

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi dalam penelitian ini adalah rimpang lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* (L.) Smith) yang diperoleh dari wilayah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah yang diambil pada bulan Februari tahun 2025 dan mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang lempuyang gajah yang memiliki warna kuning kecoklatan, dalam kondisi baik, segar, utuh, serta tidak menunjukkan tanda-tanda kerusakan atau pembusukan dan berumur sekitar 9 hingga 12 bulan. Pada usia tersebut, tanaman telah mencapai kondisi yang optimal untuk pengambilan rimpang, dengan kandungan senyawa bioaktif yang tinggi dan kualitas rimpang yang baik.

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

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

Variabel utama yang pertama adalah ekstrak etanol 96%, fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat dan fraksi air dari rimpang lempuyang gajah.

Variabel utama yang kedua adalah aktivitas tonikum fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat dan fraksi air dari rimpang lempuyang gajah terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*) dengan metode uji gelantung.

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

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol 96%, fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat dan fraksi air dari rimpang lempuyang gajah.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas ekstrak etanol 96% dan fraksi aktif dari rimpang lempuyang gajah terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*), yang meliputi % *immobility time* dan waktu ketahanan mencit ketika berenang dan menggelantung sebelum dan sesudah perlakuan.

Variabel kontrol dalam penelitian ini yaitu kondisi mencit yang meliputi berat badan, kondisi kandang, kondisi penelitian, dan kondisi pengamatan, prosedur pembuatan ekstrak dan fraksi.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Rimpang lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* (L). Smith) adalah akar umbi tanaman lempuyang gajah dari famili *Zingiberaceae*, digunakan sebagai ramuan tradisional karena memiliki kandungan aktif seperti terpenoid, flavonoid, alkaloid, saponin, tanin. Rimpang ini berpotensi sebagai imunostimulan pada budidaya ikan. membantu meningkatkan sistem pertahanan tubuh ikan dan bersifat ramah lingkungan (Affandi & Setyono, 2024)

Pertama, ekstrak etanol rimpang lempuyang gajah adalah ekstrak yang diperoleh dari rimpang lempuyang gajah menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

Kedua, fraksi *n-heksana* adalah fraksi yang diperoleh dari ekstrak etanol 96% rimpang lempuyang gajah yang dipartisi menggunakan pelarut *n-heksana* sebagai pelarut non polar.

Ketiga, fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n-heksana* dari ekstrak etanol 96% rimpang lempuyang gajah yang dipartisi menggunakan pelarut semi polar yaitu etil asetat.

Keempat, fraksi air adalah residu fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 96% rimpang lempuyang gajah yang dipartisi menggunakan pelarut polar yaitu air

Kelima, uji aktivitas tonikum adalah pengujian dengan metode uji gelantung dengan melihat durasi ketahanan mencit gelantung dan menghitung % *immobility time* untuk menentukan fraksi teraktif.

Keenam, fraksi teraktif adalah fraksi yang memiliki aktivitas tonikum paling besar atau sebanding dengan kontrol positif (kafein), ditunjukkan dengan durasi mencit menggantung dan % *immobility time* yang mendekati atau setara dengan kontrol positif.

Kedelapan, % *Immobility time* adalah waktu yang dihabiskan untuk mencit tidak bergerak atau badan,kaki dan tangan dalam keadaan diam. Efek tonikum yang kuat ditandai dengan nilai % *immobility time* yang rendah terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*).

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat-alat yang dipakai yaitu *Sterling-bidwell*, pipet tetes VWR 1 ml , batang pengaduk, ayakan no. 40, gelas ukur, tabung reaksi, beaker glass, spuit 1 ml, batang pengaduk, kertas saring, *rotary evaporator* (Buchi), corong, botol warna gelap, timbangan analitik, stopwatch,

kawat gantung, cawan penguap, chamber, lempeng KLT, lampu UV 254 nm dan 366 nm, lampu spiritus.

