

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kacang tujuh jurai yang diperoleh dari desa Gonggang RT 28 RW 03 Poncol Magetan, Jawa Timur.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kacang dari Magetan, Jawa Timur yang dipilih secara acak dengan kondisi masih segar dan tidak busuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini merupakan dosis yang akan digunakan sebagai aktivitas antipiretik yang dimiliki ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi panas dengan vaksin DTP-HB-Hib setelah 6 jam penginduksian suhu tubuh diukur lalu dibagi menjadi 5 kelompok, kelompok kontrol positif (paracetamol dosis 45 mg/kg BB), kelompok kontrol negatif (CMC Na), dan ketiga kelompok berikutnya yaitu kelompok perlakuan (dosis 28,35 mg/kgBB, dosis 56,7 mg/kgBB, dan dosis 113,4 mg/kgBB). Untuk melihat efek dari masing-masing kelompok perlakuan, dilakukan pengukuran suhu tubuh melalui rektal tiap 30 menit sampai menit ke- 120 dengan menggunakan thermometer digital.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini yaitu ekstrak daun kacang tujuh jurai dengan variasi dosis.

Variabel tergantung merupakan variabel akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu efek antipiretik ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai akibat dari variabel utama.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, lingkungan hidup, jenis kelamin, galur, kondisi percobaan, laboratorium, dan peneliti.

3. Definisi operasional variabel utama

Demam adalah suatu kondisi di mana suhu tubuh naik di atas suhu normal atau lebih 37°C yang bisa menjadi manifestasi klinik awal dari suatu infeksi.

Daun kacang tujuh jurai adalah daun kacang tujuh jurai yang diperoleh dari Magetan, Jawa Timur.

Serbuk daun kacang tujuh jurai adalah daun kacang tujuh jurai yang diperoleh kemudian dicuci dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan sisa kotoran yang masih menempel, kemudian dirajang, lalu dikeringkan di dalam oven dengan suhu 53°C. daun kacang tujuh jurai yang telah kering kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan No.40.

Ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai adalah ekstrak kental yang didapatkan dari penyarian serbuk daun kacang tujuh jurai dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% yang kemudian diuapkan *pada rotary evaporator* hingga ekstrak menjadi kental.

Vaksin DTP-HB-Hib adalah vaksin yang mempunyai reaksi mampu menimbulkan demam sehingga pada penelitian ini digunakan sebagai penginduksi demam.

Aktivitas antipiretik adalah kemampuan ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai sebagai antipiretik.

Dosis paling efektif adalah dosis yang khasiat nya sebanding dengan kontrol positif yaitu paracetamol dan memiliki onset paling bagus.

Kadar suhu adalah suatu kadar yang diperoleh dari hasil pengukuran suhu tubuh melalui rektal dengan thermometer digital.

C. Bahan, Alat, dan Hewan Uji

1. Bahan.

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kacang tujuh jurai yang diperoleh dari Gonggang RT 28 RW 03 Poncol Magetan, Jawa Timur.

1.2. Bahan kimia. Pelarut yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai adalah etanol 70%. Bahan yang digunakan untuk kontrol positif yang digunakan adalah paracetamol, kontrol negatif yang digunakan adalah Na CMC dan penginduksi panas yang digunakan adalah vaksin DTP-HB-Hib .

2. Alat

Alat untuk membuat simplisia seperti pisau dan blender. Alat untuk maserasi antara lain, gelas ukur, corong kaca, gelas beker, kain flanel, dan botol berwarna gelap, timbangan tikus, jarum suntik, neraca analitik, dan alat-alat gelas. Alat untuk uji antipiretik ekstrak daun kacang tujuh jurai yaitu timbangan, neraca analitik, spuit injeksi, beaker glass, sarung tangan, stopwatch, dan thermometer digital.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar dengan jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 150-200 g yang didapatkan dari pengelola Abimanyu Farm.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil agar menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Dalam penelitian ini menggunakan sampel tanaman daun kacang tujuh jurai yang akan dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengumpulan bahan

Daun kacang tujuh jurai yang segar dari desa Gonggang RT 28 RW 03 Poncol Magetan, Jawa Timur. Dengan ketinggian tanaman tumbuh 800 meter dari permukaan laut.

3. Pengeringan dan pembuatan serbuk daun kacang tujuh jurai

Pengeringan daun kacang tujuh jurai dilakukan di atas loyang yang terbuat dari alumunium dan dikeringkan di dalam oven dengan suhu 53°C. Daun kacang tujuh jurai sudah kering diblender dan diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh derajat kehalusan yang sesuai. Hasil serbuknya disimpan di dalam wadah kering dan tertutup rapat agar tidak terkena cemaran.

