**BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

**3.1 Metode Penelitian**

Penelitian ini terdiri meliputi pengumpulan dan pengolahansampel, skriningfitokimiayangmeliputi pemeriksaanterhadapsenyawagolongankimia yangterdapat pada serbukkeringdaunkembangmerakdanekstraketanol daun kembangmeraksertaujiantipiretikekstraketanol denganmetodologiterhadap hewan coba mencit.

**3.2 LokasidanJadwalPenelitian**

**3.2.1 LokasiPenelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmasi Terpadu Universitas

MuslimNusantaraAl-Washliyah Medan.

**3.2.2 Jadwal Penelitian**

Penelitian inidilakukan selama 4 bulan daribulanJanuari-April2023

**3.3 Alat-alat yang Digunakan**

Alat yangdigunakandalampenelitianiniadalah bejana atautoples,batang pengaduk,timbanganhewan, timbangananalitik,thermometer digital,*Rotary evaporator*,kertassaring,alat-alatgelas,penangas air, spuit1ml, 3ml, 5ml, oral sonde, aluminiumfoil, lumpang dan stamper.

**3.3.1 Bahan-bahan yangDigunakan**

Bahan-bahanyangdigunakanpada penelitian ini adalah daunkembang merak*(Caesalpiniapulcherrima(L.),*etanol 96%,aquadest, Na-CMC1%, VAKSINDPTHB, tabletparacetamol,serbukmagnesium,asam klorida10%, alkohol

30

,pereaksiBouchardat,pereaksiMayer,gelatin1%,asamsulfat(p)danasamasetat anhidrat, Besi(III) Klorida0,1%, pereaksiDragendorff.

**3.3.2 Hewan Percobaan**

Hewanyangdigunakandalampenelitianiniadalahmencitjantan *(Mus musculus)*,yang sehat denganberat 20-30gsebanyak25 ekordibagi dalam5 kelompokbagian.Sebelumperlakuan, hewan dipeliharadahuluselama 2minggu dalam kandangyangbaik.Wadah makandan minum di bersihkan setiap dua kali sehari. Mencitdiberi makan secukupnya.

**3.4 Derteminasi Tumbuhan**

Derteminasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Hebarium

Medanedanense SumateraUtara.

**3.5 SampelPenelitian**

Sampel yang digunakanadalahdaunkembang merak*(Caesalpinia pulcherrima*(L.)yangberwarnahijau,diambildari KotaPangkalanBrandan, Kecamatan SeiLepan, Kabupaten Langkat, Provinsi Sumatera Utara.

Daunkembangmerak yangmasihsegardibersihkandarikotoran yang melekat dengan dengan caramencucidenganairbersihyang mengalir, lalu ditiriskan dan ditimbang berat basahnya, dikeringkan dilemari pengering, simplisia dianggapkeringapabila diremashancur.Selanjutnya dihaluskan menggunkanblendersehingga menjadiserbukhalus,diayak dan ditimbang kemudian serbuk simplisia disimpang dalamwadah yang lebihbaik.

**3.6 Pembuatan Ekstrak**

Ekstraksi daun kembang merakdilakukan dengancara meserasi.Serbuk simplisia 10bagian (500g) dimasukkankedalam bejana kemudian dituangkan75 bagian (3750ml) cairan penyarietanol laluditutupdandibiarkanselama 5hari terlindungdaricahaya mataharisambildiaduk-aduksesekali.Setelah5 hari campurandiserkaidanampasnyadiperas.Cuci ampasnyadengancairanpenyari etanol secukupnya hinggadiperoleh100bagian(ml)maserat.Dipindahkandalam bejanatertutup,dibiarkanditempat sejukterlindungdari cahaya selama 2hari kemudiandisaring.Maserat laludipekatkan denganalat*Rotary evaporator*lalu ditimbang (Depkes RI, 1979).

**3.7 Pembuatan LarutanPereaksi**

**3.7.1 Larutan Pereaksi Asam Sulfat**

Larutanasam sulfat(p) sebnayak10,32 mlditambahkan airsuling secukupnyahingga volume 100 ml (Depkes RI, 1995).

**3.7.2 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N**

Asam Klorida(p) sebnayak 17 ml ditambahkan air suling scukupnya hingga volume 100ml(Depkes RI, 1995).

**3.7.3 Larutan Pereaksi Bouchardat**

KaliumIodida4 g dilarutkandalam airditambahkan iodium3 g dan diaduk sampai larut.Ditambahkanairsulingsecukupnya hingga 100ml (Depkes RI, 1995).

**3.7.4 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 0,1%**

Besi (III)ditimbangsebanyak1mgdilarutkandalamairsulingsehingga diperolehlarutan 100 ml(Depkes RI, 1995).

