

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian Deskriptif Observasional dengan menggunakan pemeriksaan laboratorium secara kuantitatif.

3.2 Waktu dan Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2023, dimulai dengan mendeterminasi tanaman Kalangkala di Laboratorium Dasar FMIPA ULM. Kemudian pada Laboratorium Bahan Alam Universitas Borneo Lestari untuk mengolah ekstrak kentalnya dan dilakukan uji bobot jenis lalu sampel ekstrak kental dilakukan uji parameter non-spesifik ke Laboratorium Dasar FMIPA ULM untuk uji kadar air, kadar abu total, dan cemaran kapang khamir serta di BSPJI Banjarbaru untuk uji kadar abu tidak larut asam, cemaran logam berat (Pb dan Cd), dan cemaran mikroba.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah semua tumbuhan Kalangkala (*Litsea angulata*) yang diperoleh dari Desa Sirih, Kecamatan Kalumpang, Kabupaten Hulu Sungai Selatan, Provinsi Kalimantan Selatan.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun Kalangkala (*Litsea angulata*) yang diperoleh dari Desa Desa Sirih, Kecamatan Kalumpang, Kabupaten Hulu Sungai Selatan, Provinsi Kalimantan Selatan. Bagian daun Kalangkala (*Litsea angulata*) yang digunakan adalah daun segar yang berwarna hijau.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

- a. Variable bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% Daun Kalangkala (*Litsea angulata*).
- b. Variabel terikat pada penelitian ini adalah Standardisasi ekstrak parameter non spesifik meliputi persentase Bobot Jenis, persentase Kadar Air, persentase Kadar Abu Total, persentase Kadar Abu Tidak Larut Asam, persentase Cemar Logam Berat, dan Jumlah Koloni Kapang dan Khamir.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yakni oven (Mommert®), batang pengaduk (PT. Pandu Multi Jaya®), labu spiritus, krus tang, bejana, cawan petri (Pyrex®), cawan porselen (PT. Pandu Multi Jaya®), tanur (Thermo Scientific®), desikator (Isolab Germany®), gelas Erlenmeyer (Pyrex®), gelas kimia (Pyrex®), labu

ukur (Pyrex®), waterbath (Mettler®), hot plate (Maspion®), hot plate stirrer (Thermo Scientific®), inkubator (Mettler®), kaca arloji, kertas saring, krus porselen, piknometer (Pyrex®), pipet tetes (Onemed®), pro pipet (Onemed®), jarum ose, rotary evaporator (IKA®), Spektrofotometer Serapan Atom (Shimadzu AA- 7000®), tabung reaksi (Pyrex®), blender, kertas saring bebas abu dan timbangan analitik (Ohaus®).

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *quadest/air suling* (CV. Eralika®), *etanol 96%* (CV. Eralika®), *asam sulfat* (CV. Eralika®), *asam nitrat* (Smart-Lab®), *asam perklorat* (CV. Eralika®), *timbal nitrat* (CV. Eralika®), *HCL pekat* (CV. Eralika®), *Buffered Peptone Water* (Oxoid®), *Plate Count Agar* (Oxoid®), *Potato Dextrose Agar* (Oxoid®), daun Kalangkala (*Litsea angulata*).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengambilan Daun Kalangkala (*Litsea angulata*)

Daun Kalangkala (*Litsea angulata*) sebanyak 2 kg diperoleh dari daerah Desa Sirih, Kecamatan Kalumpang, Kabupaten Hulu Sungai Selatan, Provinsi Kalimantan Selatan pada bulan Desember tahun 2023. Pengambilan daun Kalangkala (*Litsea angulata*) diperoleh dengan cara memetik bagian daun tua dari tumbuhan Kalangkala (*Litsea angulata*), pemetikan dapat dilakukan dengan menggunakan

tangan dan menggunakan alat seperti gunting. Pengambilan daun Kalangkala (*Litsea angulata*) diambil secara acak dengan kriteria daun meliputi: warna daun hijau tua dibandingkan dengan daun muda, tekstur daun sedikit lebih keras, dipanen pada sore hari dengan pertimbangan bahwa pada saat itu metabolit sekunder telah terbentuk sempurna (Maulidya *et al.*, 2023).

3.6.2 Determinasi Daun Kalangkala (*Litsea angulata*)

Determinasi tumbuhan Kalangkala (*Litsea angulata*) dilakukan dengan cara membandingkan sampel Kalangkala (*Litsea angulata*) yang akan digunakan dengan data pustaka acuan. Determinasi tumbuhan Kalangkala (*Litsea angulata*) dilakukan di Laboratorium Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lambung Mangkurat.

