

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah akar alang-alang berusia 3 bulan yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Desember 2018 dalam keadaan basah dan tidak busuk.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar alang-alang yang mempunyai akar berserat dan berwarna kuning kecoklatan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol akar alang-alang dalam berbagai variasi konsentrasi. Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas trombolitik ekstrak etanol akar alang-alang yang meliputi waktu lisis bekuan darah dan jumlah trombosit. Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah hewan uji tikus putih jantan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel yang diteliti terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol akar alang-alang dalam berbagai konsentrasi yang diberikan pada tikus putih jantan.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria peneliti. Variabel tergantung yang digunakan dalam penelitian

ini adalah aktivitas trombolitik ekstrak etanol akar alang-alang yang meliputi lisis bekuan darah dan jumlah trombosit.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel terikat selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi lingkungan tempat tumbuh tumbuhan, tikus putih jantan, kondisi lingkungan kandang, pakan, pengelompokan hewan uji yang seragam, metode uji dan pengamatan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, trombosis adalah sel darah yang berperan sebagai proses hemostatis. Dalam keadaan normal, trombin membentuk menjadi trombus yang digunakan untuk mencegah perdarahan. Jika keadaan tidak normal maka trombus dapat menyebabkan kelainan vaskular.

Kedua, 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*.

Ketiga, akar alang-alang adalah bagian akar dari alang-alang yang berada di atas tanah yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Februari 2019.

Keempat, tikus putih jantan adalah hewan uji yang digunakan pada penelitian ini dengan kisaran berat badan 180-210 gram dalam keadaan sehat yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kelima, waktu lisis bekuan darah dilakukan dengan mengitung massa bekuan darah menggunakan rumus persentase lisis bekuan.

Ketujuh, jumlah trombosit adalah jumlah yang dihitung dengan menggunakan metode *Rees ecker* menggunakan kamar hitung (hemometer).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan yaitu pisau, oven, mesin penggiling, dan ayakan no 40, *Sterling-Bidwell*, botol kaca kedap cahaya sebagai tempat maserasi, botol penampung, gelas piala, batang pengaduk, corong gelas, kain flanel, kertas saring dan evaporator (Heidolp WB 4000), timbangan hewan, kandang tikus, tempat makan dan minum tikus, pipa kapiler, pipet eritrosit, tabung mikro sentrifus, tabung reaksi, mikro pipet, kamar hitung, mikroskop, masker, handscoon, *deck glass* dan *objek glass*.

2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar alang-alang (*Imperata cylindrica* (L.)), etanol 70%, HCl pekat, FeCl₃, amil alkohol, magnesium, pereaksi mayer, dragendorff toluen, larutan *Rees ecker* dan *aqua destillata*.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan dengan berat badan berkisar 180 – 210 gram.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tumbuhan

Determinasi tumbuhan dalam tahap penelitian adalah menetapkan kebenaran sampel tumbuhan 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 Fakultas Biologi 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 dicuci bersih dengan air yang mengalir dengan tujuan untuk menghilangkan sisa kotoran yang menempel pada tumbuhan. Akar alang-alang dirajang untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan, penggilingan dan penyimpanan, kemudian dikeringkan di oven pada suhu 50°C selama beberapa hari sampai kering (Gunawan & Mulyani 2004).

Simplisia yang kering dihaluskan dengan mesin penggiling, setelah digiling simplisia diayak dengan ayakan 40. Simplisia dibuat serbuk 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 ekstrak etanol akar alang-alang

