

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

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

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang digunakan dalam jalannya penelitian. Sampel yang digunakan adalah akar alang-alang berusia 3 bulan diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Desember 2018 yang mempunyai akar berserat dan berwarna kuning kecoklatan dalam keadaan basah dan tidak busuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Dalam penelitian ini menggunakan variabel utama ekstrak etanol akar alang-alang dalam dosis yang bervariasi. Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas hemostatis ekstrak akar alang-alang yang berupa waktu pendarahan, waktu pembekuan darah dan *protombin time* (PT). Variabel utama yang ketiga dalam penelitian ini adalah hewan uji mencit putih jantan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat variabel yang diteliti langsung. Variabel utama dapat diklasifikasikan kedalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dibuat untuk diteliti pengaruhnya terhadap variasi terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol akar alang-alang yang diperoleh dengan metode maserasi dan diujikan ke mencit putih jantan.

Variabel tergantung adalah titik persoalan yang merupakan kriteria penilaian dan variabel penelitian ini adalah aktivitas hemostatis dengan parameter waktu pendarahan, waktu pembekuan darah dan *protombin time* (PT).

Variabel terkendali adalah variabel yang berpengaruh besar terhadap variabel tergantung selain variabel bebas. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah kondisi fisik hewan uji seperti jenis kelamin, usia dan kondisi laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, hemostatis adalah mekanisme alami dari tubuh untuk menghentikan kehilangan darah yang berlebih.

Kedua, ekstrak etanol akar alang-alang adalah sediaan pekat yang diperoleh dari akar alang-alang yang telah dibuat simplisia, dibuat serbuk dan dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% selanjutnya dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Ketiga, akar alang-alang adalah bagian akar dari alang-alang berusia 3 bulan yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Desember 2018 dalam keadaan basah dan tidak busuk.

Keempat, hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan dalam keadaan sehat yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kelima, heparin adalah obat golongan antikoagulan yang digunakan sebagai penginduksi pada penelitian ini dengan dosis 0,01 ml/ 20 g BB mencit.

Keenam, waktu pendarahan adalah interval waktu antara timbulnya darah yang keluar hingga darah berhenti mengalir. Darah diperoleh dari ujung ekor mencit putih jantan yang keluar diserap dengan kertas saring.

Ketujuh, waktu pembekuan darah adalah waktu yang digunakan untuk membentuk benang-benang fibrin. Darah diperoleh dari ekor mencit putih jantan yang diserap oleh pipa kapiler selama 30 detik sehingga membentuk benang-benang fibrin.

Kedelapan, *protombin time* (PT) adalah lamanya waktu yang digunakan untuk membentuk fibrin dari plasma sitrat setelah penambahan tromboplastin jaringan dan ion Ca dalam jumlah optimal.

Kesembilan, dosis efektif adalah dosis terkecil diberikan ke hewan uji yang sudah memberikan efek hemostatis.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, loyang, oven, neraca, mesin penggiling, dan ayakan no. 40. Botol kaca untuk maserasi, botol penampung, gelas piala, corong gelas, batang pengaduk, kertas saring, kain flanel, *Sterling-Bidwell* dan *rotary evaporator*. Kandang hewan uji, timbangan untuk menimbang hewan uji, alat makan dan alat minum hewan uji, masker, handsoon, pipa kapiler, *stopwatch*, spuit 1cc, pipet, sonde, tabung reaksi, pipet tetes, pipa kapiler, *waterbath* dan tabung serologis berbaham plastik.

