

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi Dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan seluruh bagian di sarana penelitian. Populasi dalam penelitian ini yaitu rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*).

2. Sampel

Sampel merupakan proporsi keseluruhan dalam penelitian yang digunakan. Sampel pada penelitian ini yaitu rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*) yang sudah tua dan masih segar didapatkan dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah yang didapatkan pada bulan September 2023.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel umum yang diidentifikasi dalam penelitian ini yakni aktivitas antipiretik ekstrak n-heksan rimpang jahe merah.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel umum diklasifikasikan jadi tiga diantaranya variabel bebas, variabel terikat, dan variabel tergantung.

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu dosis ekstrak n-heksan rimpang jahe merah.

Variabel terkontrol pada penelitian ini yakni hewan uji, alat yang digunakan, kualitas bahan, dan waktu pengamatan.

Variabel tergantung pada penelitian ini yakni aktivitas antipiretik ekstrak n-heksan rimpang jahe merah.

3. Definisi operasional variabel utama

Serbuk rimpang jahe merah yaitu serbuk yang terbuat dari rimpang jahe merah yang telah dihaluskan memakai mesin penggiling serta diayak menggunakan pengayak mesh 40 yang artinya terdapat 40 lubang dalam inci.

Efek antipiretik yaitu efek yang ditimbulkan pada mencit putih jantan yang ditandai dengan penurunan suhu rektal, dilakukan perhitungan nilai rerata yang telah diukur setiap 30 menit sekali hingga pada pengukuran menit ke- 120 pada alat termometer.

Demam adalah suatu respon perlindungan tubuh terhadap zat asing dengan meningkatkan suhu tubuh di atas suhu normal.

Pepton adalah turunan protein yang dapat mengganggu pusat pengaturan suhu tubuh sehingga dapat menimbulkan terjadinya demam.

Dosis efektif antipiretik adalah dosis paling kecil yang memberikan efek sebagai antipiretik

Ekstrak n-heksan adalah ekstrak yang didapat dengan menggunakan pelarut n-heksan

C. Bahan, Alat, dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan pada penelitian ini diantaranya serbuk rimpang jahe merah, parasetamol (kontrol positif), larutan Na CMC 0,5% (kontrol negatif), pepton 10%, n-heksan, dan aquades.

2. Alat

Timbangan, mesin penggiling, ayakan no.40, rangkaian alat soxhlet, jarr, *Beaker glass*, *water bath*, Erlenmeyer, batang pengaduk, *moisture analyzer*, *Sterling-bidwell*, *thermometer digital*, spuit 1 mL, sonde oral, tabung reaksi, cawan porselin, pipet tetes, lempeng KLT, pipa kapiler, spritus, dan kandang mencit.

3. Hewan uji

Hewan uji menggunakan mencit putih berjenis kelamin jantan, galur wistar.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan *Ethical Clearance*

Ethical Clearance (Klirens etik) merupakan keterangan tertulis yang digunakan untuk mengukur akseptabilitas atau keberterimaan etik rangkaian penelitian yang diterbitkan oleh Komite Etik Penelitian untuk riset yang berkaitan dengan makhluk hidup.

2. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang sehat dengan umur 2 sampai 3 bulan dan mempunyai bobot 20-30 g sejumlah 25 ekor terbagi dalam 5 kelompok berbeda, di tiap kelompok terdapat 5 ekor mencit.

3. Hasil identifikasi tanaman

Tujuan determinasi tanaman yaitu untuk membuktikan bahwa sampel yang dipakai sesuai dengan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis dari tanaman tersebut setra menghindari adanya kesalahan dalam pengumpulan bahan. Determinasi tanaman dilakukan di Balai

Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

4. Persiapan bahan

Rimpang jahe merah yang sudah tua dan masih segar yang dipilih sebagai bahan rimpang jahe yang didapatkan di daerah Tawangmangu, Karanganyar. Rimpang jahe yang sudah didapat kemudian dilakukan penyortiran dengan membersihkan kotoran yang menempel pada rimpang jahe, bahan yang busuk, dan bahan-bahan yang tidak sesuai kemudian dilakukan pencucian lanjutan dengan proses perajangan lalu dikeringkan di bawah sinar matahari dengan di tutupi kain flanel berwarna hitam.