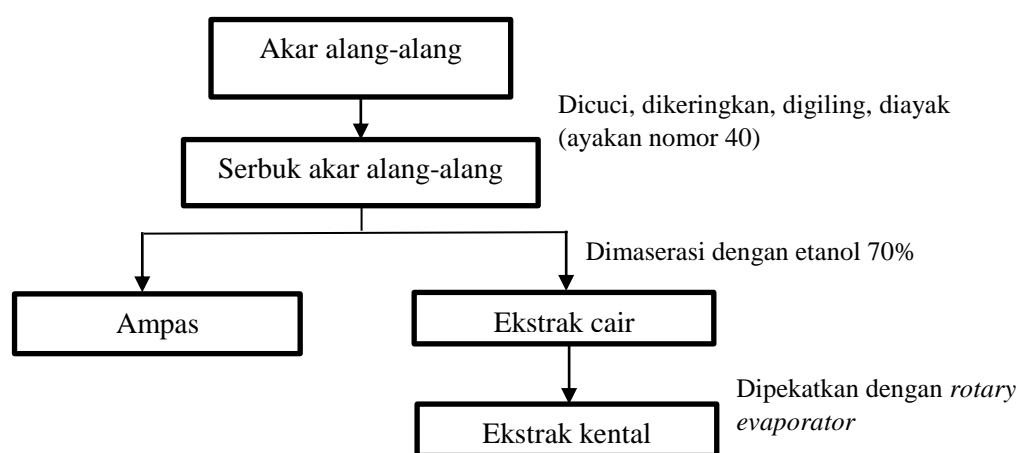
Penetapan kadar air simplisia akar alang-alang (*Imperata cylindrica* (L.)) dalam penelitian ini menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Penetapan kadar air dilakukan dengan cara ekstrak akar alang-alang ditimbang sebanyak 20 g, lalu dimasukkan ke dalam labu kering. Untuk zat yang dapat menyebabkan gejala mendadak saat mendidih, ditambahkan batu didih secukupnya. Dimasukkan kurang lebih 200 ml toluen jenuh air ke dalam labu dan dipanaskan labu dengan hati-hati. Pemanasan dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi (kurang lebih 1 jam), kemudian dibaca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b. Kadar air yang memenuhi persyaratan adalah kurang dari 10% (Kemenkes RI 2013).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{berat bahan}} \times 100\%$$

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%. Direndam selama 6 jam pertama sekali-kali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam sambil sering diaduk dan pengocokan berulang. Setelah 18 jam, filtrat disaring

menggunakan kain flanel. Diulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan menggunakan jumlah dan jenis pelarut yang sama. Semua maserat yang didapatkan, kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap dengan menggunakan tekanan tinggi hingga memperoleh ekstrak kental. Persen rendemen dihitung berdasarkan persentase bobot per bobot (b/b) antara rendemen yang diuapkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan untuk pembuatan ekstrak (Kepmenkes 2009).



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak etanol akar alang-alang

6. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak akar alang-alang

6.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 1 g serbuk dan ekstrak ditambahkan dengan 100 ml air panas kemudian dididihkan selama 5 menit, disaring dan diambil filtratnya sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, 1 ml asam klorida dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat-kuat dan dibiarkan memisah. Positif flavonoid jika terbentuk warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol (Sarker 2006).

6.2 Identifikasi tanin. Sebanyak 1 g serbuk dan ekstrak dilarutkan dalam 100 ml air panas, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah pereaksi FeCl_3 1%. Positif tanin jika terbentuk warna hijau violet atau hijau kehitaman pada reaksi dengan FeCl_3 (Sarker 2006).

6.3 Identifikasi alkaloid. Sejumlah lebih kurang 1 g serbuk ditambahkan dengan 5 mL HCl pekat, untuk ekstrak diuapkan di atas cawan hingga didapatkan residu. Residu ini kemudian ditambahkan dengan 5 mL HCl pekat. Larutan yang diperoleh dibagi kedalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama berfungsi sebagai blanko, ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat. Tabung kedua ditambahkan dengan 3 tetes pereaksi Dragendorff, dan tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer. Pada pereaksi Dragendorff akan terbentuk endapan berwarna jingga, sedangkan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan kuning yang menandakan positif adanya alkaloid (Sarker 2006).

6.4 Identifikasi saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan memasukkan \pm 100 mg serbuk akar alang-alang dan 1 ml ekstrak akar alang-alang ke dalam tabung reaksi dan ditambah 10 ml air panas ke dalam masing – masing tabung kemudian dikocok kuat selama 10 menit sampai terbentuk buih selama \pm 10 menit setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes asam klorida 2N, buih tidak hilang (Sarker 2006).

7. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan yang diperoleh dari Labortorium Farmakologi Universitas Setia Budi dengan berat badan berkisar 180-210 gram dalam keadaan sehat. Jumlah hewan uji yang digunakan sebanyak 5 ekor tikus putih jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok dimana tiap kelompok terdiri dari 1 ekor tikus putih jantan. Tiap tikus ditimbang dan diberikan tanda pengenal dan diadaptasi dengan lingkungan laboratorium selama satu minggu. Hewan uji diberi minum kemudian puasakan terlebih dahulu sebelum digunakan selama 16 jam. Hewan uji dapat segera dilakukan penelitian dengan pengambilan darah tiap hewan uji setelah semua telah dipersiapkan. Berikut pembagian perlakuan darah tikus :

Kelompok I : kontrol negatif diberikan aquadest 0,1ml secara *ex vivo*.

