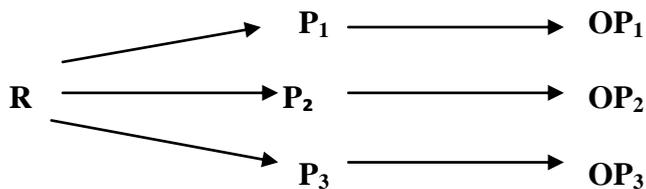


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah eksperimental yaitu untuk mengetahui perbedaan hasil jumlah leukosit dengan menggunakan darah antikoagulan EDTA dan darah antikoagulan ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*).



Keterangan :

R : Random

P₁ : Perlakuan sampel menggunakan antikoagulan EDTA

P₂ :Perlakuan sampel menggunakan antikoagulan ekstrak mangrove
(*Aegiceras corniculatum*)

P₃ :Perlakuan sampel menggunakan antiokoagulan EDTA metode automatic
Syzmex sebagai kontrol

OP₁ : Hasil pemeriksaan jumlah leukosit dengan menggunakan antikoagulan
EDTA

OP₂ : Hasil pemeriksaan jumlah leukosit dengan menggunakan antikoagulan
ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*)

OP₃ : Hasil Pemeriksaan Jumlah Leukosit dengan menggunakan antiokoagulan
EDTA metode automatic syzmex sebagai kontrol

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah mahasiswa/i D3 Analisis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah mahasiswa/i D3 Analisis Kesehatan dalam keadaan sehat yang diambil secara random. Besar sampel dalam penelitian ini ditentukan dengan perhitungan rumus Kusriningrum (1980:2) : berikut

$$(r-1)(t-1) \geq 15$$

$$(r-1)(3-1) \geq 15$$

$$(r-1)(2) \geq 15$$

$$(2r - 2) \geq 15$$

$$2r \geq 15 + 2$$

$$r \geq 17/2$$

$$r \geq 8,5$$

$$r \geq 9$$

Ket:

r = Replikasi / Jumlah Sampel

t = Perlakuan

Berdasarkan hasil perhitungan maka jumlah pengulangan sebanyak 9 kali. Jumlah sampel yang digunakan dalam seluruhnya adalah 27 sampel dengan 3 perlakuan dan 9 kali pengulangan.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Pengambilan sampel dan pemeriksaan jumlah leukosit menggunakan antikoagulan EDTA dan antikoagulan ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*) dilakukan di Laboratorium Hematologi Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan Juni 2017.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Antikoagulan EDTA dan Antikoagulan Ekstrak Mangrove (*Aegiceras corniculatum*).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah leukosit.

3.4.3 Definisi Operasional Variabel

1. Antikoagulan EDTA adalah zat yang digunakan untuk mencegah terjadinya pembekuan darah. Antikoagulan ukuran pemakaian adalah 1mg NaEDTA untuk 1ml darah atau 10 μ l larutan EDTA 10% untuk 1ml darah (Widyastuti,*dkk*, 2015).
2. Antikoagulan Ekstrak Mangrove (*Aegiceras corniculatum*) adalah antikoagulan yang menurut hasil penelitian sebelumnya dengan ukuran pemakaian adalah 120 μ l ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*) untuk 1ml darah (Tangkery, 2013).

3. Hasil pemeriksaan leukosit adalah angka yang menunjukkan hasil pemeriksaan leukosit dalam darah dengan satuan /mm³ darah dengan menggunakan kamar hitung leukosit neubauer improved.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi uji laboratorium dengan metode ekstraksi maserasi dan hitung jumlah leukosit dengan alat hemocytometer.

3.5.1 Pembuatan Ekstrak Batang Mangrove (*Aegiceras corniculatum*)

1. Alat dan Bahan

Bejana / wadah tertutup, batang pengaduk, blender, oven, vacuum rotary evaporatory, corong kaca, kertas saring, batang mangrove (*Aegiceras corniculatum*), etanol 70%.