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah akar alang-alang, etanol 70%, aquadest, heparin, asam traneksamat dan Na CMC. Bahan kimia yang digunakan adalah FeCl_3 , NaCl , H_2SO_4 pekat, kloroform, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Hanger, alkali, pereaksi Dragendorf, natrium sitrat 3,2% dan reagen TEClot PT-S.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan yang mempunyai berat badan antara 20-25 gram yang berumur 2-4 bulan sebanyak 25 ekor.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tumbuhan

Langkah awal yang dilakukan untuk penelitian ini adalah determinasi tumbuhan alang-alang di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Tujuan dilakukan determinasi tumbuhan adalah untuk mengetahui

kebenaran dari tumbuhan yang diambil, menghindari pencampuran bahan dengan bahan yang lain dan menghindari kesalahan pengambilan tumbuhan.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel akar alang-alang dilakukan dengan cara mengambil bahan baku yang masih basah kemudian dilakukan sortasi basah dengan cara dicuci dengan air mengalir yang berguna untuk menghilangkan sisa kotoran yang masih menempel pada tanaman. Akar alang-alang dirajang menjadi kecil untuk memudahkan dalam pengeringan dan pengepakan, penggilingan dan penyimpanan. Pengeringan dilakukan bertujuan untuk menghilangkan air agar tidak ditumbuhi jamur dan atau bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat mempengaruhi zat aktif (Gunawan & Mulyani 2004).

Selanjutnya simplisia dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C. Setelah dioven dan keringnya merata, simplisia siap digunakan untuk tahap penyerbukan. Simplisia dibuat serbuk dengan tujuan memperbesar luas permukaan dan diayak dengan ayakan nomor 40.

3. Pembuatan serbuk akar alang-alang

Simplisia yang telah kering lalu dihaluskan dengan mesin penghalus dan diayak dengan ayakan nomor 40. Simplisia dibuat serbuk dengan tujuan memperluas permukaan serbuk dengan pelarut sehingga mendapatkan senyawa aktif lebih banyak pada saat ekstraksi (Gunawan & Mulyani 2004).

4. Pembuatan ekstrak etanol akar alang-alang

Dalam penelitian ini pembuatan ekstrak etanol akar alang-alang menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 5000 ml. Ekstraksi dilakukan dengan cara memasukkan 500 gram serbuk akar alang-alang ke dalam botol kedap cahaya kemudian ditambahkan 5000 ml liter etanol 70%. Serbuk akar alang-alang yang sudah dicampur etanol 70% direndam selama 6 jam pertama sekali-kali diaduk, kemudian mendiamkan selama 18 jam sambil sering diaduk dan pengocokan berulang. Setelah 18 jam, filtrat disaring menggunakan kain flanel. Proses tersebut diulangi penyariannya sekurang-kurangnya dua kali dengan menggunakan jumlah dan jenis pelarut yang sama. Semua maserat yang didapatkan dikumpulkan 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 diuapkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan untuk pembuatan ekstrak (Depkes 2008).

5. Penetapan kadar air ekstrak etanol akar alang-alang

Penetapan kadar air ekstrak etanol akar alang-alang dilakukan dengan alat *Sterling-Bidwell*. Penetapan kadar air dilakukan dengan cara menimbang 20 g ekstrak, lalu dimasukkan dalam labu kering yang sudah diberi batu didih secukupnya. Dimasukkan kurang lebih 200 ml toluen jenuh air ke dalam labu dan dipanaskan dengan hati-hati. Pemanas dihentikan jika air pada penampung tidak menetes lagi (kurang lebih 1 jam) kemudian dibaca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam satuan % v/b (Kemenkes RI 2013).

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

6.1 Identifikasi tanin. Identifikasi tanin dapat dilakukan dengan cara melarutkan 1 g serbuk dan 1 gram ekstrak masing-masing dengan 100 ml air panas kemudian mendidihkan selama 5 menit, didinginkan, disaring dan diambil filtratnya sebanyak 5 ml. Memasukkan filtrat dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi FeCl_3 1%. Tanin dapat dikatakan positif apabila terbentuk warna violet atau hijau kehitaman (Sarker 2006)

6.2 Identifikasi saponin. Identifikasi saponin dapat dilakukan dengan cara uji buih. Uji buih dilakukan dengan cara mengencerkan 1 g serbuk dan 1 g ekstrak masing-masing dengan menggunakan 20 ml air suling dikocok dalam 15 menit. Saponin ditunjukkan jika busa yang dihasilkan tetap ada selama 10 menit (Tiwari *et al.* 2011).

