**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

* 1. **Jenis dan Rancangan Penelitian**

 Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental yaitu variabel bebas terdiri dari dosis ekstrak etanol daun cempedak dan variabel terikat ialah efek antipiretik.Rancangan penelitian ini meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel, pembuatan ekstrak daun cempedak (*Artocarpus integer*(Thumb.), skrining fitokimia, dan pengujian efektivitas ektrak daun cempedak (*Artocarpus integer*(Thumb.)sebagai antipiretik terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus)*.

### Parameter Penelitian

Parameter dalam penelitian ini yaitu meliputi makroskopik, mikroskopik, penetapan kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut etanol, dan kadar sari larut air. Penentuan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid/triterpenoid, glikosida.

* 1. **Lokasi Dan Jadwal Penelitian**
		1. **Lokasi Penelitian**

PenelitianinidilakukandiLaboratoriumFarmasiTerpaduUniversitasMuslim Nusantara (UMN) Al-Washliyah Medan

* + 1. **Jadwal Penelitian**

Waktu penelitiandilakukanpadaJanuari-Mei 2021

* 1. **Alat dan Bahan**
		1. **Alat-alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas laboratorium, timbangan analitik, thermometer digital, pipet tetes, spuit berbagai ukuran, oral sonde, mortar dan stamper, blender, alumunium foil, alat penetapan kadar air, objek glas dan de glass, tanur, desikator, krusporselin, oven, rotary evaporator, alat perkolasi, kandang mencit.

* + 1. **Bahan-bahan**

 Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun cempedak(*Artocarpus integer*(Thunb.) Merr.), bahan-bahan kimia yaitu vaksin DPT-Hib-Hb, parasetamol, etanol 96%, CMC (Carboxyl Methyl Cellulose), asam asetat glasial, asam sulfat (p), asam klorida(p), asam klorida 2N, amil alkohol dan akuades.

* 1. **Penyiapan Sampel**
		1. **Pengumpulan Bahan tumbuhan**

Proses pengumpulan sampel daun cempedak *(Artocarpus integer*(Thunb.) Merr.)dilakukan secara sengaja *(purposive sampling)* yaitu tanpa membandingkan dengan tumbuhan yang sama dari daerah yang lain. Sampel diperoleh dari Kp. Lalalang, Besitang ( Langkat).

* + 1. **Identifikasi Tumbuhan**

 Identifikasi/determinasi pada daun cempedak *(Autocarpus integer*(Thumb.)Merr*.)*dilakukan di Lab, Herbarium Medanense (MEDAN), Jl. Bioteknologi No. 1 kampus USU Medan, Sumatra Utara. Determinasi dilakukan untuk mengetahui morfologi markopis daun cempedak *(Artocarpus integer*(Thunb.)Merr.).

* 1. **Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cempedak**

Pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia di masukkan kedalam bejana, kemudian dituangkan dengan 75 bagian etanol 96% sebanyak 3750 ml dalam wadah tertutup rapat selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil sering diaduk, lalu diperas dengan kain flanel sehingga didapat maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dimaserasi 25 bagian etanol 96% sebanyak 1250 ml sehinnga didapat maserat II. Maserat I dan II digabungkan, didiamkan selama 2 hari lalu disaring dan diuapkan dengan alat rotary evaporator pada temperatur tidak lebih dari 400C, hingga diperoleh ekstrak kental (Ditjen POM, 1979).

* 1. **Pemeriksaan Karakteristik simplisia**

Pada pemeriksaankarakterisasi simplisia meliputi: pemeriksaan makroskop, pemeriksaan mikroskop, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar larut dalam etanol, penetapan kadar abu total, dan penetapan kadar abu tidak larut asam.

* + 1. **Pemeriksaan Makroskopik**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap sampel daun cempedak*(Artocarpus integer*(Thunb.)Merr*.)*segar yang meliputi pemeriksaan bentuk, ukuran, warna, bau dan rasa.

