Plasma dimasukkan ke dalam tabung serologis dan diinkubasi dengan suhu 37°C, selama 1-2 menit. Plasma ditambah reagen APTT dan diinkubasi suhu 37°C selama 3 menit kemudian ditambahkan  $\text{CaCl}_2$ , catat waktu ketika terbentuknya kabut dalam detik (Vogel 2006).

**10.2 Hitung trombosit.** Perhitungan jumlah trombosit menggunakan metode Rees Ecker yaitu diambil cairan Rees Ecker dengan menggunakan pipet eritrosit sampai garis tanda “1” dan cairannya dibuang. Kemudian diambil darah sampai garis tanda “0,5” dan cairan Rees Ecker sampai “101” dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dikocok segera selama 3 menit. Diteruskan tindakan-tindakan seperti untuk menghitung eritrosit dalam kamar hitung. Kamar hitung yang telah diisi dibiarkan dengan sikap datar dalam cawan petri yang tertutup

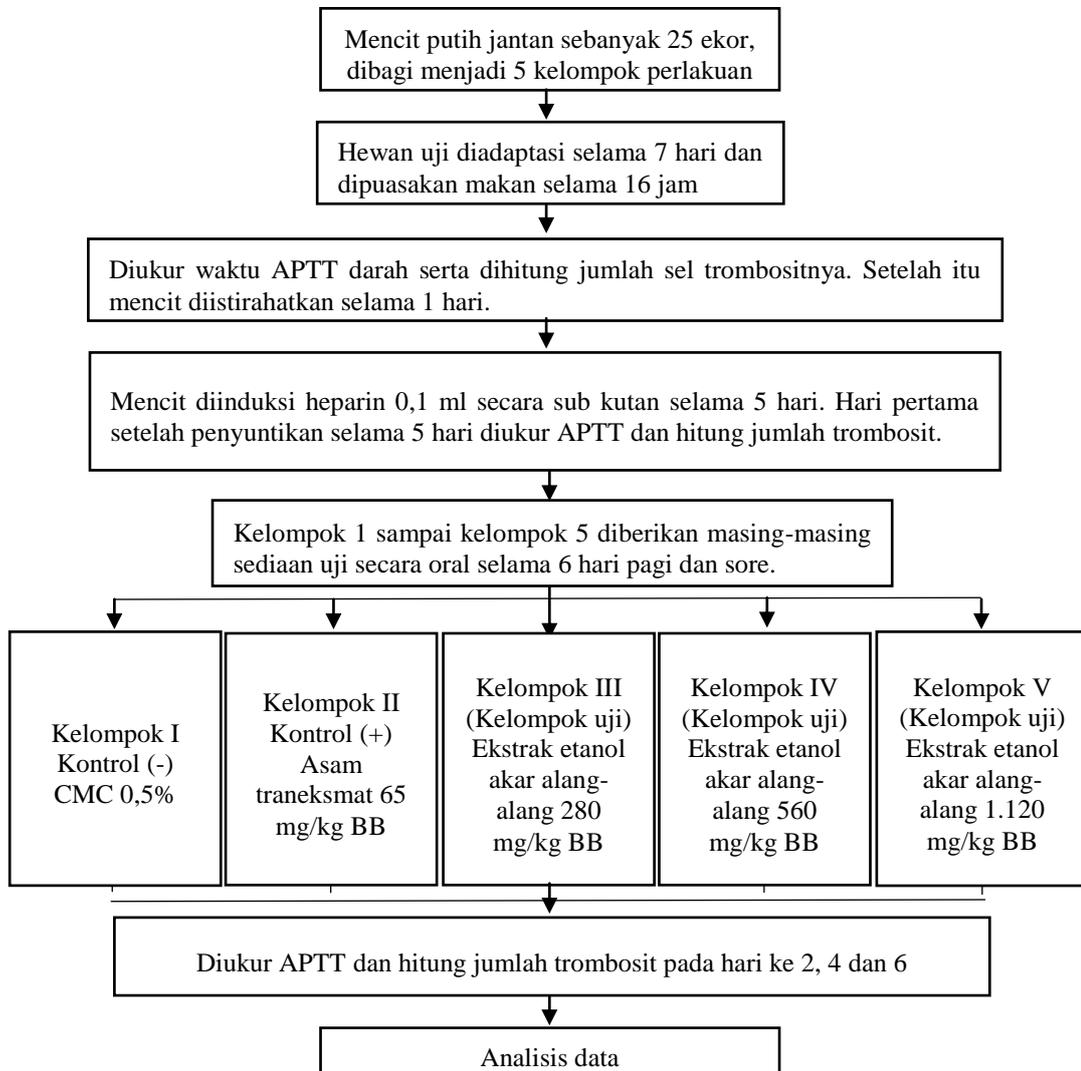
selama 10 menit agar trombosit mengendap. Dihitung semua trombosit dalam seluruh bidang besar di tengah-tengah ( $1 \text{ mm}^2$ ) dengan menggunakan lensa-lensa objektif besar. Jumlah yang dihitung dikali 2.000 untuk menghasilkan jumlah trombosit per  $\mu\text{l}$  darah (Gandasoebrata 2008). Perhitungan jumlah trombosit dihitung dengan 25 bidang besar dengan rumus :

$$\frac{N}{1/25} \times 200 = N \times 2000 \text{ (Gandasoebrata 2008)}$$

### E. Analisis Data

Sebelum dilakukan uji hipotesis untuk mengetahui apakah ada perbedaan masa pembekuan darah dan apusan darah yang nyata (signifikan), dan hasil pengukuran masa pembekuan darah, dan apusan darah, kelompok perlakuan diuji normalitasnya. Hal itu perlu dilakukan untuk menentukan apakah perlakuan uji hipotesis dilakukan dengan metode parametik atau non parametik. Uji normalitas data dilakukan dengan uji *Shapiro-Wilk*. Kriteria ujinya adalah apabila nilai signifikansi (asyp.sig) nya lebih besar dari 0,05 maka data terdistribusi normal, sebaliknya jika nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05 maka data tidak terdistribusi normal. Hasil terdistribusi normal, maka uji hipotesis menggunakan metode statistik parametrik *One Way ANOVA* satu jalan, dan dilanjutkan dengan uji parametrik (*post hoc test*) yaitu uji *Tukey* tergantung nilai homogenitas variannya. Hasil tidak terdistribusi normal, maka uji hipotesis menggunakan metode *Kruskall-wallis* (Awanda 2017).

### F. Skema Penelitian



**Gambar7. Skema pengukuran APTT dan hitung jumlah trombosit.**