## **2. Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan meliputi simplisia rimpang lempuyang gajah., etanol 96% kualitas p.a. (pro analisis), kafein, Na-CMC, akuadesilata, serbuk magnesium, amil alkohol, serta berbagai reagen seperti Dragendorff, Mayer, Wagner,  $\text{AlCl}_3$  ammonia,  $\text{HCl}$  2N,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$  (p), metanol, kloroform, asam format, air, etil asetat, dan mencit putih jantan (*Mus musculus*). Etanol yang digunakan harus memiliki kemurnian tinggi sesuai dengan standar p.a. untuk menjamin ketepatan hasil analisis, sementara aquades yang digunakan harus memenuhi kualitas farmasi, yang berarti bebas dari kontaminan kimia atau mikroorganisme, sehingga aman digunakan dalam penelitian farmasi dan eksperimen biologis.

Bahan-bahan yang digunakan meliputi simplisia rimpang lempuyang gajah (*Mus musculus*), etanol 96%, kafein, Na-CMC, akuades, serbuk magnesium, amil alkohol, serta berbagai reagen seperti Dragendorff, Mayer, Wagner,  $\text{AlCl}_3$  ammonia,  $\text{HCl}$  2N,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$  (p), metanol, kloroform, asam format, air, etil asetat, dan mencit putih jantan (*Mus musculus*).

## **D. Jalannya penelitian**

### **1. Identifikasi tanaman**

Langkah pertama dalam penelitian ini adalah melakukan identifikasi pada tanaman rimpang lempuyang gajah. Proses ini bertujuan untuk memastikan keakuratan sampel dengan mengacu pada ciri-ciri morfologi tanaman rimpang lempuyang gajah yang telah terdokumentasi dalam pustaka. Identifikasi dilakukan di UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, untuk memastikan identifikasi yang tepat.

### **2. Pengambilan bahan**

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari kawasan Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Jenis sampel yang diambil adalah rimpang lempuyang gajah yang memiliki warna kuning kecoklatan, dalam kondisi baik, segar, utuh, serta tidak menunjukkan tanda-tanda kerusakan atau pembusukan. Pemilihan rimpang dengan kualitas yang baik sangat penting untuk memastikan hasil penelitian yang akurat dan dapat diandalkan.

Etika Penelitian

### 3. Etika penelitian

Sebelum melakukan penelitian, peneliti mengajukan permohonan ijin *ethical clearance* ditujukan untuk Komite Etika Rumah Sakit Moewardi Surakarta. Penelitian akan dilaksanakan setelah surat kelayakan *ethical clearance* dikeluarkan.

### 4. Pembuatan serbuk rimpang lempuyang gajah

Pembuatan serbuk rimpang lempuyang gajah dimulai dengan memilih rimpang yang segar dan bebas dari cacat, seperti kerusakan akibat serangga. Setelah pemilihan, rimpang dicuci bersih untuk menghilangkan kotoran, lalu diiris tipis dengan ketebalan sekitar 5 mm untuk mempercepat pengeringan. Rimpang yang telah diiris dijemur di tempat terlindung dari sinar matahari langsung selama satu minggu, untuk menghindari kerusakan senyawa aktif. Setelah kering, rimpang digiling menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus. Serbuk yang dihasilkan kemudian diayak menggunakan ayakan berukuran 40 mesh untuk mendapatkan partikel yang seragam, lalu serbuk disimpan dalam wadah tertutup dan gelap agar kualitasnya tetap terjaga. Proses ini memastikan bahwa serbuk rimpang lempuyang gajah siap digunakan dalam berbagai aplikasi, baik dalam penelitian maupun industri herbal (Aji dan Zakkiyah, 2021).

### 5. Penetapan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan rimpang lempuyang gajah dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Susut pengeringan bertujuan untuk mengetahui batasan maksimal pada banyaknya senyawa yang hilang akibat lamanya proses pemanasan. Penetapan susut pengeringan yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan perhitungan manual, proses pengujian yang cepat, dan instrumen yang lebih kecil dibandingkan metode gravimetri yang membutuhkan waktu relatif lama dan perhitungan secara manual. Persen yang membutuhkan pengeringan serbuk rimpang lempuyang gajah dicatat dengan membaca angka yang tertera pada alat *moisture balance* dan dihitung dalam satuan persen (%). Bobot dikatakan konstan apabila deviasi hasil penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 10% (Kemenkes, 2017). Proses pengukuran susut pengeringan rimpang lempuyang gajah ini dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

