

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental. Rancangan penelitian ini dimulai dengan pengumpulan sampel, determinasi tumbuhan kelakai, pembuatan simplisia, pembuatan infusa daun kelakai, pembuatan sirup dengan mengembangkan formulasi sediaan sirup daun kelakai dengan ekstraksi secara panas yaitu infusa. Sediaan sirup dibuat lima formulasi dengan berbagai konsentrasi infusa daun kelakai yang berbeda yaitu 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%. Sirup yang dihasilkan kemudian dilakukan uji evaluasi dan hasil uji disajikan sebagai hasil penelitian.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tumbuhan kelakai (*Stenochlaena palustris (Burm.F) Bedd*).

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah daun kelakai (*Stenochlaena palustris(Burm.F) Bedd*) diambil bagian daun tua.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah infusa kelakai dengan konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, 30%.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil uji evaluasi sediaan sirup yang meliputi uji organoleptis, stabilitas, cemaran mikroba, hedonik, homogenitas, pH, kejernihan, viskositas, bobot jenis, dan volume terpindahkan.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat gelas (*pyrex, iwaki*), timbangan analitik (*ohaus*), pH *universal*, piknometer, *waterbath*, *viscometer stormer* tipe *NDJ-5s*, ayakan mesh No. 40, botol sirup 100 mL, inkubator, *Laminar Air Flow Cabinet (L AFC)*, autoklaf, bunsen.

2. Bahan

Serbuk daun kelakai, gula, sirup jagung, pewarna dan perasa anggur, natrium benzoat, asam sitrat, air, hidrogen klorida, *reagen Dragendorf*, *reagen Mayer*, *reagen Wagner*, besi (III) klorida, larutan *Liebermann-Burchard*, natrium klorida, media *Plate Count Agar (PCA)*, akuadest steril.

E. Pengumpulan Bahan

Pengumpulan bahan tumbuhan kelakai dilakukan secara langsung diambil di Kelurahan Palam, Kecamatan Cempaka, Kota Banjarbaru, Provinsi Kalimantan Selatan. Bagian kelakai yang diambil adalah bagian daun tua dikumpulkan sebanyak 1 kg.

F. Determinasi

Determinasi tumbuhan kelakai dilakukan di Laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lambung Mangkurat.

G. Pembuatan Simplisia

Tumbuhan kelakai yang sudah dikumpulkan kemudian disortasi basah untuk memisahkan bagian daun tua, batang dan kotoran-kotoran lalu daun kelakai tua dicuci dengan air bersih. Setelah dicuci bersih, daun kelakai dirajang dengan ukuran potongan kecil-kecil lalu dikeringkan kemudian daun kelakai yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender, setelah itu diayak memakai ayakan mesh No.40 hingga mendapatkan serbuk daun kelakai.

H. Pembuatan Infusa Serbuk Daun Kelakai

Menimbang masing-masing serbuk daun kelakai sebanyak 10 g, 15 g, 20 g, 25 g, dan 30 g, kemudian membasahi serbuk kelakai dengan air sebanyak 2x bobotnya setelah itu air dimasukkan sampai 100 mL. lalu dipanaskan di *waterbath* mencapai suhu 90° C selama 15 menit. Setelah infusa dipanaskan selama 15 menit sambil sesekali diaduk, kemudian

cairan infusa disaring dengan menggunakan kain flanel saat cairan masih panas (Savitri *et al.*, 2021). Untuk mencukupi volume infusa yang menyusut maka ditambahkan air mendidih melalui ampasnya kemudian disaring dan ditambahkan sampai batas volume (Ibrahim *et al.*, 2019).

I. Skrining Fitokimia

1. Uji Flavonoid

Memasukkan 5 mL larutan uji kedalam tabung reaksi kemudian menambahkan 1 gram bubuk Magnesium dan 1 mL Larutan asam klorida pekat. Setelah itu tabung reaksi digojok. Perubahan warna larutan menjadi kuning, jingga, dan merah menunjukkan adanya flavonoid (Oktavia *et al.*, 2020).