**3.7.5 Larutan Perekasi Dragendorff**

Bismuth(II)nitrat0,85gdilarutkandalam10mlasamasetatglasialdan8 gkaliumiodidadalam20ml airsuling.Campurkedualarutandandiamkan sampai memisah sempurna.Ambil larutanjernih dan encerkan denganair secukupnyahingga 100 ml(Depkes RI, 1995).

**3.7.6 Larutan Pereaksi Liebermann-Burchard**

Asam asetatanhidra20bagian dicampurdengan1bagianasam sulfat(p) (Depkes RI, 1995).

**3.7.7 Larutan PereaksiMayer**

Raksa(II)Klorida sebanyak1,596gdilarutkandalam60mlairsuling. Padawadahlainlarutan5glarutankaliumiodidedilarutkandalam10mlair sulingkemudian keduanya dicampurkan dan ditambahkanairsulinghingga diperoleh volume larutan 100 ml(DepkesRI, 1995).

**3.7.8 Larutan PerekasiMolish**

Sebanyak3gaiphanaftol dilarutkan dalam asam nitrat0,5Nsecukupnya hingga diperoleh 100ml(Depkes RI, 1995).

**3.7.9 Larutan Perekasi Timbal(II) Asetat 0,4 N**

Timbal (II) klorida ditimbang sebanyak 15,17 g dilarutkan dalam air suling bebas karbondioksida sehingga diperoleh 100 ml (Depkes RI, 1995).

**3.8 Skrining Fitokimia**

Skriningfitokimiadilakukanuntuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkadangdalam daun kembangmerakdalamkeadaan segar, keringdan ekstrak. Adapun golongan senyawa yang diperiksa meliputi pemeriksaan flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, glikosida.

**3.8.1 PemeriksaanAlkaloida**

Sampel rimpangtemukuncidalamkeadaanserbukatauekstrakditimbang sebanyak0,5gram,kemudiankedalammasing-masingsampel ditambahkan1ml asam klorida 2N(suasanaasam)danditambahkanaquadessampai9ml, dipanaskandiataspenangasairselama2menit, didingankandan disaring filtrat yang diperoleh diugunakanuntukpercobaanalkaloida, keadaan 3tabungsebagai berikut:

1) 3tetesfiltratditambahkan2tetespereaksimayerakanmenghasilkanendapan berwarnaputih/kuning.

2) 3tetesfiltratditambahkan2tetespereaksiBouchardadakanmenghasilkan endapan berwarnacoklatsampaihitam.

3) 3tetesfiltratditambahkan2tetespereaksiDragendorfakanmenghasilkan endapan berwarnamerah/jingga.

Alkaloidpositifjikaterjadiendapanataukekeruhanpalingsedikitduadaritiga percobaan diatas (Ditjen POM, 1995).

**3.8.2 UjiFlavonoid**

Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia dan ekstrak kental ditimbang kemudian ditambahkan 10ml airpanasdididihkan selama 5menit dan disaring dalam keadaanpanas.Kedalam 5mlfiltratditambahkan0,1gram serbuk magnesium,1 ml asam klorida pekat dan2ml amil alkohol,dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amilalkohol(DepkesRI, 1995).

**3.8.3 UjiSteroiddan Triterpenoid**

Sebanyak5gram simplisiadanekstrakkental dimaserasidalam20mln- Heksan selama2jam kemudiandisaring.Filtrat sebanyak5ml diuapkandalam cawanpenguapsampai kering.Kedalamresiduditambahkan20tetesasamasetat anhidrat dan1tetesasam sulfat pekat (pereaksi Lieberman-Buchardad). Terbentuknya warnaunguatau merahmenjadi biruhijaumenunjukkan adanya steroida atau triterpenoid (Harbone, 1987).

**3.8.4 UjiTanin**

Sebanyak0,5gramserbuksimplisiadanekstrakkentaldisaridengan10 ml air suling lalu disaring. Filtratnya diencerkan dengan air sampai tidak berwarna.Larutandiambilsebanyak2mldanditambahkan1-2tetespereaksi FeCl31%.Jika terjadi warna biru atauhijaukehitaman menunjukkan adanyatanin (Depkes RI, 1995).

**3.8.5 Uji Glikosida**

Ditimbang3 gramserbuk simplisiadan ekstrak kentaldisaring dengan30mlcampuranetanol96%denganaquades(7:3)dan10mlH2So4 2N direfluksselama2jamdidinginkandandisaring.Pada20mlfiltratditambahkan

25mlairdan25mltimbal(II)asetat0,4Ndikocok,didiamkanselama5menit laludisaring.Filtratdisaridengan20mlcampuranisopropanoldanklorofom (2:3) dilakukanberulang 3kali. Dikumpulkan sari laludiuapkan pada temperature tidak lebih dari59̊Csisanya dilarutkan dalam2 ml methanol.