## 6. Pembuatan ekstrak etanol rimpang lempuyang gajah

Serbuk rimpang lempuyang gajah dimaserasi dengan pelarut etanol 96% (Kemenkes RI, 2017) dengan perbandingan antara sampel dan pelarut sebesar 1:10. Sebanyak sekitar 1000 g serbuk rimpang lempuyang gajah dimasukkan ke dalam bejana atau botol kaca berwarna gelap. Kemudian, 10 liter etanol 96% dituangkan ke dalam botol kaca hingga serbuk terendam sepenuhnya. Serbuk direndam sambil sesekali digoyang selama 6 jam pertama, lalu didiamkan selama 18 jam. Proses penyarian dapat diulang dua kali dengan menggunakan pelarut yang sama, di mana volume pelarut pada penyarian kedua adalah setengah dari volume pada penyarian pertama. Setelah itu, maserat disaring untuk memisahkan filtrat dari ampas menggunakan kain flanel. Filtrat yang terkumpul kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Rendemen ekstrak dihitung dengan membandingkan bobot ekstrak yang diperoleh dengan bobot serbuk rimpang lempuyang gajah, kemudian dikalikan dengan 100% (Kemenkes, 2017).

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

## 7. Penetapan kadar air ekstrak rimpang lempuyang gajah

Pengujian kadar air ekstrak dilakukan dengan metode destilasi untuk memastikan kadar air dalam ekstrak tetap dalam batas yang sesuai dengan standar mutu. Sebanyak 20 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat, lalu ditambahkan batu didih untuk memastikan pemanasan yang merata. Sekitar 200 mL toluena yang sudah jenuh air dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan dipanaskan selama 15 menit. Proses pemanasan ini dilakukan hingga tidak ada lagi penambahan air pada wadah penampung, yang menandakan bahwa seluruh air dalam sampel telah menguap sepenuhnya. Setelah air dan toluena terpisah dengan sempurna, volume air yang terkumpul dicatat untuk perhitungan kadar air dalam satuan % v/b (Kemenkes, 2017).

Menurut Farmakope Herbal Indonesia (FHI) Edisi II Tahun 2017, kadar air ekstrak rimpang lempuyang gajah tidak boleh lebih dari 10%. Batas kadar air ini ditetapkan untuk menjaga stabilitas ekstrak, mencegah pertumbuhan mikroorganisme, serta menghindari degradasi senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya. Kadar air yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penurunan kualitas ekstrak, sedangkan kadar air yang sesuai akan memastikan ekstrak tetap stabil selama penyimpanan dan penggunaan.

## 8. Fraksinasi ekstrak etanol rimpang lempuyang gajah

Ekstrak etanol rimpang lempuyang gajah ditimbang sebanyak 10 gram, kemudian dilarutkan menggunakan etanol 96% sebanyak 10 ml, lalu ditambahkan aquades sebanyak 105 mL. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah bersama *n*-heksana sebanyak 75 ml, dan dilakukan pemisahan fase secara bertahap (partisi) sampai bening. Hasil fraksinasi kemudian dipadatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, dan fraksi yang diperoleh ditimbang serta ditetapkan sebagai fraksi *n*-heksana.

Residu yang dihasilkan dari partisi *n*-heksana dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian ditambahkan etil asetat sebanyak 75 ml dan dipartisi hingga lapisan pelarut menjadi bening, menandakan bahwa senyawa yang dapat diekstraksi oleh pelarut tersebut telah terlarut sepenuhnya.. Hasil partisi ini dipadatkan kembali dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, dan fraksi yang terpisah ditimbang serta ditetapkan sebagai fraksi etil asetat (Noviyanty & Wahyuni, 2017).

Residu yang dihasilkan dari partisi etil asetat dipadatkan menggunakan waterbath pada suhu 50°C, kemudian ditimbang dan ditetapkan sebagai fraksi air. Penetapan persen rendemen dari masing-masing fraksi dilakukan dengan membagi bobot fraksi yang diperoleh dengan bobot ekstrak awal, lalu dikalikan 100% (Kemenkes, 2017). Proses fraksinasi ini dapat dilihat pada gambar 5.

