

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi Dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini yaitu tanaman sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) yang berlokasi di daerah Tawangmangu Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel merupakan bagian dari suatu populasi. Sampel pada penelitian ini adalah daun sambung nyawa yang masih segar, tidak terkena serangan hama dan telah dicuci bersih dengan air mengalir setelah itu dikeringkan. Tumbuhan ini tumbuh di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak etanol daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) yang diperoleh dengan metode maserasi.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah peningkatan jumlah trombosit dan penurunan waktu pembekuan darah pada hewan uji yaitu tikus putih (*Rattus novergicus*).

Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah penggunaan tikus putih.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama terbagi menjadi tiga yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sambung nyawa dengan variasi beberapa dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah peningkatan jumlah trombosit dan penurunan waktu pembekuan darah.

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu terdiri dari hewan uji, kondisi kandang hewan uji, pemeliharaan hewan uji, metode uji yang digunakan, dan proses pengamatan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) adalah bagian dari tumbuhan sambung nyawa yang akan

digunakan dipilih dari daun yang masih muda dan segar yang diperoleh dari tanaman sambung nyawa yang tumbuh didaerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak daun sambung nyawa adalah ekstrak diperoleh dengan cara perajangan, pengeringan, kemudian diblender menjadi serbuk diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh dan dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96 %.

Ketiga, dosis ekstrak daun sambung nyawa adalah dosis yang diberikan kepada hewan uji ditentukan dengan dilakukan orientasi dosis $\frac{1}{2}$ DE, 1 DE, dan 2 DE.

Keempat, peningkatan trombosit adalah jumlah trombosit yang meningkat dalam darah hewan uji yang dihitung dengan alat *hematologi analyzer* yang memiliki kamar hitung.

Kelima, perhitungan waktu pembekuan darah adalah metode untuk melihat pembentukan benang fibrin menggunakan patahan tabung kapiler dengan mematahkan tabung kapiler per 1 cm setiap 30 detik dengan waktu normalnya selama 6 menit.

Keenam, heparin adalah obat yang digunakan untuk menginduksi hewan uji sehingga memicu terjadinya penurunan jumlah trombosit atau berfungsi sebagai antikoagulan dengan dosis 0,018 ml/200 gram BB tikus.

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis ekstrak yang sebanding dengan dosis 200 mg/Kg BB tikus yang menunjukkan pemulihan signifikan dari kerusakan yang disebabkan TAA (Tioasetamid) pada analisis jaringan hati tikus dan sebanding dengan kontrol positif (PSIDII®).

C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat maserasi, rotary evaporator, oven, batang pengaduk, labu ukur, gelas ukur, gelas kimia, gelas arloji, pipet tetes, cawan petri, erlenmeyer, corong, pipa kapiler, botol plastik, vial, tisu, kertas saring, lampu spritus, kain flanel, spatula, kurs, tabung reaksi, alat suntik, timbangan analitik, mikropipet, *alat hematology analyzer*, tabung EDTA.

2. Bahan

Penelitian ini memerlukan bahan-bahan seperti ekstrak daun sambung nyawa yang sudah dimaserasi dengan menggunakan pelarut

etanol 96 % , penginduksi heparin, PSIDII®, Na CMC 0,5 % , HCl, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, Bouchardat, serbuk Magnesium, HCl pekat, Amil alkohol, NaOH 20 % , FeCl₃, kloroform, pereaksi *Liebermann Burchard*, NaOH 0,1 N, H₂SO₄, dan aquades.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang dipakai adalah tikus putih jantan galur *Wistar*, berusia 3-4 bulan dengan berat badan berkisar antara 150-300 gram.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan *ethical clearance*

Pembuatan *ethical clearance* dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Surakarta. Hal pertama yang dilakukan yaitu mengisi formulir pendaftaran online. Mendatangi kantor forensik dan medikolegal RSUD Dr. Moewardi dengan menyerahkan bukti pendaftaran dan form yang telah diisi secara online, serta membawa proposal yang telah ditandatangani pembimbing. Melakukan pembayaran. EC akan diproses terlebih dahulu maksimal selama 14 hari. Pengambilan EC harus dilakukan secara mandiri disertai dengan bukti pengajuan yang telah ditandatangani petugas.

