

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

1.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian Deskriptif yang merupakan suatu penelitian yang dilakukan dengan tujuan utama untuk suatu keadaan secara objektif. Untuk standardisasi simplisia dilakukan pengujian kualitatif yang meliputi uji organoleptik, makroskopik, mikroskopik dan identifikasi kandungan kimia simplisia dan pengujian kuantitatif meliputi pengujian bahan organik asing, kadar air dan kadar abu. Untuk standardisasi ekstrak dilakukan pengujian secara parameter spesifik yang meliputi organoleptik, identitas, pengujian kadar senyawa yang terlarut dalam pelarut tertentu (air dan etanol), sedangkan pengujian parameter non spesifik meliputi pengujian bobot jenis, susut pengeringan, kadar air, kadar abu, cemaran mikroba, dan cemaran logam berat.

1.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* (L) Vahl.) dari Flores. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia dan ekstrak daun pecut kuda *Stachytarpheta jamaicensis* (L) Vahl yang diambil dari Kabupaten Manggarai Tengah Flores NTT.

1.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan (Januari sampai Mei 2018) di Laboratorium Kimia dan Farmakognosi Putra Indonesia Malang.

1.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi Operasional Variabel dalam penelitian ini terdiri atas pengujian kualitatif dan kuantitatif simplisia dan parameter spesifik dan parameter non spesifik pada ekstrak *Stachytarpheta jamaicensis* (L) Vahl.

1. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi, menyebabkan timbulnya atau berubahnya variabel terikat. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pecut kuda (analisa kualitatif dan analisa kuantitatif) dan ekstrak pecut kuda (parameter spesifik dan parameter non spesifik).

2. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi karena adanya variabel bebas. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji organoleptis, uji mikroskopik, uji makroskopik, identifikasi kandungan kimia dalam (air dan etanol) dan kadar air, kadar abu, bobot jenis, cemaran mikroba dan cemaran logam berat (kapang/kamir dan angka lempeng total).

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Sub Variabel	Definisi Operasional Variabel	Alat Ukur	Hasil ukur
Daun pecut kuda		Daun pecut kuda yang telah dikeringkan dengan menggunakan sinar matahari	Panca indra	Warna, bau dan rasa
Analisa kualitatif		Menentukan jenis simplisia dan komponen utama zat aktif		
	Organoleptis	Pengenalan awal yang sederhana menggunakan panca indra	Panca indra	Warna, bau, rasa dan bentuk
	Makroskopik	Menentukan ciri khas simplisia	Visual	Bentuk
	Mikroskopik	Mengamati bagian simplisia dan fragmen pengenal dalam bentuk sel, isi sel, atau jaringan	Mikroskop	
	Identifikasi kimia terhadap senyawa yang tersari	Mengetahui kandungan kimia dalam simplisia	Visual	Warna
Analisis kuantitatif		Menetapkan kemurnian dan mutu simplisia nabati		
	Bahan organik asing	Mengetahui besarnya bahan asing yang terikat dalam proses pembuatan simplisia	Visual	
	Kadar air	Untuk mengetahui kandungan air yang ada didalam simplisia	Timbangan analitik	
	Kadar abu	Untuk mengetahui gambaran awal kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuk ekstrak	Timbangan analitik	
Ekstrak etanol daun pecut kuda		Cairan kental diperoleh dari penyarian serbuk daun pecut kuda menggunakan metode maserasi		
Parameter spesifik		Aspek kandungan kimia kualitatif dan kuantitatif yang bertanggungjawab langsung terhadap aktivitas		

	farmakologi tertentu.		
Identitas	Mendeskripsikan tata nama ekstrak, nama latin tumbuhan, dan bagian tumbuhan yang digunakan	Panca Indra	
Organoleptik	Pengenalan awal yang sederhana menggunakan panca indra.	Panca Indra	
Kadar senyawa larut air dan etanol	Menentukan jumlah larutan yang identik dengan jumlah senyawa kandungan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa yang terkandung.	Timbangan analitik	
Parameter non spesifik	Aspek kandungan kimia kualitatif dan kuantitatif yang bertanggungjawab langsung terhadap aktivitas farmakologi tertentu.		
Kadar air	Mengetahui kandungan air dalam ekstrak	Timbangan analitik	
Bobot jenis	Untuk mengetahui perbandingan antara bobot ekstrak dengan bobot air pada volume dan suhu yang sama	Piknometer	
Kadar abu	Memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai	Timbangan analitik	
Cemaran mikroba	Menentukan adanya mikroba patogen secara analisis mikrobiologis		
Cemaran logam berat	Menentukan kandungan logam berat dalam ekstrak	AAS	Menentukan Pb \leq 10,0ppm dan Cd \leq 0,3ppm