3.6.3 Pembuatan Simplisia Daun Kalangkala (*Litsea angulata*)

Daun Kalangkala (*Litsea angulata*) terlebih dahulu disortasi basah untuk dibersihkan dari tanah, kotoran dan benda asing yang melekat. Kemudian daun Kalangkala (*Litsea angulata*) ditimbang dan dilakukan pencucian. Selanjutnya dilakukan perajangan lalu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 45°C. Proses dilanjutkan dengan sortasi kering dan simplisia kering kemudian dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan no. 40 sehingga diperoleh serbuk simplisia, lalu disimpan dalam wadah yang

tertutup rapat (Amalia *et al.*, 2022). Rendemen simplisia dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen Simplisia} = \frac{\text{bobot total simplisia (g)}}{\text{bobot total daun segar (g)}} \times 100\%$$

(Wijayanti, 2021).

3.6.4 Pembuatan Ekstrak Daun Kalangkala (*Litsea angulata*)

Ekstrak dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Masukkan 900 gram serbuk simplisia daun Kalangka ke dalam bejana kemudian ditambahkan pelarut sampai merendam simplisia setinggi 2-3 cm. Rendam sambil sesekali diaduk, diamkan selama 3 hari. Lakukan penyaringan maserat secara filtrasi. Residu diremaserasi sebanyak satu kali. Maserat dikumpulkan kemudian dikentalkan atau diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40°C untuk menguapkan etanolnya. Ekstrak kemudian diuapkan diatas *waterbath* pada suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak kental (Putri *et al.*, 2022). Kemudian dilakukan penentuan persen rendemen ekstrak dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot serbuk yang digunakan (g)}} \times 100\%.$$

(Wijayanti, 2021).

3.6.5 Penentuan Bobot Tetap

Penentuan bobot tetap dengan melakukan penimbangan dinyatakan sudah mencapai bobot tetap apabila perbedaan dua kali penimbangan berturut-turut setelah dikeringkan atau dipijarkan selama

1 jam tidak lebih dari 0,25 % atau perbedaan penimbangan tidak melebihi 0,5 mg pada penimbangan dengan timbangan analitik (Depkes RI, 2017).

3.6.6 Standardisasi Ekstrak Parameter Non Spesifik

a. Penentuan Bobot Jenis

Penentuan bobot jenis dilakukan dengan menimbang piknometer kosong, lalu piknometer diisi dengan aquades dan ditimbang. Setelah itu, aquades dalam piknometer dikeluarkan dan dikeringkan untuk kemudian dimasukkan ekstrak cair dan diatur suhu piknometer yang telah diisi hingga mencapai suhu 25°C (Depkes, 2000). Lalu dilakukan penentuan bobot jenis menggunakan rumus berikut.

$$\text{Bobot Jenis} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

Keterangan :

W0 = bobot Piknometer kosong (g)

W1 = bobot piknometer + air (g)

W2 = bobot piknometer + ekstrak (g) (Rizaldi, 2019).

b. Penentuan Kadar air

Untuk penetapan kadar air pada penelitian ini menggunakan metode *gravimetri* yang dilakukan dengan menimbang 1 gram ekstrak dalam cawan porselin yang sudah ditara. Kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam lalu ditimbang. Lakukan hal yang sama dengan jarak waktu 1 jam, ulangi sampai pada penimbangan tiga kali berturut-turut sehingga mempunyai bobot

tetap dan tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2017). Kemudian lakukan penentuan kadar air dengan rumus berikut. Standar kadar air ialah $\leq 10\%$ untuk sediaan obat alam (BPOM, 2019).

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \%$$

Keterangan :

a = berat konstan cawan kosong (g)

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan (g)

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan (g)

(Rosyidah, 2016).

c. Penentuan Kadar Abu

1. Kadar Abu Total

Sebanyak 2 g ekstrak ditimbang seksama (W1) lalu dimasukkan ke dalam krus silikat yang sebelumnya telah dipijarkan dan ditimbang (W0). Setelah itu, ekstrak dipanaskan dengan *hot plate* dilanjutkan dengan tanur pada suhu 600°C hingga arang habis selama tujuh jam. Selanjutnya dinginkan dalam desikator. Kadar abu total dihitung terhadap ekstrak. Dinyatakan dalam % b/b (Kemenkes, 2017). Standar kadar abu total ialah $\leq 16,6\%$ (Depkes RI, 2017; Hanif *et al.*, 2018).

$$\% \text{ Kadar abu (Total)} = \frac{W2-w0}{W1} \times 100 \%$$

Keterangan :

W0 = bobot krus kosong (g)

W1 = bobot sampel awal (g)

W2 = bobot krus + ekstrak setelah pemijaran (g).

(Rosyidah, 2016).

2. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Bagian tidak larut asam dikumpulkan dan disaring dengan kertas saring bebas abu yang sebelumnya telah ditimbang, kurs dibilas dengan air panas. Abu yang tersaring, dimasukkan kembali ke dalam kurs yang sama. Lalu, dimasukkan dalam oven sampai arang hilang, dan ditimbang hingga memperoleh bobot tetap (W3) (Utami, 2020). Standardisasi kadar abu tidak larut asam yakni $\leq 0.7\%$ (Depkes RI, 2008).

$$\% \text{ Kadar abu tidak larut asam} = \frac{W_2 - w_0}{W_1} \times 100 \%$$

Keterangan:

W0 = bobot krus kosong (g)

W1 = bobot sampel awal (g)

W2 = bobot krus + ekstrak setelah pemijaran (g)

(Rosyidah, 2016).

d. Penentuan Cemaran Logam Berat

Penentuan kadar Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) dengan menggunakan alat SSA. Ekstrak ditimbang sebanyak 1 gram lalu ditambahkan 10 ml HNO₃ pekat dan didiamkan selama 24 jam, kemudian dipanaskan hingga 100°C selama 10 menit lalu dinginkan kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 10 ml dan asam perkolat (HCL) sebanyak 5 ml. Kemudian dipanaskan kembali hingga kental dan saring ke labu ukur 50 ml lalu ditambahkan aquadest hingga tanda batas. Sampel diukur dengan

alat SSA kemudian dihitung kadar logam berat (Depkes, 2000; Marpaung & Septiyani, 2020).

$$\text{Kadar logam berat} = \frac{(X \times V)}{W}$$

Keterangan:

X = Konsentrasi Akhir (mg/ml)

V = Volume akhir (ml)

W = Massa sampel (g). (Rizaldi, 2019)

e. Penentuan Cemar Mikroba

Pada penyiapan sampel ditimbang 10 g ekstrak. Sampel dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml ditambah *buffered peptone water* (BPW) sampai tanda batas. Sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} , dan dikocok hingga larut. Dilanjutkan dengan pengenceran 10^{-2} (Saifudin *et al.*, 2011).

1. Angka Lempeng Total (ALT)

Dipipet 1 ml dari tiap pengenceran ke dalam cawan petri yang steril (*duplo*), dengan menggunakan pipet yang berbeda dan steril untuk tiap pengenceran. Media PCA dituangkan sebanyak 5 ml ke dalam tiap cawan petri yang telah dicairkan bersuhu kurang lebih 45°C . Cawan petri digoyangkan dengan hati-hati hingga sampel bercampur rata dengan pembenihan. Kemudian dibiarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku. Cawan petri dalam posisi terbalik dimasukkan ke dalam lemari inkubator suhu 35°C selama 48 jam. Dicatat pertumbuhan koloni pada masing-masing cawan yang mengandung 30-300 koloni setelah 24 jam. Dihitung ALT dalam koloni/g sampel dengan mengalihkan

jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang sesuai (Saifudin *et al.*, 2011).

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} \times V_s$$

Keterangan :

- C_s = Estimasi jumlah koloni (Koloni/g)
 Z = Total koloni pada cawan
 V_s = Volume acuan yang dipilih untuk menyatakan konsentrasi mikroorganismenya
 V_{tot} = Total volume
 n = Jumlah cawan
 V = Volume uji yang digunakan dengan pengenceran
 d = Pengenceran yang digunakan

f. Penentuan Cemar Kapang dan Khamir

Cawan petri yang steril (*duplo*) dituang 15 ml media PDA yang telah dicairkan bersuhu 45°C kemudian dipipet 1 ml dari tiap pengenceran kedalam cawan petri. Cawan petri digoyangkan dengan hati-hati kemudian dibiarkan membeku pada cawan. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu kamar atau 25°C selama 5 hari. Tujuan uji ini dilakukan ialah untuk memberikan jaminan bahwa sampel tidak mengandung cemaran fungi melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas sediaan dan aflatoxin atau senyawa beracun yang berbahaya bagi kesehatan. Dicatat hasil sebagai jumlah kapang dan khamir/g sampel (Saifudin *et al.*, 2011). Standar Angka Kapang Khamir (AKK) yaitu $\leq 10^3$ CFU/g (BPOM, 2014).

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} \times V_s$$

Keterangan :

- Cs = Estimasi jumlah koloni (Koloni/g)
Z = Total koloni pada cawan
Vs = Volume acuan yang dipilih untuk menyatakan konsentrasi mikroorganisme
Vtot = Total volume
n = Jumlah cawan
V = Volume uji yang digunakan dengan pengenceran
d = Pengenceran yang digunakan

3.7 Analisis dan Penyajian Data

Standarisasi dalam kefarmasian ialah serangkaian parameter, prosedur dan cara pengukuran yang hasilnya adalah unsur-unsur terkait mutu kefarmasian dalam artian memenuhi syarat standar termasuk jaminan stabilitas sebagai produk kefarmasian pada umumnya. Hasil dari penelitian ini disajikan secara deskriptif kuantitatif dalam bentuk tabel yang mana dalam tabel tersebut memuat hasil uji parameter non-spesifik yang dilakukan dan batasan-batasan standarisasi non-spesifik yang sesuai dengan acuan literatur yang digunakan pada penelitian untuk mengetahui apakah disetiap uji parameter non-spesifik yang dilakukan pada ekstrak yang diuji telah memenuhi standar atau tidak (Rizaldi, 2019).