2. Determinasi tanaman

Sebelum memulai penelitian, penting untuk memastikan identitas tumbuhan dengan tujuan mencegah kesalahan dalam pengambilan tanaman untuk penelitian sehingga jenis tumbuhan yang diambil tepat dan dapat diverifikasi kebenaran spesies yang digunakan. Di Laboratorium B2P2TOOT di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, karakteristik dan morfologi tanaman sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) akan dianalisis untuk menjamin akurasi dan validitas hasil penelitian.

3. Pengambilan daun sambung nyawa

Sampel daun sambung nyawa berasal dari tanaman sambung nyawa yang tumbuh di wilayah Tawangmangu di Jawa Tengah. Daun sambung nyawa yang digunakan sebagai sampel harus masih segar dan tidak rusak oleh hama.

4. Pembuatan simplisia daun sambung nyawa

Sampel daun sambung nyawa yang digunakan untuk penelitian dipilah dengan metode sortasi basah. Hal ini dilakukan untuk membedakan atau menghilangkan kontaminan pada simplisia, yang

dicuci dengan air mengalir. Setelah dibersihkan, daun sambung nyawa dikeringkan dengan sinar matahari.

5. Pembuatan serbuk daun sambung nyawa

Daun sambung nyawa sebanyak 1200 gram yang telah kering diblender untuk mendapatkan serbuk yang halus kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40. Hasil serbuk kering daun sambung nyawa disimpan dalam wadah yang telah disiapkan.

6. Penetapan susut pengeringan serbuk simplisia

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan memanfaatkan *moisture balance* untuk mengatur susut pengeringan, serbuk daun sambung nyawa ditimbang sebanyak 2 gram, dan dimasukkan ke dalam *moisture balance* pada suhu 150°C. Penetapan susut pengeringan dilakukan tiga kali. Syarat susut pengeringan simplisia daun sambung nyawa yaitu tidak > 10% (Kemenkes RI, 2017).

7. Pembuatan ekstrak

Sebanyak 200 gram serbuk daun sambung nyawa ditimbang dan ditambahkan pelarut etanol 96 % dengan perbandingan 1:10 yaitu diukur 2000 ml pelarut etanol 96 % sebanyak tiga kali replikasi dan dilakukan penambahan pada serbuk daun sambung nyawa, setelah itu disimpan dalam bejana yang terlindung dari cahaya matahari. Wadah maserasi yang terdapat serbuk dan pelarut direndam selama 24 jam, dengan 6 jam perendaman pertama dilakukan pengadukan sesekali kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah maserasi selama 24 jam, filtrat dan ampas disaring. Hasil penyaringan ampas dilakukan proses maserasi lagi dengan menggunakan setengah bagian pelarut atau setara dengan 1000 ml pelarut etanol 96 % yang baru. Hasil filtrat ekstrak I dan hasil filtrat remaserasi digabungkan, kemudian dengan alat *rotary evaporator* diuapkan pada temperature 40-60 °C dengan kecepatan 65 rpm hingga ekstrak menjadi kental kemudian hitung rendemen yang didapat (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat (gram)}}{\text{Berat serbuk simplisia yang diekstrak (gram)}} \times 100 \%$$

8. Identifikasi kandungan senyawa

8.1 Alkaloid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditimbang lalu ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan tambahkan sebanyak 9 ml air suling kemudian sekitar 2 menit dipanaskan diatas tangas setelah itu disaring. Hasil filtrat kemudian dimasukan dalam 3 tabung reaksi dengan masing-masing tabung sebanyak 3 tetes. Kedalam tabung pertama

dimasukkan 3 tetes filtrat dan ditambahkan 2 tetes pereaksi *Dragendorff*, positif alkaloid jika terbentuk endapan warna jingga atau merah bata. Tabung yang kedua diambil 3 tetes filtrat ditambahkan pereaksi *Mayer* sebanyak 2 tetes dan jika positif ditandai dengan adanya endapan berwarna kuning atau putih. Tabung ketiga diambil 3 tetes filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi *Bouchardat*, hasil positif ditandai dengan endapan coklat – hitam (Marjoni dan Saifuddin, 2022).

