

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah seluruh objek sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.) yang dari lokasi tanam dengan ketinggian yang berbeda di Kabupaten Karanganyar.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rimpang lengkuas yang diambil secara acak pada lokasi tanam yang berbeda ketinggian yaitu dari Kecamatan Jaten dengan rata-rata ketinggian 90 mdpl, Kecamatan Jumantono 450 mdpl, Kecamatan Jenawi dengan ketinggian lokasi tanam 900 mdpl, dengan usia tanaman 2,5 sampai 4 bulan (Bermawie et al., 2015).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini yaitu kualitas ekstrak dan profil senyawa metabolit sekunder etanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang teridentifikasi diklasifikasikan kedalam beberapa variabel, yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel terikat.

Variabel bebas adalah variabel yang diubah-ubah secara sengaja untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perbedaan ketinggian lokasi tanam rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.).

Variabel terikat adalah variabel yang akan dipengaruhi oleh variabel bebas. Kualitas ekstrak etanol dan kadar senyawa metabolit sekunder ekstrak etanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.) merupakan Variabel terikat dalam penelitian ini.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dianggap memberikan pengaruh terhadap variabel terikat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah karakter morfologi rimpang lengkuas sesuai dengan kriteria, usia panen rimpang dan metode ekstraksi.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Definisi operasional variabel utama, adalah definisi yang berdasarkan pada sifat hal yang dapat diamati dan diperlukan bagi peneliti lain yang akan menguji kembali penelitian ini.

Pertama, Lokasi pengambilan sampel di dataran rendah di kecamatan Jaten dengan rata-rata ketinggian 90 mdpl, dataran sedang adalah kecamatan Jumantono 450 mdpl; dan di dataran tinggi adalah kecamatan Jenawi dengan ketinggian lokasi tanam 1000 mdpl.

Kedua, rimpang lengkuas adalah bagian tanaman lengkuas yang merupakan modifikasi batang tanaman yang tumbuh di bawah permukaan tanah dengan usia tanaman 2,5 sampai 4 bulan.

Ketiga, ekstrak rimpang lengkuas berupa sediaan galenik yang telah dipekatkan dari hasil ekstraksi zat aktif dari simplisia rimpang lengkuas menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi.

Keempat, standardisasi adalah serangkaian identifikasi dan pengukuran parameter spesifik dan non spesifik terhadap simplisia dan ekstrak etanol rimpang lengkuas yang dibandingkan dengan persyaratan dalam monografi Farmakope Herbal Indonesia Edisi II Tahun 2017.

Kelima, non spesifik pada aspek fisika meliputi pengujian kadar susut pengeringan, kadar air, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam.

Keenam, parameter parameter spesifik adalah pengujian pada senyawa aktif dalam sampel meliputi uji identitas tanaman, uji kandungan senyawa pada pelarut air dan etanol, serta uji kandungan kimia berdasarkan profil metabolit sekunder dengan standar pembanding eugenol metode high performance thin layer chromatography (HPTLC).

Ketujuh, Principle Component Analysis (PCA) adalah metode statistik yang digunakan untuk analisis data multivariate nilai Rf dan luas area pada profil kromatogram seluruh sampel.

Kedelapan, Hierarchical Clustering Analysis (HCA) adalah metode statistik untuk mengelompokkan data Rf dan luas area profil kromatogram seluruh sampel ke dalam klaster berdasarkan tingkat kemiripan atau perbedaannya.

Kedelapan perbedaan dan pengaruh letak ketinggian tanam lengkuas terhadap hasil parameter kadar susut pengeringan, kadar air, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air dan etanol dianalisa secara statistika dengan Pearson Correlation.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas (Pyrex iwaki), erlenmayer (Pyrex iwaki), labu takar (Pyrex iwaki), tabung reaksi (Pyrex iwaki), Whatman filter paper, corong buchner (Pyrex iwaki), aluminum foil, chamber, ayakan mesh 40, penggiling simplisia (lokal), cawan porselen, desikator, pipet volume (Pyrex iwaki), Krus porselen, Muffle Furnace (Thermo Scientific), mikropipet (Thermo Scientific), oven simplisia (Memmert), rotary evaporator (RRC), timbangan analitik (Ohaus) dan water bath (memmert), mikropipet (Socorex), lampu UV 254 dan 366 nm, HPTLC Scanner 4 (Camag), Autosampler Linomat 5 (Camag).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.) yang diperoleh dari tiga lokasi tanam dengan ketinggian yang berbeda, etanol 70% (E-Merck), etanol proanalisa (Merck), metanol proanalisa (Merck), kloroform proanalisa (Merck), etil asetat proanalisa (Merck), aquadest, toluena proanalisa (Merck), lempeng Silica Gel F254, kertas saring whatmann.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan Sampel

Rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.) dilakukan sampling secara acak dari tiga lokasi tanam dengan ketinggian yang berbeda yaitu dari Kecamatan Jaten dengan rata-rata ketinggian 90 mdpl, Kecamatan Jumantono 450 mdpl; Kecamatan Jenawi dengan ketinggian lokasi tanam 1000 mdpl pada bulan Maret 2022. Sampel rimpang lengkuas dipilih dengan usia tanaman 2,5 sampai 4 (Bermawie et al., 2015).

2. Determinasi dan Identifikasi Tanaman

Sampel rimpang lengkuas dilakukan determinasi tanaman di UPT Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Seluruh bagian tanaman dilakukan pengujian untuk memastikan bahwa sampel yang diperoleh merupakan sampel tanaman dengan identitas lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.).

3. Pembuatan dan Penyerbukan Simplisia

Rimpang lengkuas dilakukan sortasi basah dan dibersihkan dari kotoran menggunakan air mengalir. Hasil sortasi selanjutnya dilakukan

perajangan dengan ukuran ± 3 cm. Rimpang basah kemudian dikeringkan dengan lemari pengering simplisia pada suhu kurang lebih 40°C

Simplisia lengkuas diserbuk dengan menggunakan penggiling simplisia. Serbuk selanjutnya diayak dengan mesh 60.

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.)

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk simplisia rimpang lengkuas direndam dalam pelarut etanol 70%. Perbandingan serbuk dengan pelarut adalah 1:10 bagian.

Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 100 gram dimasukkan ke dalam botol maserasi. Sebanyak 750 ml atau $\frac{3}{4}$ bagian volume pelarut dimasukkan ke dalam botol maserasi untuk selanjutnya dilakukan perendaman selama 3 hari sambil dilakukan penggojogan sesekali, kemudian disaring menggunakan kain flanel dan kertas saring. Ampas selanjutnya diremaserasi selama 2 hari menggunakan sisa $\frac{1}{4}$ volume pelarut, masing-masing sebanyak 250 ml dengan perlakuan yang sama sesuai perlakuan awal. Ekstrak cair yang diperoleh dipekatkan dengan vacum rotary evaporator pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental.

5. Penetapan Susut Pengeringan

Serbuk simplisia ditimbang saksama 1 sampai 2 gram dalam botol timbang tutup dangkal yang telah dikalibrasi, serbuk diratakan dalam botol timbang, selanjutnya dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C hingga diperoleh bobot tetap. Kadar susut pengeringan dihitung dalam %.

6. Penetapan Kadar Abu Total

Sampel ditimbang sebanyak 2 sampai 3 gram dengan seksama dan dimasukkan ke dalam krus porselin yang telah dipijar dan dikalibrasi, selanjutnya pemijaran dilakukan secara perlahan-lahan hingga pada suhu $800 \pm 25^{\circ}\text{C}$ sampai arang habis, kemudian dinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam %.

Jika terdapat sisa arang yang tidak dapat dihilangkan, ditambah air panas kemudian diaduk, selanjutnya disaring menggunakan kertas saring bebas abu. Filtrat dimasukkan kembali ke dalam krus. Filtrat dan kertas saring sisa penyaringan tersebut selanjutnya dipijarkan dalam krus yang sama. Kemudian diuapkan dan dipijarkan hingga diperoleh bobot tetap.

7. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total selanjutnya dididihkan selama 5 menit dengan pelarut 25 mL asam klorida encer LP, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, dan disaring dengan kertas bebas abu, dan residu dicuci dengan air panas, dipijarkan pada suhu 800 ± 25 °C dalam krus hingga tercapai bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam %.

8. Penetapan Kadar Air

Sampel ekstrak ditimbang seksama kurang lebih 10g, kemudian di masukkan dalam wadah yang telah dikalibrasi sebelumnya. Ekstrak dikeringkan dengan oven pada suhu 105 °C selama 5 jam dan ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang dengan interval waktu penimbangan 1 jam sampai diperoleh selisih bobot dua kali penimbangan berturut-turut kurang dari 0,25% dari bobot awal

9. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Serbuk simplisia kering ukuran 4/18 ditimbang saksama sebanyak 5 g diekstraksi dengan 100 mL air jenuh kloroform dalam erlenmeyer bersumbat. Selanjutnya dilakukan pengocokan selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan selama 18 jam dan disaring. Diambil 20,0 mL filtrat dimasukkan kedalam cawan porselen beralas datar yang telah dipanaskan dan dikalibrasi sebelumnya. Filtrat selanjutnya diuapkan pada suhu 105 °C hingga diperoleh ekstrak kering hingga diperoleh bobot tetap. Kadar sari larut air dihitung dalam %.

10. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Serbuk simplisia kering dengan ukuran 4/18 ditimbang saksama sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer bersumbat, kemudian ditambahkan 100 mL etanol Proanalisa. Simplisia dalam erlenmeyer tersumbat kemudian dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan selama 18 jam dan disaring, sebanyak 20,0 mL filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan porselen beralas datar yang telah dipanaskan 105 °C dan dikalibrasi sebelumnya, sisa ekstrak dipanaskan kembali hingga diperoleh bobot tetap. Kadar sari larut air dihitung dalam %.