Kelompok II : perlakuan ekstrak akar alang-alang dengan konsentrasi 2,5 mg/ml secara *ex vivo*.

Kelompok III : perlakuan ekstrak akar alang-alang dengan konsentrasi 5 mg/ml secara *ex vivo*.

Kelompok IV : perlakuan ekstrak akar alang-alang dengan konsentrasi 10 mg/ml secara *ex vivo*.

Kelompok V : perlakuan ekstrak akar alang-alang dengan konsentrasi 20 mg/ml secara *ex vivo*.

Konsentrasi sediaan uji diberikan berdasarkan penelitian (Setyowati 2015) pada uji aktivitas trombolitik penambahan ekstrak etanol kulit buah jeruk purut dengan konsentrasi 20 mg/ml dapat melisis bekuan darah. Perhitungan dapat dilihat di lampiran 7.

8. Cara kerja

8.1 Penghitungan bekuan darah. Menurut (Prasad *et.al* 2006), aktivitas trombolisis ditentukan dengan cara menghitung persentase lisis bekuan.

$$\text{Persentase lisis bekuan} = \frac{\text{Selisih berat sebelum dan sesudah perlakuan}}{\text{Berat sebelum perlakuan}} \times 100\%$$

Berat bekuan sebelum perlakuan diperoleh dari darah yang diambil dari hewan uji dan dimasukkan kedalam tabung mikro sentrifus dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Setelah membeku, bekuan darah ditimbang dan serum diambil agar tidak mengganggu bekuan darah. Perlakuan selanjutnya diberikan dengan cara memasukkan ekstrak dengan konsentrasi 2,5; 5 ;10 dan 20 mg/ml, aquades sebagai kontrol negatif ke dalam tabung mikro sentrifus yang telah berisi bekuan darah, kemudian ditentukan berat bekuan sebelum dan sesudah perlakuan setiap menit ke-30, 60 dan 90.

8.2 Penghitungan jumlah trombosit. Perhitungan jumlah trombosit menggunakan metode *Rees ecker* yaitu diambil cairan *Rees ecker* sebanyak 2000 mikroliter dengan menggunakan mikropipet. Kemudian diambil 10 mikroliter darah dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi *Rees ecker* lalu dikocok segera selama 3 menit. Kamar hitung dengan sikap datar diatas mikroskop diberi larutan darah dan *Rees ecker* tersebut. Dihitung semua trombosit dalam seluruh bidang besar di tengah – tengah (1 mm²) dengan menggunakan lensa-lensa objektif . Jumlah trombosit yang di peroleh dimasukkan ke dalam rumus :

$$= \frac{n \text{ (jumlah trombosit semua bidang)}}{1/25} \times 10 \times 200$$

