

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan keseluruhan unit atau individu yang digunakan sebagai ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biji alpukat (*Persea Americana*, Mill) yang diperoleh secara acak dengan kulit biji yang berwarna kecoklatan dari Dusun Puspan, Desa Blulukan, Kecamatan Colomadu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang ingin diteliti. Sampel penelitian ini adalah biji dari buah alpukat yang memiliki kualitas bagus (tidak berlubang), segar, tidak busuk, lapisan kulit luar berwarna kecoklatan dan biji alpukat berwarna kuning yang di ambil secara acak dari Dusun Puspan, Desa Blulukan, Kecamatan Colomadu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variable utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol biji alpukat dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antipiretik dari ekstrak etanol biji alpukat..

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel yang diteliti terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas yang dimaksud pada penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol biji alpukat dengan variasi dosis yang diberikan pada hewan uji mencit.

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung yang dimaksud pada penelitian ini adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian dan merupakan akibat dari variabel bebas kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah

aktivitas antipiretik dari ekstrak etanol biji alpukat dengan metode pengukuran suhu menggunakan thermometer.

2.3. Variabel terkendali. Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel dalam penelitian ini, yaitu kondisi pengukur atau peneliti, laboratorium, dan kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi berat badan, usia, lingkungan, tempat hidup, dan jenis kelamin.

3. Definisi operasional variable utama

Pertama, biji alpukat berwarna coklat tua diperoleh dari Dusun Puspan, Desa Blulukan, Kecamatan Colomadu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah

Kedua, serbuk biji alpukat adalah serbuk yang didapat dari biji alpukat yang telah dicuci bersih, dirajang, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu $\pm 55^{\circ}\text{C}$ sampai kering lalu diblender dan diayak.

Ketiga, ekstrak etanol biji alpukat adalah ekstrak hasil maserasi serbuk biji alpukat dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator.

Keempat, hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan usia 2-3 bulan dengan berat antara 20-30 gram.

Kelima, aktivitas antipiretik adalah kemampuan ekstrak etanol biji alpukat dalam mengurangi demam dengan induksi pepton 5%

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk membuat simplisia meliputi neraca analitik, pisau untuk merajang, oven, blender, ayakan. Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol 96% meliputi bejana maserasi, batang pengaduk, kain flanel, kertas saring, *rotary evaporator*, alat-alat gelas, cawan porselen, *water bath*, *moisture balance*. Alat yang digunakan untuk pengkajian *thermometer*, kandang mencit, jarum sonde oral, alat-alat gelas, timbangan mencit, sarung tangan.

2. Bahan

2.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji alpukat yang sudah masak berwarna kuning yang diambil secara acak dari Dusun Puspan, Desa Blulukan, Kecamatan Colomadu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

2.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96% yang digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi, paracetamol sebagai kontrol positif, CMC-Na 0,5% sebagai kontrol negatif. Terdapat bahan-bahan yang digunakan untuk skrining fitokimia yaitu alkohol, amil alkohol, serbuk Mg, HCl pekat, FeCl3 1%, akuadet, HCl 1N, HCl 2%, reagen dragendorff, reagen Mayer.

2.3. Hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan usia 2-3 bulan dengan berat antara 20-30 gram. Hewan tersebut dipelihara pada Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman alpukat

Sebelum dilakukan penelitian mengenai aktivitas antipiretik dari biji alpukat terlebih dahulu dilakukan determinasi. Determinasi merupakan langkah awal dalam penelitian untuk mengetahui kebenaran mengenai tanaman yang akan diujikan dengan maksud agar menghindari kesalahan dalam pengumpulan berdasarkan ciri-ciri morfologi tanaman terhadap kepustakaan dan dapat dibuktikan. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini tanaman alpukat. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Penyiapan dan pengumpulan bahan

Pengumpulan bahan baku biji alpukat diambil Bulan Desember 2024 saat sudah masak sebanyak 3 kg, diperoleh di Dusun Puspan, Desa Blulukan, Kecamatan Colomadu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah. Biji alpukat yang telah terpilih kemudian dilakukan pencucian pada air mengalir untuk menghilangkan cemaran atau kotoran yang masih melekat. Biji alpukat dirajang setelah dirajang dikeringkan menggunakan oven $\pm 55^{\circ}\text{C}$ hingga mengering dengan tujuan untuk mengurangi kadar air dan mencegah terjadinya pembusukan oleh mikroorganisme yaitu bakteri setelah biji kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak hingga didapatkan serbuk halus.

3. Penetapan susut pengeringan

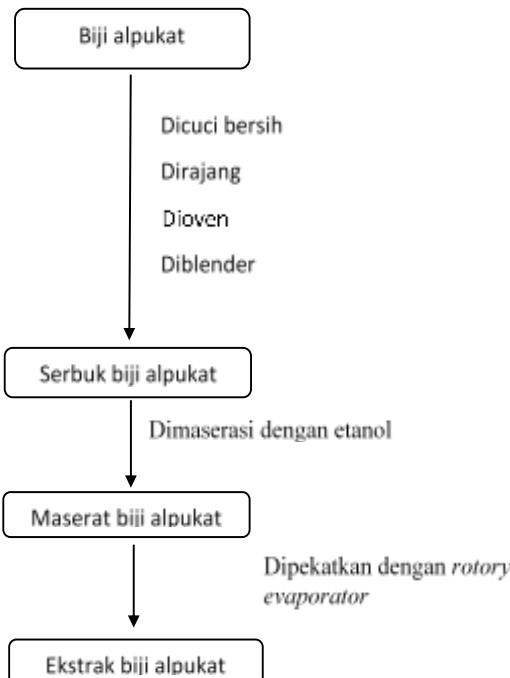
Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak biji alpukat dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*, dengan cara menimbang serbuk biji alpukat \pm 2 gram dan dimasukan dalam wadah. Suhu diatur 105°C dan tunggu sampai pemanasan berhenti. Dicatat hasil susut pengeringan pada alat dalam satuan persen (%). Penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Susut pengeringan

yang memenuhi syarat jika kadar air suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10% (Depkes, 2010).

4. Pembuatan ekstrak etanol biji alpukat

Serbuk biji alpukat diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 bagian. Seruk biji alpukat ditimbang sebanyak 250 gram kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca berwana gelap, ditambahkan dengan 10 bagian etanol 96% kemudian ditutup dan digojok, setelah itu didiamkan pada ruangan yang terhindar dari sinar matahari, setelah didiamkan lalu disaring dengan kain flanel kemudian disaring lagi dengan kertas saring. Ampas yang telah disaring ditambahkan 50% dari total pelarut awal diamkan selama 2 hari, kemudian disaring menggunakan kain flanel dan kertas saring hasil filtrat awal dan akhir dijadikan satu dan diupkan dengan rotary evaporator dilanjutkan dengan menggunakan water bath sampai dihasilkan ekstrak kental (FHI edisi II, 2017). Rendemen yang dihitung adalah persentase bobot (b/b) antara rendemen dan bobot simplisia yang digunakan dalam penimbangan. Dihitung rendemen dengan rumus berikut :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk}} \times 100 \%$$



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak

5. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak

Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan dalam ekstrak biji alpukat. Identifikasi kandungan senyawa kimia bertujuan untuk menetapkan keberadaan senyawa kimia dalam ekstrak biji alpukat. Identifikasi kandungan senyawa kimia dalam serbuk dan ekstrak etanol biji alpukat meliputi senyawa flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid (Atikah, 2013)

5.1. Flavonoid. Menimbang serbuk atau ekstrak biji alpukat ditimbang sebanyak 5 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas, ditambah 0,1 gram serbuk Mg, 2 ml larutan alkohol: HCl (1:1) dan pelarut amil alkohol, kemudian dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Reaksi hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes, 1995).

5.2. Saponin. Menimbang sebanyak 0,5 g serbuk atau ekstrak biji alpukat dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas kemudian didinginkan, dikocok kuat-kuat selama 10 detik,jika terbentuk buih yang menetap \pm 10 menit, setinggi 1-10 cm dan dengan penambahan 1 tetes HCl2N buih tidak hilang (Depkes, 1995).

5.3. Alkaloid. Ekstrak atau serbuk secukupnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dilarutkan dengan aquadest 10 ml dan diteteskan 3 tetes HCl pekat lalu dipanaskan hingga mendidih kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi yang masing-masing ditambahkan 3 tetes Mayer dan 3 tetes Dragendorf. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada Mayer dan endapan jingga pada Dragendorf menunjukkan positif alkaloid (Sari, 2010).

5.4. Tanin. Ekstrak atau serbuk secukupnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian larutkan dengan 2 ml aquadest, kemudian ditambahkan 1-2 tetes FeCl3 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan positif tanin (Safitri, 2013)

6. Penetapan dosis

6.1. Penetapan dosis paracetamol. Dosis paracetamol ditentukan berdasarkan faktor konversi manusia. Dosis lazim paracetamol adalah 500 mg sekali pakai. Konversi dosis manusia dengan berat badan 70 mg/kg ke mencit 20 gram adalah $0,0026$, maka dosis paracetamol yang diberikan adalah $500 \text{ mg} \times 0,0026 = 1.3 \text{ mg}/20\text{gBB}$ mencit.

6.2. Penetapan dosis ekstrak atanol diji alpukat. Landasan untuk penentuan dosis ekstrak menggunakan acuan dari jurnal (Handayani *et al*,2024) sebagai antipiretik pada mencit jantan (*Mus musculus*) jantan”. Jurnal tersebut menggunakan tiga variasi dosis yaitu 20 mg,40 mg dan 80 mg/kg BB . Pada jurnal tersebut dosis yang paling efektif terhadap aktivitas anipiretik adalah 80 mg/kg BB. Dengan ajuan dosis yang paling efektif maka digunakan dosis 80 mg/kg BB dengan variasi 40 mg/kg BB, 80 mg/kg BB dan 160 mg/kg BB.

7. Pembuatan larutan

7.1. Larutan CMC Na 0,5%. CMC Na dibuat dengan konsentrasi 0,5% yang digunakan sebagai pembawa yang diberikan perlakuan pada control negatif. Ditimbang CMC Na sebanyak 0,5 gram CMC Na, lalu dimasukkan air panas ke dalam mortir taburkan CMC Na secara merata tunggu hingga mengembang, jika CMC Na sudah mengembang gerus hingga homogen dan menambahkan aquades sedikit demi sedikit hingga 100 mL dan kemudian diaduk hingga homogen (Andriyani, 2017).

7.2. Pembuatan larutan pepton 5%. Larutan pepton 5% dibuat dengan menimbang 5 g pepton kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest.

7.3. Pembuatan suspense paracetamol. Ditimbang serbuk parasetamol yang telah ditentukan, lalu ditambahkan NaCMC 0,5% sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga volume mencapai 100 ml sampai terbentuk suspensi parasetamol. Dosis parasetamol ditentukan berdasarkan faktor konversi dosis manusia. Dosis lazim parasetamol untuk sekali konsumsi yaitu sebesar 500 mg. konversi dosis manusia ke mencit adalah 0,0026. Maka dosis parasetamol yang diberikan pada mencit adalah $500 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,3 \text{ mg} / 20 \text{ gram BB}$.

7.4. Pembuatan suspense sediaan uji 1%. Ditimbang CMC Na sebanyak 500 mg kemudian ditaburkan ke dalam cawan penguap yang berisi air panas secukupnya dan diaduk hingga mengembang. Ekstrak etanol biji alpukat ditimbang 1 gram, lalu digerus dalam mortir setelah itu ditambahkan mucilago CMC Na sampai volume 100 mL dan aduk sampai homogen.

8. Pengujian efek antipiretik

Prosedur pengujian efek anatipiretik ekstrak etanol biji alpukat terhadap mencit putih jantan yaitu, 25 ekor mencit percobaan terlebih dahulu diadaptasikan dengan lingkungan penelitian, dipuasakan selama

18-24 jam tetapi tetap diberikan air minum, kemudian mencit ditimbang bobotnya dan dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok. Pertama-tama dilakukan pengukuran suhu rektal awal mencit, kemudian semua mencit diinduksi demam menggunakan larutan pepton 5 % sebanyak 0,2ml/20gBB diinduksi secara intravena. Lalu dilakukan pengukuran suhu rektal mencit kembali 1 jam setelah diinduksi demam yang dicatat sebagai suhu demam mencit. Kemudian mencit diberikan perlakuan sesuai masing-masing kelompoknya dan suhu rektal mencit diukur menggunakan thermometer digital setiap interval waktu menit ke-30, 60, 90, 120.

Masing-masing kelompok 5 ekor tikus setiap kelompok diberikan perlakuan sebagai berikut:

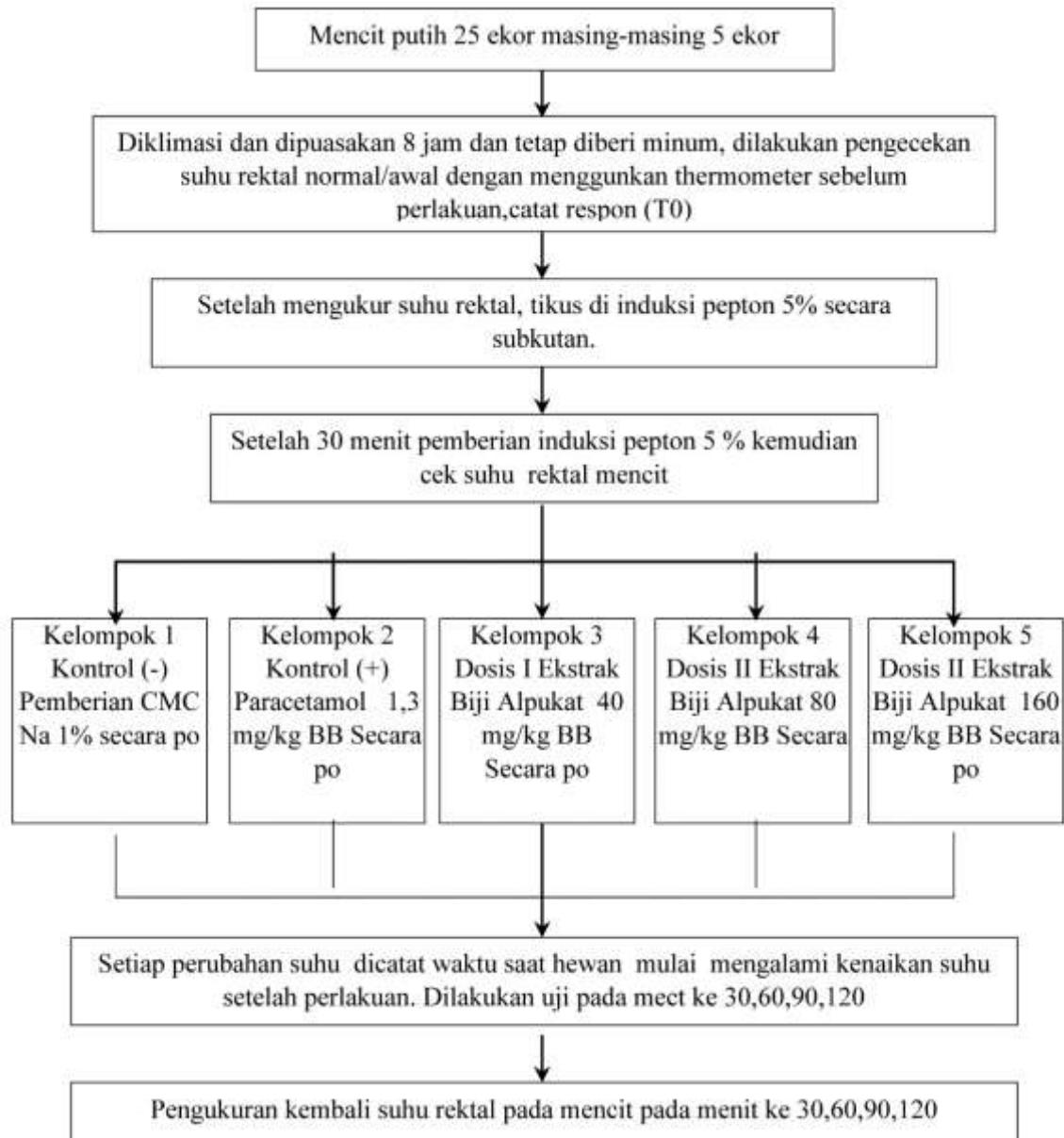
Kelompok I : Kontrol negatif yang diberikan per oral larutan CMC-Na 0,5%

Kelompok II : Kontrol positif yang diberikan per oral larutan paracetamol dengan dosis 0,13 mg/ kg BB mencit.

Kelompok III : Dosis ekstrak etanol biji alpukat 40 mg/ kg BB mencit

Kelompok IV : Dosis ekstrak etanol biji alpukat 80 mg/kg BB mencit

Kelompok V : Dosis ekstrak etanol biji alpukat 160 mg/kg BB mencit



Gambar 3. Skema uji antipiretik ekstrak etanol

Suhu rektal yang didapatkan dari pengukuran suhu menggunakan thermometer digital, kemudian dilakukan perhitungan AUC antipiretik dan persen daya antipiretik dengan rumus sebagai berikut :

Rumus AUC untuk menghitung AUC antipiretik

$$AUC_{tn-1}^{tn} = \frac{Vtn - tn-1}{2} \times (Vtn - Vtn-1)$$

Keterangan :

AUC_{tn-1}^{tn} = luas area dibawah kurva persentase suhu tubuh terhadap waktu kelompok perlakuan

Vtn = suhu tubuh pada t_0 (°C)

Rumus % daya antipiretik

$$\% DAP = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100 \%$$

Keterangan :

% DAP = persen daya antipiretik

AUC_k = AUC suhu tubuh rata-rata terhadap wakru untuk control demam

AUC_p = AUC suhu tubuh rata-rata terhadap waktu unuk kelompok perlakuan tiap individu

9. Analisis Hasil

Data yang telah diperoleh dari melakukan penelitian ini yaitu suhu dari pengukuran suhu tubuh (dalam menit). Menghitung harga rata-rata (Mean) dan Standart Deviasi (SD) Analisis statistik yang pertama digunakan dalam penelitian ini adalah untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak, yaitu dengan menggunakan uji distribusi normal (Sapiro Wilk) dan untuk menguji kehomogenitasan menggunakan uji Levene, jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$), analisis data dilanjutkan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data terdistribusi normal dan uji *Levene* untuk mengetahui homogenitas data. Jika data terdistribusi normal dan homogen maka dapat dilanjutkan dengan uji statistik menggunakan analisis variasi satu arah (*one way anova*) dan uji *Post Hoc Tukey*. Apabila data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney test* sehingga akan diketahui perbedaan antar kelompok .