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{berat fraksi}}{\text{berat ekstrak rimpang lempuyang gajah}} \times 100\%$$

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan air sebagai pelarut polar, yang efektif melarutkan senyawa-senyawa polar seperti saponin. Etil asetat digunakan sebagai pelarut semi-polar yang dapat menarik senyawa seperti alkaloid, flavonoid, dan polifenol (Pandey, 2014). Sementara itu, *n*-heksana, sebagai pelarut non-polar, efektif dalam menarik senyawa terpenoid (Dwisari *et al.*, 2016). Proses fraksinasi ini memungkinkan pemisahan berbagai senyawa berdasarkan polaritasnya, sesuai dengan karakteristik pelarut yang digunakan

## 9. Pengujian kandungan kimia rimpang lempuyang gajah

**9.1 Identifikasi alkaloid.** Untuk mengidentifikasi alkaloid, ekstrak sampel diuji dengan reagen Dragendorff. Sebanyak 1 mL reagen Dragendorff (larutan kalium iodida dan bismuth subnitrat) ditambahkan ke dalam ekstrak, di mana terbentuk endapan merah-oranye menandakan hasil positif. Pada metode ini, larutan ekstrak dicampur dengan 1 mL

reagen Mayer (larutan kalium iodida dan merkuri klorida), dan terbentuknya endapan putih atau kuning pucat menandakan keberadaan alkaloid (Fauzi *et al.*, 2021).

**9.2 Identifikasi flavonoid.** Flavonoid dapat diidentifikasi menggunakan uji alkohol magnesium. Ekstrak sampel dilarutkan dalam etanol, kemudian ditambahkan serbuk magnesium dan beberapa tetes HCl pekat. Positif flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi merah, oranye, atau ungu. Alternatif lain adalah dengan uji Wilstätter, di mana HCl pekat dan amil alkohol ditambahkan ke dalam larutan ekstrak, menghasilkan warna merah sebagai tanda positif adanya flavonoid (Putri *et al.*, 2022).

**9.3 Identifikasi saponin.** Saponin dapat diidentifikasi menggunakan uji buih. Ekstrak sampel dilarutkan dalam air suling dan dikocok kuat selama 10 menit. Adanya saponin ditandai dengan terbentuknya buih stabil yang tidak hilang selama lebih dari 10 menit. Untuk menghilangkan kemungkinan buih disebabkan oleh senyawa lain, sampel biasanya dipanaskan terlebih dahulu untuk memastikan hasilnya spesifik (Rahmawati *et al.*, 2023).

**9.4 Identifikasi terpenoid.** Uji tabung untuk mendeteksi senyawa terpenoid biasanya dilakukan dengan metode Liebermann–Burchard, yaitu dengan menambahkan anhidrida asetat dan asam sulfat pekat ke dalam ekstrak tumbuhan. Reaksi antara senyawa terpenoid dengan anhidrida asetat dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat menghasilkan perubahan warna khas seperti hijau, merah, ungu, atau biru pada batas kedua cairan, yang menandakan hasil positif. Uji ini sering digunakan dalam skrining fitokimia karena prosedurnya yang sederhana dan cepat dalam mengidentifikasi golongan triterpenoid dan steroid (Sari & Yuliastri, 2023). Metode ini juga diaplikasikan dalam berbagai penelitian ekstrak tanaman untuk menentukan kandungan metabolit sekunder aktif (Astuti *et al.*, 2022).

**9.5 Identifikasi tanin.** Uji tabung untuk identifikasi tanin dilakukan menggunakan pereaksi  $\text{FeCl}_3$ . Penambahan  $\text{FeCl}_3$  pada ekstrak akan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru kehitaman sebagai indikasi adanya tanin. Metode ini sederhana dan efektif untuk skrining awal tanin dalam berbagai bagian tanaman seperti daun, rimpang, buah, kulit batang, maupun serabut kelapa (Kasih *et al.*, 2022).

## 10. Uji KLT

**10.1 Alkaloid.** Alkaloid. Sampel ekstrak etanol dari rimpang lempuyang gajah dilarutkan dalam metanol dan ditotolkan pada plat silika gel GF254. Fase gerak yang digunakan adalah campuran kloroform:metanol:amonia. Setelah elusi, plat disemprot dengan pereaksi Dragendorff dan terbentuk noda berwarna ungu yang menunjukkan keberadaan alkaloid (Rosanti *et al.*, 2021).