6.3 Identifikasi alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara melarutkan 1 gram serbuk dan 1 gram ekstrak masing-masing dengan menggunakan 100 ml air panas kemudian disaring menggunakan kertas saring dan diambil filtratnya kemudian menambahkan 5 ml kloroform dan 5 ml amonia. Alkaloid ditunjukkan dengan uji Mayer dengan penambahan pereaksi Mayer

membentuk endapan berwarna kuning. Uji Wagner dengan penambahan pereaksi Wagner membentuk endapan merah kecoklatan. Uji Dragendrof dengan penambahan pereaksi Dragendrof membentuk endapan merah. Uji Hager dengan penambahan pereaksi Hager membentuk endapan kuning (Seniwaty *et al.* 2009).

6.4 Identifikasi flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 1 g serbuk dan 1 gram ekstrak ditambahkan dengan 100 ml air panas kemudian mendidihkan selama 5 menit, disaring dan diambil filtratnya sebanyak 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, 1 ml asam klorida dan 2 ml amil alkohol, mengocok kuat dan biarkan memisah. Positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Serker 2006).

7. Persiapan hewan uji

Jumlah hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 25 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan tiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit putih jantan. Mencit putih jantan mempunyai berat badan antara 20-25 gram dan berumur 2-4 bulan dalam keadaan sehat yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Universitas Setia Budi Surakarta. Sebelum digunakan hewan uji harus diadaptasikan di lingkungan laboratorium dan dipuasakan sebelum digunakan tetapi tetap diberikan minum.

8. Pembuatan larutan induksi

Pada pengujian ini semua kelompok perlakuan diberikan heparin sebagai zat penginduksi. Dosis heparin yang diberikan adalah 0,01 ml/ 20 g BB mencit secara subkutan selama 5 hari. Hari pertama setelah penyuntikan diukur waktu pendarahan, waktu pembekuan darah dan *protombine time* (PT) sebagai data setelah diinduksi (Th) (Apriyani *et al.* 2011).

9. Pembuatan suspensi untuk kelompok kontrol

9.1 Kontrol negatif. Pada pengujian ini dilakukan dengan memberikan Na CMC sebagai kontrol negatif. Diberikan Na CMC karena fungsinya hanya sebagai suspending agent dan tidak memiliki aktifitas sebagai hemostatis. Dibuat suspensi Na CMC 0,5% dengan cara menimbang Na CMC 0,5 g dan dikembangkan dalam 20 ml aquadest panas, lalu didiamkan selama 15 menit

digerus sampai homogen hingga memperoleh massa Na CMC yang transparan dan tambahkan aquadest hingga 100 ml.

9.2 Kontrol positif. Pada pengujian ini diberikan asam traneksamat sebagai kontrol positif. Dosis asam traneksamat yang diberikan adalah 65 mg/kg BB. Asam traneksamat diberikan secara oral selama 6 hari pagi dan sore (Apriyani *et al.* 2011).

10. Pembuatan ekstrak etanol akar alang-alang 3%

Ekstrak etanol akar alang-alang dibuat suspensi oral 3% dengan cara menimbang ekstrak etanol akar alang-alang sebanyak 3 g kemudian menambahkan dengan sedikit aquadest dan menuang sedikit demi sedikit CMC Na yang telah dikembangkan dengan air panas pada *beaker glass* 100 ml lalu mencampur campuran hingga larut kemudian ditambahkan aquadest hingga batas.