2. Prosedur

Pembuatan ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*) (Tangkery, 2013).

- a. Cuci bersih 1 kg batang mangrove (*Aegiceras corniculatum*), kemudian dikeringkan pada suhu kamar.
- b. Batang mangrove (*Aegiceras corniculatum*) yang sudah kering dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50°C selama 2 jam. Suhu pengeringan harus memenuhi standart yaitu tidak lebih dari 60°C (Kemenkes RI, 2009:5).
- c. Batang mangrove (*Aegiceras corniculatum*) yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk.

- d. Lakukan proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% sebagai pelarut.
- e. Campurkan serbuk batang mangrove dengan pelarut etanol 95% dengan perbandingan 1:5
- f. Serbuk simplisia direndam selama 3 hari dan sesekali diaduk. Setelah 3 hari sampel yang diperoleh dalam berbentuk filtrat dan supernatan.
- g. Supernatan dan filtrat dipisahkan menggunakan corong kaca yang telah dilapisi kertas saring.
- h. Supernatan disimpan lalu filtrat dilakukan perendaman kembali dengan etanol 70% selama 3 hari dan sesekali diaduk. Lalu lakukan pemisahan filtran dan supernatan menggunakan corong kaca yang telah dilapisi kertas saring.
- i. Supernatan hasil perendaman pertama dan kedua di satukan dan disaring kembali dengan corong kaca dilapisi kertas saring agar filtrat benar-benar terpisah.
- j. Supernatan hasil maserasi kemudian diuapkan menggunakan vacuum rotary evaporator dengan kecepatan 180 rpm pada suhu 50°C.

3.5.2 Penentuan Volume Ekstrak Mangrove (*Aegiceras corniculatum*) sebagai

Antikoagulan

1. Alat dan Bahan

Mikropipet, tabung konvensional, sampel ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*), darah dari pendonor.

2. Prosedur

Berdasarkan (Tangkery, 2013)

- a. Darah 1ml dimasukkan ke dalam tabung konvensional yang telah diberi antikoagulan ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*).
- b. Penentuan volume ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*) dilakukan dengan cara titrasi mulai 10 μ l hingga 120 μ l terhadap 1 ml darah.
- c. Titrasi dihentikan pada 120 μ l karena darah sudah tidak mengalami pembekuan. Sehingga volume ekstrak yang digunakan dalam 1ml darah adalah 120 μ l.

3.5.3 Teknik Pengambilan Darah

1. Alat dan Bahan

Alkohol swab, spuit 3cc, tourniquet, plester, tabung konvensional berisi ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*) dan antikoagulan EDTA, kapas steril, pendonor darah.

2. Prosedur

Berdasarkan (Widyastuti,*dkk*,2015).

- a. Tabung konvensional yang berisi antikoagulan EDTA dan antikoagulan ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*) diberi identitas pasien.
- b. Lengan pasien di letakkan diatas meja senyaman mungkin.
- c. Pasangkan tourniquet 5-7cm diatas lipatan lengan pasien.
- d. arahkan pasien untuk menggenggamkan tangannya, basahi daerah tusukan dengan alkohol swab, dan cari vena dengan bantuan telunjuk untuk mencari daerah tusukan.
- e. Saat vena ditemukan segera lakukan penusukan menggunakan jarum spuit 3cc pada vena dibawah lipatan lengan dengan sudut antara kulit dan jarum \pm 15 derajat.

- f. Setelah mendapatkan darah sesuai volume yang dibutuhkan yaitu 2ml, lepaskan tourniquet, dan gengaman pasien segera di buka.
- g. Tempelkan kapas steril diatas daerah tusukan, lalu tarik jarum keluar. Dengan segera kapas steril menutup luka bekas tusukan dan beri plester.
- h. Darah dimasukkan ke dalam tabung konvensional yang telah berisi antikoagulan EDTA sebanyak 1ml, dan ke dalam tabung konvensional yang telah berisi antikoagulan ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*) sebanyak 1ml.
- i. Lakukan pengocokkan terhadap masing-masing tabung konvensional sebanyak 10x agar darah tidak membeku.