5. Pembuatan serbuk

Rimpang jahe merah yang telah dikeringkan kemudian digiling menggunakan mesin penggiling. Setelah menjadi serbuk kasar, dilakukan pengayakan dengan menggunakan ayakan *mesh* no.40. Serbuk yang dihasilkan disimpan dalam wadah tertutup rapat dan kering.

6. Penetapan susut pengeringan serbuk rimpang jahe merah

Penetapan susut pengeringan memakai *moisture analyzer*. Serbuk rimpang jahe merah ditimbang sebanyak 2 g kemudian serbuk dimasukkan ke dalam *moisture analyzer* pada suhu 150°C. Penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 replikasi. Syarat susut pengeringan untuk serbuk rimpang jahe merah yaitu tidak >10% (Kemenkes RI, 2017).

7. Penetapan kadar air serbuk

Penetapan kadar air serbuk menggunakan alat *Sterling-Bidwell* dan pereaksi yang digunakan ialah toluen yang sudah dijenuhkan dengan air. Prosedur penetapan kadar air serbuk yaitu dengan cara simplisia sebanyak 20 g dimasukkan kedalam labu dan ditambahkan toluen jenuh sebanyak 200 ml. Labu dipanaskan selama 15 menit, ketika toluen dan air sudah terpisah dapat dilihat volume air pada penampung air dan dapat terbaca hasilnya. Kadar air rimpang jahe merah tidak >11% (Kemenkes RI, 2017).

8. Pembuatan ekstrak n-heksan rimpang jahe merah

Pembuatan ekstrak n-heksan rimpang jahe merah dengan menggunakan metode soxhletasi dan digunakan pelarut n-hexan. Timbang serbuk rimpang jahe merah sebanyak 70 g, kemudian masukkan ke dalam kondensor soxhlet dan tambahkan pelarut n-hexan sebanyak 1½ sirkulasi. Proses ekstraksi dilakukan sampai pelarut tidak

berwarna. Ekstrak yang telah didapat kemudian dimasukkan ke dalam jarra dan diuapkan di atas *water bath* sampai kental.

9. Uji bebas n-hexan

Pengujian ini dilakukan untuk menyatakan bahwa ekstrak rimpang jahe merah bebas/ tidak mengandung n-hexan. Pengujian dilakukan dengan mencium aroma ekstrak rimpang jahe merah serta membakar ekstrak yang telah diuapkan, jika tidak terdapat bau dan tidak terbakar menandakan ekstrak tersebut telah bebas n-heksana (Azizah *et al.*, 2017).

10. Skrining fitokimia

10.1. Uji alkaloid. Ambil sedikit ekstrak n-heksan rimpang jahe merah kemudian dilarutkan dengan menggunakan etanol sampai volume 9 ml. Ekstrak yang telah dilarutkan kemudian dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi, masing-masing tabung reaksi sebanyak 3 ml. Tabung reaksi pertama diberikan preaksi Dragendorff, jika muncul endapan jingga sampai merah menunjukkan positif alkaloid. Tabung reaksi kedua diberikan preaksi Mayer, jika muncul endapan putih menunjukkan positif alkaloid. Tabung reaksi ketiga diberikan preaksi Wagner, jika muncul endapan berwarna coklat muda sampai kuning menunjukkan positif alkaloid.

10.2. Uji flavonoid. Ambil sedikit ekstrak n-heksan rimpang jahe merah kemudian dilarutkan dengan menggunakan etanol sampai volume 3 ml, tambahkan sedikit magnesium, 2-3 tetes HCl 2N, dan 3 tetes amil alkohol. Munculnya endapan warna jingga hingga merah menandakan positif flavonoid.

10.3. Uji tanin. Ambil sedikit ekstrak n-heksan rimpang jahe merah kemudian dilarutkan dengan menggunakan etanol sampai volume 3 ml. Tambahkan 2 sampai 3 tetes larutan FeCl_3 . Muncul warna hitam kehijauan berarti positif tanin.

