

Effect of Garlic Filtrate as An Alternative Anticoagulant for Osmotic Fragility Test (OFT)

Aini¹, Baiq Isti Hijriani¹, Fitriani Kusuma Dewi^{1*}, Bustanul Atfal¹

¹D3 Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Medica Farma Husada Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

Article History

Received : October 02th, 2023

Revised : October 24th, 2023

Accepted : November 24th, 2023

*Corresponding Author:

Fitriani Kusuma Dewi, D3

Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Medica Farma Husada Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

Email: ainie.mfh@gmail.com

Abstract: Osmotic fragility test (OFT) is an examination conducted to measure the resistance of erythrocytes when exposed to hypotonic saline solutions with various concentrations. The purpose of this study was to analyze the effect of garlic filtrate as an alternative anticoagulant for osmotic fragility test (OFT). The samples used were blood samples with heparin anticoagulant. This study is a pre-experimental study, using NaCl solution with concentrations of 0.2%, 0.3%, 0.35%, and 0.55%. The method used to measure OFT value is spectrophotometric method. The data obtained were analyzed using statistical one way Anova. The results showed the percentage value of hemolysis with garlic filtrate at each concentration was 100%, 99%, 95%, and 5%, respectively. Data analysis using ANOVA showed that there was a significant effect on the effect of garlic filtrate as an alternative anticoagulant on OFT with ($p < 0.05$) $0.000 < 0.05$.

Keywords: Anticoagulant, garlic, filtrate, Osmotic fragilitas tes (OFT).

Pendahuluan

Tes fragilitas osmotik merupakan suatu pemeriksaan yang sering dilakukan untuk mengukur ketahanan eritrosit yang mengalami hemolisis saat dipaparkan larutan salin yang bersifat hipotonis dengan berbagai konsentrasi. Ketika eritrosit yang berada pada lingkungan hipotonis dan menyebabkan air akan masuk ke dalam sel dan menyebabkan sel tersebut mengalami pembengkakan dan akhirnya lisis. Pemeriksaan fragilitas osmotik biasanya dilakukan untuk membantu mendiagnosa beberapa jenis anemia dan thalasemia (Usman, 2020).

Peningkatan kerapuhan osmotik eritrosit akan terlihat ketika terjadinya hemolisis dalam larutan hipotonik. Ketika sel darah merah dalam keadaan lisis, hemoglobin bocor keluar dari sel dan mempengaruhi kualitas sel darah merah. Normalnya pada larutan salin dengan konsentrasi 0,55% hingga 0,85% tidak terjadi hemolisis dikarenakan memiliki tekanan sama dengan cairan tubuh normal. Sedangkan pada saat terjadinya pecah eritrosit, disebut sebagai

hemolisis awal (initial haemolysis) yang mulai terjadi pada konsentrasi 0,4% hingga 0,45% dimana menggambarkan titik fragilitas dari eritrosit, dan jika eritrosit mengalami hemolisis sepenuhnya disebut total haemolysis atau hemolisis lengkap yang terjadi pada konsentrasi 0,3% hingga 0,35% (Kiswari, 2014; Nugraha, 2017).

Pemeriksaan Osmotic fragility test perlukannya sampel darah dengan antikoagulan heparin. Antikoagulan heparin bersifat antitrombin, yang mencegah pembekuan darah dengan jalan menghambat pembentukan fungsi dari beberapa faktor pembekuan darah (faktor III, X, XII, XI, IX), yang menyebabkan tidak terjadi perbedaan terhadap bentuk eritrosit dan leukosit (Entika, 2013). Antikoagulan heparin memiliki harga yang relative mahal dibanding antikoagulan lainnya, sedangkan di Indonesia sendiri masih banyak laboratorium yang berada di desa-desa dengan kendala keterbatasan biaya dan transportasi. Maka dari itu diperlukannya antikoagulan alternative yang murah dengan bahan yang mudah diperoleh. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai antikoagulan

alternative adalah bawang putih yang memiliki berbagai macam manfaat dan sering dijumpai.

Bawang putih (*Allium sativum L.*) memiliki senyawa *Ajoene* yang berkontribusi penting dalam aksi antikoagulan. Senyawa ini memiliki aktivitas anti-agregasi dan memiliki efek pembekuan darah yang mirip dengan asam asetilsalisilat (antikoagulan) yang dapat mencegah kemampuan darah untuk membeku. Agregasi platelet terjadi apabila reseptor fibrinogen dapat berikatan dengan fibrinogen dan sel platelet dengan bantuan Ca^{2+} yang telah beraktivasi untuk membentuk agregat. Senyawa ajoene dan senyawa organosulfur lain bekerja dengan menghambat proses transport Ca^{2+} ke dalam sitoplasma sel platelet, sehingga tidak terjadi agregasi platelet.