8.2 Flavonoid. Dalam penelitian ini, 10 gram ekstrak ditimbang kemudian ditambahkan ke dalam 100 ml air panas dan dipanaskan selama 5 menit. Setelah itu, larutan disaring untuk memperoleh filtrat A. Selanjutnya, 5 ml dari filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi, diikuti dengan penambahan 0,1 gram serbuk magnesium, 1 ml HCl pekat, dan 2 ml amil alkohol. Campuran dikocok secara intensif, dibiarkan untuk memisah, dan hasilnya diperiksa. Terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan keberadaan flavonoid (Marjoni dan Saifuddin, 2022).

8.3 Tannin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 10 ml aquadest setelah itu disaring. Sebanyak 2 ml filtrat ditambahkan 1-2 tetes besi (III) klorida atau FeCl_3 positif tanin ditandai dengan pembentukan warna biru-hitam atau hijau-hitam (Marjoni dan Saifuddin, 2022).

8.4 Saponin. Dalam tabung reaksi, dimasukkan 0,5 gram ekstrak diambil dan ditambahkan 10 ml air suling panas didinginkan dan dikocok selama 10 detik ditunggu selama 10 menit sampai terbentuk buih atau busa dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N jika busa tidak hilang maka ekstrak tersebut mengandung saponin (Marjoni dan Saifuddin, 2022).

8.5 Steroid/ triterpenoid. Sebanyak 1 gram ekstrak dimaserasi dengan 20 ml N-heksan selama 2 jam lalu disaring menggunakan kertas saring. Filtrat disimpan dalam cawan porselin dan diuapkan setelah itu ditambahkan 7-8 tetes asetat anhidrida dan asam sulfat pekat selama 15 menit. Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan steroid sedangkan triterpenoid ditandai dengan pembentukan warna kecoklatan atau violet (Marjoni dan Saifuddin, 2022).

9. Penetapan kadar air ekstrak

Penetapan kadar air ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode Gravimetri, dimana dilakukan penimbangan wadah setelah diketahui bobot wadah ditimbang ekstrak etanol daun sambung nyawa

sebanyak 10 gram dimasukan ekstrak kedalam wadah kemudian dipanaskan pada suhu 105 °C. Pemakaian suhu 105 °C karena pada suhu tersebut diperkirakan kandungan air yang terdapat pada sel sebagian besar telah menguap karena air menguap pada suhu 100 °C. Proses pengeringan dilakukan selama 5 jam dan ekstrak ditimbang lagi setelah proses pengeringan. Proses pengeringan tetap dilanjutkan dan setiap 1 jam dilakukan penimbangan kembali ekstrak daun sambung nyawa. Proses akan diberhentikan sampai mencapai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Marjoni dan Saifuddin, 2022). Penetapan kadar air ekstrak tanaman sambung nyawa tidak boleh melebihi 11 % (FHI Edisi II, 2017).

Rumus perhitungan kadar air ekstrak :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{A - B}{A} \times 100 \%$$

Keterangan : A = Berat sampel sebelum dipanaskan (gram)

B = Berat sampel setelah dipanaskan (gram)

10. Persiapan hewan uji

Dalam penelitian ini, tikus sebagai hewan uji diperoleh dari Laboratorium Universitas Setia Budi. Tikus galur *Wistar* yang digunakan adalah tikus yang berat badannya berkisar antara 150-300 gram dengan umur 3-4 bulan sebanyak 24 ekor yang nantinya akan dibikin 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor. Tikus- tikus tersebut ditimbang berat badan dan diadaptasi dengan lingkungan dilaboratorium selama 1 minggu kemudian dipuaskan selama 16 jam tetapi diberi air minum sehingga dapat digunakan dalam penelitian ini.

11. Penentuan Dosis

Dosis ekstrak etanol daun sambung nyawa pada penelitian ini berdasarkan pada penelitian Jabbar *et al.*, (2023) yakni dosis 200 mg/Kg BB tikus sebagai efek pemulihan yang signifikan dari kerusakan yang disebabkan TAA (Tioasetamid) pada analisis jaringan hati tikus. Dosis penelitian ditentukan dengan orientasi dosis ½DE, 1DE, dan 2DE.

Dosis heparin yang digunakan sebagai penginduksi untuk menurunkan jumlah trombosit adalah 5000 unit/70 Kg BB sehingga volume pemberian adalah 0,018 ml/200 gram BB Tikus.