Larutansisadigunakanuntukpercobaansebagaiberikut: diambil0,1ml larutanpercobaandimasukkan kedalam tabung reaksikemudiandiuapkandiatas penangasair.Padasisanyaditambahkan2mlairsulingdanditambahkan5tetes

pereaksi molish,kemudian secara perlahan-lahan ditambahkan 2mlasam sulfat pekat. Glikosida positif apabila terbentuk cincin berwarna ungu pada larutan cairan (Depkes RI, 1989).

**3.8.6 UjiSaponin**

Sebanyak 0,5 gramserbuk simplisia danekstrak dimasukkandalam tabung reaksi,ditambahkan10ml airpanasdidinginkan kocok selama 10detik.Jika terbentukbusatinggi1-10cmyangstabil tidakkurangdari10menitdantidak hilangdenganpenambahan1tetesasamklorida 2Nmenunjukkanadanyasaponin (Depkes RI, 1995).

**3.9 PemeriksaanKarakteristik Simplisia**

Pemeriksaan karakteristik simplisisa meliputi pemeriksaan makroskopik, penetapankadarair,penetapankadar sari yanglarutdalamair, penetapankadar sariyangdidapatdalametanol,penetapankadarabutotaldan penetapankadar abu yang tidaklarutdalamasam.

**3.9.1 PemeriksaanMakroskopik**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan pada daun kembangmerak dengan mengamati morfologiluartumbuhan.Denganmengamatibentukluar,ukuran, warna, bau dan rasadaridaun kembangmerak.

**3.9.2 PenetapanKadar Air**

Penetapankadar airini dilakukandengan metodeazeotropi (destilasi toluen). Alat meliputi labu alas500ml, alatpenampung,pendingin,tabung penerima,tabungpenyambungdan alatpemanas.Cara penetapan: kedalamlabu alasnulatdimasukkan200mltoluenedan2mlairsuling,didestilasiselama2

jam. Dibiarkan mendingin selama 30 menit, dibaca volume air pada tabung penerima.

Selanjutnya kedalam labudimasukkan5gramserbuksimplisia, lalu dipanaskanhati-hatiselama15menit,setelahtoluen mulaimendidihkecepatan tetesdiatur menjadi2tetestiap detik,hingga sebagian airtersuling,kemudian dinaikkankecepatantetes menjadi4tetes tiap detik. Setelahsemua airtersuling bagian dalam pendingin dibilas dengan toluene. Dilanjutkan penyulinganselama5 menit,kemudiandibiarkanmendinginpada suhukamarsetelahairdantoluene memisah.Volumedibaca dengan ketelitian 0,1 ml, selisihkedusvolumeairyang dibaca sesuai kandungan airyang terdapat dalam bahan yangdiperiksa.Kadarair dihitung dalampersen (Ditjen POM, 1995).

Tujuan dari penetapan kadarairadalahuntukmengetahui kandunganair yang terkandung dalamsimplisia.

%Kadar air simplisia =(�������𝑖���ℎ𝑖�−�������𝑖�����

�����������(𝑔�)�100%

**3.9.3 PenetapanKadar Sari Larut Dalam Air**

Sebanyak2gserbukdi maserasiselama 24jam dengan100ml air kloroform (2,5ml klorofom dan air sulingsampe 1liter) dalamlabbersumbat sambilsesekalidikocok.Selama6jampertamadankemudiandibiarkanselama

18jam,kemudiandisaring,20ml filtrate diuapkanhingga keringdalamcawan penguapyang berdasar rata yang telahdipanaskanpada suhu105ºC hingga bobot tetap.Kadardalam persen sari larut dalam airdihitungterhadap bahanyang telah dikeringkan diudara(Ditjen POM, 1995).

%Kadar sari larut air=(𝐵������������𝑖�𝑖−𝐵�������������𝑔) ����𝑔������������������) (��)�100%

**3.9.4 PenetapanKadar Sari Larut dalam Etanol**

Sebanyak5gramserbuksimplisiadimaserasiselama24jamdengan100 mi etanol (96%)dalam labubersumbat sambil berkali-kali dikocok selama6jam pertamadankemuidiandibiarkanselama18jam.Kemudiandisaringcepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudiandiuapkan20ml filtrate hinggakering dalamcawanpenguapberdasarratayangtelahditara,dipanaskansisapadasuhu

105ºChinggabobottetap.Kadardalampersensariyanglarutdalametano!96% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara(Ditjen POM, 1995). Tujuandaripenetapankadarsarilarutdalametanoladalahuntukmengetahui apakah simplisia tersebutdapatlarut dalampelarutorganik sepertietanol.

Kadar sarietanol=(𝐵������������𝑖�𝑖−���������������𝑔) ������������������������(g)x100%

**3.9.5 PenetapanKadar Abu Total**

Sebanyak5gram serbukyangtelah digerusdanditimbangseksama, dimasukkan kedalam krusporselen yang telah dipijardan ditara, kemudian diratakan.Krusdipijarperlahan-lahansampaiaranghabis,pijarandilakukan pada suhu600°Cselama 3 jam,kemudian didinginkan danditimbang sampai diperolehbobottetap.Kadarabudihitungterhadapbananyangtelahdikeringkan diudara(Ditjen POM, 1995).

Tujuan dari penetapan kadarabu totaladalahuntukmengetahui berapa persen pengotoran yang diakibatkan dari logam-logam dan silikat yang terkandung dalamtanah.

Kadar abu total=(𝐵������������𝑖�𝑖−���������������𝑔)

�������������100%

**3.9.6 PenetapanKadar Abu TidakLarut dalam Asam**

Abu yang telah diperoleh dalam penrtapan kadar abu total dididihkan dalam 25 ml asamklorida 2Nselama 5menit, bagianyangtidak larut asam dikumpulkan, disaringmelalui kertassaring, dipijarhingga bobot tetapkemudian didinginkandan ditimbamg.Kadarabuyang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Ditjen POM, 1995).

Kadar abu tidaklarutasam=(𝐵������������𝑖�𝑖−���������������𝑔)

�������������100%

**3.10 Perhitungan Bahan Uji**

a. VaksinDPT Hb (Induksi Demam)

Besarnya dosisVAKSINjenisDPT yaitu sebesar 0,5ml.Hal inidibuat standardenganukuranbayi diIndonesiadirata-ratakan4KG,jadi4kg=0,5 ml. Dosisvaksin untukmanusia denganberat badan70kg=70kg/4kg x0,5ml =8,75 ml. Faktorkonversi manusia ke mencit sebesar 0,0026.Maka dosisuntukmencit dengan berat20 gadalah 8,75 ml x 0,0026 = 0,02 ml/20gBB.

b. Paracetamol(KontrolPositif)

Berat tablet paracetamol yangumumdigunakanadalah 500mg.Jika dilakukan konversiuntukmanusia yangberatnya 70kgdan dibandingkan dengan mencit makadapathasil sepertiiniBB20gadalah0,0026,makadosisuntuk mencitadalah:

Dosis parasetamoluntuk mencit20 gBB= 500 mg x 1,3 mg/20gBB.

**3.11 Hewan Percobaan**

Pada penelitianini hewan percobaanyangdigunakanadalahmencit*(Mus musculus)*. Hewan percobaankemudian diaklimatisasi selama 14 hari dan

dipuasakanselama18jamsebelumpengujiandantetapdiberiminumagartidak dehidrasi.

Menurut Frederer (1967), rumus penentuan sampel untuk uji eksperimentaladalah:

(t-1)(n-1)≥15

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlahpengulanganataujumlahsampel tiapkelompok.Padapenelitianini peneliiti menggunakan 5kelompokperlakuansehinggaperhitungan sampel menjadi:

(5-1)(n-1)≥15

4n-4≥15

4n≥19 n≥4,75

Dari perhitungan diatasdapat disimpulkan sampel yang digunakanpada percobaan padasetiapkelompokadalahsebanyak5ekormencit danjumlah kelompok daaripercobaaniniadalah5 kelompoksehimgga jumlah hewan percobaan yang digunakan adalah 25 ekor.

**3.12 Desain Pengamatan Efek Antipiretik**

1. 25 ekor hewan uji yang sudah di adaptasikan selama 14 hari dan dipuasakanselama18 jam sebelum pengujiandibagi menjadi 5kelompok, yang terdiri dari5 ekor mencitperkelompok.

2. Sebelummelakukanperlakuanterhadaphewanpercobaan,diukurterlebih dahulu suhu awaldarisetiaphewanpercobaan dengan menggunakan

termometerdigital,dengancaramemasukkanthermometerdigital kedalam rektalsedalam1cm dan kemudian dicatatsuhu awalnya.

3. KemudiaansemuahewanujidiinduksikanvaksinDPT-HB0,2ml/20gBB

secara intramuskular

4. Setelah 1 jam pemberian VAKSIN, kemudian setiap kelompok mendapatkan perklakuan yang berbeda,kelompok1diberikan 1,3mg parasetamol pada setiap mencit sebagai kontrol positif,kelompok2 diberikan CMC1%sebagai kontrol negatif,dan tiga kelompoklainnya diberikan ekstrak daun kembang merak 50 mg, 100 mg, dan 200 mg.

5. Setelah30menitperlakuanterhadaphewanpercobaan,suhurektaldiukur kembalisecaraberkalasampaimeneit ke180denganinterval30menit sekali.