11. Uji farmakologi

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan berumur 2-3 bulan. Jumlah hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 25 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan tiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit putih jantan. Mencit putih jantan mempunyai berat badan berat badan antara 20-25 gram diadaptasikan dalam kandang hewan selama 7 hari. Mencit putih jantan dipuasakan dahulu selama 16 jam tetapi tetap diberi minum. Kemudian dilakukan pengukuran waktu pendarahan, waktu pembekuan darah dan *protombin time* (PT) untuk mengetahui waktu ke-0 (T_0) setelah itu mencit diistirahatkan satu hari. Setelah diistirahatkan sehari mencit diberikan heparin selama 5 hari sebagai penginduksi kemudian dilakukan pengukuran waktu pendarahan, waktu pembekuan darah dan *protombine time* (PT) untuk mengetahui waktu setelah pemberian induksi (T_h).

Pengujian dilakukan dengan memberikan suspensi asam traneksamat sebagai kontrol positif, suspensi Na CMC sebagai kontrol negatif dan ekstrak etanol akar alang-alang secara peroral dengan menggunakan sonde 2 kali sehari (pagi dan sore) selama 6 hari. Mencit yang sudah diberikan kelompok oral dimasukkan ke kandang mencit sembari diberikan tanda di ekornya.

11.1 Pengukuran waktu pendarahan. Pada pengukuran pendarahan, ujung ekor mencit putih jantan disayat dan darah diserap dengan kertas saring. Pada saat darah keluar dijalankan *stopwatch*. Waktu pendarahan dilihat dari tetes pertama darah keluar hingga darah tidak menetes lagi (Vogel 2002).

11.2 Pengukuran waktu pembekuan darah. Darah diambil dari vena orbital mata mencit. Darah diserap dengan pipa kapiler selama 30 detik. Pipa kapiler dipatahkan setiap interval waktu 15 detik hingga teramati pembentukan benang fibrin pada bagian yang dipatahkan. Waktu pembekuan darah adalah waktu yang diperlukan untuk membentuk benang fibrin tersebut (Vogel 2002).

11.3 Pengukuran *protombin time* (PT). Darah diambil dari vena orbital mata mencit kemudian ditampung pada tabung serologis yang sebelumnya sudah ditambahkan dengan Na sitrat 3,2% dengan perbandingan 9:1 kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 Rpm selama 15 menit untuk mendapatkan plasma miskin trombosit. Inkubasi reagen TEClot PT-S pada suhu 37°C selama 10 menit. Memasukkan 25 µl sampel plasma darah sitrat dalam tabung serologis inkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 menit. Memasukkan 50 µl reagen TEClot PT-S yang telah diinkubasi pada suhu 37°C dan mulai menyalakan stopwatch. Tabung dimiringkan berulang sampai membentuk gumpalan dan mencatat waktu yang diperlukan untuk membentuk gumpalan dalam satuan detik (Bamidele *et al.* 2010).

12. Analisis data

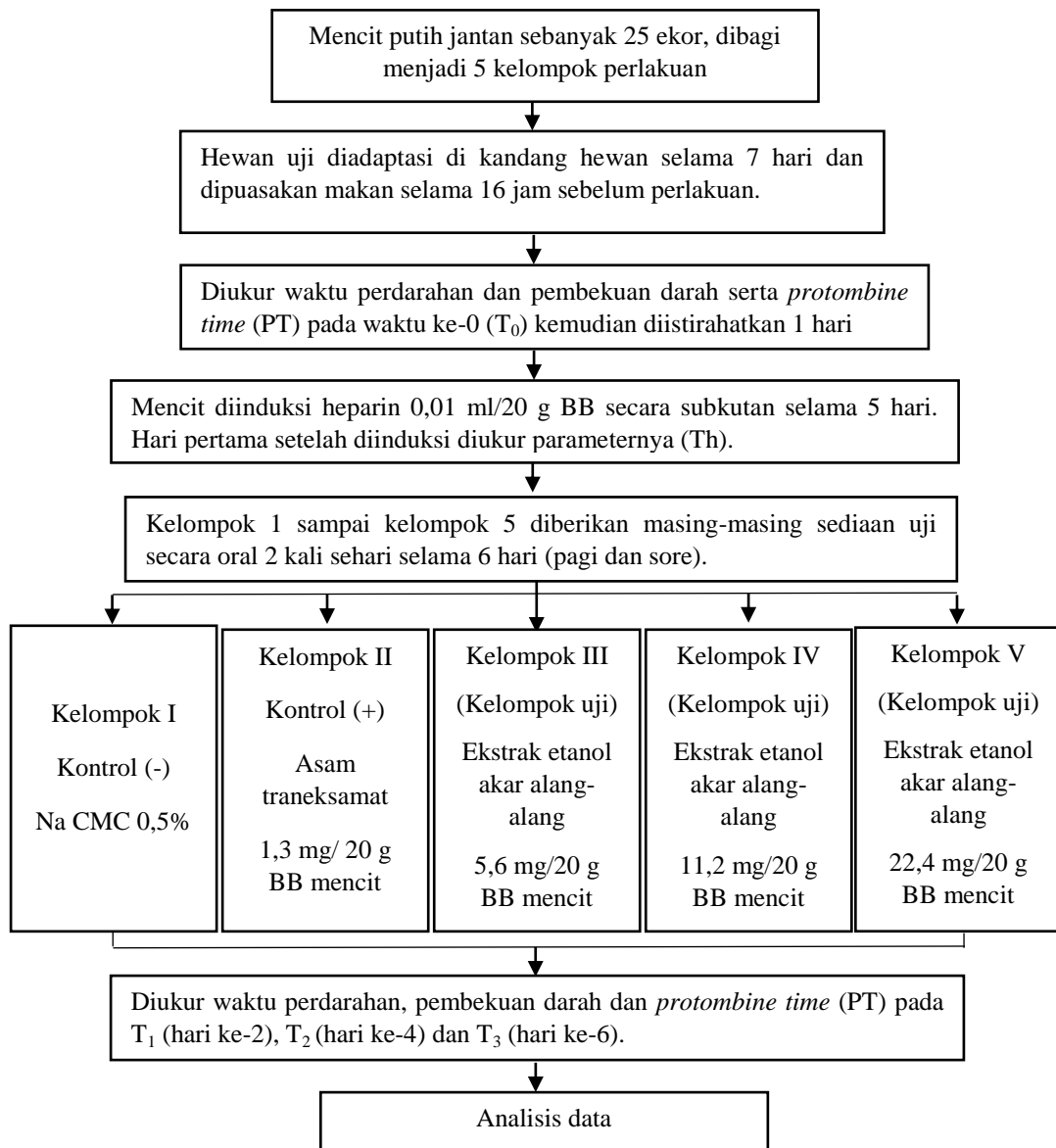
Untuk mengetahui apakah ada perbedaan waktu pendarahan, waktu pembekuan darah dan waktu *protombin time* (PT) yang nyata (signifikan) dan harus diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk*. Hal itu perlu dilakukan untuk mengetahui apakah perlakuan uji hipotesis dilakukan dengan metode parametik atau non parametik. Apabila nilai signifikansi (*asympt.sig*) lebih dari 0,05 maka data terdistribusi normal, sebaliknya jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka data tidak terdistribusi normal. Jika hasil terdistribusi normal, maka uji dilakukan dengan metode statistik parametik *One Way ANOVA* satu jalan dan dilanjutkan dengan uji parametik (*post hoc test*) yaitu uji *Tukey* tergantung nilai homogenitas

variannya. Hasil tidak terdistribusi normal, maka uji hipotesis menggunakan metode *Kruskall wallis* (Awanda 2017).

13. Perlakuan hewan uji pasca penelitian

Pada akhir penelitian hewan uji dimusnahkan dan jasad hewan uji dikubur dengan membuat lubang dengan kedalaman minimal setengah meter untuk menghindari terbongkarnya tempat penguburan. Hewan uji dikubur di tempat yang telah disediakan di Universitas Setia Budi Surakarta.

E. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema pengukuran waktu perdarahan, pembekuan darah, dan *protomine time* (PT).