

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan objek utama yang menjadi fokus utama dalam penelitian. Populasi pada penelitian ini adalah ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa tengah.

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba patikan kebo atau seluruh bagian dari tanaman patikan kebo di atas tanah yang telah dicuci bersih dengan air mengalir kemudian dikeringkan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak herba patikan kebo.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah peningkatan aktivitas jumlah trombosit dan penurunan waktu pembekuan darah pada hewan uji.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah penggunaan tikus putih.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi dikelompokkan menjadi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang dapat diubah-ubah dan diteliti pengaruhnya. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak herba patikan kebo dengan variasi dosis.

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas dan menjadi kriteria peneliti. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah peningkatan jumlah trombosit dan penurunan waktu pembekuan darah.

Variabel terkendali adalah variabel yang perlu dikontrol atau dikendalikan karena dapat mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas yang diteliti. Variabel terkendali dalam penelitian ini meliputi hewan uji, kondisi kandang hewan uji, pemeliharaan hewan uji, metode uji yang digunakan, serta proses pengamatan.

C. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, ekstrak herba patikan kebo adalah ekstrak yang didapatkan dari tanaman patikan kebo yang dilakukan perajangan dan pengeringan hingga kering sempurna, setelah itu, tanaman yang sudah kering dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan blender, kemudian diayak dengan ayakan ukuran 80 mesh, kemudian dibuat ekstrak dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%, setelah proses ekstraksi, ekstrak tersebut kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator*.

Kedua, dosis ekstrak patikan kebo adalah dosis yang diberikan kepada hewan uji. Dosis penelitian ditentukan dengan dilakukan orientasi dosis $\frac{1}{2}n$, 1n, dan 1,5n dosis, sehingga dosis yang digunakan pada penelitian adalah dosis 90 mg/Kg BB, 180 mg/Kg BB, dan 270 mg/Kg BB tikus

Ketiga, peningkatan jumlah trombosit adalah jumlah peningkatan trombosit dalam darah hewan uji yang dihitung menggunakan alat *hematology analyzer* dengan kamar hitung.

Keempat, Menghitung pembekuan darah berdasarkan pada terbentuknya benang fibrin pada patahan tabung kapiler.

Kelima, larutan penginduksi adalah larutan yang diberikan kepada hewan uji untuk memicu terjadinya penurunan jumlah trombosit. Larutan penginduksi yang digunakan adalah heparin yang merupakan obat antikoagulan dengan dosis 0,018 mL/200 g BB tikus.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

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

2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak patikan kebo yang telah dimaserasi dengan etanol 96%, penginduksi heparin, PSIDII, Na CMC 0,5%, HCl, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, Bouchardat, Serbuk Mg, HCl pekat, Amil

alkohol, NaOH 20%, FeCl₃, kloroform, pereaksi *Liebermann Burchard*, NaOH 1 N, H₂SO₄, dan akuades.

3. Hewan uji

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

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Proses determinasi tanaman merupakan langkah awal untuk memastikan identitas tanaman patikan kebo yang diambil. Langkah ini penting untuk mencegah kesalahan dalam pemilihan tanaman dan menghindari tercampurnya bahan dari tanaman lain. Determinasi tanaman dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) yang berada di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pembuatan simplisia

Pembuatan simplisia diawali dengan mencuci bersih seluruh bagian tanaman patikan kebo kecuali akar yang masih segar dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada tanaman, bagian tanaman kemudian diiris atau dirajang, lalu dikeringkan menggunakan sinar matahari dengan suhu 26-40°C. Simplisia yang telah kering kemudian diblender untuk mendapatkan serbuk halus dan diayak dengan pengayak nomor 60 sehingga didapatkan serbuk halus simplisia (Kemenkes RI, 2017). Serbuk simplisia kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat dan disimpan di ruangan yang terlindung dari cahaya matahari dan kelembaban.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk simplisia

Penetapan susut pengeringan memiliki tujuan untuk mengestimasi persentase senyawa yang hilang setelah dilakukan proses pengeringan (Depkes, 2000). Susut pengeringan merujuk pada penurunan berat bahan setelah mengalami proses pengeringan sesuai prosedur yang telah ditetapkan. Sesuai monografi, simplisia harus berbentuk serbuk dengan derajad halus nomor 8 dan dikeringkan pada suhu 105°C. Proses penetapan susut pengeringan dilakukan dengan menimbang dengan saksama 1 sampai 2 gram simplisia dalam botol

timbang yang telah dipanaskan pada suhu penetapan, kemudian ditimbang. Simplisia dalam botol timbang diratakan agar membentuk lapisan setebal sekitar 5 sampai 10 mm. Botol timbang yang berisi simplisia kemudian dikeringkan pada suhu yang telah ditetapkan sambil dibuka tutupnya sampai bobot tetap yakni bobot antara penimbangan berturut-turut setelah dikeringkan selama satu jam tidak melebihi 0,25% atau 0,5 mg. Botol sebelum ditimbang dibiarkan tertutup mendingin di dalam eksikator hingga suhu ruang kemudian ditimbang sampai berat konstan (Kemenkes RI, 2017). Penetapan susut pengeringan serbuk simplisia dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

4. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak herba patikan kebo menggunakan metode maserasi. Serbuk herba patikan kebo diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk simplisia dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10, kemudian wadah maserasi ditutup rapat dan direndam selama 24 jam, pada 6 jam pertama campuran diaduk sesekali, kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserasi dilakukan selama 24 jam kemudian filtrat dan ampas disaring. Hasil penyaringan ampas kemudian dilakukan proses maserasi lagi dengan menggunakan 5 bagian pelarut etanol 96% yang baru. Hasil dari proses maserasi dan remaserasi dikumpulkan dan diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40-60 °C dengan kecepatan 65 rpm hingga didapatkan ekstrak kental. Hasil ekstrak kemudian dihitung rendemennya (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang dapat (g)}}{\text{Berat sampel yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$

5. Identifikasi senyawa kimia ekstrak

Skrining fitokimia dilakukan dengan membuat larutan uji, larutan uji disiapkan dengan cara melarutkan 500 mg ekstrak dalam 50 mL pelarut yang cocok.

5.1 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 2 mL larutan diuapkan dan diperoleh residu, residu kemudian dilarutkan menggunakan 5 mL HCl dan dibagi menjadi 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi *Dragendorff*, hasil positif ketika terbentuk endapan berwarna jingga, tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi *Mayer*, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna kuning, tabung ketiga ditambahkan pereaksi *Bouchardat*, hasil positif

akan ditunjukkan dengan terbentuk endapan berwarna coklat (Afridan dan Sanova, 2020).

5.2 Identifikasi flavonoid. Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan 3 tabung reaksi dan masing-masing tabung reaksi dimasukkan 1 ml larutan. Tabung reaksi pertama sebagai kontrol. Tabung reaksi kedua dilakukan uji *test Wilstatter* dengan alkohol ditambahkan HCL pekat dan logam Magnesium, hasil positif akan ditandai dengan terbentuknya warna orange sampai merah (Karim *et al.*, 2015). Tabung reaksi ketiga ditambahkan beberapa tetes NaOH 20%, hasil positif flavonoid apabila terbentuk warna kuning (Yuda *et al.*, 2017).

5.3 Identifikasi tanin. Larutan sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan FeCl_3 , positif tanin ditunjukkan dengan terbentuk warna hijau violet atau hijau kehitaman (Yuda *et al.*, 2017).

5.4 Identifikasi saponin. Larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 4 mL kemudian tambahkan akuades sebanyak 5 ml, kemudian kocok kuat dan amati terbotol bentuknya busa akan hilang atau tidak dalam waktu 10 menit. Senyawa saponin dalam ekstrak ditandai dengan terbentuknya busa (Yuda *et al.*, 2017).

5.5 Identifikasi triterpen/steroid. Larutan sebanyak 2 mL diuapkan kemudian residu dilarutkan dengan menggunakan kloroform sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi *Lieberman Burchard* yang terdiri dari 3 tetes asam asetat anhidrat dan ditambahkan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung. Adanya triterpen ditunjukan dengan terbentuknya cincin kecoklatan atau violet, dan adanya steroid ditunjukkan dengan adanya cincin biru kehijauan (Yuda *et al.*, 2017).

5.6 Identifikasi antrakuinon. Ekstrak sebanyak 50 mg ditambahkan air sebanyak 10 mL kemudian dipanaskan selama 5 menit, disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 mL kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah (Yuda *et al.*, 2017).

6. Penetapan kadar air ekstrak

Penetapan kadar air menggunakan metode Gravimetri dimana prinsip dari metode ini berdasarkan penguapan air yang terkandung dalam bahan dengan jalannya pemanasan. Penetapan kadar air dengan metode Gravimetri dilakukan dengan menimbang secara saksama

kurang lebih 10 gram sampel kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang sebelumnya sudah ditimbang kemudian dilakukan pengeringan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Proses pengeringan dilanjutkan dan dilakukan penimbangan setiap selang waktu 1 jam hingga perbedaan penimbangan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes RI, 2017). Penetapan kadar air dilakukan 3 kali replikasi.