10.4. Uji saponin. Ambil sedikit ekstrak n-heksan rimpang jahe merah kemudian dilarutkan dengan menggunakan etanol sampai volume 3 ml, lalu tambahkan air hangat dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian kocok hingga membentuk busa. Positif saponin ditandai dengan munculnya busa tinggi selama 10 menit dan cukup stabil pada ketinggian busa 1 sampai 10 cm, serta ketika ditambahkan asam klorida 2N busa tidak menghilang.

10.5. Uji triterpenoid/ steroid. Ambil sedikit ekstrak n-heksan rimpang jahe merah, masukkan ke dalam cawan porselin kemudian ditambahkan asetat anhidrida 7-8 tetes dan tunggu selama kurang lebih

15 menit. Larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 2 hingga 3 tetes H_2SO_4 . Munculnya warna biru kehijauan di larutan menunjukkan positif steroid, tetapi jika ada warna merah, jingga, ataupun ungu pada larutan menunjukkan hasil positif triterpenoid.

11. Identifikasi oleoresin dengan KLT

Identifikasi oleoresin menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). prosedur identifikasi yaitu ekstrak rimpang jahe merah dan baku eugenol diteteskan pada KLT dengan jarak totalan 1 cm dari tepi bawah plat yang mempunyai ukuran sebesar 2,3 cm x 7 cm. Plat yang sudah ditotolkan ekstrak dan baku eugenol selanjutnya dikeringkan lalu dielusi memakai *Toluen : Etil asetat* (90:10). Oleoresin dapat terdeteksi sinar UV 254 serta 366 dilanjutkan dengan perhitungan nilai Rf. Lempong KLT yang telah ditotolkan baku dan sampel, dilakukan deteksi menggunakan pereaksi semprot *Anisaldehyd-asam sulfat LP*, lempeng dipanaskan dalam oven pada suhu $105^{\circ}C$ selama 3 menit. Adanya oleoresin dapat ditunjukkan dengan bercak berwarna ungu pada lempeng KLT setelah dilakukan pemanasan.

12. Pembuatan sediaan uji

12.1. Pembuatan sediaan suspensi Na-CMC. Na-CMC ditimbang 0,5 g dan masukkan pada air panas 10 ml sampai mengembang selanjutnya digerus sampai homogen, saat larutan homogen ditambah aquades secara bertahap sampai 100 mL.

12.2. Pembuatan larutan pepton. Pembuatan larutan pepton 10% yaitu ditimbang 10g pepton kemudian dicampurkan ke dalam 100 mL aquades hingga larut.

12.3. Pembuatan suspensi parasetamol 1%. Timbang 100 mg serbuk parasetamol kemudian dilarutkan dalam 10 mL larutan Na-CMC, aduk hingga homogen.

12.4. Pembuatan larutan ekstrak n-heksan. Ekstrak n-heksan yang telah di dapat ditambahkan Na-CMC bertahap dengan diaduk sampai larut.

13. Uji aktivitas antipiretik ekstrak rimpang jahe merah

Pertama, mencit putih jantan diaklimatisasi terlebih dahulu 7 hari. Sewaktu proses aklimatisasi hewan uji diberi makan serta minum sebagaimana biasanya. Hewan uji dianggap sehat jika tidak menunjukkan deviasi berat badan ($>10\%$) selama masa aklimatisasi serta tidak menunjukkan terdapat gejala tidak normal secara visual.

Kedua, pengukuran suhu tubuh hewan uji dilakukan sebelum diberikan perlakuan dan setelah diberikan perlakuan. Masing-masing

mencit putih jantan dilakukan pengukuran suhu tubuh rektal agar suhu tubuh sebelum dan sesudah diberikan perlakuan dapat diketahui.

Ketiga, mencit putih jantan disuntikkan pepton 0,3 mL/ekor secara subkutan.