2. Uji Saponin

Memasukkan 5 mL larutan uji ke dalam tabung reaksi, kemudian menambahkan 10 mL air, kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik, setelah itu, biarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa atau buih yang bertahan selama 10 menit tidak hilang kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan HCl 2N maka kemudian digojok, kalau tetap terbentuk busa maka menunjukkan adanya saponin (Oktavia *et al.*, 2020).

3. Uji Alkaloid

Memasukkan 5 mL larutan uji dengan 2 mL larutan HCl 2N kedalam tabung reaksi. Setelah itu, masukkan 1 mL sampel uji kedalam reaksi tabung reaksi 1, 2 dan 3. Setelah itu, masukkan 2

tetes *reagen Mayer* kedalam tabung 1, memasukkan 2 tetes *reagen Wagner* kedalam tabung 2, dan memasukkan 2 tetes *reagen Dragendorf* kedalam tabung 3 kemudian digojok. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada tabung 1, endapan coklat pada tabung 2, dan endapan jingga pada tabung 3 (Oktavia *et al.*, 2020).

4. Uji Tanin

Memasukkan beberapa tetes larutan FeCl_3 1% sebanyak 5 mL larutan uji ke dalam tabung reaksi kemudian tabung reaksi digojok. Hasil positif menunjukkan adanya perubahan warna menjadi biru tua atau hijau (Novindriani *et al.*, 2014; Novia, 2020).

5. Uji Steroid dan Triterpenoid

Memasukkan 5 mL larutan uji ke dalam tabung reaksi dengan menambahkan beberapa tetes larutan *Liebermann-Burchard*, kemudian tabung reaksi digojok. Hasil positif steroid menunjukkan warna hijau-biru sedangkan triterpenoid menghasilkan warna merah-ungu.

J. Formulasi Sirup Daun Kelakai

Tabel 1. Pengembangan Formulasi Sirup

Bahan	Konsentrasi (gr/mL) / (b/v)				
	F1	F2	F3	F4	F5
Infusa kelakai	10	15	20	25	30
Gula	15	15	15	15	15
sirup jagung	15	15	15	15	15
Asam sitrat	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
Natrium benzoat	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Pewarna & pengaroma	qs	qs	qs	qs	qs
Air	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

(

K. Pembuatan Sirup

Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan lalu bahan ditimbang. Pembuatan sirup dimulai dengan memasukkan infusa daun kelakai kedalam gelas beker, kemudian memasukkan gula, sirup jagung, asam sitrat, natrium benzoat, pewarna dan pengaroma lalu ad air hingga 100. Setelah itu dipanaskan diatas hot plate sambil diaduk hingga semua terlarut. Setelah gula larut matikan *hotplate* kemudian sirup didinginkan lalu masukkan sirup kedalam botol. Kemudian dilakukan uji evaluasi sirup (Palimbong *et al*, 2020).

L. Evaluasi Sirup

1. Uji organoleptik

Penampakan fisik sediaan sirup diuji secara organoleptik dengan mengamati warna, bau dan rasa sediaan (Suryanita & Hasma, 2021)

2. Uji homogenitas

Uji homogenitas dilakukan pada sirup yang sudah jadi dengan menuangkan sampel kedalam gelas beker kemudian mengamati bagian yang tidak tercampur dengan baik. Sirup yang baik bersifat stabil, homogen dan tidak keruh (Ermawati *et al.*, 2020).

3. Uji pH

Mencelupkan pH meter kedalam sediaan uji kemudian menunggu beberapa saat hingga hasil ditampilkan dengan angka yang tertera dilayar. Pengujian diulang 3 kali pada pH sirup yang tepat adalah berkisar antara 4-7 (Ermawati *et al.*, 2020).

4. Uji kejernihan

Mengamati kejernihan sediaan dengan melihat langsung. Hasil uji sediaan sirup harus jernih dan bebas dari segala kotoran dan partikel-partikel (Ermawati *et al.*, 2020).