Dosis PSIDII® (*Psidii folium extract*) yang diberikan adalah 1500 mg/70 Kg BB sebagai kontrol positif kemudian diubah ke dosis tikus menjadi 18 mg/200 gram BB Tikus.

12. Perlakuan hewan uji

Pada penelitian ini hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok dengan masing-masing kelompok terdapat 4 ekor tikus putih galur *wistar*. Tikus dipuaskan selama 16 jam tetapi tetap diberi minum, perlakuan awal dilakukan dengan menghitung jumlah trombosit dan waktu pembekuan darah pada waktu ke - 0 (T_0). Kemudian hewan uji yang telah dilakukan pengukuran T_0 diinduksi heparin selama selang waktu 5 hari, kecuali kontrol normal. Setelah hari kelima yaitu hari keenam diukur penurunan jumlah trombosit dan waktu pembekuan darah akibat induksi heparin (T_1) dan di hari keenam tikus diinduksi sediaan uji ekstrak etanol daun sambung nyawa dengan kelompok sebagai berikut :

Kelompok 1: Kelompok normal (tanpa perlakuan)

Kelompok 2: Kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)

Kelompok 3: Kelompok kontrol positif (PSIDII® dosis 18 mg/200 Kg BB tikus)

Kelompok 4: Kelompok perlakuan dengan ekstrak dosis 100 mg/Kg BB

Kelompok 5: Kelompok perlakuan dengan ekstrak dosis 200 mg/Kg BB

Kelompok 6: Kelompok perlakuan dengan ekstrak dosis 400 mg/Kg BB

Penelitian ini dilakukan selama 6 hari dan diambil darah setiap kelompok pada hari ke-3 (T_2) dan hari ke-6 (T_3) setelah diinduksi ekstrak etanol daun sambung nyawa kemudian setelah didapat hasil penelitian dari T_0 sampai T_3 dan dilakukan perhitungan jumlah trombosit dan waktu pembekuan darah pada tikus .

13. Perhitungan jumlah trombosit

Dalam penelitian ini, untuk menghitung jumlah trombosit digunakan alat *hematologi analyzer* yang bekerja secara otomatis, memberikan keuntungan praktis dan hasil yang lebih akurat. Prosedur umum penggunaan *hematologi analyzer* adalah sebagai berikut:

- a. Sambungkan kabel daya ke stabilisator,
- b. Nyalakan alat menggunakan saklar *on/off* di sisi kanan bawah,
- c. Alat akan dimulai dengan tampilan "tolong tunggu" di layar display,
- d. Alat akan otomatis melakukan kalibrasi dan pemeriksaan latar belakang,
- e. Pastikan alat berada dalam posisi siap.

Untuk memeriksa sampel, langkah-langkahnya adalah sebagai berikut:

- a. Pastikan sampel darah homogen dengan menggunakan antikoagulan,

- b. Tekan tombol ID dan masukkan nomor sampel, lalu tekan enter,
- c. Letakkan sampel darah di probe penghisap dan tekan tombol bintang hingga terdengar bunyi bep-bep. Hasil akan ditampilkan di layar dan dicetak secara otomatis, termasuk hasil jumlah trombosit (*Platelet Count*).

