

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah suatu bidang umum yang mencakup objek atau subjek dengan kualitas dan karakteristik tertentu yang telah diidentifikasi oleh peneliti sehingga dapat dipelajari dan ditarik kesimpulan (Sugiyono, 2016). Populasi pada penelitian ini adalah Kulit Laban (*Vitex Pinnata* Linn). Kulit Laban didapatkan dari Kecamatan Katingan Hilir, Kabupaten Katingan, Kalimantan Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi. Sampel yang digunakan harus memiliki kualitas dan karakteristik yang benar-benar mewakili dari populasi (*representative*) (Sugiyono, 2016). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini Kulit Laban (*Vitex pinnata* Linn) dari Kecamatan Katingan Hilir, Kabupaten Katingan, Kalimantan Tengah yang diperkirakan berusia sekitar 35 – 40 tahun dan diambil pada bulan Maret 2022 secara acak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel

Variabel yang pertama pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kulit Laban (*Vitex pinnata* Linn) yang ditambahkan ke darah tikus putih.

Variabel yang kedua pada penelitian ini adalah jenis kelamin tikus putih (jantan), umur tikus putih (3 bulan), berat badan tikus putih berkisar antara 240–500 gram), galur tikus (*Wistar*) dan kulit tanaman laban (*Vitex pinnata* Linn) diperoleh dari daerah di Kecamatan Katingan Hilir, Kabupaten Katingan, Kalimantan Tengah.

Variabel yang ketiga pada penelitian ini adalah kondisi patologi tikus putih jantan, kondisi peneliti, keadaan laboratorium dan metode analisis.

2. Klasifikasi Variabel

Variabel yang telah ditentukan pada penelitian ini meliputi variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkendali. Variabel independen (variabel bebas) adalah variabel yang mempengaruhi atau

menyebabkan perubahan atau munculnya variabel dependen (variabel terikat) (Sugiyono, 2017). Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kulit Laban yang akan diberikan pada tiap tabung reaksi berisi darah tikus putih.

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau diakibatkan oleh adanya variabel bebas (Sugiyono, 2017). Variabel terikat pada penelitian ini adalah waktu (detik) dan hasil persentase inhibisi koagulasi yang diperlukan untuk terjadinya pembekuan darah.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan agar variabel bebas dan terikatnya tidak terpengaruh oleh faktor luar yang diteliti (Sugiyono, 2017). Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah darah tikus putih yang digunakan pada uji *prothrombin time* dan uji *clotting time*, kondisi laboratorium, dan kondisi peneliti.

3. Definisi Operasional Variabel

Pertama, simplisia adalah bahan alam yang digunakan untuk pengobatan, yang belum mengalami pengolahan apa pun, kecuali dinyatakan lain, dalam bentuk bahan kering (Depkes RI, 2009). Serbuk laban (*Vitex pinnata* Linn) adalah serbuk yang berasal dari kulit batang (*cortex*) laban yang telah dihaluskan untuk digunakan pada proses ekstraksi.

Kedua, ekstrak adalah sediaan yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari zat tunggal tumbuhan atau hewan dengan pelarut yang sesuai, diikuti dengan penguapan seluruh atau hampir seluruh pelarut dan massa atau sisa serbuk diolah hingga memenuhi standar yang telah ditentukan (Depkes RI, 2009). Ekstrak kulit laban (*Vitex pinnata* Linn) adalah sediaan yang diperoleh dengan proses mengekstraksi senyawa aktif dari serbuk laban (*Vitex pinnata* Linn) dengan metode ekstraksi maserasi.

Ketiga, ekstrak kulit laban (*Vitex pinnata* Linn) adalah sediaan yang diperoleh dengan mengumpulkan kulit laban di Kecamatan Katingan Hilir, Kabupaten Katingan, Kalimantan Tengah. Kulit Laban diproses dengan cara yang dicuci bersih, dikeringkan, dihaluskan dan dilakukan proses ekstraksi untuk mendapatkan ekstrak laban.