Komponen *allicin* terdapat pada bawang putih yang bekerja saat dilepas ke pembuluh darah, memiliki kemampuan untuk menghasilkan H_2S yang mempunyai efek vasodilator dan mencegah krenasi pada eritrosit (Hernawan & Setyawan, 2003; Imelda, 2013). Hasil penelitian Alim (2021) menunjukkan bahwa antikoagulan yang diperoleh dari filtrate bawang putih tidak terdapat perubahan morfologi baik dari segi bentuk, ukuran dan warna, jarak Eritrosit dengan sel darah lainnya dan kejelasan lapang pandang yang diamati tidak jauh berbeda jika menggunakan antikoagulan K_3EDTA . Berdasarkan uraian tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang “pengaruh pemberian bawang putih sebagai antikoagulan alternative terhadap osmotik fragility tes (OFT)”.

Bahan dan Metode

Metode penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian *Experiment*. Penelitian ini dilaksanakan di “Laboratorium Kimia Politeknik Medica Farma Husada Mataram”, pada bulan Januari-Maret 2023. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bawang putih sebanyak 200 gram, terdiri dari 6 perlakuan yaitu konsentrasi NaCl 0,2%, 0,3%, 0,35%, 0,55%, kontrol positif (darah dengan antikoagulan heparin), dan kontrol negative (darah tanpa antikoagulan).

Bahan penelitian

Bahan yang digunakan diantaranya adalah darah vena, NaCl 0,9%, aquadest, filtrate bawang

putih. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, tabung heparin, mikropipet, tip mikropipet, kain, rak tabung reaksi, spuit 5cc, tourniquet, alkohol swab, tissue, plester, kuvet, dan sentrifuge.

Tahapan pembuatan filtrat

Umbi bawang putih di timbang sebanyak 200 gram dan dihaluskan menggunakan blender. Sampel di saring menggunakan kain bersih sehingga diperoleh filtrat bawang putih.

Pengujian filtrat bawang putih

Filtrat bawang putih yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan data penelitian terdahulu yang menunjukkan adanya aktifitas antikoagulan pada filtrat bawang putih sebanyak 45 mg untuk 1 ml darah (Faudziah, 2018). Darah yang dibutuhkan dalam pengujian ini diambil dari darah vena kubiti sebanyak 5 ml. pada tabung dimasukan darah sebanyak 1 ml dan filtrat bawang putih sebanyak 45 mg.

Uji Osmotic Fragility Tes

Uji OFT digunakan untuk menentukan ketahanan dinding eritrosit terhadap larutan hipotonis dalam melisiskan eritrosit pada konsentrasi NaCl. Konsentrasi NaCl yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan penelitian terdahulu terdiri dari 4 konsentrasi yaitu 0,2%, 0,3%, 0,35%, dan 0,55% (Muslim *et al.*, 2019). Dibuat pengenceran 4 konsentrasi NaCl sebanyak 5 ml dengan larutan NaCl 0,9%. Ditambahkan pada masing-masing tabung sebanyak 50 μ l darah dan dihomogenkan. Kemudian meletakkan tabung pada suhu ruangan selama 30 menit lalu disentrifuge selama 5 menit pada 3000 rpm. Lalu dibaca dengan spektrofotometer pada Panjang gelombang 540 nm. Pengukuran persentase hemolisis dengan membagi absorbansi tabung yang diukur dengan absorbansi tabung ke-1 dikalikan 100%.

Analisa data

Data yang diperoleh dari penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel. Data diuji normalitas menggunakan Shapiro Wilk dan uji homogenitas Levene test. Analisis data untuk mengetahui fragilitas osmotik menggunakan uji *One Away Anova* dengan tingkat pemaknaan $<0,05$. Data dianalisis menggunakan program Statistical Package for Social Science (SPSS).