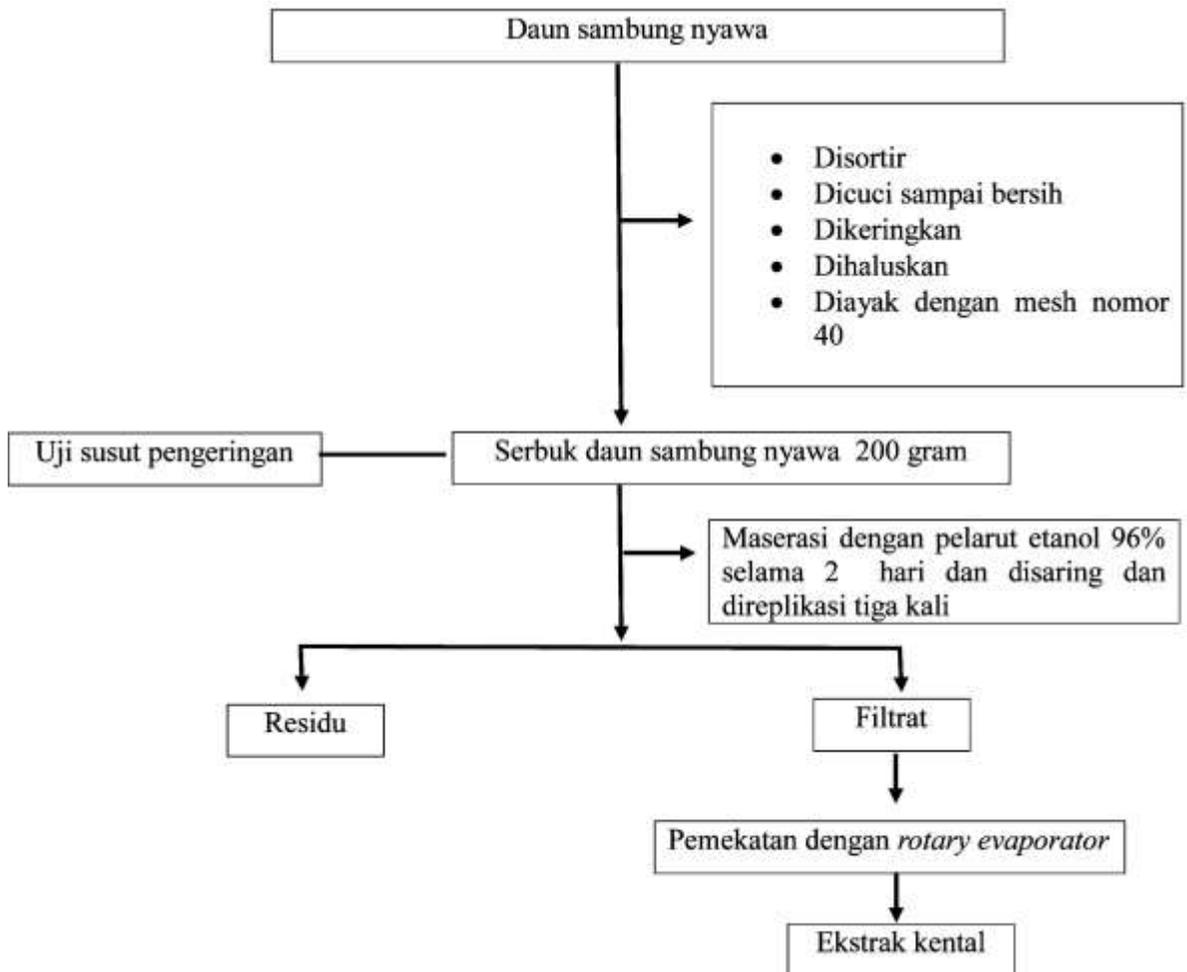
14. Pengukuran waktu pembekuan darah

Pengukuran untuk waktu pembekuan darah dilakukan dengan melihat pembentukan benang fibrin pada pipa yang dipatahkan tiap selang 30 detik, dengan menggores pipa kapiler sehingga mudah untuk dipatahkan. *Stopwatch* bekerja saat darah mulai mengalir ke vena orbital tikus melalui pipa. Pencatatan waktu pembekuan darah dilihat dari terbentuknya benang fibrin setiap 30 detik dan *stopwatch* bisa dihentikan. Waktu normalnya selama penelitian yaitu 6 menit.