Keempat, konsentrasi ekstrak kulit Laban yang digunakan pada penelitian ini adalah konsentrasi 10%, konsentrasi 30% dan konsentrasi 50%.

Kelima, parameter yang digunakan pada penelitian ini adalah kadar air, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, hasil pengujian *prothrombin time* dan pengujian *clotting time* yaitu uji pengaruh regresi linier dan hasil uji korelasi dari % inhibisi koagulasi untuk menunjukkan bahwa ekstrak kulit laban 96% (*Vitex pinnata* Linn) memiliki pengaruh antikoagulan.

C. Bahan, Alat dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu: aquadest, asam klorida 2N, darah tikus putih, ekstrak kulit laban (*Vitex pinnata* Linn), etanol 96%, kloroform, toluena, warfarin.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: alat pelindung diri (sarung tangan, masker, jas lab), alumunium poil, batang pengaduk, blender, cawan, corong kaca, gelas ukur, hot plate, kapas alkohol 70%, kertas saring, kurs porselin, labu ukur, labu alas bulat, mikropipet, pipet, pipa kapiler hematokrit, rak tabung, seperangkat alat titrasi, stirrer, stopwatch, tabung maserasi/botol gelap, tabung reaksi, timbangan analitik, vortex.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Data hewan uji dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Data Biologis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Data Biologis	Nilai
Jantan (gram)	267-500
Lama hidup (tahun)	4-5
Temperatur tubuh (°C)	36,2-36,5
Kebutuhan air	ad libitum
Kebutuhan makanan (g/hari)	50-70

D. Prosedur Penelitian

1. Proses Pengambilan Sampel

Pohon Laban (*Vitex pinnata* Linn) yang digunakan yaitu bagian kulit batang laban (*cortex*). Tanaman Laban (*Vitex pinnata* Linn) yang digunakan diperkirakan berusia sekitar 35-40 tahun dan di ambil pada bulan Maret 2022 dari Kecamatan Katingan Hilir, Kabupaten Katingan, Kalimantan Tengah.

2. Pembuatan Serbuk Laban (*Vitex pinnata* Linn)

Kulit batang laban diambil dengan cara dikupas dari batang pohonnya kemudian di cuci dengan air mengalir, dibersihkan kulit bagian luar yang kasar (disortasi basah) kemudian dilakukan perajangan agar mempermudah proses pengeringan dan penggilingan, proses selanjutnya dilakukan pengeringan bahan uji yang dilakukan menggunakan oven pada suhu 50°C hingga didapatkan bahan uji yang kering. Setelah bahan uji kulit Laban kering, ditunggu hingga hangat dan dilakukan proses penghalusan dengan menggunakan blender hingga didapatkan derajat kehalusan yang sesuai. Selanjutnya setelah halus, bahan uji kulit laban dimasukkan ke dalam plastik klip untuk dilakukan proses ekstraksi pada tahap selanjutnya.

3. Pemeriksaan Karakteristik Serbuk Simplisia

Pemeriksaan karakteristik yang dilakukan pada serbuk simplisia kulit laban (*Vitex pinnata* Linn) yaitu pemeriksaan organoleptik, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu tidak larut asam dan penetapan kadar abu total.

4. Pemeriksaan Organoleptik

Pemeriksaan organoleptik dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, bau dan rasa dari serbuk simplisia kulit laban (*Vitex pinnata* Linn).

5. Penetapan Kadar Air Serbuk

Penentuan kadar air dilakukan dengan metode destilasi toluena. Peralatan tersebut meliputi labu alas bulat 500 mL, penampung, pendingin, tabung penghubung dan tabung penerima.