Hasil dan Pembahasan

Persentase nilai absorban

Penelitian ini menggunakan filtrate bawang putih yang diperoleh dari 200 gram bawang putih sebagai bahan uji, sebanyak 45 mg filtrat bawang putih ditambahkan untuk tiap 1 ml darah. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah darah vena untuk diukur nilai OFT. Terdiri dari 6 perlakuan yaitu konsentrasi 0,2%, 0,3%, 0,35%, 0,55%, kontrol positif (dengan antikoagulan heparin), kontrol negative (darah tanpa antikoagulan). Hasil rata-rata nilai absorbansi untuk setiap konsentrasi disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Rata-Rata Nilai Absorban

No	Konsentrasi Buffer NaCl (%)	X̄ Nilai Absorbansi Tabung		
		Bawang Putih	Kontrol Positif	Kontrol Negatif
1.	0,2	0,328	0,337	0,302
2.	0,3	0,326	0,331	0,287
3.	0,35	0,312	0,315	0,242
4.	0,55	0,019	0,009	0,032

Persentase nilai hemolisis

Hasil penelitian pada tabel 2 persentase hemolisis pada konsentrasi 0,3% pada tabung berisi filtrat bawang putih, kontrol positif, dan kontrol negative secara berturut-turut adalah 99%, 99%, dan 95%. persentase hemolisis pada konsentrasi 0,35% pada tabung berisi filtrat bawang putih, kontrol positif, dan kontrol negative secara berturut-turut adalah 95%, 93%, dan 80%. persentase hemolisis pada konsentrasi 0,55% pada tabung berisi filtrat bawang putih, kontrol positif, dan kontrol negative secara berturut-turut adalah 5%, 2%, dan 10%.

Tabel 2. Persentase Hemolisis

No	Konsentrasi Buffer NaCl (%)	% Hemolisis		
		Bawang Putih	Kontrol Positif	Kontrol Negatif
1.	0,2	100%	100%	100%
2.	0,3	99%	99%	95%
3.	0,35	95%	93%	80%
4.	0,55	5%	2%	10%

Uji normalitas

Hasil uji bahwa nilai P_ value lebih besar dari taraf signifikan atau eror 5% (<0,05). Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa data

pengaruh bawang putih sebagai antikoagulan alternative terhadap OFT berdistribusi normal.

Tabel 3. Hasil uji normalitas

Test of Normality	Sig.
Konsentrasi 0,2	.507
Konsentrasi 0,3	.409
Konsentrasi 0,35	.792
Konsentrasi 0,55	.726
Kontrol Positif (0,2)	.995
Kontrol Positif (0,3)	.858
Kontrol Positif (0,35)	.492
Kontrol Positif (0,55)	.995
Kontrol Negatif (0,2)	.995
Kontrol Negatif (0,3)	.312
Kontrol Negatif (0,35)	.764
Kontrol Negatif (0,55)	.395

Uji Homogenitas

Berdasarkan hasil uji normalitas dapat dilihat bahwa untuk data pengaruh filtrate bawang putih sebagai antikoagulan alternative pada OFT nilai P_value disimpulkan data memenuhi uji homogenitas karena berasal dari populasi variansi yang sama.

Tabel 5. Hasil uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
Absorbansi			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.350	11	36	.967

Uji Anova

Berdasarkan tabel ANOVA, terdapat hasil pada kolom Sig. diperoleh nilai P-value = 0,00. Dengan demikian nilai P-value lebih kecil dari nilai taraf Sig 0,05 (0,000 < 0,05), sehingga H0 ditolak dengan kesimpulan yang didapatkan adalah terdapat pengaruh penambahan bawang putih sebagai antikoagulan alternative pada OFT, dilihat pada nilai absorban berdasarkan ke enam perlakuan tersebut.

Tabel 6. Hasil uji ANOVA

ANOVA		
	F	Sig.
Between Groups	2529.16	.000
Within Groups	4	
Total		

Pembahasan

Hasil pengukuran Osmotic Fragility Test/ OFT pada berbagai Konsentrasi)

Pemeriksaan fragilitas osmotik merupakan salah satu parameter untuk menentukan ketahanan dinding eritrosit, semakin keruh suatu larutan semakin tinggi nilai absorbansi dan semakin tinggi persentase hemolisis. Persentase hemolisis dihasilkan dari membagi nilai absorbansi konsentrasi tabung dengan nilai absorbansi konsentrasi larutan ke-1 dan dikali 100%. Pada penelitian ini digunakan 4 konsentrasi NaCl bertingkat yaitu konsentrasi 0,2%, 0,3%, 0,35%, dan 0,5% dengan dua kontrol yaitu kontrol positif (darah dengan antikoagulan heparin) dan kontrol negative (darah tanpa antikoagulan).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0,2% terjadinya hemolisis sempurna pada darah dengan filtrat bawang putih, kontrol positif, dan kontrol negative. Ini disebabkan oleh eritrosit yang akan lisis jika konsentrasi air diluar sel lebih besar dibandingkan didalam sel, sehingga air akan masuk ke dalam eritrosit yang menyebabkan eritrosit mengembang dan akhirnya lisis (Nugraha, 2017). Pada tabel 4.2 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0,3% dan 0,35% terjadinya hemolisis sempurna dengan persentase hemolisis pada darah dengan filtrat bawang putih, kontrol positif, dan kontrol negative secara berturut-turut adalah 99%, 95%, 99%, 93%, 95% dan 80%. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Virgiati *et al.*, (2017) yang melaporkan persentase hemolisis pada konsentrasi 0,30% pada penyimpanan 0 jam adalah 96,6% sedangkan persentase lisis eritrosit dalam konsentrasi 0,35% pada penyimpanan 0 jam adalah 98%.

