

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.) yang diperoleh dari Batu jamus, Kranganyar, Jawa Tengah diambil pada bulan Februari 2019. Sampel dalam penelitian ini adalah rimpang kencur. Sampel yang dipilih adalah rimpang kencur yang berumur 9-12 bulan dengan tanda daun telah menguning dan kering (Syukur & Hernani 2003). Selain itu rimpang kencur yang digunakan kondisi segar, tidak busuk, bebas dari penyakit sehingga kualitas mutu tidak menurun.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian yang pertama adalah ekstrak etanol 70% dilanjutkan dengan fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari rimpang kencur.

Variabel utama dalam penelitian yang kedua adalah aktivitas tonikum ekstrak serta fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari rimpang kencur terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*).

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel antara lain variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali. Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja diubah – ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel tergantung merupakan titik pusat persoalan berupa kriteria penelitian ini. Variabel terkendali yaitu variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanol rimpang kencur.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas tonikum dengan ekstrak dan fraksi *n*-heksan, etil asetat, air dari rimpang kencur terhadap mencit

jantan (*Mus musculus*), yang meliputi selisih dari waktu lelah mencit berenang sebelum perlakuan dan setelah perlakuan.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kondisi mencit jantan baik dari berat badan, lingkungan, jenis kelamin, kondisi kandang, kondisi penelitian dan pengamatan, kondisi alat *Natatory Exhaustion*, prosedur pembuatan fraksinasi.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.) adalah rimpang dalam kondisi segar, tidak busuk, bebas dari penyakit, diperoleh dari daerah Batu Jamus, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Februari 2019.

Kedua, serbuk rimpang kencur adalah serbuk yang dihasilkan dari proses pengambilan rimpang kencur, pencucian, pengeringan dengan bantuan oven bersuhu 50° C, selanjutnya simplisia rimpang kencur yang telah kering dihaluskan dengan blender, kemudian diayak dengan ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak etanol rimpang kencur adalah hasil ekstraksi serbuk rimpang kencur dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah fraksi dari ekstrak etanol 70% rimpang kencur yang difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut non polar.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n*-heksan dari ekstrak etanol rimpang kencur yang difraksinasi dengan pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air adalah residu fraksi etil asetat dari ekstrak etanol rimpang kencur diuapkan menggunakan *waterbath*.

Ketujuh, uji aktivitas tonikum adalah pengujian dengan metode *Natatory Exhaustion* dengan melihat durasi ketahanan berenang untuk menentukan fraksi teraktif terhadap mencit jantan (*Mus musculus*).

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

**1.1 Alat untuk pembuatan dan analisis serbuk simplisia.** Alat yang digunakan antara lain blender, ayakan mesh no 40, timbangan analitik, oven, *Sterling-Bidwel*.

**1.2 Alat maserasi.** Alat yang digunakan untuk maserasi botol gelap, kertas saring, corong, batang pengaduk, kain flanel, evaporator, *waterbath*.

**1.3 Alat uji efek tonikum.** Alat yang digunakan untuk uji efek tonikum antara lain akuarium ukuran 50x25x30 cm, *stopwatch*, *sprit* 1 ml, jarum tumpul atau bola untuk pemberian oral, *beaker glass*, *hair dryer*, gelas ukur.

**1.4 Alat identifikasi kandungan senyawa.** Alat yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa rimpang kencur antara lain tabung reaksi, cawan petri, rak tabung, gelas ukur, aluminium foil, lampu spirtus, lempeng KLT, pipet mikro, lampu UV 254 nm dan 366 nm.

**1.5 Alat pembuatan fraksi.** Alat yang digunakan membuat fraksi yaitu corong pisah, gelas ukur, *waterbath*, evaporator, timbangan.