Cara kerja:

Masukkan 200 mL toluena dan 2 mL air suling ke dalam labu alas bulat, kemudian suling selama 2 jam. Kemudian biarkan toluena mendingin selama 30 menit dan baca volume air dalam tabung penampung hingga ketelitian 0,05 mL. Kemudian masukkan 5 gram serbuk simplisia yang telah ditimbang hati-hati ke dalam labu, panaskan dalam labu selama 15 menit. Setelah toluena mendidih, kecepatan tetesan disesuaikan menjadi kira-kira 2 tetes per detik hingga sebagian besar air tersuling, kemudian kecepatan tetesan ditingkatkan menjadi 4 tetes per detik. Setelah semua air telah disuling, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluena. Distilasi dilanjutkan selama 5 menit, setelah itu

tabung yang dihasilkan didinginkan hingga suhu kamar. Setelah air dan toluena terpisah seluruhnya, volume air dibaca hingga ketelitian 0,05 mL. Perbedaan antara dua volume air yang tercatat sesuai dengan kadar air bahan yang di uji.

Rumus perhitungan kadar air :

$$\text{kadar air} = \frac{\text{volume air (ml)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$

6. Penetapan Kadar Sari Larut dalam Air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia kering direndam selama 24 jam dalam 100 mL air dan campuran kloroform (2,5 kloroform dalam air per 1000 mL) dalam botol sambil sesekali dikocok. Waktunya 6 jam pertama, lalu biarkan 6 jam pertama. Setelah 18 jam, 20 mL filtrat disaring, diuapkan hingga kering dalam gelas kimia dan sisanya dipanaskan hingga 105°C hingga massa konstan. Kandungan bensin yang larut dalam air dihitung untuk bahan yang dikeringkan di udara (Depkes RI, 2009). Rumus perhitungan penetapan kadar sari larut dalam air :

$$\text{kadar sari larut dalam air} = \frac{\text{berat sari (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times \frac{100}{20} 100\%$$

7. Penetapan Kadar Sari Larut dalam Etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia kering direndam selama 24 jam dalam 100 mL etanol 96% dalam toples, dikocok sesekali selama 6 jam pertama kemudian didiamkan selama 18 jam. Kemudian disaring, diuapkan 20 mL filtrat sampai kering dalam gelas kimia dan panaskan sisanya pada suhu 105°C sampai massa konstan. Konsentrasi kadar sari yang larut dalam etanol dihitung berdasarkan bahan kering (Depkes RI, 2009). Rumus perhitungan penetapan kadar sari larut dalam etanol :

$$\text{kadar sari larut dalam etanol} = \frac{\text{berat sari (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times \frac{100}{20} 100\%$$

8. Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia yang telah ditimbang dan dihaluskan dimasukkan ke dalam kurs porselin yang telah dipijar dan ditara, kemudian diratakan. Kurs porselin dibakar secara perlahan, kemudian suhu dinaikkan secara bertahap hingga 600°C hingga seluruh arang habis. Jika arang masih tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas dan saring melalui kertas saring bebas abu. Larutkan residu dan kertas saring dengan laju alir yang sama, tambahkan filtrat dengan laju alir yang sama, uapkan, hembuskan hingga massa tetap, lalu timbang.

Kadar abu dihitung untuk bahan kering (Depkes RI, 2009). Rumus perhitungan penetapan kadar abu total :

$$\text{kadar abu total} = \frac{\text{berat abu (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$

9. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dengan menentukan kadar abu total di didihkan dalam 25 mL asam klorida 2N selama 5 menit, fraksi yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu dan dicuci dengan air panas, dipijarkan lalu dinginkan dan timbang hingga massa tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung untuk bahan kering (Depkes RI, 2009). Rumus perhitungan penetapan kadar abu tidak larut asam :

$$\text{kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu(g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$