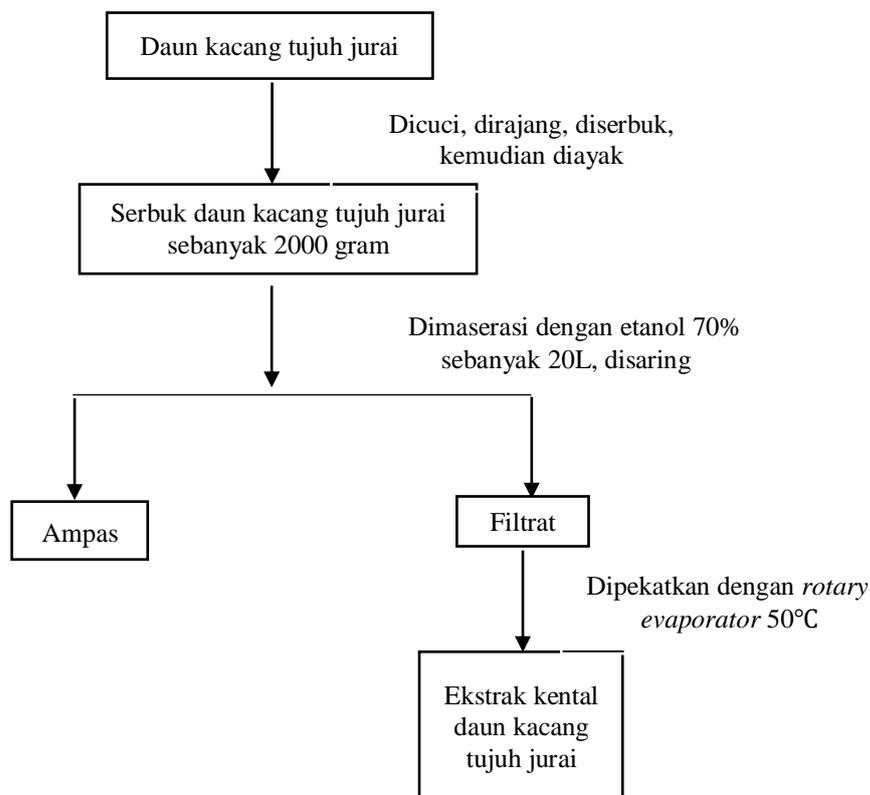
4. Pembuatan serbuk daun kacang tujuh jurai

Pengeringan daun kacang tujuh jurai dilakukan di atas loyang yang terbuat dari alumunium dan dikeringkan di dalam oven dengan suhu 53°C. Daun kacang tujuh jurai sudah kering diblender dan diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh derajat kehalusan yang sesuai. Hasil serbuknya disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat agar tidak terkena cemaran.

5. Pembuatan ekstrak daun kacang tujuh jurai

Pembuatan ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai dibuat dengan menggunakan metode maserasi. Dengan menimbang serbuk daun kacang tujuh jurai sebanyak \pm 500 gram. Masukkan serbuk daun kacang tujuh jurai kedalam botol maserasi dan tambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Ekstraksi dilakukan pada botol kaca gelap yang kedap cahaya. Rendam selama 6 jam pertama sampai sekali kali dikocok atau diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Kumpulkan hasil maserat, kemudian uapkan dengan menggunakan vakum atau mesin penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan (DepKes 2008).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapatkan}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$



Gambar 5. Cara Pembuatan ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai

6. Penetapan kadar air serbuk

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*, serbuk daun kacang tujuh jurai ditimbang sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat pada alat *Sterling-Bidwell*, kemudian dimasukkan ± 100 ml toluene jenuh air ke dalam labu, pasang rangkaian alat. Toluene jenuh air dimasukkan ke dalam tabung penerima melalui pendingin hingga leher alat penampung. Labu dipanaskan selama 15 menit. Setelah toluene mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan ± 2 tetes tiap detik, sampai sebagian air tersuling, lalu naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes per detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluene jenuh air, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambung pada sebuah kawat dan telah dibasahi dengan toluene jenuh air. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima pada suhu ruang. Jika ada tetes yang melekat maka gosok tabung pendingin dengan menggunakan karet yang telah diikat pada kawat dan dibasahi dengan toluene jenuh air turun. Baca volume air setelah air

dan toluene terpisah dengan sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b dan kadarnya tidak lebih dari 10% (DepKes 2008).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Bobot serbuk awal}} \times 100\%$$

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kacang tujuh jurai

7.1 Uji flavonoid. Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan cara melarutkan 5 ml ekstrak daun kacang tujuh jurai ke dalam tabung reaksi dan tambahkan sebanyak 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCL pekat, 2 ml amil alkohol, kemudian dikocok lalu biarkan sampai memisah. Jika terjadi perubahan warna merah atau jingga pada lapisan amil maka alkohol maka positif flavonoid (Ciulei 1984).