11. Uji Profil Metabolit Sekunder

11.1 Optimasi Fase Gerak. Ekstrak Etanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.) ditimbang 100 mg, kemudian dilarutkan dalam etanol sebanyak 1 mL. Masing-masing sampel ditotolkan

sebanyak 5µl dengan menggunakan autosampler linomat 5 pada fase diam lempeng silica gel F254 ukuran 20x10 cm, dilakukan optimasi dengan tiga komposisi fase gerak, kombinasi toluena : aseton (9:1); heksan : etil asetat (7:3); metanol : kloroform (8:2) (Hadya, 2018; Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

Masing-masing komposisi fase gerak yang telah diukur, dijenuhkan terlebih dahulu menggunakan kertas saring yang dimasukkan dalam chamber. Kondisi jenuh dapat diamati pada kertas saring yang basah menyerap fase gerak. Setelah itu fase diam dimasukkan dalam chamber sampai tereluasi sempurna. Hasil eluasi kemudian diamati pada lampu UV 254nm dan 366nm. Kemudian dilakukan penyemprotan dengan pereaksi Anisaldehida asam sulfat sebagai penampak bercak dan dipanaskan diatas hotplate dengan suhu 105°C selama 5 menit dan diamati kembali (Chorida M, 2018).

11.2 Uji Validasi Metode. Fokus validasi profil senyawa metabolit sekunder metode high performance thin layer chromatography (HPTLC) adalah dengan identifikasi profil sidik jari, seperti nilai Rf dan pita warna. Hasil yang diperoleh dari langkah validasi dievaluasi sesuai dengan parameter uji stabilitas analit pada lempeng silica gel, uji presisi, dan linieritas (Schibli dan Reich, 2006).

Uji stabilitas analit pada lempeng silica gel dilakukan identifikasi pada pola kromatogram HPTLC yang stabil pada penotolan 0 menit, 2 menit, 5 menit, 10 menit, 20 menit, 30 menit, 60 menit (Astuti M et al., 2018).

Uji presisi dilakukan tiga kali pengujian pada hari yang sama dari analisis profil metabolit sekunder serta pengulangan nilai Rf pada masing-masing pita. Variasi nilai Rf dari ketiga pita terpilih masing-masing kurang atau sama dengan 0,02 dan 0,05 (Astuti M et al., 2018). Pengujian pada hari yang sama dari analisis profil metabolit sekunder serta pengulangan nilai Rf pada masing-masing pita. Variasi nilai Rf dari ketiga pita terpilih masing-masing kurang atau sama dengan 0,02 dan 0,05 (Astuti M et al., 2018).

Uji linieritas dilakukan dengan pembuatan deret kurva baku standar eugenol sebanyak 4 konsentrasi. Dipipet 100µl eugenol standar kemudian ditambahkan sampai dengan 1000µl metanol (konsentrasi 1.000 ppm), kemudian dilakukan pengenceran dengan seri konsentrasi 50; 60; 80; 90 µl/ml dengan perhitungan dalam lampiran 12.

11.3 Uji Profil Metabolit Sekunder. Ekstrak etanol rimpang

lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.) ditimbang secara tepat dan teliti sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan dalam etanol sebanyak 1 ml (konsentrasi 1.000 ppm) lalu disaring dengan whatman filter paper. Sampel yang telah disaring ditotolkan menggunakan autosampler linomat 5 masing-masing 5µl pada fase diam Lempeng KLKT Silica Gel 60 F254 ukuran 20x10 cm yang telah diaktivasi. Kemudian dieluasi dengan fase gerak terpilih yaitu toluena: aseton (9:1) dengan penampak bercak digunakan anisaldehida asam sulfat. Hasil eluasi kemudian dianalisis menggunakan HPTLC Scanner-4 (Camag) pada UV 254nm dan 366nm dan direplikasi sebanyak 3 kali (Chorida M, 2018). Nilai Rf diidentifikasi sebagai hasil analisa kualitatif sampel. Nilai area under curve (AUC) atau disebut juga sebagai luas area yang teridentifikasi merupakan hasil analisa kuantitatif (Rubiyanto, 2016).

12. Analisis Data

Hasil uji susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar air sebagai parameter non spesifik dan kadar sari larut air, kadar sari larut etanol sebagai parameter spesifik dianalisis dengan diskriptif komparatif terhadap acuan monografi Farmakope Herbal Indonesia Edisi II tahun 2017. Adanya pengaruh antara hasil uji parameter spesifik dan non spesifik sampel dengan ketinggian lokasi tanam rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Sw.) diuji secara statistika menggunakan analisis korelasi Pearson Correlation untuk mengetahui nilai signifikansi yang menunjukkan adanya hubungan antar variabel dengan tingkat kepercayaan 95% menggunakan IBM SPSS stasitik 26.

Identifikasi metabolit sekunder ekstrak etanol rimpang lengkuas dari tiap sampel dilakukan analisis pada nilai Rf, AUC dan hasil identifikasi komponen minyak atsiri eugenol dinyatakan sebagai profil metabolit dan diolah dengan menggunakan principle component analysis (PCA) dan hierarchical clustering analysis (HCA) untuk mengetahui kedekatan profil antar sampel dan dapat dikelompokkan berdasarkan perbedaan maupun persamaan pada masing-masing sampel.