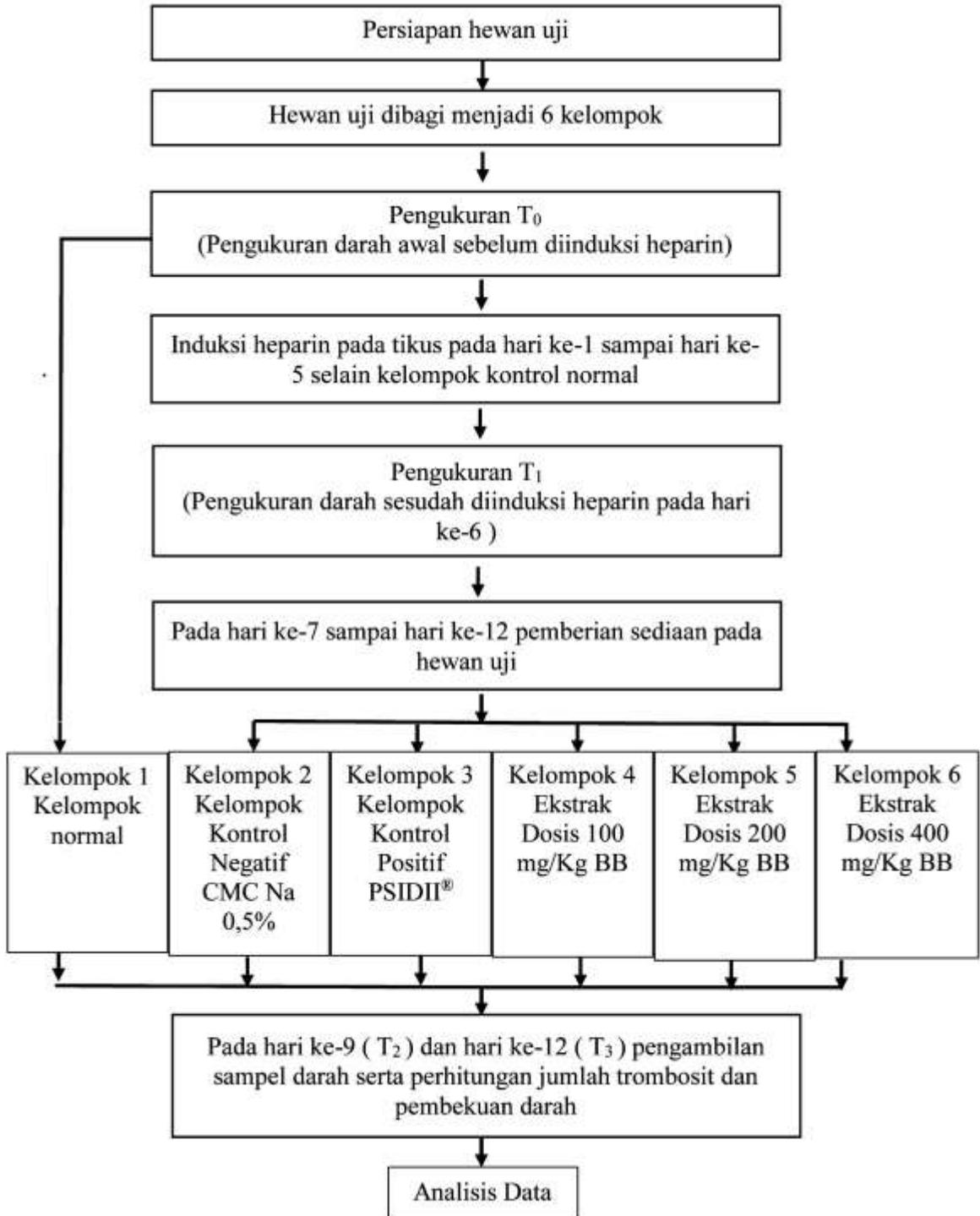
E. Analisis Data

Analisis data dilakukan dalam penelitian untuk mengetahui apakah data yang dihasilkan mengandung perbedaan yang signifikan dan berdistribusi normal. Program Statistik untuk Sains Sosial, atau SPSS, digunakan untuk menganalisis data. Karena jumlah data <50 , uji *Saphiro Wilk* digunakan untuk menguji distribusi normal ($p>0,05$), dan uji homogenitas varian dengan uji *Levene* digunakan untuk menguji distribusi normal ($p>0,05$). Jika data menunjukkan distribusi normal dan homogen, analisis dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) dan uji parametrik lanjutan (*post hoc test*), yaitu uji *Tukey*. Namun, jika data tidak menunjukkan distribusi normal dan homogen, uji non parametrik dilakukan menggunakan uji *Mann-Whitney*, dilanjutkan dengan uji perbandingan antar perlakuan menggunakan uji *Kruskal Wallis* ($p<0,05$). Analisis data dilakukan menggunakan uji *Paired T-Test* ($p<0,05$) untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan setelah diinduksi.

F. Skema Penelitian



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.)



Gambar 4. Prosedur penelitian peningkatan jumlah trombosit dan waktu pembekuan darah.