7.2 Uji saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan cara melarutkan 0,05 mg sampel daun kacang tujuh jurai ke dalam 20 ml air, kemudian panaskan dan saring, masukkan 1 tetes HCl 2 N lalu kocok kuat-kuat selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 detik (Ciulei 1984).

7.3 Uji polifenol. Ekstrak daun kacang tujuh jurai diambil 1ml, dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Jika larutan menghasilkan warna hijau kebiruan, maka ekstrak tersebut mengandung polifenolat (Halimah 2010).

8. Pembuatan larutan dan penetapan dosis

8.1 Larutan CMC Na 0,5 %. Ditimbang 500 mg dalam 100 ml . CMC Na lalu dimasukkan kedalam cawan penguap tambahkan air suling secukupnya dan panaskan hingga mengembang. Kemudian pindahkan ke dalam mortir lalu gerus sambil menambahkan air suling sedikit demi sedikit hingga 100 ml dan kemudian aduk sampai homogen (Andriyani 2017).

8.2 Pembuatan suspensi paracetamol 1%. Ditimbang 1 gram paracetamol masukkan sedikit demi sedikit ke dalam mortir yang berisi 100 ml CMC Na, lalu gerus sampai homogen (Andriyani 2017).

8.3 Pembuatan sediaan uji. Ditimbang 3 gram ekstrak daun kacang tujuh jurai dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam mortir yang berisi 100 ml CMC Na, lalu aduk sampai homogen (Andriyani 2017).

8.4 Penetapan dosis paracetamol. Dosis yang digunakan pada manusia normal yaitu 500 mg/70 kg BB manusia, kemudian dikonversikan pada tikus dan diperoleh dosis 45 mg/kg BB. Hasil konversi dosis paracetamol akan digunakan sebagai kontrol positif (Andriyani 2017).

9. Prosedur pengujian efek antipiretik

Kesatu, sebelum perlakuan hewan uji di adaptasi terlebih dahulu di dalam ruangan percobaan selama 1 minggu, kemudian setelah di adaptasi hewan uji di puasakan selama \pm 8 jam dan di bagi menjadi 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus putih jantan.

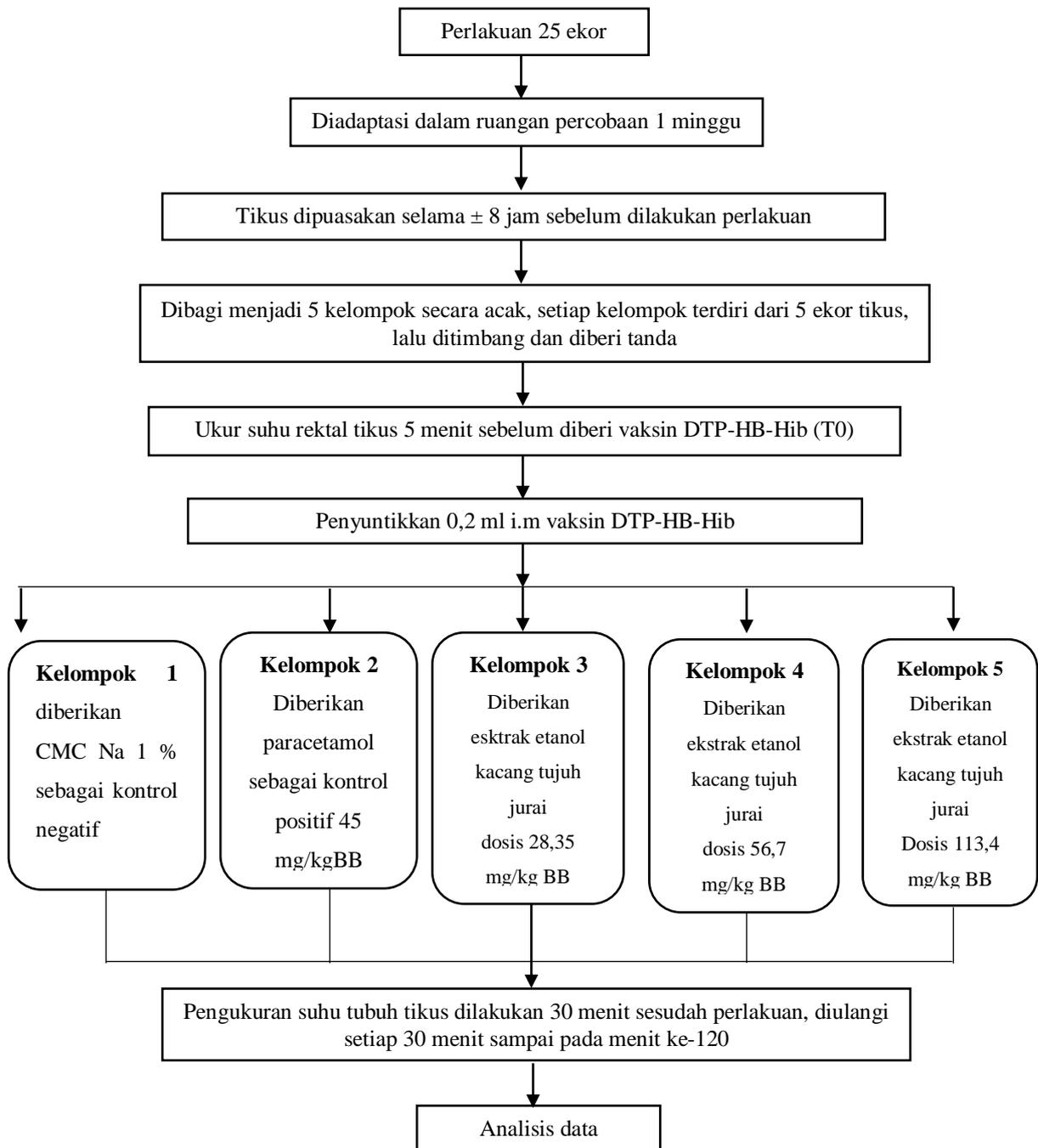
Kedua, ukur suhu rektal tikus terlebih dahulu untuk mengatasi suhu normal baru, kemudian baru diinduksi vaksin DTP-HB-Hib 0,2 ml/kg BB melalui intramuscular.