### 2. Bahan

**2.1. Sediaan uji.** Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang kencur yang didapat dari daerah Batu jamus, Karanganyar, Jawa Tengah usia sekitar 9-12 bulan, tandanya daun telah menguning dan kering (Syukur & Hermani 2003)

**2.2. Hewan uji.** Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*), sehat, berat badan  $\pm$  20 g, umur 2-3 bulan yang didapat dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

**2.3. Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan meliputi pelarut : etanol 70%, *n*-Heksan, aquadest, etil asetat, toluen. Kontrol negatif : aquadest. Kontrol positif : kafein. Reagen : dragendrof, Sudan III Wagner dan Mayer, amoniak, sitroborat. Asam klorida 2N, serbuk magnesium, iodium, naftol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, asam asetat.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.)**

Tahap pertama penelitian ini adalah determinasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.). Tujuan dari determinasi ini untuk menetapkan kebenaran sampel berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman terhadap pustaka yang dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah.

### **2. Pembuatan serbuk rimpang kencur**

Rimpang kencur diambil sekitar bulan Februari 2019 di daerah Batu jamus, Karanganyar, Jawa Tengah. Penyerbukan rimpang kencur dilakukan dengan cara rimpang kencur dicuci bersih dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan tanah dan kotoran lainnya, kemudian rimpang dirajang sedemikian rupa melintang agar luas permukaan besar, kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C sampai mengering, selanjutnya simplisia kencur dihaluskan dengan mesin penyerbuk kemudian diayak menggunakan pengayak no. 40.

### **3. Penetapan kadar air**

Labu ukur 500 ml dihubungkan dengan pendingin air balik melalui alat penampung yang dilengkapi dengan tabung penerima 5 ml yang berskala 0,1 ml. Alat dipanaskan menggunakan pemanas listrik yang suhunya dapat diatur atau tangas minyak. Bagian atas labu tabung penyambung sebaiknya dibungkus dengan asbes (Depkes 2008). Penetapan kadar air serbuk rimpang kencur dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Metode ini dilakukan dengan cara menimbang serbuk rimpang kencur 5 gram dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut toluen jenuh air 200 ml kemudian memasang alat *Sterling Bidwell*. Labu dipanaskan dengan hati-hati menggunakan api kecil setelah mendidih api dibesarkan. Pemanasan dihentikan jika pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes. Kemudian diukur kadar airnya dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell* dengan melihat volume pada skala alat tersebut. Kadar air dihitung dalam % v/b (Depkes2008).

#### 4. Pembuatan ekstrak etanol rimpang kencur

Serbuk simplisia rimpang kencur diekstraksi dengan metode maserasi. Simplisia rimpang kencur sebanyak 1000 gram dimasukkan ke dalam sebuah bejana atau botol kaca gelap, dituangi 7,5 bagian etanol 70% kemudian ditutup, dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk. Setelah lima hari kemudian diserkai dan diperas, ampas dicuci dengan etanol 70% secukupnya kurang lebih 2,5 bagian sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 10 bagian. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40°C sehingga menjadi ekstrak kental rimpang kencur. Selanjutnya dilakukan Penetapan persen rendemen ekstrak. Cara memperoleh persen rendemen dengan menimbang bobot ekstrak dibagi bobot serbuk rimpang kencur dikalikan 100%.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk rimpang kencur}} \times 100 \%$$

#### 5. Pembuatan fraksi ekstrak etanol rimpangkencur

Ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.) yang sudah ditimbang sebanyak 10 gram dilarutkan dengan etanol 65 ml, ditambah dengan aquadest hangat 10 ml kemudian masukkan dalam corong pisah dengan *n*-heksan sebanyak 75 ml dipartisi beberapa kali sampai pelarut tidak berwarna lagi. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan oven pada suhu 50°C kemudian hasil ditimbang disebut sebagai fraksi *n*-heksan.

Residu dari fraksinasi *n*-heksan dimasukkan dalam corong pisah lagi dengan penambahan etil asetat sebanyak 75 ml partisi beberapa kali sampai warna pelarut tidak berwarna lagi. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan oven pada suhu 50°C kemudian hasil ditimbang dan disebut sebagai fraksi etil asetat.

