

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian kali ini adalah studi eksperimental 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 estrak etanol batang jamblang, 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 ekstrak etanol batang jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dengan dosis 100 mg/kgBB, 150 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB dan pepton 5%.

Jumlah sampel ditetapkan dengan menggunakan rumus Federer, yaitu: $(K-1)$ $(n-1) \geq 15$ (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Penelitian ini menerapkan analisis dengan rancangan acak lengkap (RAL) sebagai desain penelitiannya.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang diapakai pada penelitian kali ini yaitu hewan uji tikus putih jantan galur wistar, sementara sampel yang digunakan terdiri dari ekstrak etanol kulit batang jamblang (*S. cumini*).

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan yang dipakai pada penelitian ini tikus putih, pepton 5%, etanol 70%, aquadest, tablet parasetamol® 500mg (Indo Farma), *Pulvis Gummi Arabicum*, asam klorida, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorf, pereaksi Liebermann-Burchard, besi (III) klorida, dan serbuk magnesium.

3.3.2 Alat

Alat yang dipakai pada penelitian kali ini adalah spuit 1cc, sonde oral, mortir dan steamper, termometer digital , tabung reaksi , kertas perkamen, sendok tanduk, cawan, gelas ukur 100mL ,Alat-Alat Di Lab Kimia Farmasi.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi dosis 100, 150 , dan 200 dari ekstrak kulit etanol batang jamblang (*S.cumini*.)

3.4.2 Variabel Terikat

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

3.4.3 Definisi Operasional Variabel

Berikut dibawah ini merupakan definisi operasional dari 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 Ekstrak etanol	6 kelompok perlakuan dengan menggunakan obat parasetamol dan ekstrak etanol	Nominal		1. Kontrol negatif Pepton 5% 2. Kontrol positif parasetamol 150mg/kgB B 3. Kontrol normal hanya diberikan aquadest 4. Kelompok Ekstrak etanol 100mg/kgB B,150mg/kg BB dan 200mg/kgB

B						
Variabel Terikat						
2.	Penurunan suhu tubuh tikus melalui Rektal	Mengukur suhu tubuh putih galur melalui rektal	tikus jantan wistar	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 UPT Laboratorium Biosistematika Dan Molekuler, Departemen Biologi FMIPA UNPAD

2. Penyiapan Simplisia

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

3. Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi dilakukan melalui proses maserasi, dengan langkah-langkah berikut: Pertama, kulit batang jamblang 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

mengkonsentrasiakan maserat tersebut dengan alat *rotary evaporator*, sehingga ekstrak kental dapat diperoleh.

Rendemen yang diperoleh dihitung dan dicatat :

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

4. 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 ke dalam cawan, kemudian ditambahkan 2 mL etanol 70% dan diaduk. Setelah itu, tambahkan 3 tetes HCl pekat dan 0,5 gram serbuk magnesium. Pembentukan warna jingga hingga merah menandakan adanya flavon, sedangkan warna merah padam hingga merah keunguan menunjukkan keberadaan flavanon (Sulistyawati *et al.*, 2017).

b. Identifikasi Alkaloid

Sampel uji Ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian dicampur dengan 2 mL etanol 70% dan 5 mL HCl 2N. Campuran tersebut dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit, lalu didinginkan dan 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.

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. 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

Reaksi dengan pereaksi Liebermann-Burchard dilakukan pada 0,5 gram sampel uji. Warna yang berubah menjadi ungu dan kemudian biru mengindikasikan adanya senyawa golongan triterpenoid, sedangkan perubahan warna menjadi merah dan akhirnya hijau menandakan keberadaan senyawa golongan steroid.

5. Pembuatan Larutan PGA 1%

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

6. Pembuatan Suspensi Parasetamol

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

7. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji dimulai dengan mengukur berat ekstrak etanol batang jamblang sesuai dosis yang ditentukan, lalu mencampurkannya dengan larutan PGA 1%. Setelah itu, larutan ekstrak etanol masing-masing dosis dimasukkan ke dalam botol

sampel dan diberi label.