Ketiga, ukur kembali suhu pada rektal hewan uji setelah 6 jam penginduksian vaksin DTP-HB-Hib.

Keempat, setelah 6 jam penginduksian vaksin DTP-HB-Hib, masing-masing kelompok mendapatkan perlakuan yaitu:

- a. Kelompok 1 diberikan CMC Na 1 % sebagai kontrol negatif
- b. Kelompok 2 diberikan paracetamol 45 mg/kg BB
- c. Kelompok 3 diberikan ekstrak daun kacang tujuh jurai 28,35 mg/kg BB
- d. Kelompok 4 diberikan ekstrak daun kacang tujuh jurai 56,7 mg/kg BB
- e. Kelompok 5 diberikan ekstrak daun kacang tujuh jurai 113,4 mg/kg BB

Kelima, Untuk melihat efek dari masing-masing kelompok perlakuan, dilakukan pengukuran suhu tubuh melalui rektal tiap 30 menit sampai ke menit 120 dengan menggunakan termometer digital. Skema prosedur pengujian antipiretik dapat dilihat pada gambar.



Gambar 6. Skema prosedur pengujian antipiretik

Daya antipiretik (DAP) obat ditunjukkan oleh kemampuan dalam menghambat peningkatan suhu tubuh pada tikus yang dihasilkan akibat induksi vaksin DT-HB-Hib. Hitung AUC (*Area Under Curve*) dan DAP (Daya Antipiretik).

Rumus untuk menghitung data AUC dan daya antipiretik :

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

Keterangan :

AUC_{n-1}^n : luas daerah dibawah kurva persentase suhu tubuh terhadap waktu kelompok perlakuan

$V_{t_{n-1}}$: suhu tubuh pada t_{n-1} (°C)

V_{t_n} : suhu tubuh pada t_n (°C)

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

Keterangan :

AUC_k : AUC suhu rata-rata terhadap waktu untuk kontrol negative

AUC_p : AUC suhu tubuh rata-rata terhadap waktu untuk kelompok perlakuan tiap individu

DAP : Daya Antipiretik

E. Analisis Data

Analisa data yang digunakan untuk pengolahan data diawali dengan uji normalitas menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, jika hasil normal maka dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA) kemudian uji homogenitas (uji *levene*). Uji *levene* digunakan untuk mengetahui homogenitas, jika homogen dilanjutkan dengan uji *Tukey Post Hot Test*, sedangkan jika tidak homogen dilakukan dengan uji *Games-Howell*. Sedangkan jika hasil analisa data uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* tidak normal maka dilanjutkan uji Nonparametrik (*Kruskal Wallis*) dan dilakukan uji *Man Whitney*.