Keempat, 1 jam setelah diinduksi pepton tiap kelompok diberi perlakuan yang berbeda secara oral dalam bentuk larutan, yaitu:

1. Kelompok 1 (Kontrol positif) : Diberikan parasetamol 1,3 mg/20 gram mencit

1. Kelompok 2 (kontrol negatif) : Diberikan Na-CMC 0,5%

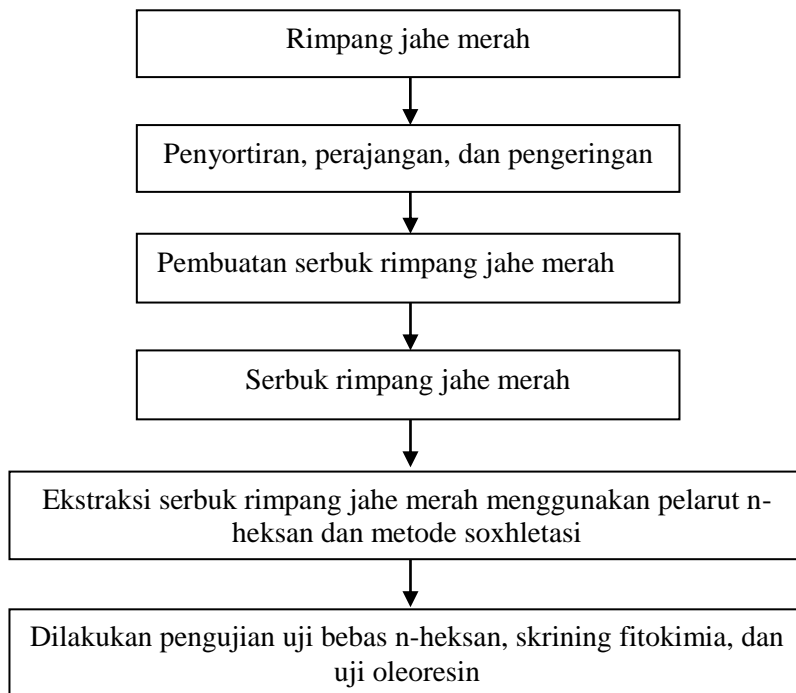
2. Perlakuan 1 : Diberikan 98 mg/KgBB mencit

3. Perlakuan 2 : Diberikan 196 mg/KgBB mencit

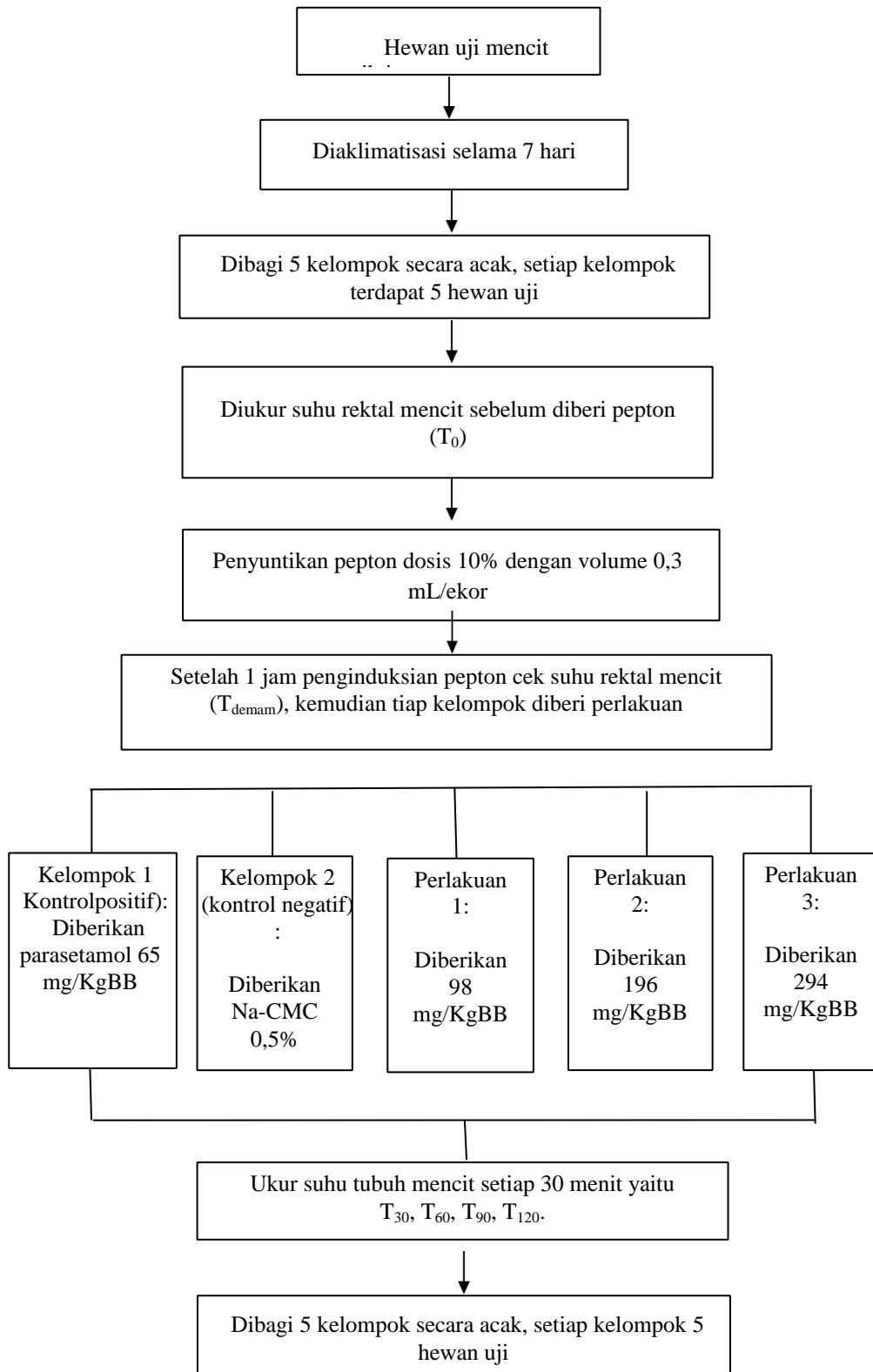
4. Perlakuan 3 : Diberikan 294 mg/KgBB mencit

Kelima, pengukuran suhu tubuh hewan uji dilakukan sebelum perlakuan yaitu suhu tubuh hewan uji diukur tiap 30 menit. Pengukuran suhu rektal yaitu T_0 , T_{demam} , T_{30} , T_{60} , T_{90} , dan T_{120} .

E. Skema Penelitian



Gambar 5. Pembuatan ekstrak n-heksan rimpang jahe merah



Gambar 6. Prosedur penelitian

Daya antipiretik (DAP) obat ditandai dengan kemampuan menahan kenaikan temperatur badan hewan uji dengan menggunakan induksi pepton. Hitung AUC (*Area UnderCurve*) serta DAP (Daya Antipiretik):

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

Keterangan :

$AUC_{tn}^{tn} - 1$ = luas daerah di bawah kurva persentase suhu tubuh terhadap waktu kelompok perlakuan

V_{tn} = Suhu subuh pada t_0 V_{tn-1} = Suhu tubuh pada $t-1$

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

Keterangan :

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

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

DAP = Daya Antipiretik

F. Analisis Hasil

Data yang telah didapatkan dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk*. Hasil yang diperoleh data normal maka dilakukan dengan uji parametrik yaitu *Analysis of Variance* (ANOVA), kemudian dilakukan uji homogenitas atau uji *levene*. Uji *levene* dilakukan untuk mengetahui homogenitas, jika homogen dilanjutkan dengan uji *Tukey Post Hoc Test* dan jika hasil tidak homogen dapat dilanjutkan dengan uji *Games-Howell*. Hasil dari analisis data uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* , jika diperoleh data tidak normal maka dilakukan uji non-parametrik menggunakan uji *KruskalWallis* dan uji *Mann Whitney*.