Hasil pengukuran pada konsentrasi 0,55% menunjukkan tidak terjadi lisis, dengan persentase hemolisis pada darah dengan campuran filtrat bawang putih, kontrol positif dan kontrol negative secara berturut-turut adalah 5%, 2%, dan 10%. Tabel 4.2 menunjukkan normalnya pada konsentrasi 0,55% memiliki persentase hemolisis sebesar 0-5. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa batas normal OFT adalah pada konsentrasi 0,32%-0,44% (Salvagno,

2020). Hasil OFT dapat dengan mudah dipengaruhi oleh beberapa faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor ekstrinsik meliputi, teknis, pH media inkubasi, jenis antikoagulan lama penyimpanan darah, dan obat-obatan sedangkan faktor intrinsik adalah umur, jenis kelamin, dan faktor genetic (Igbokwe, 2018).

Peningkatan dan penurunan persentase hemolisis dari OFT berhubungan erat dengan berbagai kondisi sel darah merah bawaan lainnya yang dapat memberikan hasil positif (yaitu peningkatan lisis sel darah merah), termasuk anemia hemolitik dan varian kadar hemoglobin yang tidak stabil (Samuel, 2016). Peningkatan OFT juga berhubungan dengan peningkatan suhu yang menyebabkan stres eritrosit yang menjadi faktor utama dalam kerapuhan eritrosit, sehingga Konsistensi plasma mudah berubah dan mempengaruhi bentuk eritrosit yang menyebabkan hemolisis meningkat seiring dengan bertambahnya suhu (Rodríguez-Varela *et al.*, 2019).

Jenis antikoagulan yang digunakan untuk pemeriksaan OFT adalah antikoagulan heparin, heparin bekerja dengan berikatan dengan berbagai protein dan antithrombin. Antitrombin berikatan dengan trombin (Faktor IIa) dan Faktor Xa. (Warnock *et al.*, 2021). Bawang putih memiliki komponen Allicin (diallylthiosulfinate) yang dapat menekan agregasi platelet manusia hingga 90% (Olas, 2019). Dan juga terdapat senyawa Ajoene yang dapat menghambat pengikatan fibrinogen dan faktor von Willebrand (vWE) sehingga memiliki sifat anti-agregator dan antitrombotik, dan juga memblokir agregasi platelet (Mateen *et al.*, 2011) (Ahmad *et al.*, 2019).

Penelitian yang dilakukan oleh Nuswanto & Berlianti (2022) menunjukkan penurunan kadar kalsium dalam plasma filtrat bawang putih memberikan bukti bahwa bahan aktif di dalamnya mengikat ion kalsium, memperpanjang waktu pembekuan, hal ini menunjukkan bahwa filtrat bawang putih memiliki kemungkinan sebagai antikoagulan alternatif. Filtrat bawang putih dianggap lebih unggul dari ekstrak bawang putih, karena komponen dalam filtrat bawang putih memiliki efek antikoagulan yang lebih baik dan dapat mengimbangi antikoagulan sintetik seperti heparin. Sedangkan pada ekstrak bawang putih hanya satu komponen bahan kimia aktif yang dapat diperoleh sehingga potensinya

dianggap berkurang saat digunakan sebagai antikoagulan alternatif (Nuswantoro & Berlianti, 2022). Berdasarkan hasil Uji analisa data menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa terdapat pengaruh secara signifikan terhadap pengaruh pemberian filtrate bawang putih sebagai antikoagulan alternative pada OFT dengan dengan p-value sebesar 0,000 ($p < 0,05$) $0,000 < 0,05$, yang menyatakan terdapat perbedaan nyata pada darah dengan filtrate bawang putih, darah dengan antikoagulan heparin sebagai kontrol (+), dan darah tanpa antikoagulan (-) pada tiap konsentrasinya.