* + 1. **Pemeriksaan Mikroskopik**

 Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap sampel daun cempedak*(Artocarpus integer*(Thunb.)Merr.)segar, daun cempedak segar diiris setipis mungkin kemudian diletakkan diatas kaca objek dan ditetesi dengan larutan kloralhidrat dan ditutup dengan kaca penutup, kemudian diamati dibawah mikroskop.

* + 1. **Penetapan Kadar Air**

 Toluen sebanyak 200 ml dan 2 ml air suling dimasukkan kedalam labu alas, didestilasi selama 2 jam, biarkan mendingin selam 30 menit dan volume air pada tabung penerima dibaca. Serbuk simplisia daun cempedak*(Artocarpus integer*(Thunb.)Merr.)sebanyak 5 g dimasukkan kedalam labu, dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes/detik, hingga sebagian air terdestilasi.Kecepatan destilasi dinaikkan hingga 4 tetes/detik.Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen.Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin sampai suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, dibaca volume air dengan ketelitian 0,05 ml. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air di dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen.

* + 1. **Pemeriksaan Kadar Sari Larut Dalam Air**

Sebanyak 5 g serbuk simplisia daun cempedak *(Artocarpus integer*(Thunb.)Merr.) yang telah dikeringkan dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air-kloroform (2,5 ml kloroform dalam 1 liter) menggunakan labu erlemeyer bertutup sambil dikocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam lalu disaring, 20 ml filtrat dipipet, diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang telah ditara dan dipanaskan pada suhu 105ºC sampai bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam air dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara(Depkes RI, 1989).

**3.6.5 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol**

Sebanyak 5 g serbuksimplisia daun cempedak *(Artocarpus integer*(Thunb.)Merr*.)* yang telah dikeringkan dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol 96% menggunakan labu dan di pipet, diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang telah ditara dan dipanaskan pada suhu 105ºC sampai bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam etanol dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah di udara(Depkes RI, 1989).

* + 1. **Penetapan Kadar Abu Total**

Sebanyak 2,5 g serbuk simplisia daun cempedak *(Artocarpus integer*(Thunb.)Merr*.)*ditimbang, dimasukkan kedalam krus porselin yang telah dipijar didalam oven pada suhu 105º C selama 30 menit dan ditara. Krus dipijarkan perlahan-lahan sampai arang habis, pemijaran dilakukan pada suhu 500-600º C sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu total dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikering(DepkesRI, 1989).

* + 1. **Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas. Residu dan kertas saring dikeringkan dalam oven pada suhu 105ºC selama 30 menit lalu dipijar pada suhu 500-600º C sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang . Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah diudara (Depkes RI, 1989).

* 1. **Pembuatan Larutan Pereaksi**
		1. **Larutan Pereaksi Bouchardat**

Ditimbang kalium iodida sebanyak 4 g dan 2 g iodium dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml, ditambahkan aquades sedikit demi sedikit sambil diaduk, lalu diencerkan dengan aquades sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Mayer**

Ditimbang raksa (II) klorida sebanyak 1,35 g dilarutkan dengan 60 ml aquades di dalam gelas ukur 100 ml. Pada wadah lain dilarutkan 5 g kalium iodida dilarutkan dalam 10 ml aquades. Kedua larutan dicampur dalam labu ukur 100 ml lalu diencerkan dengan aquades sampai garis tanda (Depkes RI,1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Dragendrof**

Dipipet 20 ml campuran larutan Bismuth Nitrat 40% di dalam asam nitrat pekat dengan 50 ml larutan kalium iodida 54,4% didiamkan sampai memisah, diambil larutan jernih dimasukkan dalam labu ukur 100 ml dan diencerkan dengan aquades sampai garis batas (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N**

Di pipet asam klorida pekat sebanyak 17 ml dimasukkan kedalam gelas kimia 100 ml lalu diencerkan dengan aquades sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Kloralhidrat**

Ditimbang kloralhidrat sebanyak 50 g dilarutkan dalam 20 ml aquades didalam gelas ukur 100 ml (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Lieberman-Bouchardat**

