

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilakukan pada bulan Februari – Mei 2024 di Laboratorium Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Cenderawasih.

3.2 Alat, Bahan, dan Hewan Uji

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu timbangan, toples, cawan porselin, thermometer suhu, waterbath, gelas ukur, gelas beaker, blender, batang pengaduk, pipet tetes, sudip, disposable syringe 1 cc, labu ukur, ayakan mesh 60, sonde oral, kertas saring, corong kaca, gelas ukur, kandang hewan.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu aquadest, daun Konde Mambruk (*Clerodendrum japonicum* (Thunb.) Sweet)), etanol 96 %, Na CMC 1%, mencit jantan (*Mus musculus*), pepton 10%, sirup paracetamol 250 mg/5ml, makanan hewan uji (pelet), aluminium foil, mayer, dragendorff, wagner, HCl, Mg, amil alkohol, FeCl₃, CHCl₃, asetat anhidrat, H₂SO₄.

3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) galur Swiss webster.

3.3 Prosedur kerja

3.3.1 Pembuatan Etika Penelitian

Etika penelitian merupakan aspek penelitian yang penting dan aturan yang dapat mendukung nilai-nilai privasi yang tepat. Penelitian yang menggunakan hewan uji harus memastikan kelayakan dari hewan uji tersebut. Saat melakukan percobaan pada hewan uji, mereka harus mengikuti konsep reproduksi 3R, yaitu Reduction, Replacement, dan Refinement ataupun azas 5 F (*Freedom from hunger and thirst* (bebas dari rasa lapar dan haus), *freedom from pain* (bebas dari rasa nyeri), *freedom from distress and feeling discomfort* (bebas dari stress dan rasa

tidak nyaman), *freedom from injury and disease* (bebas dari luka dan penyakit), *freedom from to express their normal behaviour* (bebas berperilaku normal untuk hewan)) dari aspek kesehatan dan kesejahteraan hewan uji (Mutiarahmi *et al.*, 2021). Dalam penelitian hewan uji yang digunakan sehat dan tidak sakit, hewan uji bebas dari rasa lapar dan haus, hewan uji h bebas dari rasa cemas dan stress kronis, dan harus aktif. Hewan uji harus difasilitasi dan mendapatkan sarana dan fasilitas yang layak sesuai ketentuan.

3.3.2 Pembuatan Simplisia

Daun Konde Mambruk (*Clerodendrum japonicum* (Thunb.) Sweet) yang di peroleh dari Tablanusu, Depapre, Kabupaten Jayapura. Daun hijau yang diperoleh disortasi basa menggunakan air yang mengalir. Setelah daun dibersihkan di keringkan dengan cara diangin-anginkan hingga setengah kering, lalu dioven pada suhu 50°C hingga daun benar-benar kering. Daun yang sudah kering diblender hingga halus seperti serbuk kemudian diayak menggunakan ayakan mesh no. 60 dan di simpan pada wadah tertutup.

3.3.3 Pembuatan Ekstrak Daun Konde Mambruk

Konde mambruk yang sudah dihaluskan ditimbang sebanyak 500 gram direndam menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1500 ml (1:3). Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi selama 3 hari dengan pergantian pelarut selama 1x24 jam. Hasil dari ekstraksi difiltrasi kemudian dipisahkan filtrat dan maserat menggunakan corong dan kertas saring. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *Waterbath* dengan suhu 60°C sehingga didapatkan ekstrak yang kental. Kemudian hasil ekstrak kental yang diperoleh dihitung rendemennya menggunakan rumus :

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

3.3.4 Uji Bebas Etanol

Ekstrak daun konde mambruk diuji bebas etanol dengan cara ekstrak ditambahkan 2 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 ml larutan K₂Cr₂O₇. Kandungan etanol yang

terdapat dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Harbone, 1987 dalam Adiningsih et al., 2021).

3.3.5 Skrining Fitokimia

1. Pemeriksaan alkaloid

Filtrat dibagi menjadi 3 tabung reaksi. Filtrat ditambahkan ke tabung pertama sebagai kontrol. 3 tetes reagen Dragendroff ditambahkan ke tabung kedua dan 3 tetes reagen Mayer ke tabung ketiga. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan terbentuknya endapan putih pada tabung ketiga disebabkan adanya alkaloid.

2. Pemeriksaan flavonoid

Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian 0,1 g serbuk Mg dan 1 ml HCl 2N – etanol (1:1) ditambahkan. Larutan dikocok dengan 2 ml amil alkohol. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya senyawa berwarna jingga, kuning atau merah yang menarik lapisan amil alkohol.

