

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini yaitu rimpang lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* L.) Smith) yang berada di Desa Gonggang, Kabupaten Magetan, Jawa Timur

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dibuat sebagai informasi untuk menyelesaikan masalah penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rimpang lempuyang gajah dalam keadaan bagus dan segar, berwarna coklat, dan bebas hama yang dipanen pada bulan agustus di Desa Gonggang, Kabupaten Magetan, Jawa Timur.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol rimpang lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.) yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dan diperoleh dengan metode maserasi.

Variabel utama kedua pada penelitian ini yaitu aktivitas analgetik dari ekstrak etanol 96% rimpang lempuyang gajah.

Variabel utama ketiga pada penelitian ini yaitu metode *tail flick* dan *writhing test* pada hewan uji mencit putih jantan (*Mus musculus*)

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dikelompokkan menjadi beberapa kelompok variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang variasinya mempengaruhi variabel lain. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi dosis ekstrak etanol rimpang lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.).

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah permasalahan inti yang menjadi parameter pada penelitian ini. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah daya analgetik ekstrak etanol rimpang lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.).

2.3 Variabel terkontrol. Variabel terkontrol adalah faktor yang dapat memengaruhi variabel tergantung. Maka penting untuk menentukan kualifikasi variabel terkontrol agar hasil yang didapat seragam dan dapat direplikasi oleh analisis lain. Dalam penelitian ini, variabel terkontrol mencakup sampel, proses ekstraksi, alat yang digunakan, waktu penelitian, kondisi hewan uji seperti jenis kelamin, galur, kondisi fisik, umur, dan bobot, serta kondisi lingkungan, laboratorium, dan penelitian itu sendiri.

C. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, Rimpang lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.) yang digunakan adalah rimpang yang dalam keadaan segar, berwarna coklat, bebas dari hama yang diambil di Desa Gonggang, Magetan, Jawa Timur

Kedua, serbuk rimpang lempuyang gajah adalah serbuk yang diperoleh dari rimpang lempuyang gajah yang telah dicuci bersih menggunakan air mengalir, kemudian dirajang, dikeringkan dengan oven, diblender dan diayak dengan nomor ayakan mesh 40.

Ketiga, Ekstrak etanol rimpang lempuyang gajah merupakan ekstrak maserasi dari serbuk rimpang lempuyang gajah yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu diuapkan pada *rotary evaporator* sampai mengental.

Keempat, Metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Tail flick* dan *writhing test*. *Tail flick* untuk melihat aktivitas analgesik sentral atau narkotik sedangkan *Writhing test* untuk melihat aktivitas analgesik perifer atau non narkotik.

Kelima, Aktivitas analgesik metode *tail flick* adalah kemampuan dari ekstrak etanol 96% rimpang lempuyang gajah dalam menghambat nyeri dengan respon penarikan ekor pada mencit.

Keenam, aktivitas analgesik metode *writhing test* adalah penghilangan rasa nyeri oleh ekstrak rimpang lempuyang gajah dengan metode *writhing test* terhadap mencit jantan.

Ketujuh, Dosis efektif adalah dosis terkecil rimpang lempuyang gajah yang dapat memberikan aktivitas analgesik setara dengan kontrol positif.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah blender atau penghalus sampel, oven, ayakan nomor 40, cawan porselin, erlenmeyer, beaker glass, gelas ukur, rotary evaporator, serangkaian alat maserasi, corong pisah, botol semprot, batang pengaduk, kain flannel, kertas saring, pipet tetes, tabung reaksi, batang pengaduk, pipa kapiler, rak tabung, lampu bunsen, spiritus, cap kaki tiga, lampu uv. Peralatan untuk uji farmakologi yaitu jarum oral, timbangan, hewan coba,

2. Bahan

Penelitian ini membutuhkan beberapa bahan diantaranya adalah rimpang dari tanaman lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.) sebagai sampel. Etanol 96% sebagai pelarut. Tramadol dan Asam mefenamat sebagai kontrol positif. CMC-Na sebagai kontrol negatif. Asam asetat 1% sebagai penginduksi nyeri. Asam klorida, kloroform, FeCl_3 1%, toluen, etil asetat, HCL pekat, asam asetat anhidrat, H_2SO_4 pekat, serbuk Mg, aquadest, amil alkohol, reagen mayer dan dragendorff, dan bouchardat untuk uji identifikasi senyawa kimia. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan berusia ± 2 bulan dengan berat badan 20-40 gram.

E. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan *ethical clearance*

Pembuatan *ethical clearance* dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Surakarta. Hal pertama yang dilakukan yaitu mengisi formulir pendaftaran online. Mendatangi kantor forensik dan medikolegal RSUD Dr. Moewardi dengan menyerahkan bukti pendaftaran dan form yang telah diisi secara online, serta membawa proposal yang telah ditandatangani pembimbing. Melakukan pembayaran. EC akan diproses terlebih dahulu maksimal selama 14 hari. Pengambilan EC harus dilakukan secara mandiri disertai dengan bukti pengajuan yang telah ditandatangani oleh petugas.

2. Determinasi tanaman

Determinasi bagian tanaman rimpang lempuyang gajah dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan dengan cara memperhatikan makroskopis dan mikroskopis menggunakan data pustaka acuan. Makroskopis atau yang bisa dilihat dengan mata telanjang seperti warna, bentuk daun dan batang.

Sedangkan mikroskopis atau yang tidak bisa dilihat dengan mata telanjang seperti bentuk dan ukuran sel. Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

3. Pengambilan dan pembuatan simplisia

Rimpang lempuyang gajah yang dipilih yaitu rimpang yang dalam keadaan segar dan bagus, serta tidak terserang hama. Rimpang lempuyang gajah diambil di Desa Gonggang, Kabupaten Magetan, Jawa Timur. Rimpang lempuyang gajah yang sudah didapat, dicuci bersih menggunakan air mengalir, kemudian ditiriskan. Setelah itu dilakukan perajangan pada rimpang lempuyang gajah dan diletakkan di atas loyang selanjutnya dikeringkan dibawah sinar matahari dan dikeringkan lagi menggunakan oven suhu 50°C.

4. Pembuatan simplisia

Rimpang lempuyang gajah yang sudah dikeringkan kemudian diayak dan diblender sampai halus dan diayak menggunakan ayakan nomor 40, sehingga diperoleh serbuk yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Simplisia yang sudah menjadi serbuk disimpan dalam wadah tertutup untuk selanjutnya di uji susut pengeringan serbuk dan dilakukan proses ekstraksi.

5. Penetapan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan bersumber dari (FHI, 2017) kecuali dinyatakan lain di pedoman, simplisia wajib berwujud serbuk menggunakan derajat halus nomor 8, suhu oven 105°C serta susut pengeringan ditentukan dengan menimbang tepat 1 hingga 2 g simplisia di botol timbang dengan tutup rapat yang lebih dahulu sudah dipanaskan dengan suhu penentuan dan ditara. Ratakan bahan di botol timbang dengan menggojok botol, sampai menghasilkan lapisan kurang lebih 5 sampai 10 mm, tambahkan di tempat pengering, buka tutupnya, keringkan dengan suhu penentuan sampai bobot tetap. Sebelum melakukan pengeringan, diamkan botol pada suasana tertutup hingga dingin di eksikator sampai temperatur ruang. Rumus susut pengeringan adalah :

$$\frac{\text{Bobot sampel sebelum dikeringkan} - \text{Bobot sampel setelah dikeringkan}}{\text{Bobot sampel sebelum dikeringkan}} \times 100\%$$

6. Pembuatan ekstrak etanol rimpang lempuyang gajah

Pembuatan ekstrak bersumber dari (FHI, 2017). Ekstrak rimpang lempuyang gajah dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 800 gram kemudian

dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 yaitu diukur 8000 ml pelarut etanol 96% dan dilakukan penambahan serbuk rimpang lempuyang gajah, setelah itu disimpan dalam bejana yang terlindungi dari cahaya matahari. Wadah maserasi yang terdapat serbuk dan pelarut direndam selama 24 jam, dengan 6 jam perendaman pertama dilakukan pengadukan sesekali kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah itu filtrat dan ampas disaring. Hasil penyaringan ampas dilakukan proses maserasi lagi, dengan menggunakan sekurang-kurangnya lima bagian pelarut atau setara dengan 4000 ml pelarut etanol 96% yang baru. Hasil filtrat ekstrak 1 dan hasil filtrat remaserasi digabungkan, kemudian dengan alat *rotary evaporator* diuapkan pada temperatur 40-60°C dengan kecepatan 60 rpm hingga ekstrak menjadi kental. Lalu mencari (%) rendemen menggunakan rumus berikut :

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

7. Penetapan kadar air ekstrak rimpang lempuyang gajah

Penetapan kadar air ekstrak rimpang lempuyang gajah bersumber dari (FHI, 2017) dengan cara menimbang ekstrak 10 gram masukkan kedalam labu kering Lakukan penyulingan dengan toluene 100 ml dan 10 ml aquadest sebagai pelarut. Lakukan ECC sampai jernih lalu bisa dikatakan jenuh. Lalu lakukan penetapan kadar sampai mendidih yaitu toluene berada di atas sedangkan air dibawah. Skala pada air yang akan digunakan di perhitungan. Rumus kadar air

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{Volume akhir}}{\text{Berat simplisia yang ditimbang}} \times 100\%$$

8. Identifikasi Kandungan kimia ekstrak etanol lempuyang gajah

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk mengenal kandungan dalam rimpang lempuyang gajah. Persepsi yang dilakukan adalah senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, dan saponin. (Roosevelt & Ghari, 2018). Yang akan dilakukan di Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

8.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak rimpang lempuyang gajah sebanyak 10 gram ditambahkan dengan 100 ml air panas lalu dipanaskan selama 5 menit. Kemudian disaring dan diperoleh filtrat A, setelah itu 5 ml filtrat A dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium, 1 ml HCl pekat, dan 2 ml amil alkohol kemudian campuran dikocok kuat, dan dibiarkan memisah setelah itu lihat hasilnya jika terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada

lapisan amil alkohol maka menunjukkan positif flavonoid (Marjoni dan Saifuddin, 2022)

8.2 Identifikasi alkaloid. Ekstrak rimpang lempuyang gajah sebanyak 0,5 gram ditimbang kemudian tambahkan air suling sebanyak 9 ml kemudian dipanaskan diatas penangas air sekitar 2 menit lalu disaring. Hasil filtrat kemudian dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi dengan masing-masing tabung sebanyak 3 tetes. Tabung pertama dimasukkan 3 tetes filtrat dan tambahkan 2 tetes pereaksi *Dragendorff*, positif alkaloid jika terbentuk endapan warna jingga atau merah bata. Tabung kedua dimasukkan 3 tetes filtrat ditambahkan pereaksi *Mayer* sebanyak 2 tetes, positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan berwarna kuning atau putih. Tabung ketiga, dimasukkan 3 tetes filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi *Bouchardat*, hasil positif alkaloid ditandai dengan endapan coklat-hitam (Marjoni dan Saifuddin, 2022).

8.3 Identifikasi tannin. Ekstrak rimpang lempuyang gajah sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 10 ml aquadest kemudian disaring. Sebanyak 2 ml filtrat ditambahkan dengan 1-2 tetes besi (III) klorida atau FeCl_3 . Hasil positif tannin ditandai dengan terbentuknya warna biru-hitam atau hijau-hitaman (Marjoni dan Saifuddin, 2022).

8.4 Identifikasi saponin. Ekstrak rimpang lempuyang gajah sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 ml air suling panas, setelah itu dikocok selama 10 detik lalu tunggu selama 10 menit sampai terbentuk buih atau busa dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N jika busa tidak hilang maka ekstraks tersebut positif saponin (Marjoni dan Saifuddin, 2022).

8.5 Identifikasi minyak atsiri secara Kromatografi Lapis Tipis. Sampel ekstrak rimpang lempuyang gajah ditotolkan pada lempeng silika gel GF254 menggunakan pipa kapiler. Lempeng tersebut kemudian dimasukkan ke dalam chamber yang telah dijenuhkan dengan fase gerak berupa campuran toluene-etil asetat (93:7). Setelah fase gerak naik hingga mencapai batas atas, lempeng dikeluarkan dari chamber dan dikeringkan. Deteksi noda dilakukan dengan menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian disemprot dengan pereaksi anisaldehyde-asam sulfat untuk memperjelas noda. Lempeng kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 5-10 menit. Warna yang muncul diamati, dan nilai R_f dari bercak dihitung menggunakan rumus

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh sampel}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

9. Penetapan dosis dan pembuatan larutan

9.1 Penetapan dosis ekstrak. Penetapan dosis ekstrak berdasarkan penelitian oleh Somchit *et al.*, (2005) menunjukkan bahwa ekstrak etanol (*Zingiber zerumbet* (L) Smith) memberikan efek analgesik dengan dosis efektif adalah 50 mg/kgBB mencit. Dosis tersebut digunakan sebagai dosis orientasi yang selanjutnya akan digunakan untuk penetapan variasi dosis ekstrak rimpang lempuyang gajah dalam tiga peringkat variasi konsentrasi dosis yang berbeda yaitu 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB.

9.2 Penetapan dosis asam mefenamat. Dosis asam mefenamat ditentukan berdasarkan faktor konversi dosis manusia. Dosis lazim asam mefenamat sekali pakai adalah 500 mg. Konversi dosis manusia dengan berat badan 70 mg/kg ke mencit 20 g yaitu 0,0026. Lalu diambil perhitungan dosis asam mefenamat yaitu $500 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,3 \text{ mg}/20 \text{ gBB}$ mencit.

9.3 Pembuatan larutan CMC-Na 0,5%. Larutan CMC-Na 0,5% dibuat dengan menimbang Na CMC 0,5 g dan dilarutkan dalam aquadest secukupnya dan dipanaskan hingga mengembang kemudian dipindahkan ke dalam labu takar dan ditambahkan aquadest hingga 50 ml lalu dihomogenkan.

9.4 Pembuatan larutan induksi asam asetat. Pembuatan larutan induksi asam asetat dengan dosis 100 mg/kgBB. Asam asetat glasial sebanyak 100 mg disuspensikan dengan aquadest 10 ml. Pada penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Febriana (2010) dosis asam asetat 100 mg/kgBB cukup memberikan rasa nyeri yang baik.

9.5 Pembuatan larutan asam mefenamat. Asam mefenamat dibuat suspensi karena praktis tidak larut dalam air dengan cara pembuatan yaitu memasukkan 500 mg asam mefenamat kemudian disuspensikan dengan CMC-Na 0,5% ad 50 ml aduk ad homogen.

9.6 Pembuatan larutan ekstrak rimpang lempuyang gajah. Langkah dalam pembuatan larutan uji, yakni timbang Na CMC sebanyak 500 mg lalu masukkan secukupnya pada cawan penguap yang sudah diisi air panas disertai dengan pengadukan hingga mengembang. Ekstrak rimpang lempuyang gajah yang diperoleh kemudian ditimbang dengan dosis yang telah ditentukan lalu gerus dalam mortar setelah itu tambahkan Na CMC hingga volume 50 ml lalu aduk hingga homogen.

F. Pengujian efek analgesik

Pengujian efek analgesik menggunakan 2 metode yakni metode *tail flick* dan metode *writhing test*

1. Metode *tail flick*.

Sebanyak dua puluh lima ekor mencit yang telah dipuasakan selama 18 jam dengan tetap diberi minum dibagi menjadi 5 kelompok secara acak.

Kelompok 1 Na-CMC (Kontrol negatif)

Kelompok II Tramadol (Kontrol positif)

Kelompok III 25 mg/kgBB mencit

Kelompok IV 50 mg/kgBB mencit

Kelompok V 100 mg/kgBB mencit

Setelah diberi perlakuan dosis tunggal peroral, kemudian mencit diberi larutan uji sesuai kelompok, 30 menit kemudian mencit diberi rangsangan panas pada temperatur 70 C yang diperoleh dari infra-red pada alat uji. Parameter yang diamati berupa waktu yang diperlukan mencit untuk menarik atau mengibaskan ekornya dari sumber panas. Pengujian dilakukan selama 2 jam dengan rentan waktu tercatat, yaitu 30 menit, 60 menit, 90 menit, 120 menit, 180 menit, dan 240 menit. Metode uji selengkapnya dapat dilihat pada gambar 6.

2. Metode *writhing test*.

Sebanyak dua puluh lima ekor mencit yang tidak diberi makan selama 18 jam tetapi diberi minum dibagi menjadi 5 kelompok secara acak.

Kelompok 1 Na-CMC (Kontrol negatif)

Kelompok II Asam mefenamat (Kontrol positif)

Kelompok III 25 mg/kgBB mencit

Kelompok IV 50 mg/kgBB mencit

Kelompok V 100 mg/kgBB mencit

Setelah diberi perlakuan dosis tunggal peroral, kemudian mencit diberi larutan uji sesuai kelompok, 30 menit kemudian mencit diberi perangsang nyeri berupa asam asetat 1% dengan cara intraperitoneal. Satu geliat ditandai dengan kedua pasang kaki ditarik kebelakang dan tangan ditarik ke depan dengan disertai abdomen yang turun ke bawah. Selanjutnya diamati dan dicatat jumlah geliat yang ditunjukkan hewan uji setiap 15 menit selama 90 menit. (Hapsari 2017). Metode uji selengkapnya dapat dilihat pada gambar 7.

G. Perhitungan persen daya analgetik

1. Metode *tail flick*.

Menurut Rochmat (2016) perhitungan persen daya analgesik *metode tail flick* dinyatakan dengan persen hambatan nyeri (% PHN) yang dihitung dengan rumus :

$$\% PHN = \frac{T2 - T1}{T1} \times 100\%$$

Keterangan :

T1 = Rata-rata respon (detik) pada pemberian kelompok kontrol negatif.

T2 = Rata-rata waktu respon (detik) pada pemberian bahan uji.

2. Metode *writhing test*

Pengolahan data dilakukan dengan melihat total geliat masing-masing kelompok perlakuan. Perhitungan kemampuan analgetik dinyatakan menggunakan % daya analgetik (%DA) menggunakan rumus perhitungan :

$$\% DA = 100 - \left(\frac{P}{K} \times 100\% \right)$$

Keterangan :

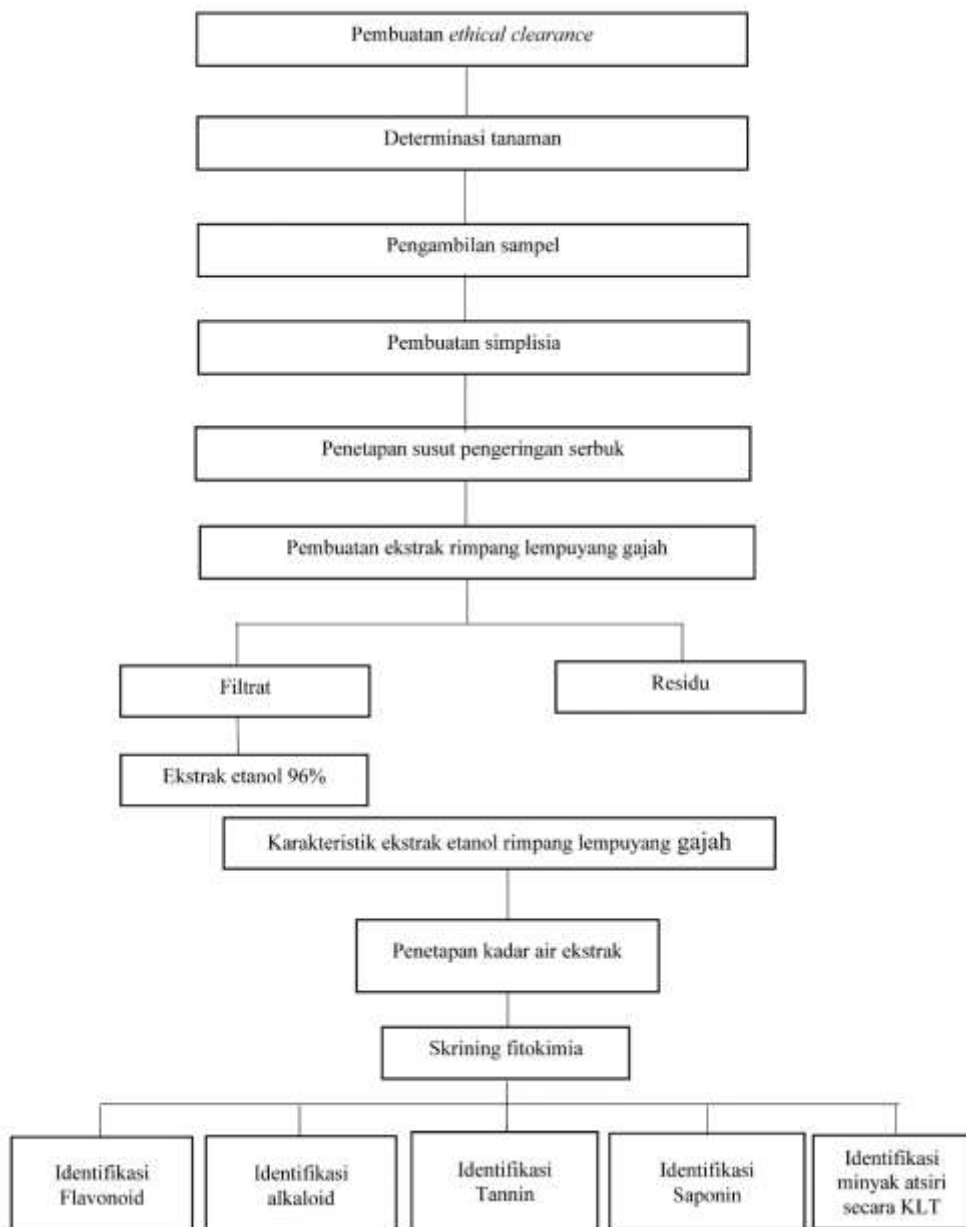
P = Total kumulatif anggota perlakuan

K = Total kumulatif anggota kontrol rata-rata (Azizah & Yunita, 2017)

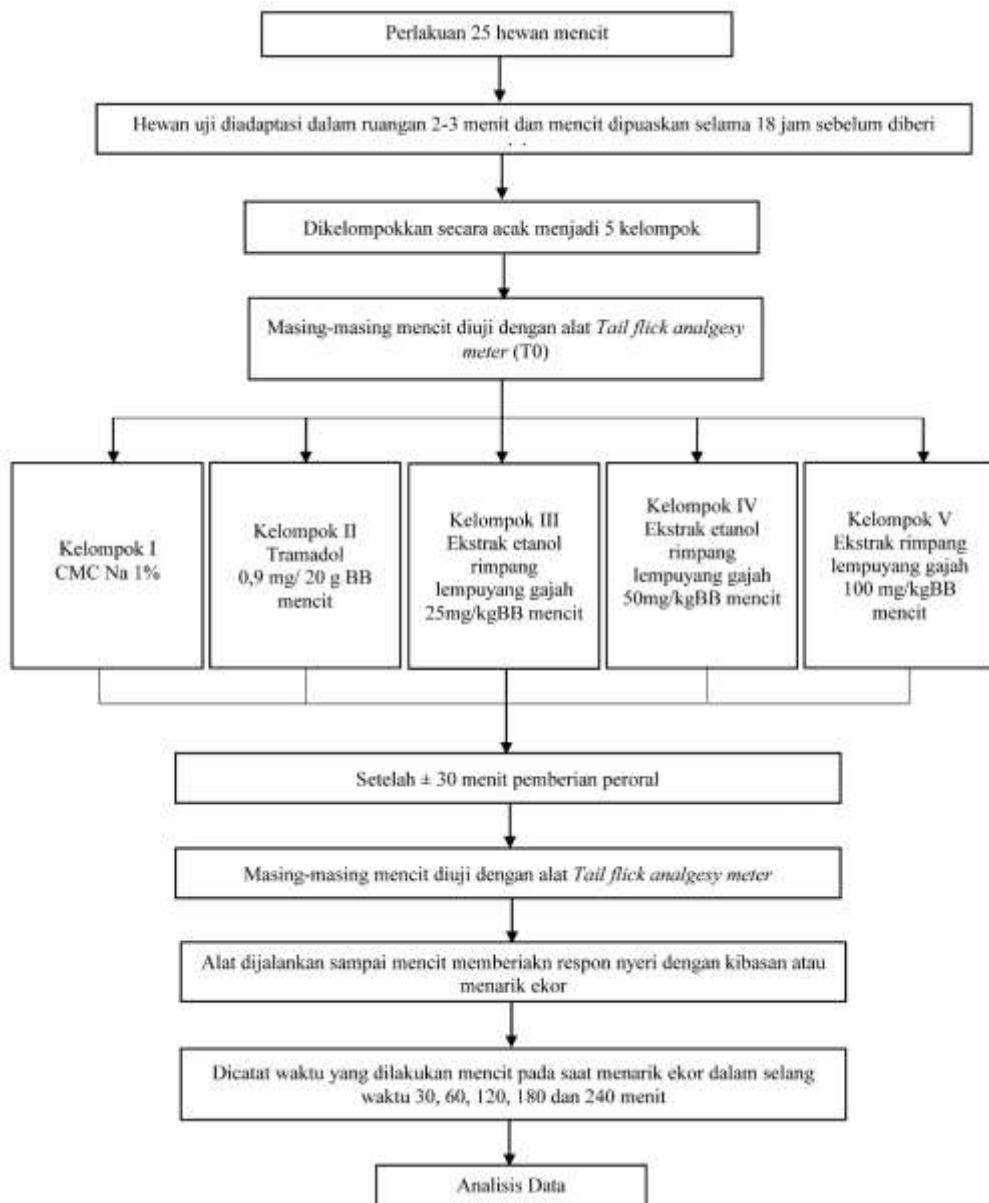
H. Analisis data

Analisis data menggunakan perangkat lunak statistik *SPSS*. Data yang dikumpulkan meliputi jumlah geliat hewan uji dan waktu respon mencit (dalam detik). Data tersebut disajikan dalam bentuk tabel dan diagram, dengan mencatat nilai rata-rata (mean) dan standar deviasi (SD) untuk setiap kelompok. *Uji Shapiro-Wilk* digunakan untuk mengevaluasi apakah data berdistribusi normal, sedangkan uji *Levene* digunakan untuk memeriksa homogenitas data. Jika data memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas, maka analisis statistik dilanjutkan menggunakan analisis varians satu arah (*One-Way ANOVA*) dan uji *post hoc*. *tukey* untuk melihat perbedaan antara kelompok. Namun, jika data tidak homogen, analisis dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk menentukan perbedaan antar kelompok.

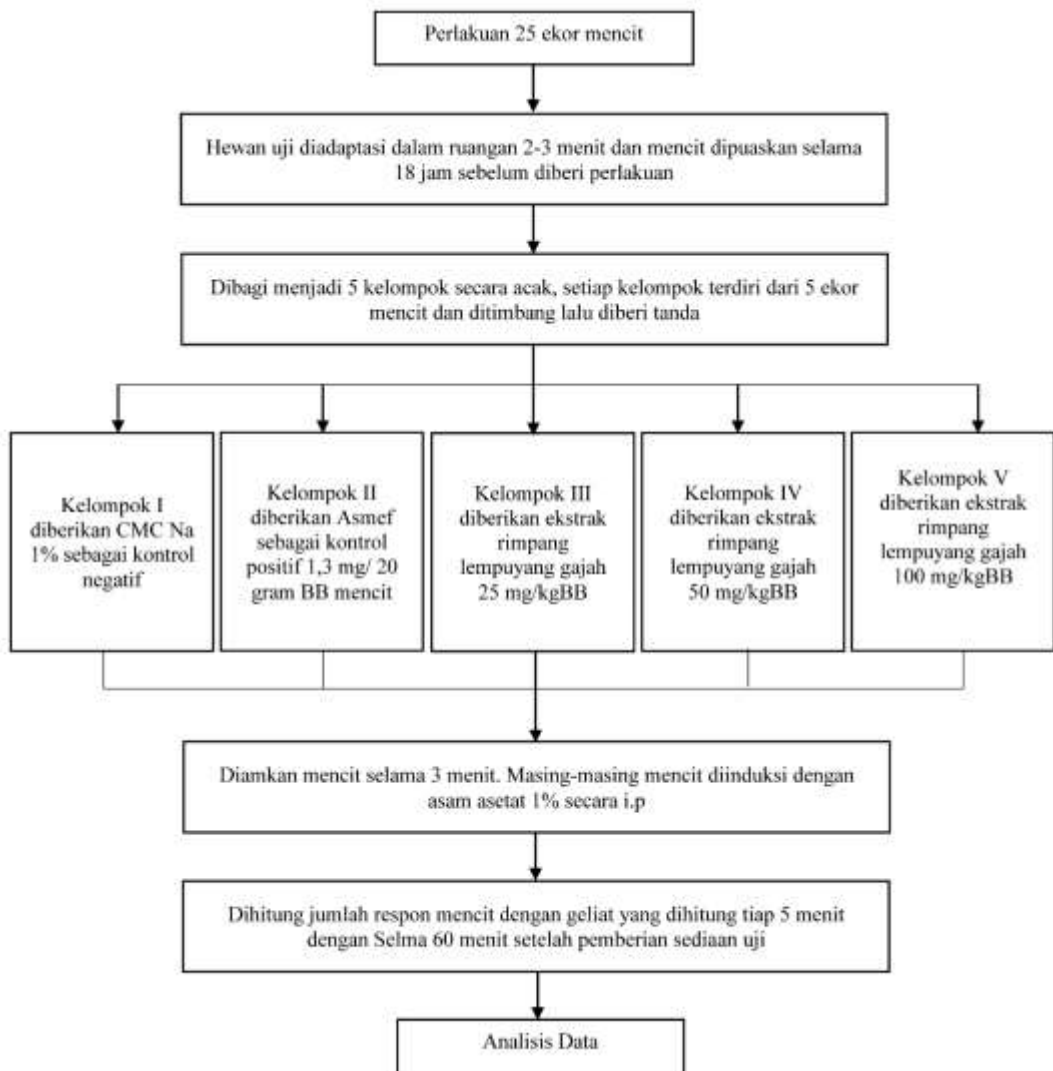
I. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak rimpang lempuyang gajah



Gambar 6. Skema uji analgetik dengan metode *tail flick*



Gambar 7. Skema uji analgetik dengan metode *Writhing test*