8. 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 24 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 dipuaskan 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°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.

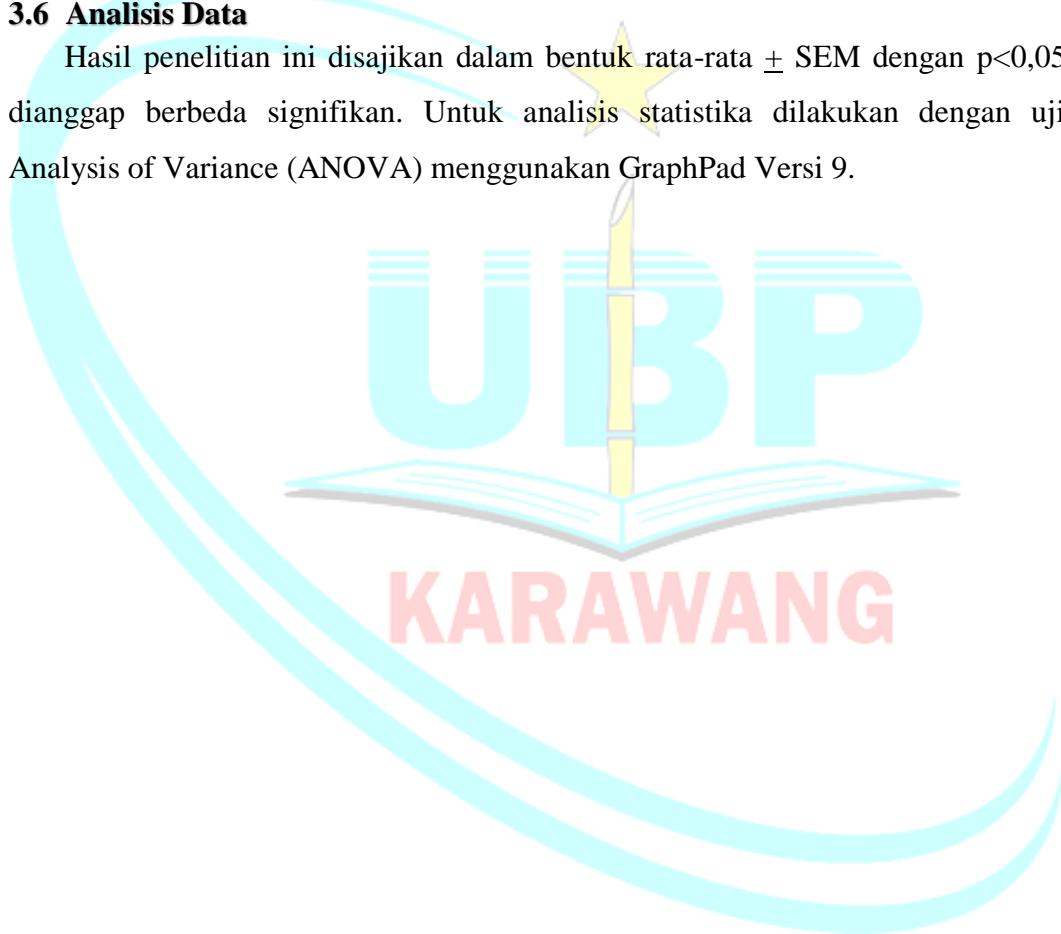
Berdasarkan pembagian perlakuan adalah sebagai berikut:

- Kelompok K- : Tikus putih diberikan suspensi PGA 1% dan penginduksi pepton 5%.