10. Proses Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Ekstraksi menggunakan metode maserasi menggunakan perbandingan 1:10 (Depkes RI, 2009). Ditimbang sebanyak 150 gram serbuk simplisia kulit laban yang telah dihaluskan dengan derajat halus yang cocok, selanjutnya dimasukkan ke botol berwarna gelap agar tidak terjadi kontak langsung dengan cahaya. Selanjutnya ditambahkan dengan 1500 mL pelarut yaitu etanol 96%, diaduk sebentar kemudian ditutup dengan tutup botol atau aluminium foil agar tidak terjadi penguapan. Direndam selama 24 jam. Etanol 96% digunakan sebagai pelarut karena bersifat polar, mudah didapatkan dan universal. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan corong kaca dan kertas saring, setelah proses ekstraksi selanjutnya dilakukan pemekatan ekstrak dengan menggunakan alat rotary vacuum evaporator untuk menghilangkan pelarut. Kemudian dipekatkan kembali dengan menggunakan tangas uap hingga didapatkan ekstrak laban (*Vitex pinnata* Linn). Pelarut akan menarik senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan sehingga dapat menghasilkan hasil maserasi yang lebih besar (zat aktif). Perhitungan pelarut yang digunakan :

$$150 \text{ g} \times 10 \text{ mL} / 1 = 1500 \text{ mL} = 1,5 \text{ Liter}$$

E. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Kulit Laban

Sediaan ekstrak pekat (100%) dari ekstrak kulit laban diencerkan menggunakan aquadest, menjadi konsentrasi 10%, konsentrasi 30% dan

konsentrasi 50%. Dilakukan pengujian titrasi ekstrak laban pada sampel darah, hal ini dilakukan sebagai bagian dari studi pendahuluan untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang akan digunakan dalam 1 mL darah. Masukkan 1 mL ekstrak kulit laban ke dalam labu dan isi dengan aquades hingga 100 mL (homogenkan) kemudian titrasi dengan menambah volume ekstrak dalam 1 mL darah dari 10 μ l, 20 μ l, 30 μ l, 40 μ l, 50 μ l, 60 μ l, 70 μ l, 80 μ l, 90 μ l, 100 μ l, 110 μ l, 120 μ l sampai konsentrasi tercapai dimana darah tidak lagi menggumpal.

F. Uji Prothrombine Time secara *In Vitro*

Metode yang digunakan yaitu metode Lee – white. Metode ini digunakan untuk menentukan masa pembekuan darah yang diamati secara visual. Pengambilan sampel darah dari sinus orbital dilakukan dengan cara menempelkan hewan pada kulit leher dan punggung dengan ibu jari dan jari telunjuk kiri. Pipet hematokrit yang digunakan untuk mengambil darah dipegang dengan tangan kanan, kemudian pipet diarahkan dengan sudut 45° ke dalam area sinus orbital (sudut mata bagian dalam). Masukkan pipet hingga masuk ke lapisan kulit terluar hingga terdengar bunyi klik, miringkan mouse dan darah akan mulai mengalir ke dalam pipet kemudian ditampung ke dalam tabung reaksi.

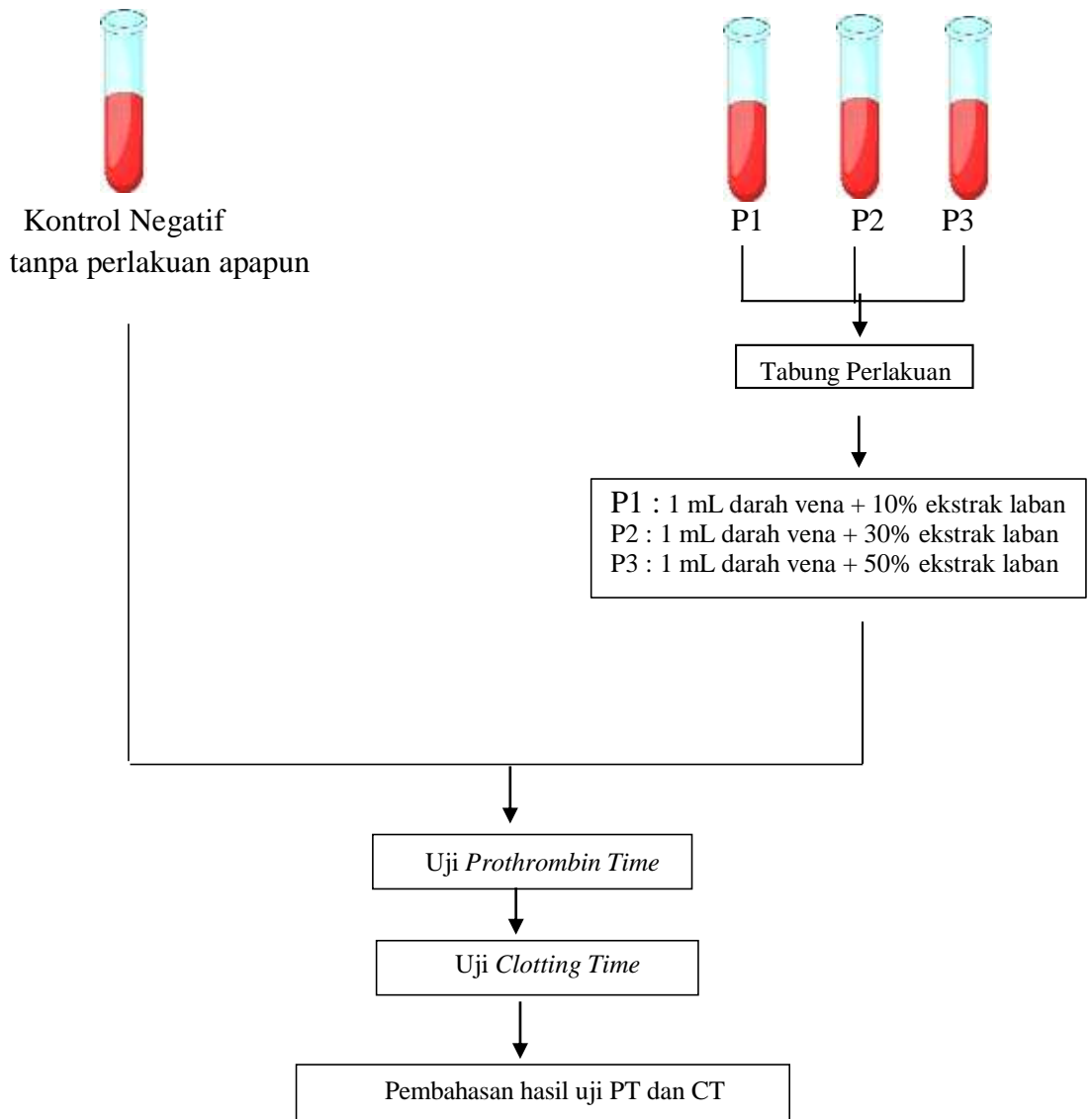
Prosedur kerja menggunakan metode Lee – white yang sudah dimodifikasi yaitu dengan menyiapkan 4 buah tabung reaksi yang telah dibersihkan dan diberi nomor 1 sampai nomor 4. Tabung reaksi diletakkan di rak tabung. Darah sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung nomor 1 darah tanpa perlakuan apapun (kontrol negatif). Darah sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung nomor 2 ditambahkan ekstrak kulit laban konsentrasi 10% sebanyak mL. Darah sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung nomor 3 ditambahkan ekstrak kulit laban konsentrasi 30% sebanyak 120 μ l. Darah sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung nomor 4 ditambahkan ekstrak kulit laban konsentrasi 50% sebanyak 120 μ l. Pada masing – masing tabung dicampur dengan digojok sebanyak 3 kali saat itu stopwatch dijalankan untuk melihat masa pembekuan darah yang terjadi. Setelah itu, tabung masing – masing dimiringkan dan tarik sedikit darah menggunakan lidi perlahan untuk melihat apakah terbentuk seperti serat benang pada darah.

G. Uji *Clotting Time* secara *In Vitro*

Pemeriksaan *clotting time* uji antikoagulan melihat persen inhibisi koagulasi dengan mengamati nilai *clotting time* yang menggunakan metode Lee – white. Metode ini digunakan untuk menentukan masa pembekuan darah yang diamati secara visual seperti cair, kental, sangat kental dan beku. Pengambilan sampel darah dari sinus orbital dilakukan dengan cara menempelkan hewan pada kulit leher dan punggung dengan ibu jari dan jari telunjuk kiri. Pipet hematokrit yang digunakan untuk mengambil darah dipegang dengan tangan kanan, kemudian pipet diarahkan dengan sudut 45° ke dalam area sinus orbital (sudut mata bagian dalam). Masukkan pipet hingga masuk ke lapisan kulit terluar hingga terdengar bunyi klik, miringkan mouse dan darah akan mulai mengalir ke dalam pipet kemudian ditampung ke dalam tabung reaksi.

Prosedur kerja metode Lee – white yang sudah dimodifikasi yaitu dengan menyiapkan 4 buah tabung reaksi yang ditempatkan ke 4 tabung reaksi ke dalam waterbath (37°C). Stopwatch mulai dijalankan bersamaan dengan masuknya darah pada pipet. Darah sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung nomor 1 darah tanpa perlakuan apapun (kontrol negatif). Darah sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung nomor 2 ditambahkan ekstrak kulit laban konsentrasi 10% sebanyak 120 µl. Darah sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung nomor 3 ditambahkan ekstrak kulit laban konsentrasi 30% sebanyak 120 µl. Darah sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung nomor 4 ditambahkan ekstrak kulit laban konsentrasi 50% sebanyak 120 µl. Masukkan kembali tabung 1 sampai tabung 4 kedalam waterbath (37°C). Setelah 3 menit tabung 1 mulai diamati. Diangkat tabung keluar dari waterbath dalam posisi tegak lurus, lalu dimiringkan dan diperhatikan apakah darah masih bergerak atau tidak (membeku). Dilakukan hal yang sama pada semua tabung setiap selang waktu 30 detik sampai terlihat darah dalam tabung sudah tidak bergerak (darah sudah membeku) dan dicatat selang waktu dari saat pengambilan darah sampai darah membeku sebagai masa pembekuan.

Skema prosedur uji antikoagulan secara *in vitro* seperti pada gambar 3.



Gambar 3. Skema prosedur uji antikoagulan ekstrak kulit Laban (*Vitex pinnata* Linn)

H. Analisis Hasil Penelitian

Analisis data dilakukan dengan menghitung waktu koagulasi untuk membekukan. Pengukuran waktu protrombin dan dilanjutkan dengan analisis data waktu pembekuan darah menggunakan uji untuk mengetahui apakah terdapat pemanjangan waktu (detik) dari nilai uji *prothrombin time* yang dihasilkan pada saat penelitian. Hasil pemeriksaan *clotting time* uji antikoagulan digunakan untuk melihat persen inhibisi koagulasi dengan mengamati nilai *clotting time* yang menggunakan metode Lee – white. Metode ini digunakan untuk menentukan masa pembekuan darah yang diamati secara visual seperti cair, kental, sangat kental dan beku. Hasil berupa grafik akan menunjukkan bahwa dengan semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit laban (*Vitex pinnata* Linn) maka kemampuannya dalam pembekuan darah apakah dapat meningkat atau darah tetap cair (tidak membeku atau terjadi koagulasi). Cara menyimpulkan hasil uji apakah hasil rerata populasi dibandingkan antara kontrol negatif dan antara kelompok perlakuan terdapat variasi konsentrasi ekstrak kulit laban (*Vitex pinnata* Linn) mempengaruhi waktu koagulasi atau pembekuan darah atau membuat darah tetap cair (tidak terjadi pembekuan/koagulasi).