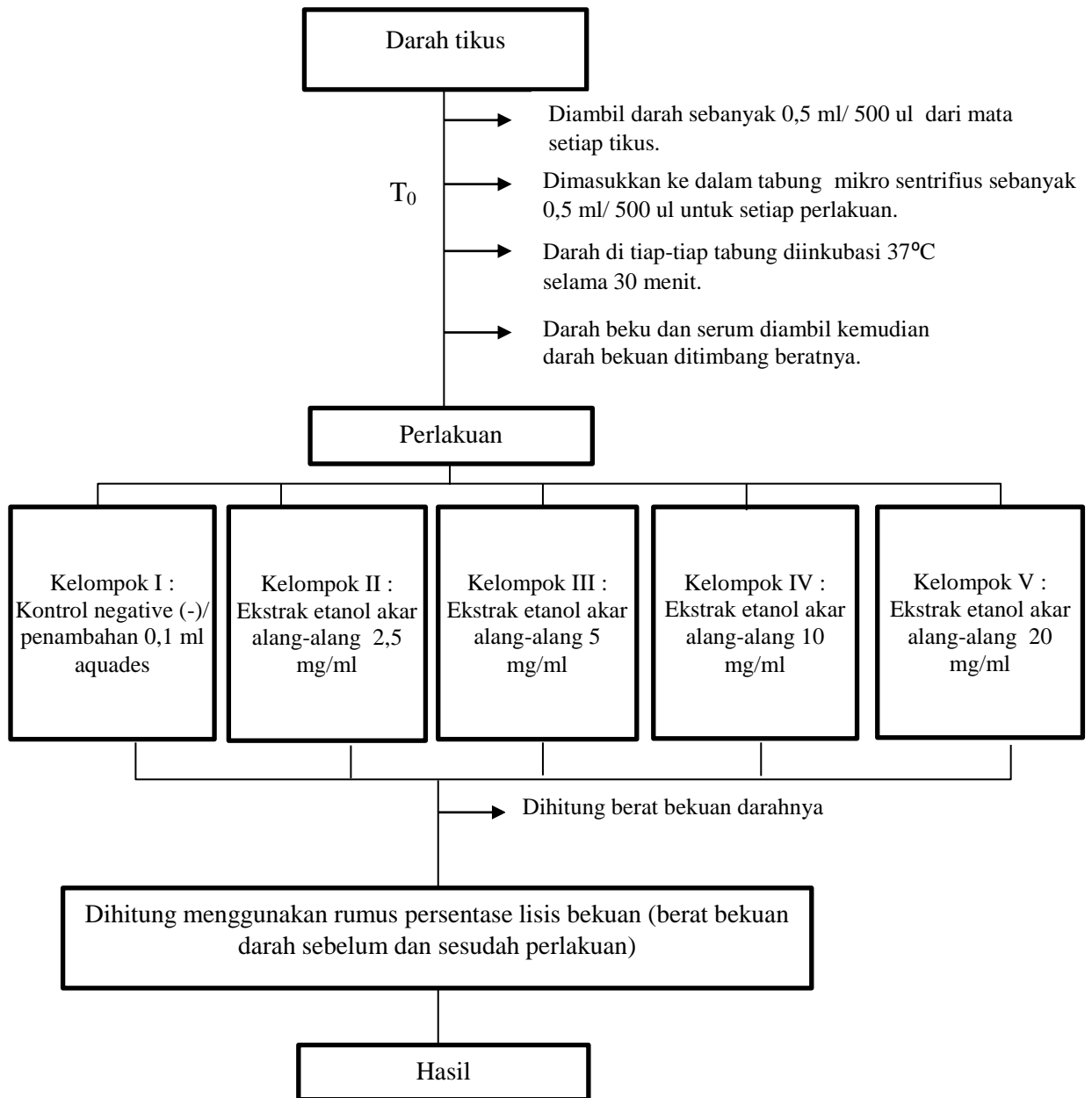
9. Pembuatan larutan stok uji ekstrak etanol akar alang-alang 5%

Ditimbang 1 gram ekstrak etanol akar alang-alang, kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselin. Ditambahkan aquades ad homogen, kemudian ditambahkan aquades sampai tanda batas 20 ml.