3. Pemeriksaan saponin

Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok secara vertikal selama 10 detik kemudian didiamkan selama 10 detik. Terbentuknya buih setinggi 1-10 cm yang stabil selama minimal 10 menit dan penambahan 1 tetes HCl 2N tidak menghilangkan buih menunjukkan adanya saponin.

4. Pemeriksaan tannin

Sebanyak 1 ml filtrat direaksikan dengan larutan FeCl_3 10%. Jika warnanya menjadi biru tua atau hitam kehijauan, ini menandakan adanya tanin.

5. Pemeriksaan triterpenoid dan steroid

Sebanyak 2 ml filtrat diuapkan dalam cawan. Residu dilarutkan dalam 0,5 mL CHCl_3 dan kemudian tambahkan 5 mL asam asetat anhidrat. Kemudian 2 mL H_2SO_4 pekat ditambahkan melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin coklat atau ungu di tepi larutan menunjukkan adanya

triterpenoid dan perubahan warna menjadi hijau jika terdapat steroid (Depkes RI, 1995).

3.3.6 Pembuatan larutan Na-CMC 1% b/v

Na-CMC ditimbang sebanyak 1 g kemudian dimasukkan sedikit demi sedikit kedalam aquadest panas sekitar 50 ml sambil diaduk sampai terbentuk larutan koloidal dan tambahkan lagi dengan aquadest hingga 100 mL.

3.3.7 Pembuatan Pepton 10%

Larutan pepton dibuat dengan menimbang 10 g pepton kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest. Volume penyuntikan pepton 1% dari berat badan, jadi jika berat 20 g, maka volume penyuntikan adalah 20 g BB mencit dibagi 100 mL yaitu sebesar 0,2 mL/20 g BB.

3.3.8 Pemilihan dan penyiapan hewan uji

Pada percobaan ini menggunakan hewan uji berupa mencit (*Mus musculus*) jantan yang sehat yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 g. Jumlah mencit yang digunakan yaitu 30 ekor. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan., yang terdiri dari 5 ekor mencit yang dipilih secara acak. Mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu dimana bertujuan untuk mengadaptasikan hewan uji dengan suasana laboratorium dan untuk menghilangkan stres uji.

3.3.9 Pengujian dan penentuan efek antipiretik

Hewan yang akan diuji ditimbang berat badannya dan dikelompokkan menjadi 6 kelompok. Kelompok pertama dipilih sebagai kontrol normal, kelompok 2 sebagai kontrol positif, kelompok 3 sebagai kontrol negatif sedangkan untuk kelompok 4 sampai 6 diberikan ekstrak dari konde mambruk dengan dosis yang berbeda-beda secara oral. Penggunaan empiris pada masyarakat menggunakan 3 lembar daun konde mambruk. sehingga membutuhkan jumlah ekstrak kental yang didapatkan untuk di konversikan ke 3 lembar daun tersebut.

Pada tahap pertama suhu rektal mencit diukur terlebih dahulu, lalu diinduksikan dengan pepton 10% secara subkutan. Setelah 30 menit diinduksikan, suhu rectal dari mencit diukur kembali menggunakan alat yaitu termometer digital. Hewan uji yang telah terbagi menjadi 6 kelompok yaitu tahap pertama suhu rektal

mencit diukur terlebih dahulu, lalu diinduksikan dengan pepton 10% secara subkutan. Setelah 30 menit diinduksikan, suhu rectal dari mencit diukur kembali menggunakan alat yaitu termometer digital. Hewan uji yang telah terbagi menjadi 6 kelompok yaitu Suhu yang telah diperoleh kemudian digunakan untuk menghitung persen daya antipiretik dengan rumus :

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

Keterangan :

AUC_{tn-1}^{tn} = Luas daerah dibawah 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} ($^{\circ}\text{C}$)

$$\text{DAP} = \frac{AUC_K - AUC_P}{AUC_K} \times 100 \%$$

Keterangan :

AUC_K = AUC suhu tubuh rata-rata terhadap waktu untuk control negatif

AUC_P = AUC suhu tubuh rata-rata terhadap waktu untuk kelompok perlakuan tiap individu

DAP = Daya Antipiretik

3.4 Teknik Pengelolaan dan Analisis Data

Pengumpulan data dilakukan dengan teknik pengamatan dan pengukuran pada suhu rektal hewan uji sebelum dan sesudah dilakukannya. Hasil data yang nanti diperoleh akan dianalisis dengan menggunakan metode statistika. Data dianalisis dengan uji *one-way anova* dan dilanjutkan dengan uji Duncan untuk melihat adanya perbedaan yang jelas pada tiap perlakuan kelompok. Taraf kepercayaan yang digunakan yaitu 95% atau α 0.05.