Residu dari fraksi etil asetat dipekatkan menggunakan *waterbath* suhu  $\pm$  50°C kemudian hasil ditimbang dan disebut fraksi air. Skema pembuatan ekstrak etanolik dan fraksi rimpang kencur dapat dilihat pada gambar 3. Penetapan persen rendemen fraksi dilakukan dengan menimbang fraksi kemudian dibagi berat ekstrak dikali 100%.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{berat ekstrak rimpang kencur}} \times 100 \%$$

## 6. Pengujian kandungan kimia serbuk dan ekstrak rimpang kencur

**6.1 Flavonoid.** 0,5 gram serbuk dan ekstrak dilarutkan dalam etanol panas dan ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat ditambah amil alkohol. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk warna merah sampai magenta (Hanani 2015).

**6.2 Alkaloid.** 0,5 gram serbuk dan ekstrak ditambah 1 ml HCl 2N dan 9 ml aquadest kemudian panaskan  $\pm$  2 menit, dinginkan dan disaring. Filtrat dibagi 3 bagian, tiap filtrat ditambah pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk endapan putih, terbentuk warna coklat kemerahan, terbentuk jingga (Setyowati *et al.* 2014).

**6.3 Minyak atsiri.** 0,5 gram serbuk dan ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah tetes pereaksi sudan III. Hasil menunjukkan reaksi positif jika larutan berwarna merah (Depkes 1989).

## 7. Uji KLT

Ekstrak dan fraksi ditotolkan pada lempeng KLT kemudian dielusi dengan fase gerak *n*-heksan:etil asetat (7:3) (Diniatik 2016). Identifikasi flavonoid pereaksi menggunakan uap amoniak dan disemprot menggunakan sitroborat. Hasil positif mengandung flavonoid pada sinar UV 254 nm meredam sedangkan dibawah sinar UV 366 nm berfluoresensi berwarna biru, kuning, sampai warna ungu gelap. Lempeng berubah warna menjadi kuning pudar setelah diuap dengan amoniak dan setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat serta dipanaskan suhu 100°C selama 5 menit warna bercak menjadi kuning (Hanani 2015). Identifikasi alkaloid pereaksi semprot menggunakan Dragendorff (Hanani 2015). Hasil positif alkaloid pada sinar UV 254 nm meredam sedangkan dibawah sinar UV 366 nm berfluoresensi warna biru atau kuning, setelah disemprot akan menghasilkan warna coklat atau jingga (Hanani 2015). Identifikasi minyak atsiri disemprot dengan anisaldehyd asam sulfat, lempeng dipanaskan 100°C selama 10 menit (Depkes 2008). Hasil positif pada sinar tampak noda berwarna biru, violet, merah, atau coklat sedangkan dibawah sinar UV 366 nm berfluoresensi (Hanani 2015).

## 8. Pengujian tonikum

**8.1 Pembuatan kontrol negatif.** Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades. Aquades diukur 100 ml (Setyowati 2018). Volume pemberian oral sebanyak 0,5 ml. Kemudian mencit dioral aquades. Perhitungan dapat dilihat di lampiran 14.

**8.2 Pembuatan larutan stok kontrol positif.** Kafein merupakan kontrol positif yang dipakai sebagai tonikum dosisnya sebesar 100 mg/Kg BB (Turner 1965). Mencit dengan bobot 20 gram dosisnya 2 mg. Volume maksimal pemberian per oral pada mencit sebesar 1ml, sehingga volume yang diberikan hanya setengahnya yaitu 0,5 ml. Larutan stok 25 ml. Kafein 100 mg disuspensikan kedalam larutan CMC 0,5% sebanyak 25 ml diaduk sampai larut sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 0,1 /25 ml. Selanjutnya larutan suspensi kafein dioralkan ke mencit. Perhitungan dapat dilihat di lampiran 14.

**8.3 Pembuatan larutan stok ekstrak rimpang kencur.** Dosis ekstrak etanol yang diberikan sebesar 105,05 mg/Kg BB mencit (Ningsih 2012). Ekstrak ditimbang sebanyak 105,05 mg disuspensikan dengan CMC 0,5%. Volume larutan stok 25 ml. Volume pemberian 0,5 ml/20 g BB mencit kemudian dioralkan. Perhitungan dapat dilihat di lampiran 14.

**8.4 Pembuatan larutan stok fraksi *n*-heksan.** Fraksi *n*-heksan dosis 2,63 mg/Kg BB mencit ditimbang sebanyak 2,63 mg disuspensikan kedalam larutan CMC 0,5% volume 25 ml. Volume pemberian 0,5 ml/20 g BB mencit kemudian dioralkan. Perhitungan dapat dilihat di lampiran 14.

**8.5 Pembuatan larutan stok fraksi etil asetat.** Dosis fraksi etil asetat 21,01 mg/Kg BB mencit. Fraksi ditimbang 21,01 mg kemudian disuspensikan kedalam larutan CMC 0,5% sebanyak 25 ml. Volume pemberian oral 0,5 ml. Perhitungan dapat dilihat di lampiran 14.

**8.6 Pembuatan larutan stok fraksi air.** Dosis fraksi air 32,83 mg/Kg BB mencit, ditimbang 32,83 mg kemudian disuspensikan ke dalam larutan CMC 0,5% sebanyak 25 ml. Kemudian sediaan dioralkan ke mencit. Perhitungan dapat dilihat di lampiran 14.

## 9. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji.

Penelitian ini menggunakan mencit jantan sebagai hewan uji. Berat badan mencit berkisar antara 20-30 g dengan usia 2-3 bulan sebanyak 25 ekor. Mencit dibagi menjadi 6 kelompok (kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan ekstrak, fraksi *n*-heksan fraksi etil asetat dan fraksi air). Tiap kelompok terdiri 5 ekor mencit diberi perlakuan secara per oral. Pembagian kelompok hewan uji sebagai berikut :

Kelompok I : kontrol negatif diberi aquades volume 0,5 ml.

Kelompok II : kontrol positif diberi kafein dosis 100 mg/Kg BB mencit per oral.

Kelompok III : perlakuan ekstrak etanol 70% dosis 105,05 mg/Kg BB mencit per oral

Kelompok IV : perlakuan fraksi fraksi *n*-heksan dosis 2,63 mg/Kg BB mencit per oral

Kelompok V : perlakuan fraksi etil asetat dosis 21,01 mg/Kg BB mencit per oral

Kelompok VI : perlakuan fraksi air dosis 32,83 mg/Kg BB mencit per oral

## 10. Prosedur uji efek tonikum rimpang kencur

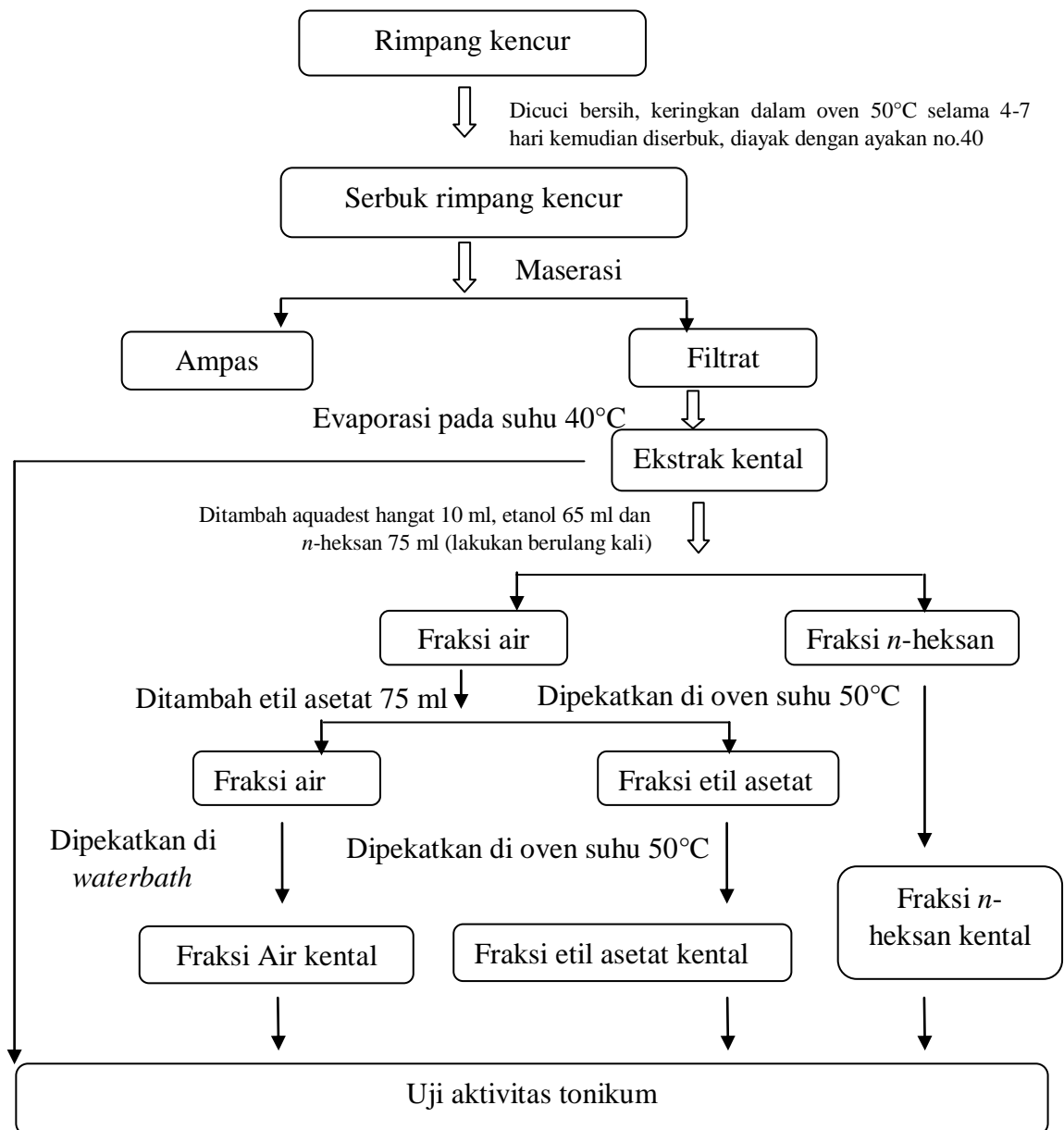
Mencit terlebih dahulu direnangkan dalam aquarium dan dicatat waktu lelahnya sebelum diberi sediaan sebagai data  $T_0$ . Mencit lelah ditandai dengan kepala yang berada di bawah permukaan air selama lebih dari 7 detik, selanjutnya mencit diangkat. Mencit diistirahatkan selama 30 menit, kemudian diberi sediaan secara per oral, ditunggu 30 menit kemudian direnangkan kembali, catat waktu lelahnya sebagai data  $T_1$ . Data efek tonikum adalah penambahan daya tahan dari selisih waktu lelah mencit sebelum diberi sediaan dan setelah diberi sediaan. Prosedur uji aktivitas tonikum secara skematis dapat dilihat pada gambar 4.

## E. Analisis Hasil

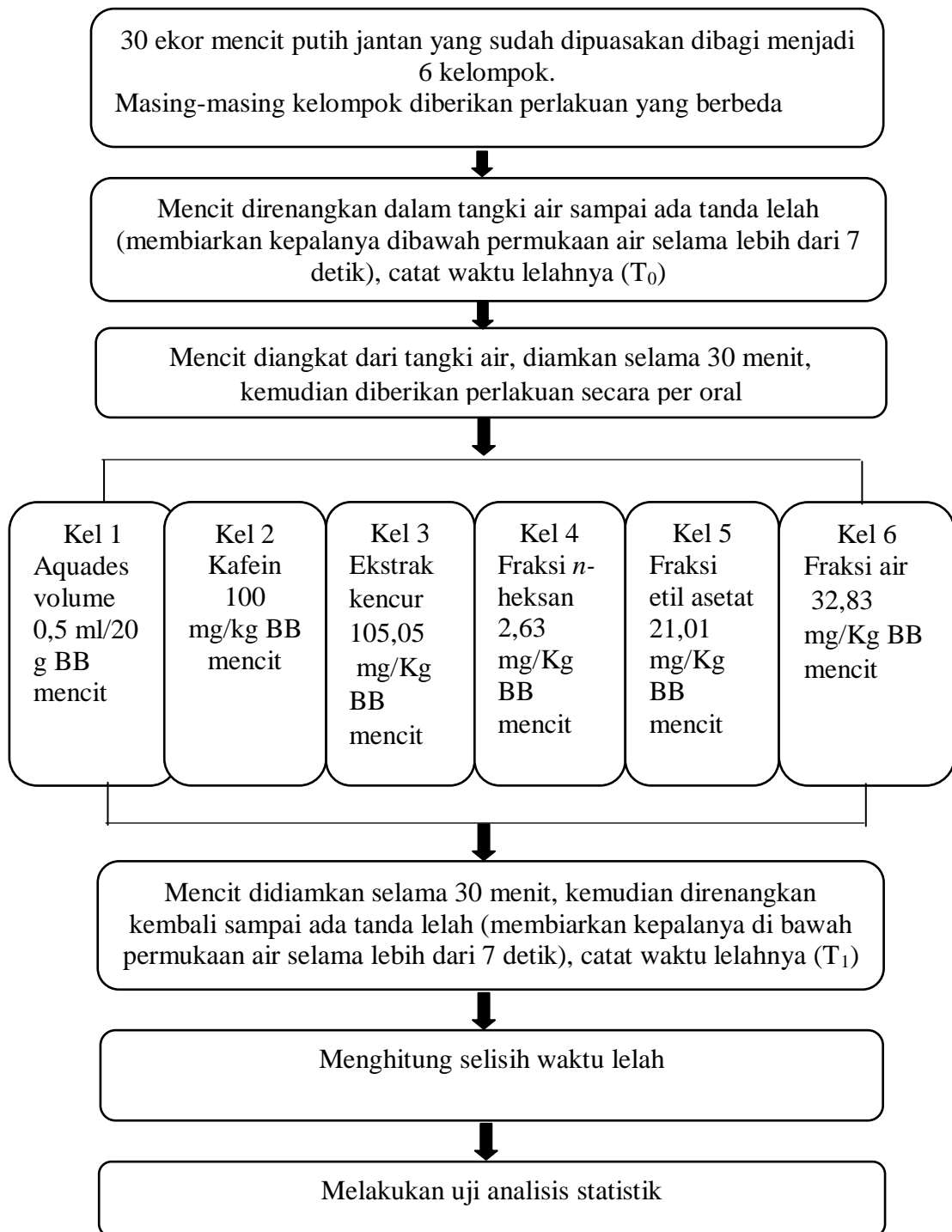
Analisis data yang didapatkan dalam penelitian ini berupa data penambahan daya tahan tubuh mencit jantan (*Mus musulus*). Data dianalisis



dengan *software* SPSS. Data hasil pengukuran daya tahan tubuh dianalisis dengan *Saphiro-Wilk Test* untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Data terdistribusi normal dilakukan uji homogenitas menggunakan metode *Levene Test*. Data dikatakan homogen jika  $p > 0,05$ . Data homogen dilanjutkan uji parametrik menggunakan metode *ANOVA*. Data tidak terdistribusi normal ( $p < 0,05$ ) dapat dilakukan analisis secara non parametrik menggunakan *Kruskal-Wallis Test* (Hariyati 2018).



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanolik dan fraksinasi rimpang kencur



Gambar 4. Skema jalannya penelitian