**10.2 Flavonoid.** Sampel ekstrak etanol dari rimpang lempuyang gajah sebesar 20 mg dilarutkan dalam etanol dan ditotolkan pada plat silika gel GF254. Elusi dilakukan menggunakan fase gerak etil asetat:asam format:air (5:1:1). Setelah elusi, plat disemprot dengan pereaksi sitroborat dan diamati di bawah sinar UV 366 nm, fluoresensi kuning-hijau menunjukkan keberadaan flavonoid (Putri *et al.*, 2022).

**10.3 Saponin.** Sampel ekstrak etanol dari rimpang lempuyang gajah dilarutkan dalam metanol dan ditotolkan pada plat silika gel GF254. Elusi dilakukan menggunakan fase gerak n-butanol: asam asetat: air (4:1:5). Setelah elusi, plat disemprot dengan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5–10 menit hingga muncul noda ungu kemerahan pada plat. Hasil menunjukkan nilai Rf pada sampel sebesar 0,30–0,33, sesuai dengan kisaran Rf saponin pada sistem pelarut ini yang umumnya berada pada rentang 0,20–0,40, sehingga dapat menunjukkan keberadaan saponin pada ekstrak rimpang lempuyang gajah (Widyaningsih *et al.*, 2021).

**10.4 Terpenoid.** Identifikasi ini menggunakan silika gel sebagai fase diam dan pelarut seperti kombinasi *n*-heksana dan etil asetat sebagai fase gerak. Skrining fitokimia sering dilakukan dengan pereaksi seperti *Lieberman-Buchard* atau vanillin-asam fosfat untuk mendeteksi senyawa terpenoid. Reaksi positif ditandai dengan munculnya bercak berwarna merah keunguan atau biru pada plat KLT. KLT juga memungkinkan pemantauan kemurnian senyawa dengan mengamati pola pemisahan dan menghitung nilai Rf (rate of flow), sehingga fraksi-fraksi dengan pola yang sama dapat digabungkan untuk memperoleh isolat murni yang dapat dianalisis lebih lanjut (Dwisari *et al.*, 2016; Fauzia *et al.*, 2021).

**10.5 Tannin.** Sampel ekstrak etanol dari rimpang lempuyang gajah dilarutkan dalam metanol dan ditotolkan pada plat silika gel GF254. Elusi dilakukan menggunakan fase gerak n-butanol:asam asetat:air (4:1:5). Setelah elusi, plat disemprot dengan larutan FeCl<sub>3</sub> 5%



sebagai pereaksi sempnot; munculnya noda hitam menunjukkan keberadaan tannin (Harborne *et al.*,1998).

### **11. Uji bebas etanol ekstrak rimpang lempuyang gajah**

Uji bebas etanol dilakukan untuk memastikan tidak adanya sisa etanol dalam ekstrak karena sisa etanol dapat mempengaruhi hasil uji farmakologi maupun keamanan produk herbal. Dalam penelitian Mulyati *et al.* (2024), uji bebas etanol pada ekstrak dilakukan dengan menambahkan asam asetat ( $\text{CH}_3 \text{COOH}$ ) dan asam sulfat pekat ( $\text{H}_2 \text{SO}_4$ ) ke dalam sejumlah ekstrak, lalu dipanaskan untuk memicu reaksi esterifikasi. Hasil pengujian dikatakan positif apabila tercium bau ester yang khas setelah pemanasan, yang menunjukkan masih terdapat kandungan etanol pada ekstrak. Apabila hasilnya positif, maka perlu dilakukan proses penguapan ulang hingga benar-benar tidak tercium bau ester agar kualitas ekstrak terjamin sebelum digunakan dalam pengujian aktivitas farmakologi, seperti uji tonikum. Pengujian ini menjadi penting dalam menjamin kemurnian dan keamanan sediaan herbal karena sisa etanol dapat mempengaruhi interpretasi hasil, terutama pada uji aktivitas tonikum maupun antibakteri (Mulyati *et al.* 2024)

### **12. Pembuatan larutan uji**

**12.1 Pembuatan Larutan Na CMC 0,5%.** Larutan Na CMC 0,5% dibuat dengan menimbang serbuk Na CMC 0,5 grm masukkan dalam mortir, kemudian digerus dan ditambahkan air panas sebanyak 1 ml, biarkan beberapa menit, kemudian digerus kembali sampai homogen. Selanjutnya tambahkan aquadest, masukkan ke dalam beaker glass 100 ml dan tambahkan aquadest sampai tanda batas. Pemilihan larutan Na CMC 0,5% dikarenakan larutan emulsi tidak mempengaruhi penurunan kadar glukosa darah dan juga digunakan sebagai control negatif.

**12.2 Pembuatan Larutan stok kontrol positif.** Kafein merupakan kontrol positif yang digunakan sebagai tonikum dengan dosis sebesar 13 mg/Kg BB (Turner 1965). Mencit dengan bobot 20 gram dosisnya 2 mg. Volume maksimal pemberian per oral pada mencit sebesar 1 ml, sehingga volume yang diberikan hanya setengahnya yaitu 0,5 ml. Larutan stok 25 ml. Kafein 100 mg disuspensikan ke dalam 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

**12.3 Pembuatan Larutan Ekstrak dan Fraksi rimpang lempuyang gajah.** Ekstrak etanol atau fraksi rimpang lempuyang gajah ditimbang sebanyak 400 mg. Masukkan Na. CMC 0,5% ditaburkan diatas air panas pada mortir, tunggu hingga Na CMC mengembang lalu aduk hingga homogen. Masukkan ekstrak atau fraksi ke dalam mortir aduk hingga homogen, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, dan tambahkan aquadest sampai tanda batas. Larutan yang telah siap diberikan secara oral pada hewan uji.

### **13. Pengelompokan perlakuan hewan uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan dengan berat rata-rata antara 20-30 gram, sebanyak 25 ekor yang dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut:

Kelompok I : kontrol negatif diberi Na CMC 0,5% per oral

Kelompok II : kontrol positif diberi kafein 13 mg/kg BB mencit per oral

Kelompok III : perlakuan ekstrak etanol 96% dosis 400 mg/kg BB mencit per oral

Kelompok IV : perlakuan fraksi n heksan setara dengan dosis ekstrak

Kelompok V : perlakuan fraksi etil asetat setara dengan dosis ekstrak

Kelompok VI : perlakuan fraksi air setara dengan dosis ekstrak

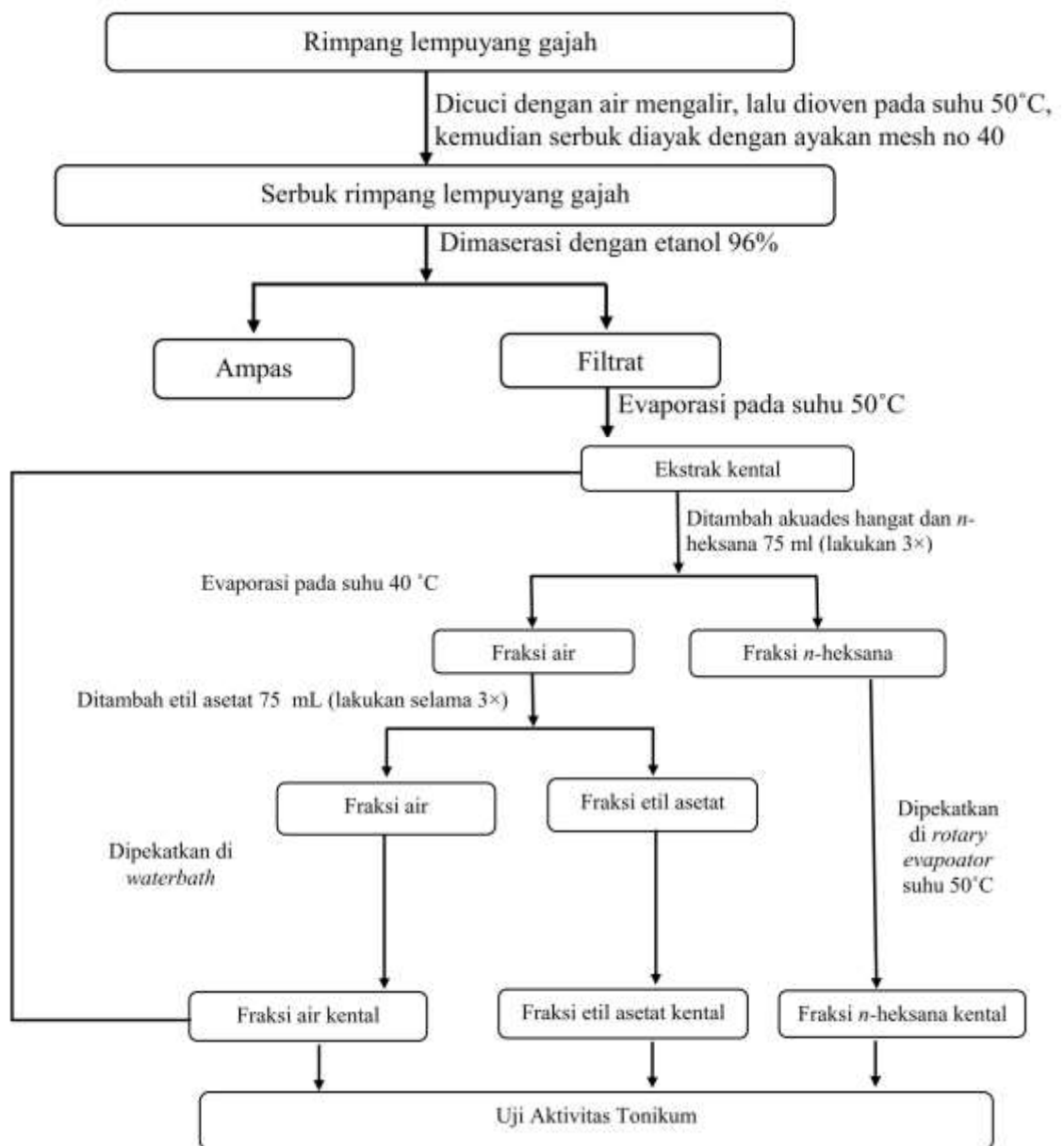
Pengujian dosis efektif ekstrak dan efek tonikum dari fraksi rimpang lempuyang gajah dilakukan dengan menggunakan desain penelitian *pretest-posttest control group*. Metodologi ini merupakan pengamatan yang dilakukan pada dua tahap, yaitu sebelum dan setelah perlakuan uji. Uji efek tonikum sendiri dilakukan pada hari ke-9 setelah proses aklimatisasi hewan uji yang berlangsung selama satu minggu. Pada tahap ini, mencit yang akan digunakan dalam percobaan direndam untuk memastikan bahwa mencit dalam kondisi baik sebelum menerima perlakuan dengan sediaan uji.

### **14. Prosedur uji efek tonikum**

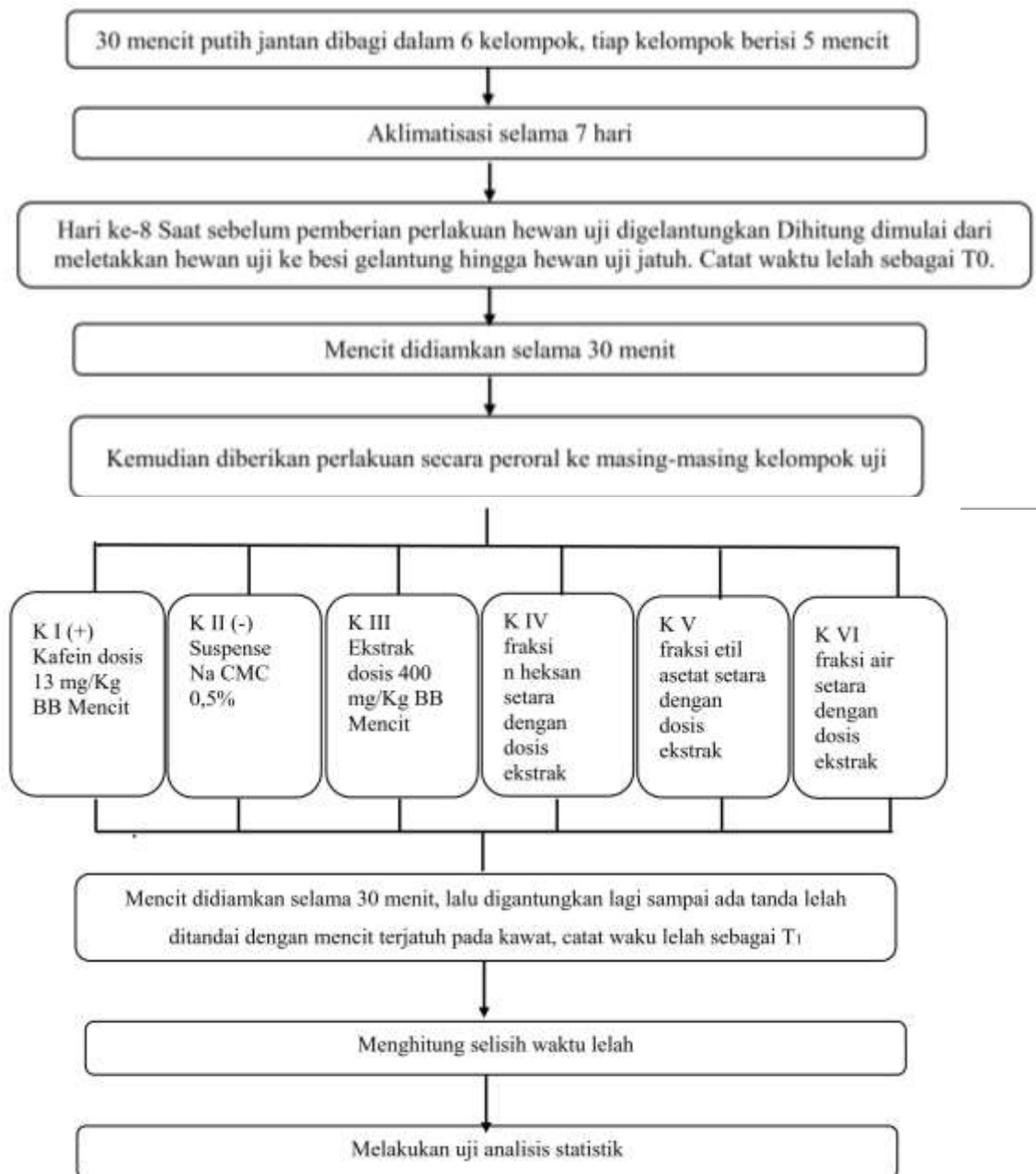
Hewan uji diaklimatisasi dengan lingkungan sekitar 7 hari serta sebelum perlakuan, hewan uji dipuasakan selama 8 jam sebelum perlakuan untuk memastikan lambung dalam keadaan kosong sehingga penyerapan sediaan uji optimal. Kemudian mencit diberi larutan kontrol positif dan negatif serta larutan sediaan uji sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan. Pemberian sediaan pada hewan uji dilakukan dengan cara per oral. Penelitian ini menggunakan metode uji gelantung untuk

mengevaluasi daya tahan mencit sebelum dan setelah pemberian perlakuan. Sebelum pemberian sediaan, mencit diletakkan pada kawat gelantung yang dipasang secara horizontal dengan ketinggian 20 cm di atas permukaan lantai, dan waktu dicatat mulai dari saat mencit digantungkan hingga mencit terjatuh. Setelah sesi ini, mencit didiamkan selama 30 menit, kemudian diberikan perlakuan sediaan kontrol negatif (Na-CMC 0,5%) kontrol positif (kafein), serta dosis perlakuan dari ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air. Setelah pemberian perlakuan, mencit didiamkan kembali selama 30 menit, kemudian diletakkan pada kawat gelantung. Data yang diperoleh yaitu waktu tubuh mencit putih jantan (*Mus musculus*) bergelantung (Mulyati *et al.*, 2024).

### E. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi rimpang lempuyang gajah



**Gambar 6. Skema kerja penellitian metode uji gantung**

## F. Analisis Data

Dalam penelitian ini, analisis data yang didapatkan berupa data penambahan daya tahan tubuh mencit jantan (*Mus musculus*). Data dianalisis dengan menggunakan *software* SPSS. Analisis data hasil pengukuran daya tahan tubuh dimulai dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk Test* untuk menentukan apakah data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Data dikatakan homogen jika  $p > 0,05$ . Jika data menunjukkan distribusi normal, data homogen dilanjutkan uji parametrik menggunakan metode *ANOVA*. Data tidak terdistribusi normal ( $p < 0,05$ ) dapat dilakukan analisis secara non parametrik dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test*. Metodologi ini memberikan pemahaman yang jelas mengenai dampak perlakuan yang diberikan kepada mencit.