Kesimpulan

Nilai osmotic fragility tes dengan pemberian filtrate bawang putih sebagai antikoagulan alternative pada konsentrasi NaCl 0,2% adalah 100%, pada konsentrasi NaCl 0,3% adalah 99%, pada konsentrasi NaCl 0,35% adalah 95%, pada konsentrasi NaCl 0,55% adalah 5%. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang bermakna terhadap pengaruh pemberian filtrate bawang putih sebagai antikoagulan alternative pada OFT dengan p-value sebesar 0,000 ($p < 0,05$).

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terimakasih pada laboratorium D3 Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Medica Farma Husada Mataram yang merupakan tempat melakulan penelitian.

Referensi

- Ahmad P, Alvi SS, Salman Khan M. (2019) Functioning of organosulfur compounds from garlic (*Allium sativum* Linn) in targeting risk factor-mediated attherosclerosis: A cross talk between alternative and modern medicine. *Nat Bio-active Compd* Vol 1: 561–85. DOI: 10.1007/978-981-13-7154-7_20
- Entika R, (2013). *Antikoagulan*. Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Riau. Pekanbaru.
- Faudziah. L, (2018). Perbandingan Penggunaan Antikoagulan EDTA dan Filtrat Bawang Putih (*Allium Sativum*) Sebagai Antikoagulan Alternatif Terhadap Keutuhan Dinding Sel Leukosit, Program Studi D IV Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah.
- Hernawan, U. E., & Setyawan, A. D. (2014). Senyawa Organosulfur Bawang Putih (*Allium sativum* L.) dan Aktivitas Biologinya. *Biofarmasi Jurusan Biologi FMIPA UNS*, 1,64–76. DOI: 10.13057/biofar/f010205
- Igbokwe, N. A. (2018). A review of the factors that influence erythrocyte osmotic fragility. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 16(4), 1-23. DOI: 10.4314/SOKJVS.V16I4.1
- Imelda, M., & Kurniawan, S. (2013). Peranan garlic (bawang putih) pada pengelolaan hipertensi. *CDK-209*, 40(10), 746-750.
- Kiswari, R. (2014). *Hematologi dan Transfusi*. Jakarta: 2 ed. Jakarta.
- Mateen, A. A., Rani, P. U., Naidu, M. U. R., & Chandrashekar, E. (2011). Pharmacodynamic interaction study of *Allium sativum* (garlic) with cilostazol in patients with type II diabetes mellitus. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3), 270. DOI: 10.4103/0253-7613.81514
- Muslim. Z., Prasetyo. A., & Surya. W. S (2019). Pengaruh Vitamin C terhadap Fragilitas Osmotik Eritrosit pada Mahasiswa Kedokteran Universitas Jember yang Mengalami Stres Psikologis. *e-Journal Pustaka Kesehatan*, vol. 7 (no.1).
- Nuary, A., Aryandi, R., & Makmur, A. S. (2021). Gambaran Morfologi Eritrosit Menggunakan Antikoagulan K3EDTA dan Antikoagulan Filtrat Bawang putih (*Allium sativum*). *Jurnal TLM Blood Smear*, 2(2), 48-53. DOI: <https://doi.org/10.37362/jmlt.v2i2.735>
- Nugraha, G. (2017). *Panduan Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Dasar*. Jakarta: Trans info media.
- Olas, B. (2019). Anti-aggregatory potential of selected vegetables—Promising dietary components for the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Advances in Nutrition*, 10(2), 280-

290. DOI: 10.1093/ADVANCES/NMY085
- Rodríguez-Varela, M., García-Rubio, D., De la Mora-Mojica, B., Méndez-Méndez, J., Durán-Álvarez, C., & Cerecedo, D. (2019). Alterations to plasma membrane lipid contents affect the biophysical properties of erythrocytes from individuals with hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1861(10), 182996. DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.05.018.
- Virgiati. V., Liliana. A., & Agus. P.W (2017). Perbedaan fragilitas osmotik eritrosit setelah penyimpanan 2 jam, 4 jam, dan 6 jam. Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Achmad Yani.
- Salvagno, G. L., Demonte, D., Dima, F., Bovo, C., & Lippi, G. (2020). Stability of refrigerated whole blood samples for osmotic fragility test. *Hematology, transfusion and cell therapy*, 42, 134-138. DOI: 10.1016/j.htct.2019.06.001
- Samuel O. S. (2016). *Red blood cell hemolysis during processing*. Scientific and Laboratory Services, Pall Corporation, Port Washington, NY. USA. DOI: 10.1111/j.15372995.2011.03298.x
- Usman. K, (2020). Medscape. Osmotic fragility of erithyrocite
- Warnock LB, Huang D. (2021). Heparin. *Encycl Toxicol Third Ed*, 837–9. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00733-8