1.5 Instrumen Penelitian

1.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : labu erlenmayer, thermometer, pipet tetes, pembakar bunsen, kertas saring whatmannno.42, batang pengaduk, buret, timbangan analitik, labu takar 100 ml dan 50ml, kurs porselen, piknometer, *vacum rotary evaporator*, tabung reaksi, tanur.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak *Stachytarpheta jamaicensis* (L) Vahl. (daun pecut kuda), Kloral hidrat 70% LP, aquadest, asam sulfat encer (H_2SO_4), HNO_3 , asam perklorat ($HClO_4$) amonium hidroksida encer (HCl), logam Mg, kloroform beramoniamayer, dragendrof, wagner, $FeCl_3$ 1 %, etanol 70% dan 96%.

1.6 Prosedur Penelitian

1.6.1 Tahapan Pembuatan Simplisia

Pembuatan serbuk dipilih daun pecut kuda 3 kg yang segar diambil di daerah Manggarai, pemanenan dilakukan pada pagi hari kemudian daun dicuci dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama tujuh hari dan diperoleh daun kering 2 kg. Setelah dilakukan pengeringan disiapkan simplisia daun pecut kuda, kemudian simplisia daun pecut kuda dihaluskan dengan menggunakan blender, setelah itu simplisia daun pecut kuda yang sudah halus diayak dengan menggunakan ayakan 30, dan diperoleh serbuk halus sebanyak 1700 g.

1.6.2 Standardisasi Simplisia

1.6.2.1 Pengujian kualitatif simplisia

1.6.2.1.1 Pengujian organoleptik

Penetapan organoleptik dilakukan dengan mengamati kekhususan bentuk, warna, bau dan rasa simplisia yang diuji (Depkes RI 2000).

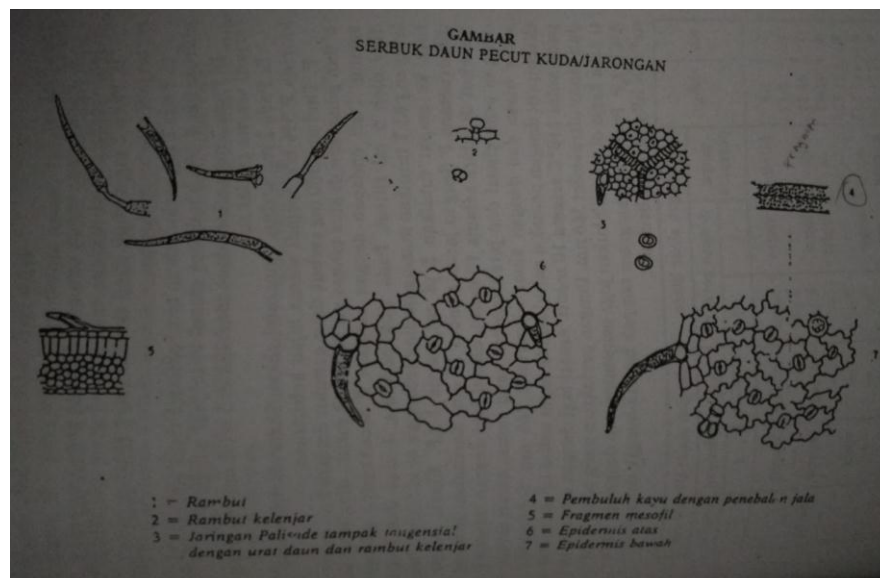
1.6.2.1.2 Pengujian Makroskopik

Uji makroskopik dilakukan dengan menggunakan mistar. Cara ini dilakukan untuk mencari kekhususan morfologi, ukuran dan warna simplisia yang di uji. Daun yang tebal dapat diambil dengan menggunakan simplisia yang telah dikeringkan. Daun yang tipis sebaiknya menggunakan simplisia yang telah

direndam. Bagian yang diamati antara lain, helai daun, bentuk, ujung daun, pangkal daun, permukaan daun, pinggir daun, tulang daun, ukuran, warna, tangkai daun, bau dan rasa.

1.6.2.1.3 Pengujian Mikroskopik

Uji mikroskopik dilakukan dengan menggunakan mikroskop yang derajat pembesarannya disesuaikan dengan keperluan. Simplisia yang diuji dapat berupa sayatan melintang, radial, paradermal maupun membujur atau berupa serbuk. Pada uji mikroskopik dicari unsur-unsur anatomi jaringan yang khas. Dari pengujian ini, akan diketahui jenis simplisia berdasarkan fragmen pengenal yang spesifik bagi masing-masing simplisia. Pengujian serbuk dilakukan sebagai berikut, sedikit serbuk simplisia diletakkan di atas kaca objek, serbuk tersebut ditetesi dengan larutan kloral hidrat 70% LP, kemudian dipanaskan dan dijaga tidak boleh sampai kering. Uji mikroskopik tersebut dilakukan menggunakan tanda-tanda tiap simplisia yang diuji seperti, warna dan fragmen pengenal.



Gambar 3.1 Daun serbuk pecut kuda
sumber: Materia Medika Indonesia jilid V

1.6.2.1.4 Identifikasi Kimia terhadap Senyawa Tersari

1. Flavonoid

Simplisia sebanyak 5 g diekstraksi dengan pelarut n-heksan atau petroleum eter sebanyak 15 ml kemudian disaring. Ekstrak yang diperoleh kemudian diekstraksi lebih lanjut dengan menggunakan metanol (CH_3OH) atau etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) sebanyak 30 ml. 2 ml ekstrak metanol/etanol yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 0,5 ml asam klorida pekat (HCl) dan 3-4 pita logam Mg. Adanya flavonoid Terbentuknya dua lapisan dan lapisan atas terlihat endapan merah, kuning dan jingga yang menandakan adanya senyawa flavonoid (Depkes RI 1989).

2. Alkaloid

Simplisia sebanyak 5 - 10 g diekstraksi dengan kloroform beramonia lalu disaring. Selanjutnya kedalam filtrat ditambahkan 0,5 – 1 ml asam sulfat 2 N dan dikocok sampai terbentuk dua dengan warna merah, orange, dan hijau lapisan. lapisan asam (atas) dipipet dan dimasukkan kedalam tiga buah tabung reaksi. Kedalam tabung reaksi yang pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer. Kedalam tabung reaksi kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendrof dan kedalam tabung reaksi yang ketiga dimasukkan 2 tetes pereaksi wagner. Adanya senyawa alkaloid endapan putih pada tabung reaksi pertama dan timbulnya warna coklat kemerahan pada tabung reaksi kedua dan ketiga (Depkes RI 1989).

3. Tanin

Sebanyak 1 g serbuk ditambahkan 100 ml air, didihkan selama 15 menit, setelah dingin kemudian disaring dengan kertas saring. Sebanyak 5 filtrat

ditambahkan 1-2 tetes FeCl_3 1 % terbentuk warna biru, hijau atau hitam menunjukkan adanya senyawa golongan tanin.

4. Saponin

Sebanyak 0,5 g serbuk dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuknya busa yang stabil, menunjukkan adanya saponin bila ditambahkan 1 tetes HCl 1 % (Depkes RI 1989).

1.6.2.2 Pengujian Kuantitatif Simplisia

1.6.2.2.1 Penentuan bahan organik asing

Timbang 25 g simplisia, ratakan. Pisahkan sesempurna mungkin, timbang dan tetapkan jumlahnya dalam persen terhadap simplisia yang digunakan. Makin kasar simplisia yang diperiksa, makin banyak jumlah simplisia yang ditimbang (DepKes RI, 1989).

1.6.2.2.2 Penentuan kadar air

1. Dimasukkan lebih kurang 2 g serbuk simplisia dan ditimbang saksama dalam wadah yang telah ditara.
2. Dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam ditimbang.
3. Lanjutkan pengeringan dan ditimbang pada jarak 1 jam perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%

1.6.2.2.3 Penentuan kadar abu

Sebanyak 1 g simplisia ditimbang seksama (W_1) dimasukkan ke dalam krus silikat yang sebelumnya telah dipijarkan dan ditimbang (W_0). Setelah itu simplisia dipijarkan dengan menggunakan tanur secara perlahan-lahan (dengan

suhu dinaikkan secara bertahap hingga $600 \pm 25^{\circ}\text{C}$ (DepKes RI, 1980)) dalam hingga arang habis. Kemudian ditimbang hingga bobot tetap (W2).

$$\% \text{ kadar abu total} = \frac{W2-W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = bobot cawan kosong (g)

W1 = bobot simplisia awal (g)

W2 = bobot cawan + simplisia setelah diabukan (g)

1.6.3 Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* (L) Vahl.) dimaserasi menggunakan etanol 70%. Maserasi dilakukan selama 3 hari dan hasil maserasi disaring dengan kapas atau kertas saring. Selanjutnya residu dimaserasi kembali. Filtrat daun pecut kuda yang diperoleh disatukan dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C - 50°C sampai diperoleh ekstrak kental (Saefudin, Rahayu dan Teruma, 2011).

