

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental laboratorium Farmakologi yang menggunakan tikus putih jantan galur wistar sebagai hewan percobaan di Laboratorium Farmakologi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah hewan uji coba tikus putih jantan galur wistar. Sampel yang digunakan adalah daun *C. costata* yang diambil di Hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara.

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan adalah Air suling, Daun *C. costata*, PGA 1%, Etanol 70%, Pepton 5%, Paracetamol 500 mg, pelet dan minuman tikus (ad libitum).

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan antara lain kandang tikus, tempat makan dan tempat minum, erlenmeyer, batang pengaduk, gelas ukur, gelas kimia, sendok tanduk, *stopwatch*, timbangan analitik, wadah maserasi, *spoit* 1cc dan 3cc, corong, penangas air listrik, sonde oral, thermometer digital.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Penyiapan Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun *C. costata*

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Daun *C. costata*

Serbuk simplisia daun *C. costata* sebanyak 1 kg dimaserasi dalam etanol 70% selama 72 jam. Ekstrak cair diperoleh dan dipekatan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C untuk menghasilkan kental. Dan kembali dipanaskan pada waterbath pada suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan untuk percobaan. Ekstrak etanol yang telah dikeringkan dilarutkan dalam aquadest untuk berbagai dosis. Dihitung presentasi rendemen ekstrak yang diperoleh.

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak Total}}{\text{Berat simplisia}} 100\%$$



3.4.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ekstrak daun *C. costata* sebagai berikut :

a. Pemeriksaan Alkaloid

Sampel dibasakan dengan ammonia, kemudian ditambahkan kloroform, digerus kuat. Lapisan kloroform dipipet dan disaring, kemudian kedalamnya ditambahkan asam klorida 2 N. campuran dikocok kuat hingga terdapat dua lapisan. Lapisan asam dipipet, kemudian dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama sebagai pembanding, bagian kedua ditambahkan pereaksi *Mayer*, jika terdapat kekeruhan atau endapan putih menandakan adanya alkaloid. Bagian ketiga ditambahkan pereaksi *Dragendroff*, jika terdapat kekeruhan atau endapan berwarna kuning sampai jingga menandakan adanya alkaloid (Farnsworth, 1966).

b. Pemeriksaan Flavonoid

Sampel ditambahkan air lalu dipanaskan dan disaring. Filtrat yang terbentuk ditambahkan dengan serbuk magnesium dan asam klorida 5 N lalu disaring dan Ditambahkan amil alkohol, dikocok kuat, lalu diamati warna lapisan amil alkohol yang terbentuk. Senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuk warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Farnworth, 1966).

c. Pemeriksaan Glikosida

Sampel ditambahkan campuran etanol 96% dengan air (7:3) dan asam klorida 2 N sampai terendam, direfluks selama 1 jam, didinginkan dan disaring. Kemudian filtrat ditambahkan air suling dan timbal (II) asetat 0,4 M, diaduk, didiamkan sampai endapan turun dan disaring. Filtrat disaring dengan campuran klorofotm dan isopropanol (2:3) di dalam corong pisah, dikocok sampai terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan atas (gula) dan lapisan bawah (non gula).

1. Lapisan atas

Dengan penambahan air dan pereaksi Molish, kemudian secara perlahan-lahan ditambahkan asam sulfat pekat melalui dinding tabung, terbentuk cincin warna coklat/coklat keunguan/ungu pada batas antara kedua cairan menunjukkan adanya ikatan gula.

2. Lapisan bawah

Dilakukan dengan penambahan pereaksi *Lieberman-Bouchard*. Bila terbentuk warna ungu kemerahan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila terbentuk warna biru hijau/hijau menunjukkan adanya steroid (Farnsworth, 1966).

d. Pemeriksaan Glikosida Antrakuinon

Sampel dimasukkan ke dalam Erlenmeyer ditambah etanol sampai terendam ditambahkan asam sulfar 2 N, dipanaskan sebentar, setelah dingin dimasukkan ke dalam corong pisah ditambahkan 10 ml benzena, dikocok dan didiamkan. Lapisan benzena dipisahkan dan disaring, kocok lapisan benzena dengan 2 ml

larutan natrium hidroksida 2 N, didiamkan. Lapisan natrium hidroksida berwarna merah yang menunjukkan adanya glikosida antrakuinon (Farnsworth, 1966).

e. Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Sampel ditambahkan eter sambal digerus lalu dikocok dan didiamkan setelah itu dipipet dan disaring. Filtrat diuapkan eternya lalu residunya ditambahkan pereaksi *Lieberman-Bouchard* dan diamati warnanya. Senyawa steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru-hijau sedangkan senyawa triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna ungu (Farnsworth, 1966).

f. Pemeriksaan Saponin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit kemudian saring dan didinginkan. Setelah dingin, filtrat dikocok kuat secara *vertical* selama 30 detik. Senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang persisten selama beberapa menit dan tidak hilang juga setelah ditambahkan asam klorida atau setelah didiamkan selama 20 menit (Farnsworth, 1966).

g. Pemeriksaan Tanin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit, saring panas-panas. Filtratnya diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru atau kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Farnsworth, 1966).

3.4.4 Pembuatan Larutan Pepton 5%

Ditimbang 2,5 gram pepton kemudian ditambahkan Aqua Pro Injeksi sedikit demi sedikit hingga larut dan dimasukkan dalam labu ukur 50 ml. kemudian tambahkan dengan Aqua Pro Injeksi sampai tanda batas 50 ml. Selanjutnya disterilkan dalam autoclave (Ibrahim N *et al*, 2014).

3.4.5 Pembuatan Pulvis Gummi Arabic 1%

Suspensi PGA dibuat dengan cara ditimbang sebanyak 1 gram, kemudian dimasukan sedikit demi sedikit aquadest sebanyak 100 mL ke dalam mortar kemudian digerus sampai menjadi suspensi.

3.4.6 Pembuatan Suspensi Paracetamol 500mg

Pembuatan yaitu dengan paracetamol serbuk sebanyak 500 mg, sesuai dengan dosis lazim untuk manusia yang dikonversikan ke tikus percobaan, kemudian digerus dan ditimbang sebanyak 10,1 gram. Kemudian dimasukan ke dalam mortar dan ditambahkan dengan suspensi Gummi arabic sedikit demi sedikit sambil digerus hingga homogen, lalu dimasukan ke dalam labu ukur 50ml. kemudian volumenya dicukupkan hingga 50 mL dengan suspensi Gummi arabic.

3.4.7 Pemilihan dan Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus jantan galur wistar yang sehat sebanyak 28 ekor dengan bobot badan 200 gram. Sebelumnya tikus diaklimatisasi selama 1 minggu yang bertujuan untuk menkondisikan hewan dengan suasana laboratorium dan untuk menghilangkan stress akibat dalam perjalanan. Tikus kemudian di bagi menjadi 7 kelompok perlakuan, tiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus jantan galur wistaryang ditentukan secara acak.

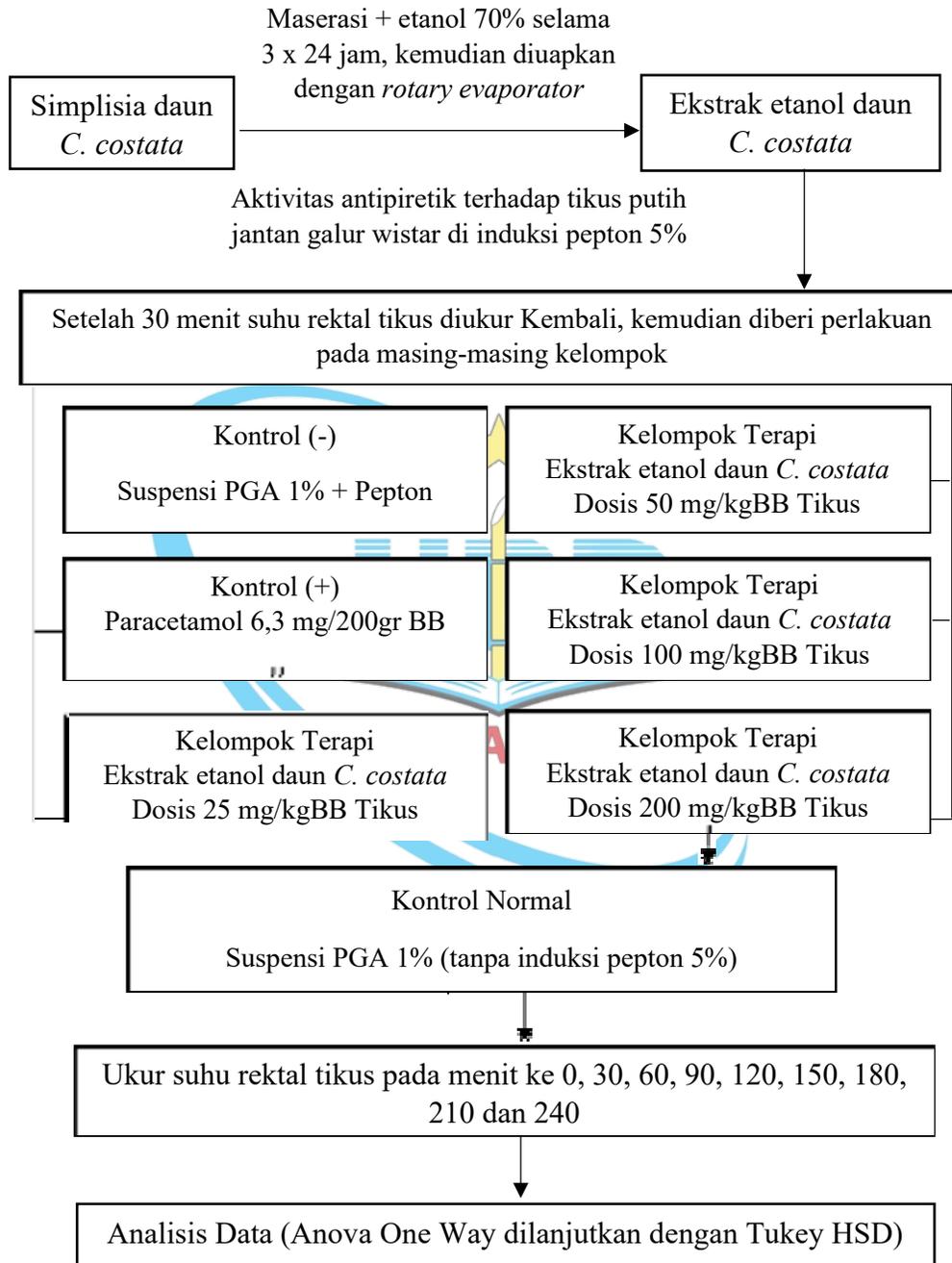
3.4.8 Pengujian Efek Antipiretik Daun *C. costata*

Hewan uji dipuasakan selama 1 hari, masing-masing hewan uji ditimbang berat badannya, dan di kelompokkan menjadi 7 kelompok. Dalam 1 kelompok tikus ditempatkan secara bersamaan dalam 1 kandang. Pada kelompok 1 sebagai kontrol negatif, kelompok 2 kontrol positif, kelompok 3 kontrol normal, kelompok 4 kelompok terapi ekstrak daun *C. costata* dosis 25mg/kg BB tikus, kelompok 5 kelompok terapi ekstrak daun *C. costata* dosis 50 mg/kg BB tikus, kelompok 6 kelompok terapi ekstrak daun *C. costata* dosis 100 mg/kg BB tikus, dan kelompok 7 kelompok terapi ekstrak daun *C. costata* dosis 200 mg/kg BB tikus diberikan secara oral. Pertama diukur suhu

rektal awal tikus, kemudian diinduksi demam menggunakan pepton 5% secara per oral, tunggu sampai tikus mengalami demam, kemudian lakukan pengukuran mulai dari menit ke 0 sampai menit ke 240 selama 4 jam. Pengecekan dilakukan 30 menit sekali menggunakan thermometer digital dan masing-masing kelompok di beri perlakuan.



3.5 Skema Penelitian



Gambar 3.1 Skema penelitian