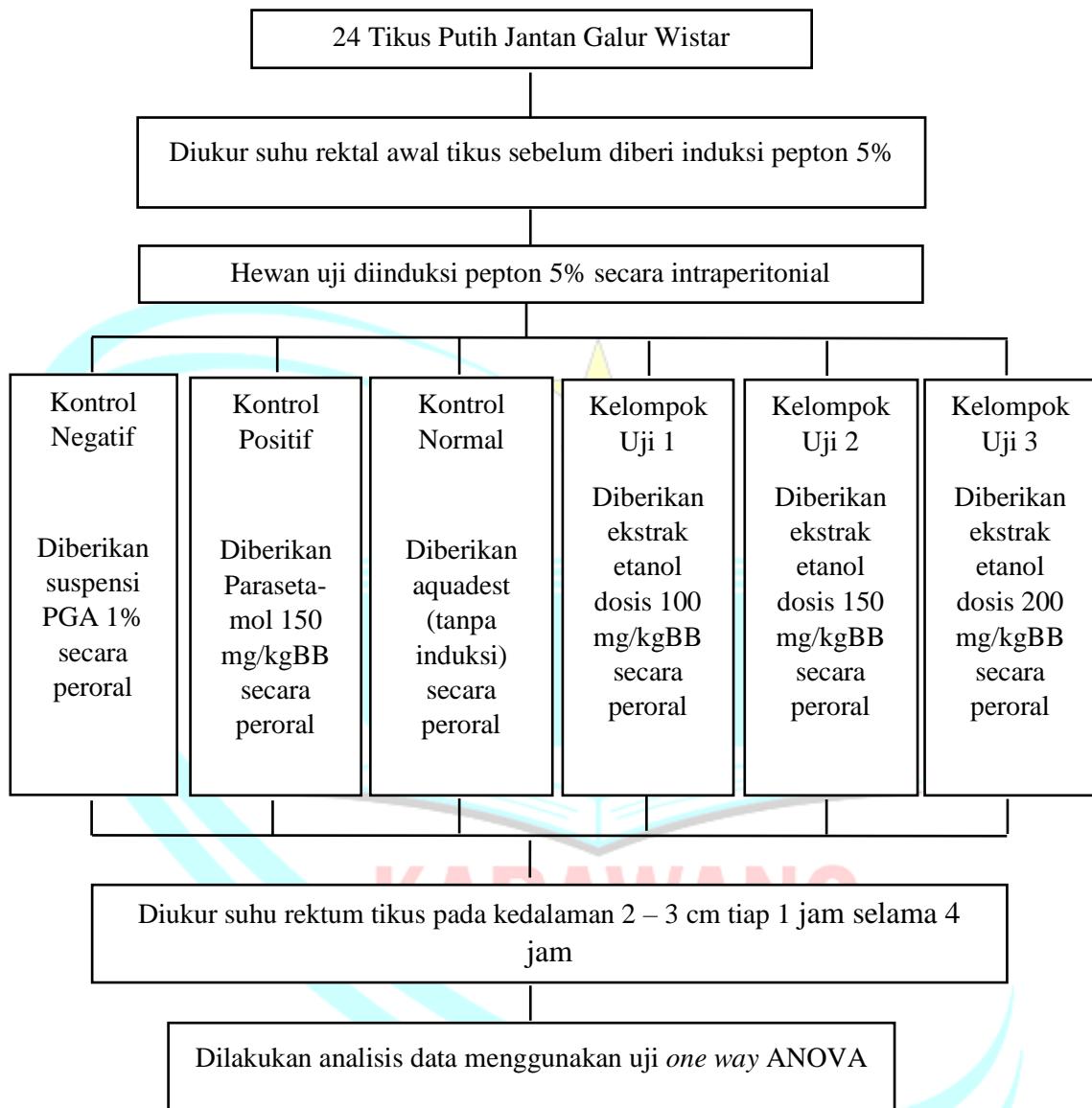
- b. Kelompok K+ : Tikus putih diberikan suspensi parasetamol 150mg/kgBB dan penginduksi pepton 5%.
- c. Kelompok K0: Tikus putih diberikan aquadest (tanpa induksi)
- d. Kelompok K1: Tikus putih diberikan Ekstrak kulit batang jamblang *S.cumini* dengan variasi dosis 100,150, dan 200mg/kgBB serta penginduksi 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.



3.7 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian