

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi yaitu seluruh objek yang digunakan pada penelitian. Objek yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun sampare (*Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob.) yang diperoleh dari daerah Kabupaten Biak Numfor, Biak, Papua.

2. Sampel

Sampel yaitu bagian terkecil dari keseluruhan objek pada penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sampare (*Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob.) segar yang belum busuk, berwarna hijau serta tidak rusak maupun terkena hama.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini yaitu ekstrak daun sampare melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% terhadap efek penurunan suhu tubuh dalam variasi dosis yang berbeda.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini yaitu efektivitas perubahan suhu pada setiap kelompok perlakuan.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan.

Variabel utama keempat dalam penelitian ini mencakup peneliti, kondisi laboratorium, dan kondisi fisik hewan uji, termasuk jenis kelamin, berat badan, dan usia.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama meliputi pengidentifikasian semua variabel yang langsung diteliti. Variabel utama yang sudah diidentifikasi dapat dikelompokkan menjadi beberapa jenis variabel.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah agar dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel bebas adalah ekstrak etanol daun sampare yang diberikan pada mencit dalam beberapa variasi dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu efektivitas perubahan suhu tubuh hewan uji setelah dilakukan perlakuan dengan pemberian ekstrak daun sampare pada kelompok uji, kontrol negatif dan kontrol positif.

Variabel terkontrol yaitu variabel yang mempengaruhi variabel tergantung dan perlu dinetralkan atau dikualifikasikan agar hasil yang diperoleh konsisten dan dapat diulang oleh peneliti lain dengan cara yang sesuai. Dalam penelitian ini, variabel terkontrol meliputi peneliti, kondisi laboratorium, metode ekstraksi daun sampare, serta kondisi fisik hewan uji seperti berat badan, jenis kelamin, umur, dan zat penginduksi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sampare adalah daun muda, segar, hijau, utuh dari tanaman sampare yang diperoleh dari daerah Kabupaten Biak Numfor, Papua.

Kedua, serbuk daun sampare yang dihasilkan melalui proses pengeringan daun sampare, kemudian digrinding dan disaring menggunakan ayakan mesh nomor 40.

Ketiga, ekstrak daun sampare diperoleh melalui proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%. Ekstrak tersebut diuapkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental yang diinginkan.

Keempat, pepton adalah bahan yang diberikan secara subkutan untuk menginduksi demam sehingga terjadi kenaikan suhu tubuh pada hewan uji.

Kelima, suhu demam adalah suhu di mana suhu tubuh meningkat di atas normal atau lebih dari 37°C sehingga dilanjutkan dengan dosis efektif.

Keenam, dosis efektif adalah dosis yang dapat memberikan efektivitas antipiretik yang sebanding atau lebih baik dari kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat grinding, bejana maserasi, penangas air, ayakan, batang pengaduk, kertas saring, kain flanel, corong pisah, gelas *beaker*, vacuum *rotary evaporator*, sarung tangan, labu ukur, stamper, mortir, tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu bunsen kaki tiga, *moisture balance*, kurs porselen, oven, kandang mencit, timbangan analitik, spuit, sonde oral, alkohol swab, dan termometer.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi ekstrak daun sampare, etanol 96%, aquades, serbuk Mg, HCl 2N, HCl pekat, FeCl₃ 1%, H₂SO₄ pekat, CH₃COOH pepton, parasetamol, CMC Na dan hewan uji mencit putih jantan.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tanaman yang diperoleh berasal dari wilayah Kabupaten Biak Numfor, Papua. Sampel berupa tanaman sampare (*Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob.) yang masih segar. Determinasi tanaman yang berkaitan dengan morfologi tanaman sampare dilakukan di UPT-Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta pada bulan februari 2023.

2. Pembuatan serbuk simplisia

Pembuatan serbuk simplisia daun sampare dilakukan sortasi basah, dicuci, penirisan dan perajangan. Sampel yang telah dirajang dikeringkan dengan diangin-anginkan atau menggunakan oven pada suhu 50°C hingga kering. Simplisia yang telah kering kemudian dihaluskan dengan digrinding dan diayak menggunakan ayakan no. 40. Serbuk simplisia diuji standarisasi serbuk dengan uji susut pengeringan (Kemenkes RI, 2017).

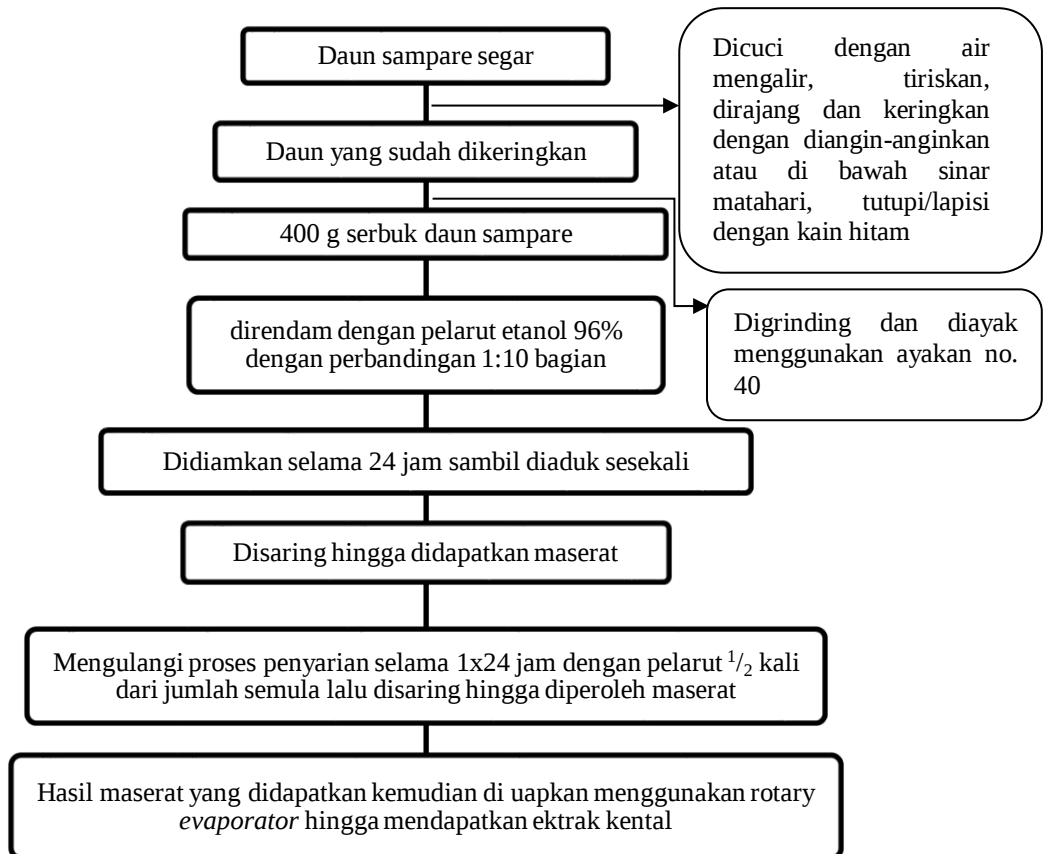
3. Penetapan susut pengeringan serbuk

Susut pengeringan untuk menunjukkan persentase berat yang hilang saat dipanaskan pada suhu 105°C. Kandungan yang hilang seperti air atau senyawa-senyawa kandungan lain yang mudah menguap (Kemenkes RI, 2017). Alat yang digunakan untuk mengukur susut pengeringan adalah *moisture balance*. Alat *moisture balance* sebelum digunakan sebaiknya ditara terlebih dahulu dengan akurasi dan suhu yang sesuai dengan ketentuan. Bahan yang ditimbang sebanyak 2 g serbuk, kemudian dimasukkan ke dalam cawan aluminium dangkal dan ratakan. Alat ditutup dan dikeringkan pada suhu penetapan hingga diperoleh berat konstan secara otomatis. Pengecekan diulang sebanyak tiga kali untuk meminimalisir kesalahan (Depkes RI, 2000).

4. Pembuatan ekstrak etanol

Ekstraksi daun sampare dilakukan dengan ditimbang 400 g serbuk daun sampare dan ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1:10 dimasukkan ke dalam wadah botol maserasi kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan dilakukan sesekali penggojokan. Maserat dipisah dari serbuk simplisia setelah 24 jam dengan cara disaring menggunakan kertas saring hingga didapatkan filtratnya. Ampas dari maserasi pertama dimaserasi kembali dengan etanol 96% perbandingan 1:5 dan diberi perlakuan yang sama seperti

maserasi sebelumnya hingga didapatkan filtrat. Hasil maserasi pertama dan kedua dicampur dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kental yang diinginkan (Kemenkes RI, 2017).



Gambar 3. Pembuatan ekstrak daun sampare.

5. Penetapan kadar air ekstrak etanol

Kadar air ekstrak ditentukan dengan metode gravimetri. Langkah awal, ekstrak ditimbang sebanyak 10 g ke dalam kurs porselen yang sudah ditara. Ekstrak dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 5 jam, kemudian ditimbang. Ekstrak ditimbang setiap jam pengeringan sampai selisih berat antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2000).

6. Uji bebas etanol

Uji kandungan etanol ekstrak daun sampare dilakukan untuk menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sampare bebas etanol. Uji bebas etanol dilakukan dengan cara uji esterifikasi etanol menggunakan reagen H_2O_4 pekat dan CH_3COOH kemudian dipanaskan, jika ekstrak daun sampare tidak berbau ester khas dari etil asetat, maka ekstrak daun sampare bebas dari etanol (Depkes, 2000).

7. Skrining fitokimia ekstrak etanol daun sampare

Skrining fitokimia dilakukan untuk membenarkan penetapan kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak daun sampare. Kandungan kimia yang akan di skrining yaitu senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, fenolik, steroid/triterpenoid, dan saponin yang terdapat dalam ekstrak daun sampare. Sampel untuk skrining fitokimia fenolik, tanin, dan flavonoid diambil sebanyak 1 g masing-masing sampel dipanaskan dengan 100 mL aquades dan dididihkan selama kurang lebih 15 menit, kemudian di saring dan diperoleh filtrat A.

7.1. Fenolik dan tanin. Sebanyak 5 mL filtrat A, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan FeCl_3 1%. Positif fenolik jika hasil menunjukkan terbentuknya warna hijau violet biru hingga hitam. Positif tanin jika hasil menunjukkan terbentuknya larutan berwarna biru kehitaman (tanin galat) atau munculnya warna hijau kehitam-hitaman (tanin katekol) (Farnsworth, 1966).

7.2. Flavonoid. Sebanyak 5 mL filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan serbuk Mg, 2 mL HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol. Tabung reaksi ditutup, dikocok dengan kuat, dan kemudian dibiarkan sampai menjadi dua fase. Positif flavonoid bila hasil menunjukkan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol. Flavon ditunjukkan dengan warna jingga sampai merah, flavanol dengan warna merah sampai dengan merah tua dan

flavanon dengan warna merah tua sampai merah keunguan (magenta) (Farnsworth, 1966).

7.3. Steroid/triterpenoid. Ditimbang 1 g sampel, dimaserasi pada 20 mL n-heksana selama 1 jam, disaring dan diperoleh filtrat diuapkan. Beberapa tetes reagen *Liebermann-Burchard* yang mengandung anhidrida asetat dan asam sulfat pekat (2:1) ditambahkan ke residu. Steroid positif ditandai dengan perubahan warna biru sampai hijau dan positif triterpenoid ditandai dengan warna merah sampai ungu (Farnsworth, 1966).

7.4. Alkaloid. Ditimbang 0,5 g sampel, ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL aquades, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, biarkan dingin, disaring dan dibagi menjadi dua tabung 5 mL. Ditambahkan 2 tetes *Mayer* ke tabung pertama dan 2 tetes *Bouchardat* ke tabung kedua. Adanya alkaloid ditandai terbentuknya endapan putih keruh. Terbentuk alkaloid jika terdapat endapan putih atau kuning yang larut dalam metanol pada *mayer* dan endapan coklat hingga hitam pada *bouchardat* (Depkes RI, 1980).

7.5. Saponin. Sebanyak 10 mL ekstrak air dikocok vertikal selama sepuluh detik dan diamkan selama sepuluh menit. Terbentuk busa dengan tinggi buih 1 - 10 cm, ditambahkan beberapa tetes asam klorida 2N. Saponin positif jika buih tersebut tetap stabil atau tidak hilang (Farnsworth, 1966).

8. Pembuatan larutan dan penetapan dosis

8.1. Pembuatan larutan pepton 10%. Ditimbang pepton sebanyak 2,5 g, dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL. Dilarutkan dalam 25 mL aquades diaduk ad homogen, kemudian dicukupkan hingga 25 mL. Pemberian dosis agar mencit menjadi demam adalah 0,42 mL diberikan secara subkutan. Perhitungan di lampiran 13.

8.2. Larutan CMC Na 0,5%. Ditimbang sebanyak 0,5 g, lalu dimasukkan ke dalam mortir, ditambahkan aquades panas sedikit demi sedikit digerus hingga homogen ad 100 mL. Suspensi ini digunakan sebagai kontrol negatif dan zat pensuspensi. Perhitungan di lampiran 13.

8.3. Penetapan dosis parasetamol. Kontrol positif yang digunakan adalah parasetamol sebagai perbandingan uji sehingga harus memberikan penurunan respon suhu pada mencit. Dosis parasetamol pada manusia normal yaitu 500 mg/70 kg BB manusia. Untuk mendapatkan dosis yang sesuai, maka dosis parasetamol perlu dikonversi ke dosis mencit. Perhitungan di lampiran 13.

8.4. Pembuatan suspensi parasetamol. Ditimbang 0,1 g parasetamol, dimasukkan ke dalam mortir kemudian disuspensikan dengan 1 mL CMC Na dan dilakukan secara peroral. Perhitungan di lampiran no. 13.

8.5. Pembuatan suspensi ekstrak etanol daun sampare. Pemberian dosis ke mencit pada penelitian ini dibuat dalam tiga variasi perbandingan yaitu dosis I (200 mg/kg BB mencit), dosis II (400 mg/kg BB mencit), dan (800 mg/kg BB mencit). Larutan stok 2%, ditimbang 2g ekstrak daun sampare ditambahkan suspensi CMC Na 0,5% ke dalam labu ukur 100 mL dan diisi sampai tanda batas. Volume pemberian dihitung menurut berat badan mencit dan pemberiannya secara per oral. Perhitungan di lampiran no. 13.

9. Penyiapan hewan uji

Hewan uji mencit sebanyak 31 ekor yang berumur antara 6 - 8 minggu yang memiliki berat badan antara 20 – 30 g. Mencit yang sesuai kemudian akan ditimbang dan diadaptasikan di lingkungan tempat penelitian selama 7 hari dengan tujuan untuk menyesuaikan

hewan uji terhadap lingkungan dan perlakuan baru. Mencit dipuasakan 12 - 18 jam dengan pemberian air yang cukup sebelum dilakukan uji.

10. Uji pendahuluan atau orientasi dosis

Sebelum dilakukan perlakuan terhadap hewan uji, dilakukan orientasi terlebih dahulu, untuk mengetahui interval waktu setelah pemberian pepton dengan kenaikan suhu tubuh mencit atau sebelum waktu puncak yaitu pada setiap 15 menit selama 1 jam. Orientasi ini bertujuan untuk menentukan waktu pemberian sampel yang tepat setelah penginduksian pepton agar diketahui bahwa penurunan suhu adalah efek dari sampel bukan dari penurunan efek pepton selain itu, untuk melihat apakah dosis yang akan diberikan kepada mencit sudah memiliki efektivitas antipiretik. Orientasi dilakukan terhadap 6 mencit yang dibagi menjadi 2 kelompok dosis pepton.

11. Uji efektivitas antipiretik

Sehari sebelum dilakukan percobaan, hewan dipuasakan 12-18 jam sebelum perlakuan, tetapi tetap beri minum. Hewan yang telah dipuasakan kemudian ditimbang dan dibagi menjadi 5 kelompok uji, tiap kelompok uji terdapat 5 mencit. Masing-masing kelompok tersebut yaitu:

Kelompok I adalah kelompok kontrol negatif yang diberikan larutan CMC Na 0,5%.

Kelompok II adalah kelompok kontrol positif yang diberikan parasetamol.

Kelompok III adalah percobaan ekstrak daun sampare dengan dosis 200 mg/kg BB mencit.

Kelompok IV adalah percobaan ekstrak daun sampare dengan dosis 400 mg/kg BB mencit.

Kelompok V adalah percobaan ekstrak daun sampare dengan dosis 800 mg kg BB mencit

Pengujian efektivitas antipiretik dimulai dengan diukur suhu normal masing-masing mencit menggunakan alat termometer digital, lalu diinduksi pepton dan 15 menit sesudah diinduksi, dicek suhu, jika kenaikan suhu sudah mencapai $0,6^{\circ}\text{C}$ dari suhu awal, artinya mencit sudah dikatakan demam dan dapat dilakukan perlakuan uji. Diukur suhu tubuh mencit setelah 15 menit dan diulangi kembali setiap 15 menit sampai menit ke-180.

Daya antipiretik (DAP) obat ditunjukkan oleh kemampuannya untuk menghambat peningkatan suhu tubuh yang diinduksi pepton pada mencit. Menghitung AUC (*Area Under Curve*) dan DAP (Daya Antipiretik) dengan rumus berikut (Mardianingrum, 2019) :

$$AUC_{n-1}^n = \frac{V_{t_{n-1}} - V_{t_n}}{2} (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan:

AUC_{n-1}^n = Luas daerah di bawah kurva persentase suhu tubuh terhadap waktu kelompok perlakuan

V_{t_n} = Suhu tubuh pada t_n ($^{\circ}\text{C}$)

$V_{t_{n-1}}$ = Suhu tubuh pada t_{n-1} ($^{\circ}\text{C}$)

Rumus untuk menghitung Daya Antipiretik:

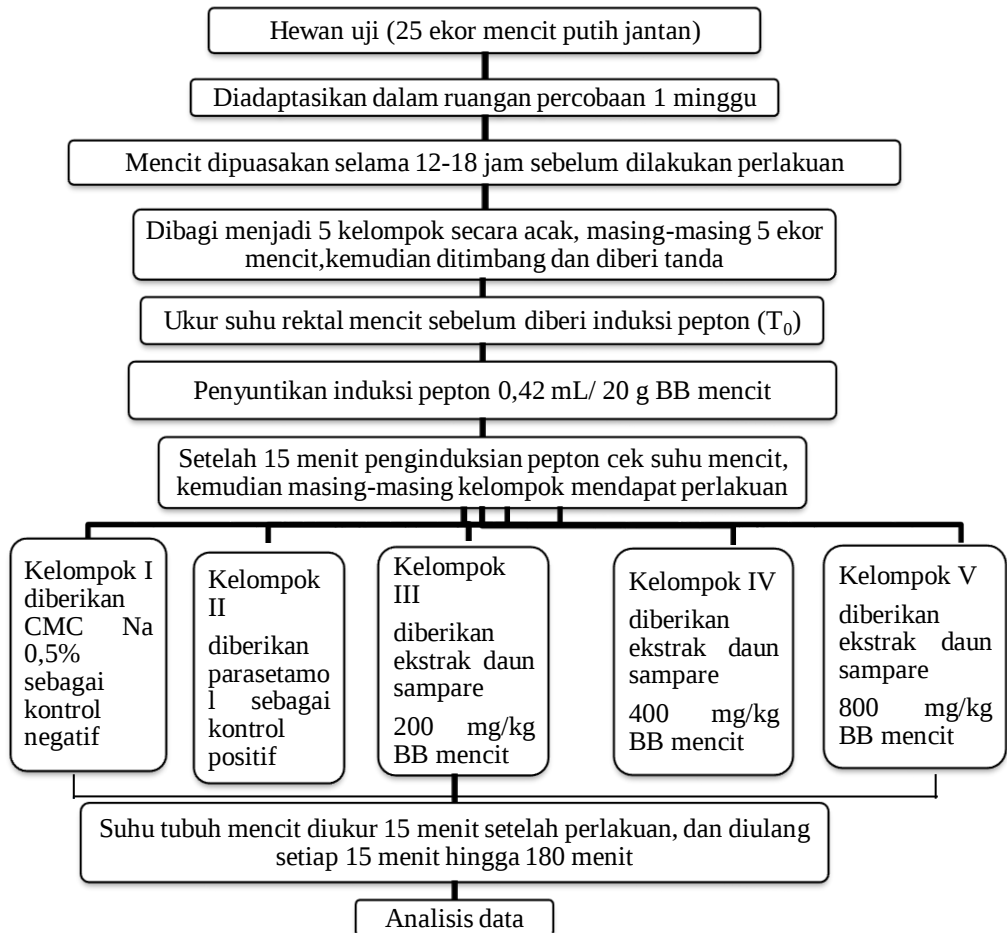
$$\%DAP = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan:

$\%DAP$ = Persen daya antipiretik

AUC_k = AUC suhu tubuh rata-rata terhadap waktu untuk kontrol negatif

AUC_p = AUC suhu tubuh rata-rata terhadap waktu untuk kontrol perlakuan tiap individu



Gambar 4. Skema uji antipiretik pada mencit.

E. Analisis Data

Hasil uji efektivitas antipiretik ekstrak etanol daun sampare yang diperoleh dianalisis dengan program (SPSS) *Statistical Product and Service Solution* versi 26, untuk membuktikan potensi ekstrak etanol daun sampare sebagai antipiretik terhadap mencit putih jantan, data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis dengan menggunakan uji normalitas apakah data terdistribusi normal atau tidak. Pengujian data menggunakan uji *Shapiro wilk*. Hasil data yang terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji *Repeated measures* parametrik ANOVA, namun jika data tidak terdistribusi normal, maka digunakan uji nonparametrik *Friedman*.