7. Persiapan hewan uji

Tikus putih jantan galur *Wistar* menjadi hewan uji yang digunakan dalam penelitian, diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi dengan bobot berkisar antara 150-300 gram, berumur 3-4 bulan. Jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian adalah 24 ekor, dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Awal mula perlakuan, setiap tikus ditimbang dan diberi tanda pada bagian ekor kemudian tikus, kemudian diaklimatisasi dengan lingkungan laboratorium selama kurang lebih satu minggu. Tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 16 jam sebelum digunakan dalam penelitian dengan diberi air minum.

8. Penentuan dosis hewan uji

Berdasarkan dosis empiris nya, patikan kebo digunakan sehari-hari dengan cara direbus sebanyak kurang lebih 50 gram bahan segar atau 10 gram bahan kering yang dipotong-potong dan dihancurkan hingga ukuran lebih kecil dan direbus menggunakan air sebanyak kurang lebih 150 mL. Dosis ekstrak etanol patikan kebo pada penelitian ini berdasarkan pada penelitian Lingga *et al.* (2014) yakni dosis 180 mg/Kg BB Tikus sebagai efek diuretik. Dosis penelitian ditentukan dengan dilakukan orientasi dosis $\frac{1}{n}$, 1n, dan 1,5n dosis, sehingga dosis yang digunakan pada penelitian adalah dosis 90 mg/Kg BB, 180 mg/Kg BB, dan 270 mg/Kg BB tikus

Dosis heparin yang digunakan sebagai penginduksi penurunan jumlah trombosit adalah 5000 unit/70 Kg BB sehingga volume pemberian pada penelitian adalah 0,018 ml/200 g BB tikus.

Dosis PSIDII® yang diberikan adalah 1000 mg/70 Kg BB sebagai kontrol positif kemudian diubah ke dosis tikus menjadi 18 mg/200 gram BB tikus.

9. Perlakuan hewan uji

Uji aktivitas ekstrak herba patikan kebo terhadap peningkatan jumlah trombosit dan waktu pembekuan darah menggunakan tikus

putih jantan galur Wistar yang telah dipersiapkan pada persiapan hewan uji dan dibagi ke dalam 6 kelompok masing-masing 4 ekor tikus putih. Tikus dipuaskan makan selama 16 jam dan tetap diberi minum. Awal perlakuan, dilakukan pengukuran dengan menghitung jumlah trombosit, dan waktu pembekuan darah pada waktu ke-0 (T_0). Hewan uji setelah dilakukan pengukuran T_0 , kemudian diberi heparin selama lima hari sebagai penginduksi terjadinya penurunan trombosit, kecuali kontrol normal. Hari kelima diukur penurunan jumlah trombosit dan waktu pembekuan darah yang diakibatkan induksi heparin (T_1). Hari ke enam hewan uji diberikan sediaan uji sesuai dengan pembagian kelompok uji yaitu sebagai berikut:

Kelompok 1 : Kontrol normal (tidak diberi perlakuan)

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

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

Kelompok 4 : sediaan uji dosis ekstrak 90 mg/Kg BB

Kelompok 5 : sediaan uji dosis ekstrak 180 mg/Kg BB

Kelompok 6 : sediaan uji dosis ekstrak 270 mg/Kg BB

Perlakuan dengan sediaan uji dilakukan selama 6 hari, diambil darah setiap kelompok pada hari ke-3 (T_2) dan hari ke-6 (T_3) dan dilakukan perhitungan jumlah trombosit dan waktu pembekuan darah.

10. Perhitungan jumlah trombosit

Perhitungan jumlah trombosit dilakukan dengan cara automatik yakni menggunakan alat *hematologi analyzer*. Pemeriksaan dengan cara autometik memiliki keuntungan yakni lebih praktis dan hasil yang didapatkan lebih akurat. Cara kerja dari alat *hematologi analyzer* adalah *self check*, yakni sampel darah yang akan dicek dipastikan homogen dengan antikoagulan, kemudian tekan tombol “whole blood” pada layar dan tekan tombol “ID” untuk memasukkan nomor sampel dan tekan “enter”. Sampel diletakkan pada adaptor kemudian ditutup dan tekan tombol “run”. Hasil akan muncul secara otomatis pada layar display alat. Hasil pemeriksaan pada alat *hematologi analyzer* adalah pemeriksaan darah secara lengkap sehingga untuk melihat hasil jumlah trombosit maka dilihat hasil PLT (*Platelet Count*) pada layar (Ramadhani dan Raga, 2022).

11. Pengukuran waktu pembekuan darah

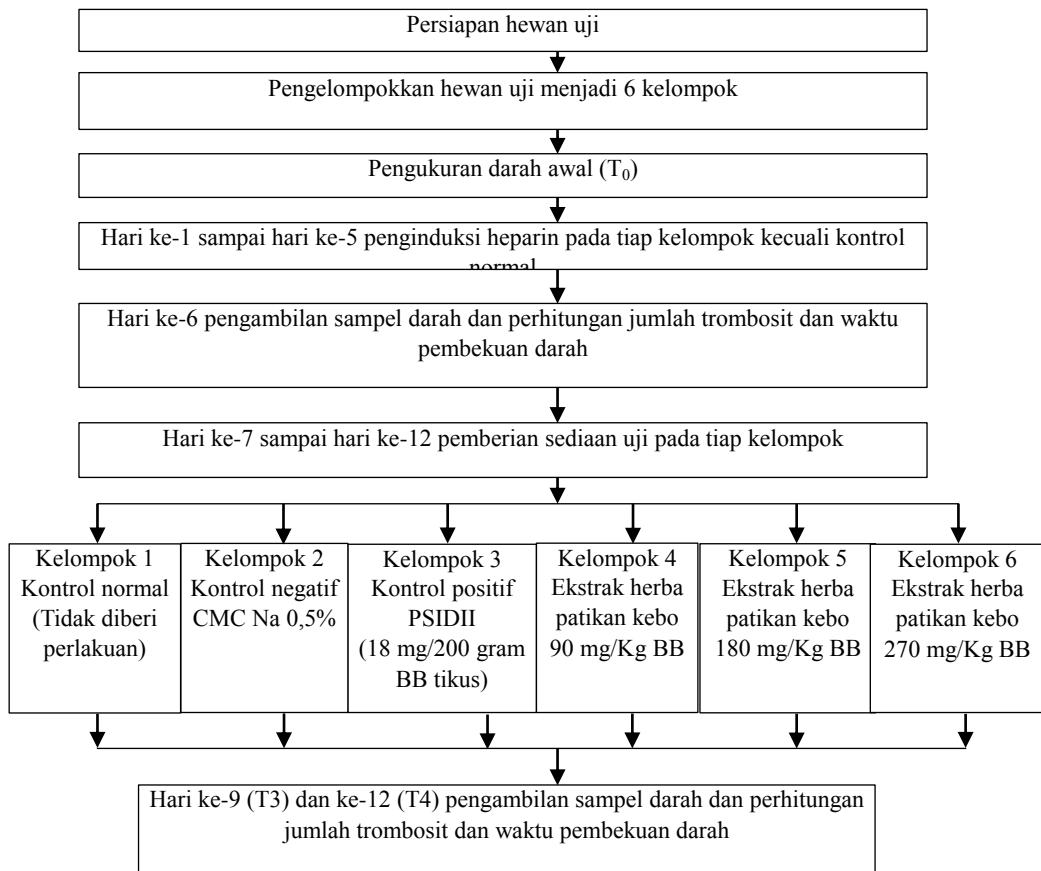
Pengukuran waktu pembekuan darah dilakukan dengan cara tabung kapiler dengan mengamati terbentuknya benang fibrin pada pipa kapiler yang dipatahkan tiap selang watu 1 menit. Pipa kapiler yang

digunakan sebelumnya telah digores sehingga mudah dipatahkan. Pipa kapiler ditusukkan pada vena orbital tikus dan saat awal darah mulai *stopwatch* dijalankan. Tiap 30 detik pipa kapiler dipatahkan sampai terlihat adanya benang fibrin *Stopwatch* dihentikan dan dicatat sebagai waktu pembekuan darah

F. Analisis Data

Analisis data dilakukan pada penelitian yang bertujuan untuk melihat data yang dihasilkan terdapat perbedaan yang bermakna dan terdistribusi normal atau tidak. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Program for Social Science*). Uji distribusi normal ($p>0,05$) dengan menggunakan uji *Saphiro Wilk*, dikarenakan jumlah data <50 dan uji homogenitas varian dengan uji *levene* ($p>0,05$). Apabila data menunjukkan distribusi normal dan homogen, maka analisis dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) serta uji lanjutan parametrik (*post hoc test*) yaitu uji *Tukey*. Namun, jika data yang diperoleh tidak terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji non parametrik menggunakan uji *Mann-Whitney*, dilanjutkan dengan uji perbandingan antar perlakuan menggunakan uji *Kruskal Wallis* ($p<0,05$). Untuk melihat adanya perbedaan yang bermakna setelah diinduksi maka analisis data menggunakan uji *Paired T-Test* ($p<0,05$).

G. Skema Penelitian



Gambar 6. Skema uji aktivitas ekstrak herba patikan kebo.