Rendemen dari ekstrak kemudian dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{berat bahan yang diekstrak}} \times 100\%$$

1.6.4 Standardisasi Ekstrak

1.6.4.1 Parameter Spesifik Ekstrak

1. Pengujian Parameter Organoleptik Ekstrak

Dalam pengujian organoleptik, menggunakan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa ekstrak daun pecut kuda.

2. Kadar Senyawa yang Larut dalam Air

Sejumlah 1 g ekstrak (W1) dimaserasi dengan 25 mL air selama 24 jam, menggunakan labu ukur sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama.

Kemudian didiamkan selama 18 jam dan disaring. Filtrat sebanyak 5 mL diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara (W0) dengan cara didiamkan sampai pelarutnya menguap dan tersisa residunya, kemudian dipanaskan residu pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap (W2) (Saifudin et al., 2011).

$$\% \text{ kadar senyawa larut dalam air} = \frac{W2-W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = bobot cawan kosong (g)

W1 = bobot ekstrak awal (g)

W2 = bobot cawan + residu yang dioven (g)

3. Kadar Senyawa yang Larut dalam Etanol

Maserasi sejumlah 5.0 gram ekstrak selama 24 jam dengan 100 ml etanol (96%). Menggunakan labu bersumbat sampai berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian di biarkan selama 18 jam. Saring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol, kemudian uapkan dengan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara, panaskan residu pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap ekstrak awal.

$$\% \text{ Kadar senyawa larut dalam etanol} = \frac{W2-W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = Bobot cawan kosong (g)

W1 = Bobot ekstrak awal (g)

W2 = Bobot cawan + residu yang dioven (g)

3.6.4.2 Parameter Non Spesifik Ekstrak

3.6.4.2.1 Penentuan kadar air

1. Dimasukkan kurang lebih 10 gram ekstrak ditimbang saksama dalam wadah yang telah ditara.
2. Dikeringkan pada suhu 105⁰C selama 5 jam ditimbang.
3. Dilanjutkan pengeringan dan ditimbang pada jarak 1 jam perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{V}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

V = Volume air (mL)

W = bobot ekstrak (g)

3.6.4.2.2 Bobot Jenis

1. Piknometer kosong yang kering ditimbang
2. Kemudian dimasukkan aquadest kedalam piknometer pertama dan masukkan ekstrak daun pecut kuda kedalam piknometer kedua
3. Piknometer ditutup volume cairan yang terbuang dibersihkan menggunakan tisu
4. Piknometer diamkan selama 15 menit
5. Lalu ditimbang bobot piknometer yang berisi aquadest dan piknometer yang berisi ekstrak daun pecut kuda dan dicatat hasilnya

$$d = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0}$$

Keterangan:

d = bobot jenis

W₀ = bobot piknometer kosong (g)

W1 = bobot piknometer + air (g)

W2 = bobot piknometer + ekstrak (g)

3.6.4.2.1 Kadar Abu Total

1. 2 g ekstrak dimasukkan dalam krus silikat yang telah dipijar dan tara
2. Pijarkan perlahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Jika arang tidak hilang tambahkan air panas
3. Saring dengan kertas saring bebas debu
4. Pijarkan kertas saring dengan krus yang sama
5. Masukkan filtrat dalam krus silikat lalu pijarkan hingga bobot tetap dan timbang (DepKes RI, 1980)

$$\% \text{ Kadar abu total} = \frac{W2 - W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = bobot cawan kosong (g)

W1 = bobot ekstrak awal (g)

W2 = bobot cawan + ekstrak setelah diabukan (g)

3.6.4.2.3 Cemar mikroba

Pada penyiapan sampel ditimbang 1 gram ekstrak. Sampel dimasukkan ke dalam gelas ukur 10 mL ditambahkan aquadest sampai 10,0 mL, sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} dan dikocok hingga larut atau dengan bantuan *vortex*. Dilanjutkan dengan pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} (Depkes RI, 2000).

a. Angka Lempeng Total (ALT)

Dipipet 1 mL dari setiap pengenceran ke dalam cawan petri yang steril (duplo), dengan menggunakan pipet yang berbeda dan steril untuk tiap pengenceran. Ke dalam tiap cawan petri dituangkan 5 mL media *Plate Count*

Agar (PCA) yang telah dicairkan bersuhu kurang lebih 45°C . Cawan petri digoyangkan dengan hati-hati (diputar dan digoyangkan ke depan dan ke belakang serta kanan ke kiri) hingga sampel bercampur rata dengan pembedihan. Kemudian dibiarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku. Cawan petri dengan posisi terbalik dimasukkan ke dalam lemari inkubator suhu 35°C selama 24 jam. Dicatat pertumbuhan koloni pada masing-masing cawan yang mengandung 30-300 koloni setelah 24 jam. Dihitung ALT dalam koloni/g sampel dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang sesuai (Depkes RI, 2000) dalam (Saefudin, Rahayu dan Teruma, 2011).

b. Kapang dan Khamir

Dituangkan 5 mL media *Potato dextros agar* ke dalam cawan petri yang steril (diplo), yang telah dicairkan bersuhu 45°C , dibiarkan membeku pada cawan. Pipet 0,5 mL dari tiap pengenceran ke dalam cawan petri yang steril (metode semai), dengan menggunakan pipet yang berbeda dan steril untuk tiap pengenceran. Cawan petri digoyangkan dengan hati-hati hingga sampel tersemai secara merata pada media. Kemudian diinkubasikan pada suhu kamar atau 25°C selama 7 hari. Dicatat hasil sebagai jumlah kapang dan khamir/g sampel (Saefudin, Rahayu dan Teruma, 2011).

4. Cemarkan Logam Berat

Penetapan kadar Arsen (As), Timbal (Pb) dan kadmium (Cd) dengan menggunakan alat *Atomic Absorption Spechtrophotometer*. Penelitian logam berat dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Brawijaya Malang

4.6 Analisis Data

Hasil penelitian dibandingkan dengan analisa data kualitatif dan kuantitatif pada standardisasi simplisia sesuai yang ditetapkan pada buku Materi Medika Indonesia Jilid VI dan analisa parameter spesifik dan nonspesifik pada standardisasi ekstrak sesuai yang ditetapkan Depkes RI 2008, dengan metode deskriptif. Metode deskriptif adalah suatu metode penelitian yang digunakan untuk menggambarkan atau melukiskan keadaan subyek penelitian (seseorang, lembaga, masyarakat dan lain-lain) berdasarkan fakta-fakta yang tampak sebagaimana adanya. yaitu menuturkan atau menafsirkan data yang berkenaan dengan fakta, keadaan, variable, dan fenomena yang terjadi saat penelitian berlangsung dan menyajikan apa adanya (Lexy, 2001). Gambaran atas hasil analisis data akan disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut.

Tabel 3.2 Gambaran Hasil Analisis Standardisasi Simplisia

Serbuk simplisia	Pengujian	Literatur
Analisa Kualitatif	Organoleptik	-
	Makroskopik	Daun bewarna hijau sampai hijau tua atau hijau kecoklatan, helain daun berbentuk bundar telur atau bundar telur memanjang, panjang 2 cm-8 cm, lebar 1 cm-5 cm, ujung helaian helaian daun meruncing, pangkal menyempit dikit demi sedikit, pinggir daun pada pangkal rata, pinggirnya bergerigi, tulang daun menyirip, menonjol pada permukaan bawah, permukaan daun berambut, jika diraba terasa kasar. (<i>Materi Medika Indonesia Jilid V 1989</i>)
	Mikroskopik	Mesofil dan epidermis (<i>Materi Medika Indonesia Jilid V 1989</i>)
	Identifikasi fitokimia	
	Flavonoid	
	Alkaloid	
Saponin		
Kadar air	$\leq 10\%$	
Kadar abu	$\leq 10\%$	

Tabel 3.3 Gambaran Hasil Analisis Standardisasi Ekstrak

Standardisasi ekstrak	Pengujian	Literatur
Parameter spesifik ekstrak	Identitas	-
	Organoleptik	-
	Kadar senyawa larut air	-
	kadar senyawa larut etanol	-
	Bobot jenis	-
	Kadar air	-
	Kadar abu	-
	Cemaran mikroba ALT	1 x 10 ⁴ koloni/g (BPOM RI 2006)
	Cemaran kapang/khamir	1 X 10 ³ koloni/g (BPOM RI 2006)
	Cemaran logam berat	Pb dan Hg masing-masing ≤ 10,0 ppm dan Cd ≤ 0,3 ppm;