5. Uji viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan *Viskometer Stormer*. Prosedur kerja untuk penentuan viskositas dengan *Viskometer Stormer* adalah :

- a. Memasukkan sirup kedalam gelas beker.
- b. Memasang alat *viskometer* kemudian memasukkan spindle kedalam sediaan.
- c. Mengatur kecepatan dan amati angka yang ditampilkan pada saat konstan kemudian mencatat angka yang sudah tertera.

6. Uji bobot jenis

Menimbang piknometer kosong yang bersih dan kering kemudian hasil dicatat, setelah itu menimbang piknometer yang telah diisi dengan akuadest hingga penuh lalu mencatat hasil, setelah itu membersihkan piknometer kemudian dikeringkan lagi. Menimbang piknometer yang telah diisi dengan sampel sirup sampai penuh kemudian mencatat hasil. volume piknometer dihitung menggunakan rumus bobot jenis. (Ermawati *et al.*, 2020).

7. Uji volume terpindahkan

Mengkalibrasi botol 100 mL terlebih dahulu dan memberi tanda. Setelah itu, menuangkan sirup kedalam botol 100 mL sampai tanda batas kalibrasi. Kemudian menuang sirup kedalam gelas ukur untuk melihat volume yang dituang dan keakuratan kalibrasi (Fickri, 2018).

8. Uji stabilitas

Uji stabilitas menggunakan metode *freeze thaw* untuk melihat stabilitas sirup setelah disimpan pada suhu yang berbeda yaitu 4⁰ C dan 31⁰ C selama 24 jam. Penyimpanan dilakukan dalam satu siklus dan dilakukan sebanyak enam siklus selama enam hari pada masing-masing suhu. Sirup setelah diolah kemudian disimpan dalam lemari es (4⁰C) selama enam siklus, kemudian dilanjutkan dengan menyimpan sirup pada suhu kamar (suhu 31⁰C) pada waktu yang sama. Kemudian diamati organoleptis, homogenitas, kejernihan, pH, volume terpindahkan, bobot jenis, viskositas.

9. Uji hedonik

Uji hedonik dilakukan terhadap 5 responden dengan menilai rasa, bau, dan warna dari lima formulasi yang sudah dibuat, yaitu panelis menilai dari 1-5 dengan berdasarkan skor tingkat kesukaannya.

10. Uji angka lempeng total

Uji angka lempeng total dilakukan di Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit (BBTKLPP) Banjarbaru. Metode yang dipakai yaitu uji angka lempeng total atau *Uji Total Plate Count* (TPC). menyiapkan 5 tabung reaksi, masing-masing memasukkan larutan NaCl sebanyak 9 mL. Pipet sampel sebanyak 10 mL kemudian memasukkan kedalam NaCl fisiologis steril 90 mL (Pengenceran 10^{-1}). Dari larutan pengenceran 10^{-1} pipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi 9 mL NaCl pengencer (Pengencer 10^{-2}). Pengenceran selanjutnya dibuat sampai pengenceran 10^{-6} . Masing-masing pengenceran yang telah dibuat pipet sebanyak 1 mL setelah itu memasukkan kedalam cawan petri. Masukkan 15-20 mL media NA setelah itu kedalam lima cawan petri kemudian ratakan dengan menggoyangkan cawan petri hingga tersebar merata. Setelah media menjadi padat, cawan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24-48 jam dengan posisi terbalik. Kemudian amati (Suzanni *et al.*, 2021).

M. Pengolahan dan Analisis data

Data hasil penelitian uji organoleptis, homogenitas, kejernihan, dan hedonik dilakukan secara deskriptif. Data hasil uji pH, viskositas, bobot jenis, volume terpindahkan dianalisis menggunakan SPSS. Jika uji normalitas dan homogenitas terpenuhi dan terdistribusi normal ($\text{sig} > 0,05$) maka selanjutnya dilakukan uji parametrik yaitu uji *ANOVA (Analysis Of Variance)*. Jika uji normalitas data tidak terdistribusi normal maka akan dilakukan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis*, kemudian jika terdistribusi normal maka dilakukan uji T-Test dan jika tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji *Wilcoxon*. Nilai Sig. (2-tailed) ($<0,05$) maka menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan, sebaliknya jika nilai Sig. (2-tailed) ($>0,05$) maka menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan.