

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Pada penelitian kali ini disebut studi eksperimental yang memanfaatkan tikus putih jantan galur Wistar yang dijadikan sebagai subjek percobaan, yang menggunakan metode *post test only control group*. Penelitian ini mencakup berbagai aspek, termasuk pengumpulan dan pengolahan sampel, pembuatan dari ekstrak sampai fraksi daun sirih, skrining fitokimia dan pengujian efek antipiretik terhadap penurunan suhu tubuh hewan uji. Digunakan 6 kelompok perlakuan adalah 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 *Piper Betle* L dengan dosis 100 mg/kgBB, dosis 200mg/kgBB, dan dosis 400mg/kgBB dari masing-masing fraksi n- heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air serta pepton 5%.

#### **3.2 Sampel**

Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah hewan uji tikus putih jantan galur wistar secara acak.

#### **3.3 Bahan dan Alat Penelitian**

##### **3.3.1 Bahan**

Bahan yang dipakai pada penelitian ini, daun sirih hijau, pepton 5%, etanol 70%, aquadest, tablet parasetamol® 500mg, *Pulvis Gummi Arabicum* (PGA), n-heksan (PT. Brataco), etil asetat (PT. Brataco), asam klorida, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorf, pereaksi Liebermann-Burchard, besi (III) klorida, dan serbuk magnesium.

##### **3.3.2 Alat**

Alat yang dipakai pada penelitian ini yaitu sputit 1cc, sonde oral, mortir dan steamper, termometer digital (Thermo One), tabung reaksi, 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 Klasifikasi Variabel

#### a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi dosis 100, 200, dan 400 dari masing-masing fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air daun *Piper betle* L

#### b. Variabel Terikat

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

### 3.5 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3. 1** Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
<b>Variabel Bebas</b>				
Dosis	12 kelompok		Nomina	1. Kontrol negatif
Fraksi	perlakuan dengan		1	Pepton 5%
Tanaman	menggunakan obat Parasetamol dan fraksi			2. Kontrol positif parasetamol 150mg/kgBB
	tanaman masing- masing dengan 3 dosis bervariasi			3. Kontrol normal hanya diberikan aquadest
				4. Kelompok fraksi n- heksan dosis 1, 2, 3
				5. Kelompok fraksi etil asetat dosis 1,2, dan 3.

- 
6. Kelompok  
fraksi air  
dosis 1,2,  
dan 3.
- 

Variabel terikat

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

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Preparasi Sampel

##### 1. Destriminasi Tanaman

Untuk mengetahui identitas dari tanaman daun *Piper Betle* L, dilakukan determinasi di HERBARIUM JATINANGORIENSE Laboratorium Biostematika dan molekuler departemen biologi, FMIPA UNPAD .

##### 2. Penyiapan Simplisia

Sampel tanaman daun *Piper Betle* L diambil dari Kecamatan Jayakerta Kabupaten Karawang. Selanjutnya, tanaman tersebut disortasi basah, dibersihkan dengan air mengalir, dan dikeringkan selama 24 jam. Setelah itu, daun sirih diiris-iris dan dikeringkan kembali dengan cara dibiarkan terkena udara sampai kering selanjutnya disortasi kering. Simplisia kering dari daun sirih dilakukan penyimpanan kedalam tempat yang kedap udara.

### 3. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan tambah peraturan maserasi, dengan langkah-langkah berikut: Pertama, daun sirih kering seberat 1000 gram dihancurkan menjadi serbuk dengan menggunakan blender. Selanjutnya, serbuk simplisia tersebut direndam dalam pelarut etanol 70% pada suhu kamar. Merasasi dilakukan 24 jam sebanyak tiga kali, dengan mengganti pelarut yang sama setiap 24 jam. Setelah proses maserasi selesai, serbuk yang telah direndam diperas untuk mendapatkan maserasinya. Langkah selanjutnya adalah mengkonsentrasi maserasi itu sendiri dengan alat rotary evaporator, sehingga ekstrak kental dapat diperoleh.

Rendemen yang diperoleh dihitung dan dicatat :

**Tabel 3.1** Rendemen Ekstrak

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

### 4. Pembuatan Fraksi Daun Sirih

Pembuatan fraksi daun sirih ekstrak Dilarutkan bagian dalam gabungan etanol dan enceran tambah perbandingan (1:3), setelah itu difraksinasi dengan praktisi cair-cair yang dipakaai dalam heksan serta etil asetat masing – masing dilakukan 3 kali pengulangan sebanyak (3 x 300 mL) dengan menggunakan alat corong pisah dengan cara dikocok kuat berkali – kali secara searah kemudian didapatkan hasil fraksi merupakan fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan. Fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat dilakukan pekat dengan rotary evaporator pada suhu 50C° sedangkan fraksi air dengan *freeze dry* (pengeringan beku) untuk menghadirkan atau memencilkkan mendekati kebanyakan enceran pada ekstrak.

Rendemen yang diperoleh dihitung dan dicatat :

**Tabel 3.2** Rendemen Fraksi

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

### 5. Skrining Fitokimia

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

#### a) Indetifikasi Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram sampel uji dimasukkan kedalam cawan, lalu ditambahkan dengan 2mL etanol 70% kemudian diaduk, ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat serta serbuk magnesium 0,5 gram. Warna yang terbentuk dari jingga hingga merah mengindikasikan keberadaan flavon, sementara warna merah gelap hingga merah keunguan menandakan keberadaan flavanon (Sulistyawati et al., 2017)

#### b) Indentifikasi Alkaloid

Sampel uji dilakukan penimbangan sebanyak 0,5 gram kemudian diberi tambahan dengan 2mL etanol 70% dan 5mL HCl 2N, dilakukan pemanasan di atas pemanas air dengan waktu 2 menit, serta didinginkan kemudian disaring (Sulistyawati et al., 2017). Filtrat yang diperoleh digunakan untuk pengujian alkaloid; Dalam percobaan ini, ambil tiga tabung reaksi. Kemudian, masukkan 0,5mL filtrat pada masing-masing tabung reaksi.

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

#### c) Indentifikasi Tanin

0,5 gram sampel uji dilarutkan pada 20mL air murni, dipanaskan

menggunakan bak air, disaring, lalu dicampur dengan 2 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 0,1%. Keberadaan senyawa tanin ditandai oleh perubahan warna menjadi hijau gelap atau biru kehitaman. (Kemenkes RI, 2016).

d) Identifikasi Samponin

Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 gram pada 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 menandakan adanya senyawa golongan triterpenoid, sedangkan Hasil uji menunjukkan warna hijau pada sampel, yang mengindikasikan adanya campuran senyawa steroid.

6. Pembuatan Larutan PGA 1%

Larutan PGA 1% dibuat dengan cara dilakukan penimbangan sebanyak 1 gram PGA lalu dilarutkan pada 100mL aquadest.

7. Pembuatan Suspensi Paracetamol

Tablet parasetamol digerus sampai halus serta dilakukan penimbangan 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 sirih sesuai dosis yang ditentukan, lalu mencampurkannya dengan larutan PGA 1%. Setelah itu, larutan fraksi Berbagai dosis obat dimasukkan ke dalam wadah percobaan dan diberi label.

9. Pembuatan Larutan Peinduksian 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

### **3.7 Prosedur Pengujian Antipiretik**

#### **3.7.1 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 pada kondisi yang persis 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 diberikan penempatan pada 1 kandang yang sama.

#### **3.7.2 Pengujian Antipiretik**

Hewan uji diberi akses air minum tetapi dipuasakan selama 12 jam terlebih dahulu, 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°C (suhu normal rektal tikus 36,5 – 37,2°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.

