

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah studi ekperimental yang menggunakan tikus putih jantan galur wistar sebagai hewan percobaan dan menggunakan metode *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel, pembuatan dari ekstrak sampai fraksi daun jambang, skrining fitokimia dan pengujian efek antipiretik terhadap penurunan suhu tubuh hewan uji. Digunakan 12 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif diberikan pepton 5% dan suspensi PGA 1%, kelompok kontrol positif diberikan pepton 5% dan suspensi parasetamol 150mg/kgBB, kelompok kontrol normal hanya diberikan aquadest, dan kelompok uji diberikan fraksi daun *S.cumini* dengan dosis 100mg/kgBB, dosis 200mg/kgBB, dan dosis 400mg/kgBB dari masing-masing fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air serta pepton 5%.

Rancangan penelitian ini menggunakan analisis Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus Federer yaitu : $(K-1)(n-1) \geq 15$ (Smith dan Mangkoewidjojo., 1988). (Lampiran 9)

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah hewan uji tikus putih jantan galur wistar, sementara sampel yang digunakan terdiri dari fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun *S.cumini* yang diperoleh dari Kecamatan Klari, Kabupaten Karawang.

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini, tikus putih, pepton 5%, etanol 70%, aquadest, tablet parasetamol® 500mg (Indo Farma), *Pulvis Gummi Arabicum* (PGA), n-heksan (PT. Brataco), etil asetat (PT. Brataco), asam klorida,

pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Liebermann-Burchard, besi (III) klorida, dan serbuk magnesium.

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu spuit 1cc, sonde oral, mortir dan steamper, termometer digital (Thermo One), tabung reaksi (iwaki), kertas perkamen, sendok tanduk, cawan, gelas ukur 100mL (pyrex), gelas piala 100mL (pyrex), corong pisah 500mL (pyrex), *deep freezer*, *freeze dry* (buchi), batang pengaduk, timbangan analitik (kern), blender (phillips), penangas air (favorit), saringan, kandang tikus.

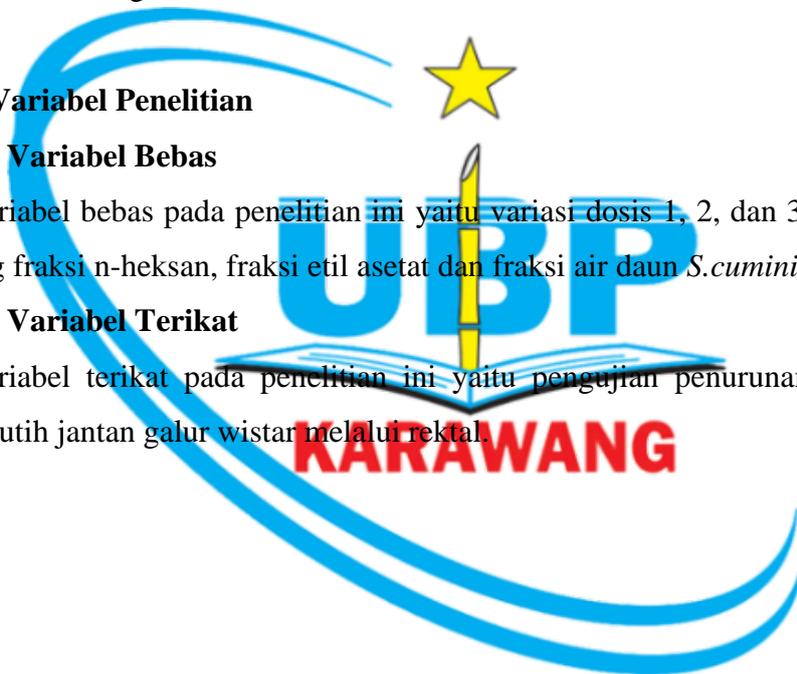
3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi dosis 1, 2, dan 3 dari masing-masing fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air daun *S.cumini*.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu pengujian penurunan suhu tubuh tikus putih jantan galur wistar melalui rektal.



3.4.3 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini adalah definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini, yaitu :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1.	Dosis fraksi tanaman	12 kelompok perlakuan dengan menggunakan obat parasetamol dan fraksi tanaman masing-masing dengan 3 dosis bervariasi		Nominal	1. Kontrol negatif Pepton 5% 2. Kontrol positif parasetamol 150mg/kgBB 3. Kontrol normal hanya diberikan aquadest 4. Kelompok fraksi n-heksan dosis 1,2, dan 3. 5. Kelompok fraksi etil asetat dosis 1,2, dan 3. 6. Kelompok fraksi air dosis 1,2, dan 3.
Variabel Terikat					

2.	Penurunan suhu tubuh tikus melalui Rektal	Mengukur suhu tubuh putih galur melalui rektal	Termometer Digital	Interval	1. Derajat celcius ($^{\circ}$ C) 2. Suhu rektum normal tikus $36,5^{\circ}$ C – $37,2^{\circ}$ C.
----	---	--	--------------------	----------	--

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

1. Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu untuk mengetahui identitas dari tanaman daun *S.cumini*.

2. Penyiapan Simplisia

Sampel tanaman daun *S.cumini* diambil dari Kecamatan Klari Kabupaten Karawang. Selanjutnya, tanaman tersebut disortasi basah, dibersihkan dengan air mengalir, dan dikeringkan selama 24 jam. Setelah itu, daun jambang diiris-iris dan dikeringkan kembali dengan cara dibiarkan terkena udara sampai kering selanjutnya disortasi kering. Simplisia kering dari daun jambang disimpan dalam wadah yang kedap udara.

3. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi, dengan langkah-langkah berikut: Pertama, daun jambang kering seberat 500 gram dihancurkan menjadi serbuk dengan menggunakan blender. Selanjutnya, serbuk simplisia tersebut direndam dalam pelarut etanol 70% pada suhu kamar. Maserasi dilakukan selama tiga kali 24 jam, dengan mengganti pelarut yang sama setiap 24 jam. Setelah proses maserasi selesai, serbuk yang telah direndam diperas untuk mendapatkan maseratnya. Langkah

selanjutnya adalah mengkonsentrasikan maserat tersebut dengan alat *rotary evaporator*, sehingga ekstrak kental dapat diperoleh.

Rendemen yang diperoleh dihitung dan dicatat :

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Berat simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

4. Pembuatan Fraksi Daun Jamblang

Pembuatan fraksi daun jamblang ekstrak dilarutkan dalam campuran etanol dan air dengan perbandingan (1:3), setelah itu difraksinasi dengan praktisi cair – cair menggunakan etil asetat dan n-heksan masing – masing dilakukan 4 kali pengulangan sebanyak 150mL (4 x 150 mL) dengan menggunakan alat corong pisah dengan cara dikocok kuat berkali – kali secara searah kemudian didapatkan hasil fraksi yaitu fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan. Fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sedangkan fraksi air dengan *freeze dry* (pengeringan beku) untuk mengeluarkan atau memisahkan hampir sebagian besar air dalam ekstrak.

Rendemen yang diperoleh dihitung dan dicatat :

$$\% \text{ Rendemen fraksi} = \frac{\text{Berat fraksi yang diperoleh (g)}}{\text{Berat ekstrak awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

5. Skrining Fitokimia

Selanjutnya diuji secara kualitatif untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak dengan pengujian senyawa flavonoid, alkaloid, fenol, tannin dan saponin (Kemenkes RI, 2016).

a. Identifikasi Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram sampel uji dimasukkan kedalam cawan, lalu ditambahkan dengan 2mL etanol 70% kemudian diaduk, ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan serbuk magnesium 0,5 gram. Terbentuknya warna jingga sampai merah menunjukkan adanya flavon,

dan merah padam sampai merah keunguan menunjukkan flavanon (Sulistyawati *et al.*, 2017).

b. Identifikasi Alkaloid

Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian ditambahkan dengan 2mL etanol 70% dan 5mL HCl 2N, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, dan didinginkan lalu disaring (Sulistyawati *et al.*, 2017). Filtrat yang diperoleh digunakan untuk pengujian alkaloid;

Dalam percobaan ini, ambil tiga tabung reaksi. Kemudian, masukkan 0,5mL filtrat ke masing-masing tabung reaksi.

- Pada tabung reaksi pertama, tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer untuk menghasilkan endapan yang berwarna putih atau kuning.
- Pada tabung reaksi kedua, campurkan 2 tetes pereaksi Dragendorff untuk mendapatkan endapan berwarna coklat atau jingga kecoklatan.
- Tabung reaksi ketiga digunakan sebagai blanko.

c. Identifikasi Tanin

0,5 gram sampel uji dilarutkan pada 20mL air murni, dipanaskan menggunakan bak air, disaring, lalu dicampur dengan 2 tetes larutan FeCl₃ 0,1%. Keberadaan senyawa tanin ditandai oleh perubahan warna menjadi hijau gelap atau biru kehitaman. (Kemenkes RI, 2016).

d. Identifikasi Saponin

Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 gram dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 2mL etanol 70%, diaduk, dan diikuti dengan penambahan 20mL aquadest. Campuran dikocok dan dibiarkan diam selama 15-20 menit. Jika ada busa yang tetap stabil dengan ketinggian lebih dari 2 cm selama 10 menit, itu menunjukkan adanya saponin (Sulistyawati *et al.*, 2017).

e. Identifikasi Triterpenoid dan Steroid

Sebanyak 0,5 gram sampel uji ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Terbentuknya warna ungu dan akhirnya biru menunjukkan

adanya senyawa golongan triterpenoid, sedangkan terbentuk warna merah dan akhirnya hijau menunjukkan adanya senyawa golongan steroid.

6. Pembuatan Larutan PGA 1%

Larutan PGA 1% dibuat dengan cara menimbang sebanyak 1 gram PGA lalu dilarutkan dalam 100mL aquadest.

7. Pembuatan Suspensi Parasetamol

Tablet parasetamol digerus sampai halus dan ditimbang sesuai dengan perhitungan dosis untuk tikus lalu dilarutkan dengan PGA (*Pulvis Gummy Arabicum*) 1%.

8. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji dimulai dengan mengukur berat fraksi daun jambang sesuai dosis yang ditentukan, lalu mencampurkannya dengan larutan PGA 1%. Setelah itu, larutan fraksi masing-masing dosis dimasukkan ke dalam botol sampel dan diberi label.

9. Pembuatan Larutan Induksi Pepton 5%

Larutan pepton 5% dapat dihasilkan dengan menimbang 5 gram pepton dan melarutkannya dalam 100 mL air proinjeksi sambil diaduk hingga merata, pepton 5% b/v siap digunakan.

3.5.2 Prosedur Pengujian Antipiretik

1. Penyiapan Hewan Uji

Dalam penelitian ini, Tikus Putih Jantan Galur Wistar digunakan sebagai subjek uji, memiliki berat sekitar 200 – 300 gram dan usia antara 2 –3 bulan. Sebelumnya, tikus ditempatkan dalam kondisi yang sama dengan laboratorium selama 1 minggu agar mereka bisa beradaptasi dengan lingkungan dan mengurangi stres yang mungkin terjadi selama perjalanan,

dengan tetap diberikan makanan dan minuman secara rutin sebelum diberikan perlakuan. Menggunakan hewan uji 48 ekor tikus diacak secara randomisasi menjadi 12 kelompok perlakuan yang setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus, dalam 1 kelompok tikus ditempatkan dalam 1 kandang yang sama.

2. Pengujian Antipiretik

Hewan uji dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam namun tetap diberi minum, bertujuan agar dampak makanan terhadap penyerapan sampel yang diberikan dapat berkurang. Lalu, masing-masing hewan uji ditimbang berat badannya. Semua hewan uji dilakukan pengukuran suhu rektal sebelum diberikan induksi dengan pepton 5%. Kemudian hewan uji diinduksi dengan pepton 5% secara intraperitoneal dan dibiarkan hingga suhu rektal meningkat menjadi $0,6^{\circ}\text{C}$ (suhu normal rektal tikus $36,5 - 37,2^{\circ}\text{C}$) (Widyasari *et al.*, 2018), setelah mencapai suhu demam tikus diberikan perlakuan dan diamati suhu rektal tikus dengan termometer digital tiap 1 jam selama 4 jam.

Berdasarkan pembagian perlakuan adalah sebagai berikut:

- a. Kelompok K- : Tikus putih diberikan suspensi PGA 1% dan penginduksi pepton 5%.
- b. Kelompok K+ : Tikus putih diberikan suspensi parasetamol 150mg/kgBB dan penginduksi pepton 5%.
- c. Kelompok K0 : Tikus putih diberikan aquadest (tanpa induksi)
- d. Kelompok K1 : Tikus putih diberikan fraksi n-heksan daun *S.cumini* dengan variasi dosis 100, 200, dan 400mg/kgBB serta penginduksi pepton 5%.
- e. Kelompok K2 : Tikus putih diberikan fraksi etil asetat daun *S.cumini* dengan variasi dosis 100, 200, dan 400mg/kgBB serta penginduksi pepton 5%.