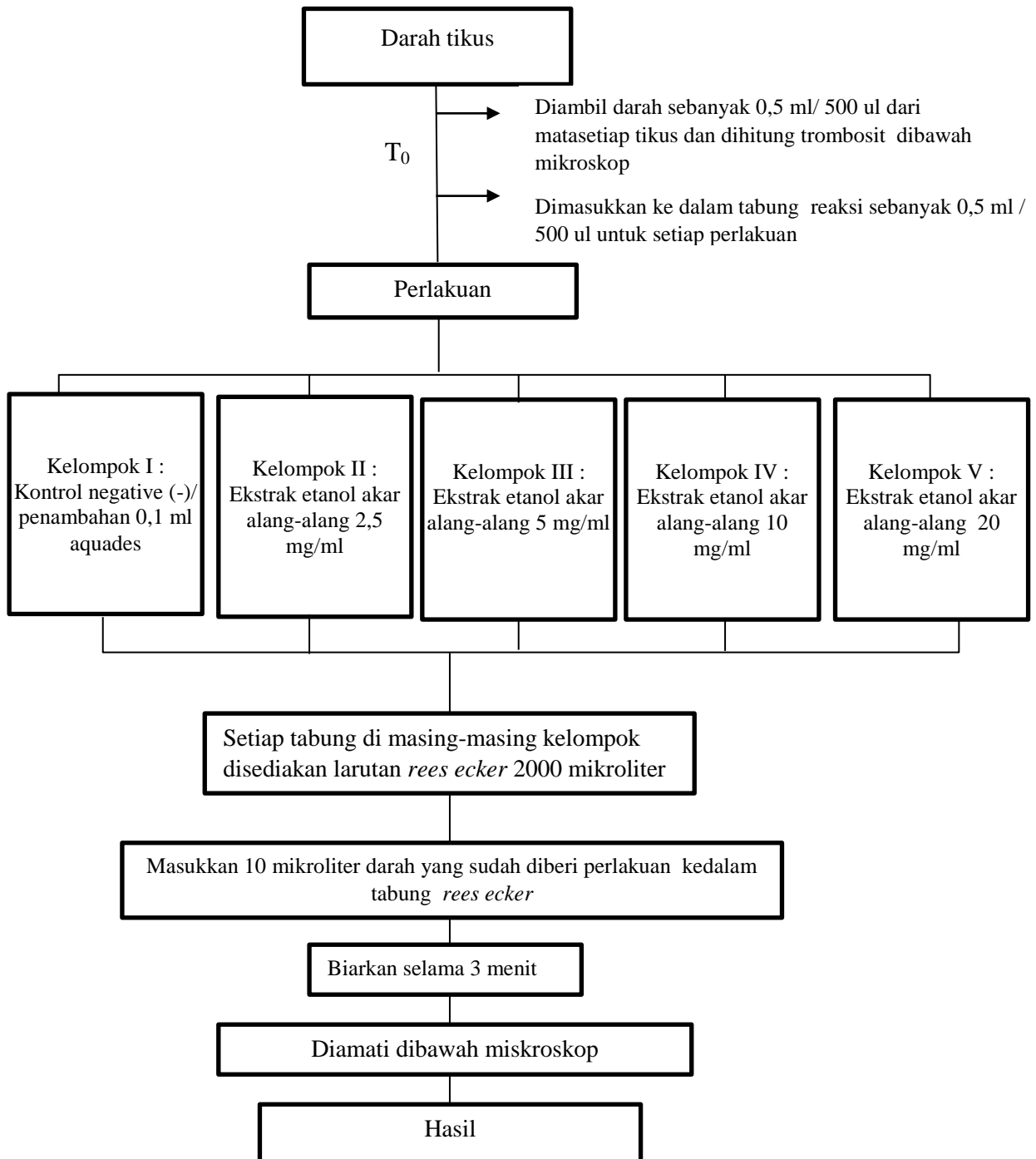
10. Pembuatan larutan sediaan uji dari larutan stok

Kelompok 1 diberikan aquades sebanyak 0,1 ml, kelompok II diberikan ekstrak akar alang-alang dengan konsentrasi 2,5 mg/ml sebanyak 0,2 ml dengan cara mengambil 0,5 ml dari larutan stok di taruh di labu takar dan ad kan sampai 10 ml. Kelompok III diberikan ekstrak akar alang-alang dengan konsentrasi 5 mg/ml sebanyak 0,2 ml dengan cara mengambil 1 ml dari larutan stok di taruh di labu takar dan ad kan sampai 10 ml. Kelompok IV diberikan ekstrak akar alang-alang dengan konsentrasi 10 mg/ml sebanyak 0,2 ml dengan cara mengambil 2 ml dari larutan stok di taruh di labu takar dan ad kan sampai 10 ml. Kelompok V diberikan ekstrak akar alang-alang dengan konsentrasi 20 mg/ml sebanyak 0,2 ml dengan cara mengambil 4 ml dari larutan stok di taruh di labu takar dan ad kan sampai 10 ml.

I. Skema Penelitian



Gambar 6. Perhitungan lisis bekuan darah



Gambar 7. Perhitungan jumlah trombosit

J. Analisis Data

Sebelum dilakukan uji hipotesis untuk mengetahui apakah ada perbedaan lisis bekuan darah dan penurunan jumlah trombosit (signifikan) dan hasil pengukuran lisis bekuan darah dan penurunan jumlah trombosit kelompok perlakuan diuji normalitasnya. Hal itu perlu dilakukan untuk menentukan apakah perlakuan uji hipotesis dilakukan dengan metode parametrik atau non parametrik. Uji normalitas data dilakukan dengan uji *Shapiro-Wilk*. Kriteria ujinya adalah apabila nilai signifikansi (asympt.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 statistik non parametrik meliputi *Kruskall-wallis*, *Mann Whitney* dan *Wilcoxon* (Awanda 2017).