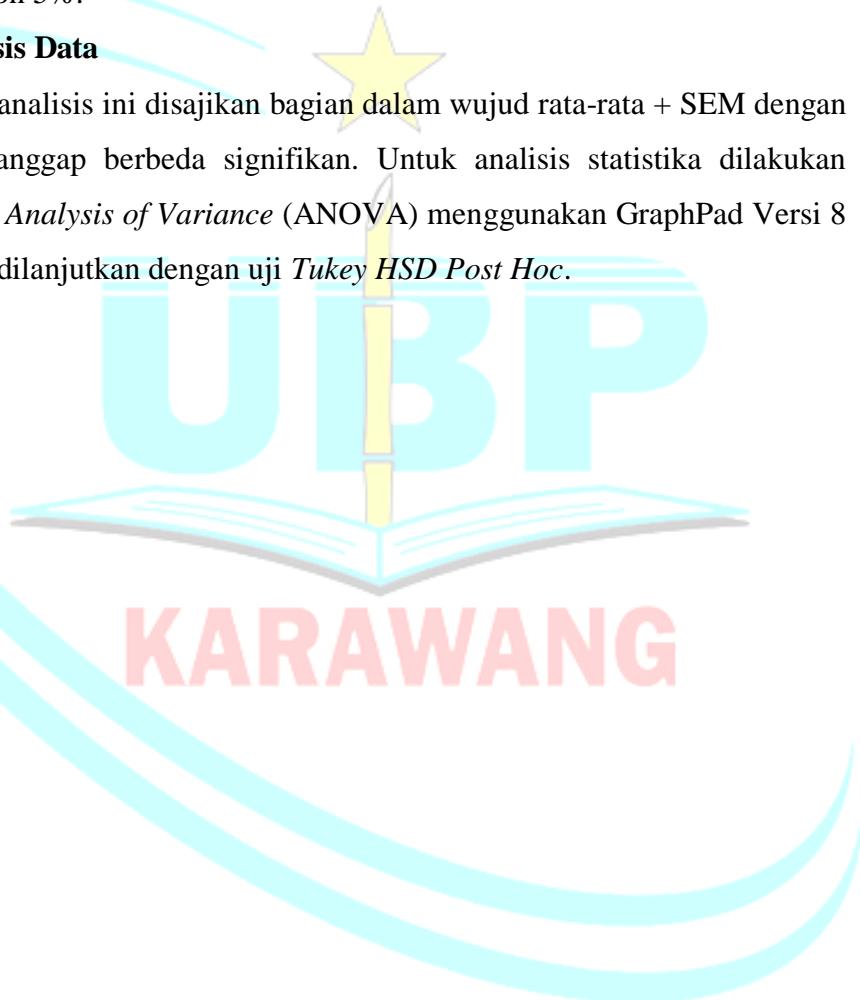
- a. Kelompok K- : Tikus putih diberikan suspensi PGA 1% dan penginduksi pepton 5%.
- b. Kelompok K+ : Tikus putih diberikan suspensi parasetamol 150mg/kgBB dan penginduksi pepton 5%.
- c. Kelompok K0 : Tikus putih diberikan aquadest (tanpa induksi)
- d. Kelompok K1 : Tikus putih diberikan fraksi n-heksan daun *Piper Betle*

L dengan variasi dosis 100, 200, dan 400mg/kgBB serta penginduksi pepton 5%.

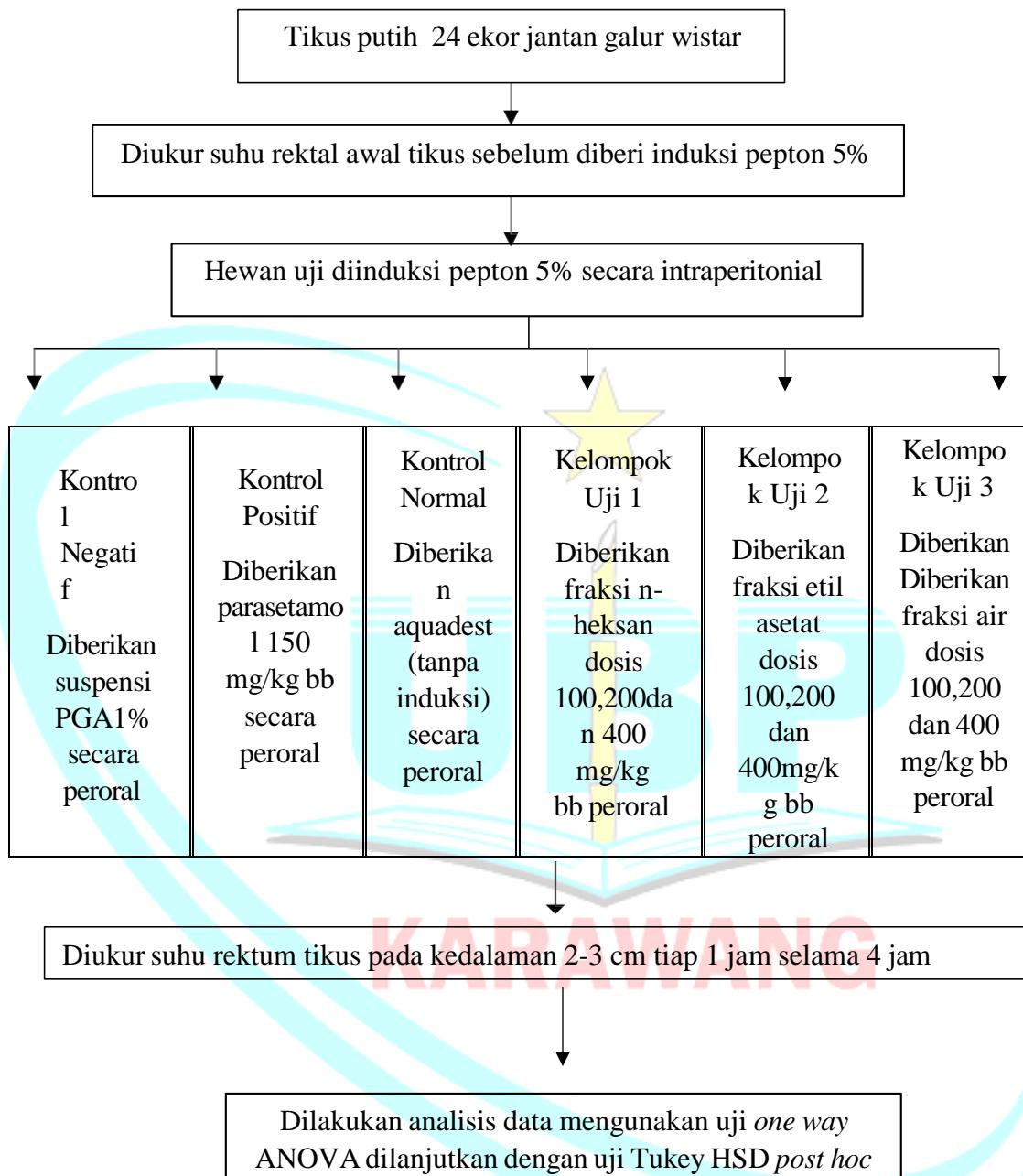
- e. Kelompok K2 : Tikus putih diberikan fraksi etil asetat daun *Piper Betle* L dengan variasi dosis 100, 200, dan 400mg/kgBB serta penginduksi pepton 5%.
- f. Kelompok K3 : Tikus putih diberikan fraksi air daun sirih *Piper Betle* L dengan variasi dosis 100, 200, dan 400mg/kgBB serta penginduksi pepton 5%.

### 3.8 Analisis Data

Hasil analisis ini disajikan bagian dalam wujud rata-rata + SEM dengan  $p<0,05$  dianggap berbeda signifikan. Untuk analisis statistika dilakukan dengan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) menggunakan GraphPad Versi 8 kemudian dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD Post Hoc*.



### 3.9 Skema Penelitian



**Bagan 3.1 Skema Penelitian**