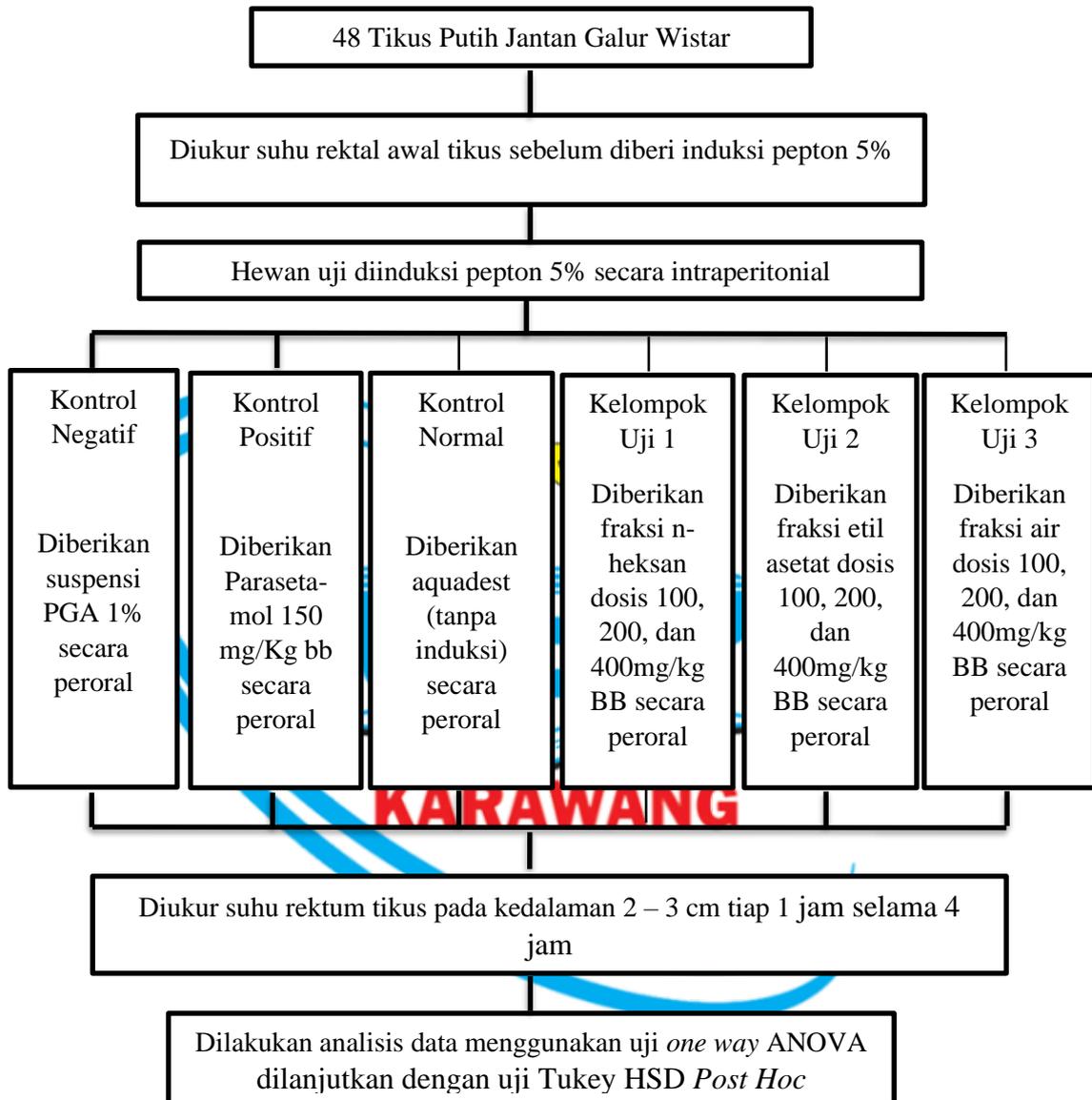
- f. Kelompok K3 : Tikus putih diberikan fraksi air daun jambang *S.cumini* dengan variasi dosis 100, 200, dan 400mg/kgBB serta penginduksi pepton 5%.

3.6 Analisis Data

Hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM dengan $p < 0,05$ dianggap berbeda signifikan. Untuk analisis statistika dilakukan dengan uji Analysis of Variance (ANOVA) menggunakan GraphPad Versi 9 kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey HSD *Post Hoc*.



3.7 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian