

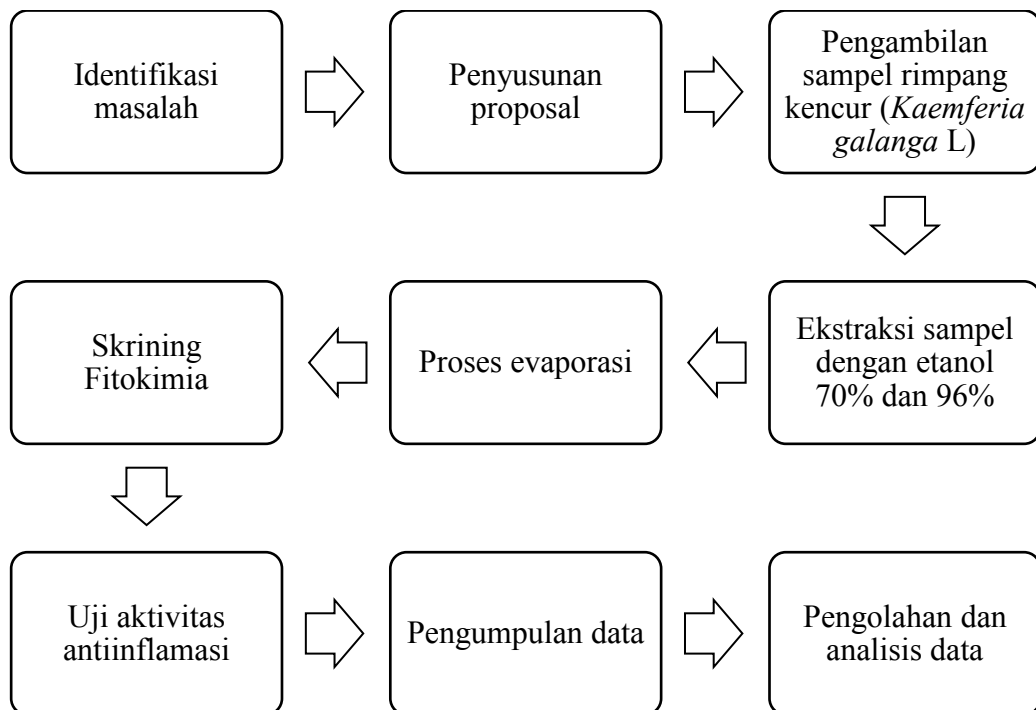
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *Post-test only group design*.

B. Alur Penelitian



Gambar 3 Bagan Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Sampel rimpang kencur (*Kaemferia galanga* L) diperoleh di Banjar. Baturiti Kelod, Desa. Baturiti, Tabanan, Bali. Pemeriksaan fitokimia dan uji aktivitas anti inflamasi dilakukan di laboratorium kimia dasar dan laboratorium kimia terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2023 sampai dengan April 2024.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kencur (*Kaemferia galanga* L) yang diperoleh dari Banjar Baturiti Kelod, Tabanan, Bali.

2. Sampel

a. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol 70% dan 96% rimpang kencur (*Kaemferia galanga* L) secara *in vitro*.

b. Besar sampel

Besar sampel pada penelitian ini adalah 30 sampel yang terdiri dari 2 perlakuan yaitu ekstrak etanol kencur 70% dan ekstrak etanol 96% kencur dengan

menggunakan 5 perlakuan yaitu 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm dan 500 ppm.

c. Teknik pengambilan sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang tanaman Kencur (*Kaemferia galanga* L) yang diperoleh di Banjar. Baturiti Kelod, Desa. Baturiti, Tabanan. Teknik sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Purposive Sampling*. Dimana metode ini menggunakan kriteria yang telah ditentukan oleh peneliti.

- 1) Kriteria inklusi dari rimpang tanaman Kencur (*Kaemferia galanga* L) yang digunakan adalah rimpang yang masih segar dengan batas waktu simpan tidak lebih dari 7 hari dan penyimpanan dilakukan di ruang gelap.
- 2) Kriteria eksklusi, yaitu rimpang sudah kering dan mengkerut serta bau khas kencur sudah menghilang.

Sehingga, sampel yang memenuhi kriteria inklusi yang digunakan dalam penelitian ini.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : blender (1), labu ukur 10 mL (1), labu ukur 100 mL (1), labu ukur 250 mL (1) tabung reaksi (pyrex) ukuran 16 x 100 mm (50), tabung centrifuge 50 mL (10), satu set alat *rotary vacuum evaporator* (1), pipet volume 1 mL (1), pipet volume 10 mL (1), pipet volume 100 mL (1), pipet tetes (5), oven (1), incubator (1), spektrofotometer UV-Vis (1), centrifuge (1), kompor listrik (1), neraca analitik (1).

2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu rimpang kencur, aquadest, pelarut etanol 96%, etanol 70%, kloroform, H₂SO₄, pereaksi dragendroff, pereaksi mayer, bubuk Mg, asam sulfat pekat, etanol, larutan ferri klorida 0,1 %, HCl 2N, buffer fosfat 7,4 pH, NaCl bubuk, natrium diklofenak, suspensi 10%, n-heksan, asam asetat, asam sulfat pekat.

3. Prosedur kerja

a. Pra-analitik

Bahan yang telah diperoleh dicuci bersih kemudian ditimbang lalu dipotong tipis-tipis kemudian ditimbang lagi dan dikeringkan secara diangin-anginkan atau di oven dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Bahan yang telah kering sempurna kemudian akan ditimbang lalu dihaluskan. Sebelum dilakukan maserasi bahan kering yang telah dihaluskan lalu dibagi menjadi dua dan direndam dengan pelarut etanol 70% dan etanol 96%. Proses maserasi dilakukan selama 7 hari pada ruang gelap dan pada suhu ruang. Setelah itu maserat disaring dan diputar dengan evaporator untuk mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya dengan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

b. Analitik

1. Skrining fitokimia

a. Uji alkaloid

1) Mayer

Tambahkan 10 tetes ekstrak ke dalam tabung reaksi lalu tambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Hasil positif menunjukkan terbentuknya endapan berwarna putih kekuningan yang menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Syamsul *et al.*, 2020).

2) Dragendorf

Tambahkan 10 tetes ekstrak kemudian 2-3 tetes reagen Dragendorf ke dalam tabung reaksi. Hasil positif menghasilkan endapan berwarna jingga atau merah kecoklatan yang menunjukkan adanya senyawa alkaloid.. (Syamsul *et al.*, 2020).

b. Uji flavonoid

Masukkan 10 tetes ekstrak etanol daun kencuri ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 2 tetes HCl pekat, sedikit serbuk Mg dan amil alkohol. Jika lapisan amil alkohol berwarna kuning, oranye atau merah, hal ini menunjukkan adanya flavonoid. (Syamsul *et al.*, 2020).

c. Uji tannin

Tambahkan 10 tetes ekstrak ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru atau hijau kehitaman, yang menunjukkan adanya senyawa tannin (Syamsul *et al.*, 2020).

d. Uji saponin

Tambahkan 10 tetes ekstrak ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 10 ml air panas. Kocok kuat-kuat selama 10 detik dan amati busa yang stabil selama 5 menit. Jika busa tetap terlihat meskipun telah ditambahkan 1 tetes larutan HCl 2N, hal ini menunjukkan adanya saponin (Syamsul *et al.*, 2020).

e. Uji terpenoid

Rendam 0,5 gram ekstrak kencur dalam 10 ml n-heksana selama 2 jam. Setelah penyaringan, filtrat diuapkan dan ditambahkan reagen asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Hasil positif menunjukkan terbentuknya warna ungu atau merah, yang berubah menjadi ungu atau hijau-biru, menunjukkan adanya steroid atau terpenoid.. (Syamsul *et al.*, 2020).

2. Pembuatan larutan uji

Untuk menyiapkan buffer fosfat pH 7,4 (0,15 M), larutkan 13,35 gram dinatrium hidrogen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dalam 500 ml air suling. Untuk natrium dihidrogen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), larutkan 4,14 gram dalam 200 ml air suling. Campurkan 80,8 mL larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,15 M) dengan 19,2 mL larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,15 M) pada suhu kamar. Untuk menyiapkan isosalin, larutkan 2,125 gram NaCl dalam 250 ml buffer fosfat pH 7,4. Hiposalin dibuat dengan melarutkan 0,625 gram NaCl dalam buffer fosfat, pH 7,4. Sterilkan setiap larutan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan kontrol positif dibuat dengan melarutkan 0,1 gram natrium diklofenak dalam 100 ml isosalin.. (Burhannuddin & Karta, 2023).

3. Pembuatan suspensi 10%

Masukkan 10 ml darah ke dalam centrifuge kemudian centrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Buang supernatan dengan pipet steril, cuci sel darah dengan larutan isosalin dan sentrifugasi kembali. Ulangi ini empat kali sampai larutan isosaline menjadi jernih. Ukur volume sel darah dan resuspensi dengan isosaline untuk membuat suspensi 10% v/v (Burhannuddin & Karta, 2023).

4. Pembuatan larutan control positif

Campurkan 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL larutan natrium diklofenak, dan 2 mL hiposalin.

5. Pembuatan larutan control negative

Campurkan 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL larutan isosalin sebagai pengganti larutan sampel, dan 2 mL hiposalin.

6. Pembuatan larutan control uji

Campurkan 1 mL sampel, 1 mL dapar posfat, 2 mL hiposalin, 0,5 mL suspensi 10%

7. Pembuatan larutan uji

Campurkan 1 mL sampel, 1 mL dapar posfat, 2 mL hiposalin, dan 0,5 suspensi sel 10%

8. Uji aktivitas antiinflamasi ekstrak kencur (*Kaemferia galanga* L)

Setelah semua larutan siap, inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Ambil supernatannya dan ukur konsentrasi hemoglobinnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada

560 nm (Burhannuddin dan Karta, 2023). Untuk mengetahui efek anti inflamasi, hasil penyerapan yang dihasilkan diukur dengan memasukkan rumus:.

$$\% \text{ inhibisi} = 100 - \left(\frac{\text{abs sampel uji} - \text{abs larutan kontrol larutan uji}}{\text{abs larutan kontrol neg}} \right) \times 100\%$$

(Burhanuddin & Karta, 2023).

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer merupakan informasi yang diperoleh melalui observasi langsung yang dilakukan peneliti. Data primer diperoleh dari percobaan laboratorium. Data yang diperoleh merupakan hasil uji kualitatif skrining fitokimia dan uji kuantitatif efek anti inflamasi dengan tanaman Kencuri.

b. Data sekunder

Data sekunder merupakan informasi yang diperoleh dari penelitian orang lain. Informasi ini dapat berupa laporan layanan kesehatan, penelitian kesehatan, atau jurnal penelitian lainnya.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian observasional dan laboratorium. Observasi merupakan teknik pengumpulan data berdasarkan observasi dan catatan. Pada penelitian ini dilakukan observasi untuk mengetahui bahan alam yang diteliti. Sementara itu, penelitian di laboratorium memberikan informasi mengenai hasil uji skrining fitokimia dan uji antiinflamasi *in vitro* pada rimpang Kencur.

3. Instrument pengumpulan data

Instrument adalah alat yang membantu peneliti dalam proses pengumpulan data. Dalam konteks ini, ada hubungan erat antara pendekatan penelitian yang dipilih dan alat pengukuran yang digunakan. Hasil yang diperoleh dalam penelitian seringkali sangat bergantung pada kualitas alat pengukuran yang digunakan, mengingat data yang terkumpul merupakan elemen sentral dalam proses penelitian dan juga menentukan kualitas hasil penelitian secara keseluruhan. Instrument yang digunakan dalam pengumpulan data pada penelitian ini, yaitu :

- a. Alat tulis
- b. Kamera
- c. Alat untuk skrining fitokimia dan aktivitas antiinflamasi

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Informasi yang diterima disimpan, dikumpulkan, diolah dan kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan laporan. Dalam penelitian ini peneliti menggunakan metode analisis data deskriptif dan kuantitatif. Pengolahan data yang diperoleh selama skrining fitokimia dilakukan dengan analisis deskriptif yaitu menjelaskan konsentrasi senyawa metabolit sekunder, flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin dan tanin pada ekstrak kencur. Sementara itu, informasi mengenai efek antiinflamasi metode *Red Blood Cell* (RBC) diperoleh melalui analisis kuantitatif, yaitu data yang dapat diwujudkan melalui angka-angka yang diperoleh dari perhitungan lapangan..

2. Analisis data

Data yang diperoleh dalam percobaan pada penelitian ini diolah untuk analisis data secara kuantitatif untuk mengetahui adanya pengaruh penggunaan pelarut etanol 70% dan 96% terhadap uji aktivitas antiinflamasi dengan menggunakan uji saphiro-wilk untuk uji normalitas data dan uji paired t-test untuk mengetahui adanya pengaruh penggunaan pelarut etanol 70% dan 96%.