Di pipet asam asetat anhidrat sebanyak 20 ml dicampurkan dengan 1 ml asam sulfat pekat dalam gelas ukur (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 N**

Ditimbang timbal (II) asetat sebanyak 15,17 g dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml lalu dilarutkan dalam aquades bebas CO2 sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%**

Ditimbang besi (III) klorida sebanyak 1 g kemudian dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 100 ml sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

* 1. **Skrining Fitokimia**
		1. **Pemeriksaan Alkaloid**

Pemeriksaan alkaloid menggunakan HCl 2N, air suling, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, dan pereaksi Dragendroff. Pereaksi HCl 2N dibuat dengan 17 ml HCl (p) diencerkan dengan air suling sampai volume 100 ml; pereaksi Mayer dibuat dengan 1.36 g Mercuri (II) klorida dilarutkan dalam 60 ml aquadest, pada wadah lain dilarutkan sebanyak 5 g KI dalam 10 ml aquadest, kemudian kedua larutan dicampur, ditambahkan aquadest hingga 100 ml; pereaksi Bouchardat dibuat dengan 4 g KI dilarutkan dalam aquadest secukupnya kemudian 2 g I2 dilarutkan dalam KI setelah larut ditambahkan aquadest hingga 100 ml dan pereaksi Dragendroff dibuat dengan 8 g bismuth nitrat dilarutkan dalam asam nitrat pekat 20 ml pada wadah lain dilrutkan sebanyak 27.2 g KI dalam 50 ml aquadest, kemudian kedua larutan dicampurkan dan di diamkan sampai memisah larutan jernih diambil dan diencerkan dengan aquadest secukupnya hingga 100 ml (Depkes RI, 1979).

 Pemeriksaan alkaloid ditimbsng sebanyak 0,5 g serbuk simplisia daun cempedak*(Autocarpus integer*(Thumb.)Merr.*)*dan ekstrak etanol daun cempedak*(Autocarpus integer*(Thumb.)Merr.*)*masing-masing ditambahkan 1 ml HCl 2N, ditambahkan 9 ml air suling, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring.Filtrat dipakai untuk tes alkaloid.

1. Diambil 3 tetes filtrat ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, akan terbentuk endapan berwarna putih atau kuning.

2. Diambil 3 tetes filtrat ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, akan terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam.

3. Diambil 3 tetes filtrat ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendroff, akan terbentuk warna merah atau jingga.

 Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga dari percobaan diatas (Depkes RI, 1989).

* + 1. **Pemeriksaan Flavonoid**

Sebanyak 10 g serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun cempedak*(Autocarpus integer*(Thumb.)Merr.*)*masing-masing ditambahkan 100 ml air panas, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 ml lalu ditambahkan 9,1 g serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat dan 2 ml amil alkohol. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1989).

* + 1. **Pemeriksaan Saponin**

 Pemeriksaan saponin menggunakan pereaksi HCl 2N dibuat dengan 17 ml HCl (p) diencerkan dengan air suling sampai volume 100 ml (Depkes RI, 1979).

 Pemeriksaan saponin ditimbang sebanyak 0,5 g serbuk simplisia daun cempedak*(Autocarpus integer*(Thumb.)Merr.*)* dan ekstrak etanol daun cempedak*(Autocarpus integer*(Thumb.)Merr.*)*masing-masing dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik terbentuk buih atau busa tidak kurang dari 10 menit tinggi 1-10 cm. penambahan 1 tetes larutan HCl 2N, apabila buih tidak hilang, menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1989).

#### Pemeriksaan Tanin

 Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun cempedak *(Autocarpus integer*(Thumb.)Merr.*)*didihkan selama 3 menitdalam 100 ml air suling, lalu didinginkan dan disaring. Filtratnya diencerkan dengan air sampai tidak berwarna.Kemudian larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida.Bila terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Depkes RI,1995).

* + 1. **Pemeriksaan Steroid/triterpenoid**

Sebanyak 1 g serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun cempedak, masing-masing dimaserasi dengan 20 ml N-heksana selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap, pada sisa ditmbahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Timbul warna ungu atau merah kemudian berubah menjadi hijau biru menunjukkan adanya steroid/triterpenoid (Depkes RI, 1989).

* 1. **Pembuatan Bahan Uji**
		1. **Pembuatan Suspensi Na-CMC 1%**

Ditimbang Na-CMC sebanyak 1 g dimasukkan sedikit demi sedikit kedalam 50 ml air suling panas (suhu 700C) sambil diaduk hingga terbentuk larutan koloidal dan dicukupkan volumenya dengan air suling hingga 100 ml.

* + 1. **Pembuatan Suspensi Parasetamol**

 Ditimbang serbuk parasetamol yang telah ditentukan, lalu ditambahkan Na-CMC 1% sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga volume mencapai 100 ml sampai terbentuk suspensi parasetamol. Dosis parasetamol ditentukan berdasarkan faktor konversi dosis manusia. Dosis lazim parasetamol untuk sekali konsumsi yaitu sebesar 500 mg. konversi dosis manusia ke mencit adalah 0,0026. Maka dosis parasetamol yang diberikan pada mencit adalah 500 mg x 0,0026 = 1,3 mg/ 20 gram BB.

* + 1. **Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol Daun Cempedak**

Dalam pengujian ini akan digunakan 3 variasi dosis yakni dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB dan 150 mg/kgBB. Dibuat suspensi masing-masing ekstrak etanol daun cempedak dengan berat ekstrak yang telah dihitung dan disesuaikan , kemudian dilarutkan dalam ml Na-CMC 1%.

* 1. **Hewan Percobaan**
		1. **Pemilihan Dan Penyiapan Hewan Uji**

 Hewan yang digunakan pada uji aktivitas antipiretikdari ekstrak etanol daun cempedak *(Artocarpus integer*(Thunb.)Merr*.)*adalah mencit putih jantan *(Mus musculus*) sebanyak 25 ekor dibagi5 kelompok, terdiri dari 5 ekor perkelompok.

 Mencit diadaptasikan dengan lingkungan kandang selama 7 hari Aklimatisasi yang dilakukan bertujuan untuk memberikan adaptasi pada mencit putih jantan *(Mus musculus)* terhadap lingkungan baru.Mencit diletakkan dalam kandang yang berisi sekam berfungsi untuk menyerap kotoran mencit.

 Rumus Federer : (n-1) (t-1) ≥ 15

n = jumlah hewan dalam satu kelompok

t = jumlah kelompok

 (n-1) (1-1) ≥ 15

 (n-1) (5-1) ≥ 15

 (n-1) 4 ≥ 15

 4n - 4 ≥ 15

 4n ≥ 19

 n ≥ 4,75

* + 1. **Prosedur Uji Efek Antipiretik**

 Hewan uji dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok 5 ekor hewan uji, kemudian hewan uji dipuasakan selama 18 jam, ditimbang berat badannya.Diukur suhu tubuh awal mencit dengan thermometer digital melalui rectal, selanjutnya mencit di induksi dengan vaksin DPT-HB secara im. Setelah 30 menit di induksi di ukur kenaikan suhu tubuh mencit,setiap kelompok diberikan perlakuan secara per oral dengan tingkatan dosis yang ditentukan:

Kelompok I : Kotrol berupa larutan Na-CMC1%

Kelempok II : Pembanding berupa parasetamol

Kelompok III : Suspensi Ekstrak Etanol daun cempedak dengan dosis 50 mg/kgBB

Kelompok IV : Suspensi Ekstrak Etanol daun cempedak dengan dosis 100mg/kgBB

Kelompok V :Suspensi Ekstrak Etanol daun cempedak dengan dosis 150mg/kgBB

 Setelah diberi perlakuan, suhu rectal pada mencit kemudian diukur kembali pada selang waktu 30 menit selama 3 jam. Kemudian data dianalisis menggunakan program SPSS one way ANOVA dan dilanjut dengan tukey.