3.5.4 Metode Pemeriksaan Leukosit Menggunakan Kamar Hitung Leukosit

Neubauer Improved.

1. Alat dan Bahan

Larutan turk, pipet pengencer leukosit, haemocytometer, mikroskop binokuler, cover glass, sampel darah dengan antikoagulan EDTA dan sampel darah dengan antikoagulan ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*).

2. Prosedur

Berdasarkan (Widyastuti, *dkk*, 2015).

- a. Hisap sampel darah dengan antikoagulan EDTA menggunakan pipet pengencer leukosit yang telah dipasang aspirator hingga tanda 0,5. Kemudian hisap larutan turk sampai tanda 11, jadi pengencerannya sebanyak 20 kali.

- b. Aspirator dilepas kemudian pegang mendatar pipet pengecer leukosit diantara ibu jari dengan telunjuk atau jari tengah.
- c. Kocok cairan dalam pipet selama 2-3 menit secara perlahan dengan gerakan keatas kebawah.
- d. Siapkankamar hitung, kemudian pasang cover glass diatas garis kamar hitung
- e. Terlebih dahulu buang cairan dalam pipet pengencer leukosit sebanyak 2-3 tetes, tetes berikutnya dimasukkan ke kamar hitung.
- f. Letakkan kamar hitung diatas meja mikroskop dengan lensa obyektif 10x. Tunggu 1 menit agar leukosit mapan dalam kamar hitung.
- g. Lakukan penghitungan leukosit yang terdapat dalam 4 kotak.
- h. Untuk pengerjaan sampel darah dengan antikoagulan ekstrak mangrove (*Aegiceras corniculatum*) adalah sama seperti pengerjaan sampel darah dengan antikoagulan EDTA seperti diatas.

3. Harga normal leukosit : 4.000 – 10.000 / mm³ darah.

4. Rumus perhitungan leukosit :

Jumlah leukosit dalam 4 kotak (A+B+C+D) = L

Jumlah volume 4 kotak = (1x1x1,0) mm³ x 4

$$= 0,4 \text{ mm}^3$$

0,4 mm³ = L

1 mm³ = L x 10/4 = 2 1/2 L

(darah diencerkan 20x)

Jadi : dalam 1 mm³ darah = 2 1/2 L x 20 = 50 L

Atau : jumlah leukosit dalam 1 mm³ darah = jumlah leukosit dalam 4 kotak kamar hitung dikalikan 50.

5. Perhitungan Leukosit : jumlah leukosit x 50 =/mm³ darah.

3.6 Metode Analisis Data

Adapun data yang diperoleh dari pemeriksaan tersebut dimasukkan dalam tabel pengamatan seperti dibawah ini :

Tabel 3.6 Tabel Hasil Uji Laboratorium Pemeriksaan Jumlah Leukosit

Kode sampel	Jumlah Leukosit /mm ³ darah		
	Automatic Sysmex	Haemocytometer Neubauer Improved	
	Antikoagulan EDTA	Antikoagulan EDTA	Antikoagulan Ekstrak Mangrove (<i>Aegiceras corniculatum</i>)
Jumlah			
Rata-rata			

Keterangan : Pemeriksaan menggunakan Automatic Sysmex hanya sebagai gold standar dari pemeriksaan manual haemocytometer neubauer improved.

3.7 Teknik Analisis Data

Setelah hasil diperoleh dari pemeriksaan laboratorium dan dikumpulkan dalam bentuk tabel, maka selanjutnya akan dianalisa menggunakan Uji Anova dengan tingkat kesalahan (α) 0.05 menggunakan program SPSS 16.