

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian adalah semua proses yang dilakukan pada penelitian tersebut. Penelitian yang akan digunakan adalah penelitian bersifat deskriptif karena penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ada perbedaan hasil standardisasi simplisia daun wungu yang diperoleh dari daerah Kabupaten Lumajang dengan standard yang sudah ada. Penelitian ini dilakukan dengan memperoleh daun wungu segar atau pemanenan, diubah menjadi simplisia kering, selanjutnya pengubahan simplisia menjadi serbuk, lalu dilakukan standardisasi meliputi parameter susut penegeringan, kadar air, kadar abu, kadar abu tidak larut asam, cemaran mikroba (ALT).

3.2 Populasi Dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun wungu (*Grathophyllum pictum* (L.) Griff).

3.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah simplisia daun wungu (*Grathophyllum pictum* (L.) Griff) sebanyak 100g.

3.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan mikrobiologi Politeknik Kesehatan Putra Indonesia, Jl. Barito No.5, Bunulrejo, Kec. Blimbing, Kota Malang, Jawa Timur. Untuk waktu penelitian ini dilakukan mulai dari bulan Mei - Juli 2023.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Sub Variabel	Devinisi Variabel	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
Non Spesifik	Susut pengeringan	Penetapan rentang senyawa yang hilang pada simplisia setelah melalui proses pengeringan.	Timbangan analitik	Nominal	$\leq 10\%$ (Depkes RI, 2008)
	Kadar abu	Pemeriksaan suatu senyawa organik dan turunannya yang terdapat didalam simplisia.	Timbangan analitik	Nominal	$\leq 12\%$. (Depkes, 1989)
	Kadar abu tidak larut asam	Menunjukkan adanya senyawa pada simplisia yang tidak larut dalam asam.	Timbangan analitik	Nominal	$\leq 1,1\%$ (Kemenkes, 2017)
	Kadar air	Pemeriksaan pada simplisia untuk mengetahui kadar air yang hilang pada saat proses pengeringan.	Timbangan analitik	Nominal	$< 10\%$ (Depkes, 1989)
	Cemaran mikroba (ALT)	Pemeriksaan cemaran mikrobiologi yang terkandung pada simplisia agar tidak melebihi batas yang telah ditetapkan sehingga dapat diketahui kualitas dan keamanan suatu simplisia	Visual dan koloni counter	Nominal	$< 10^6$ cfu/mL (Depkes RI, 2009)

3.5 Instrumen Penelitian/Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi blender, ayakan mesh No. 40, krus porselen, cawan penguap, timbangan analitik, oven, desikator, tanur, kertas saring, beker glas, cawan petri, tabung reaksi, pipet mikro, erlenmeyer, blue tip, autoklaf, batang pengaduk.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk menguji standardisasi simplisia meliputi simplisia daun wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff), HCl, NaCl 0,9%, PCA, aquadest.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Simplisia

Pengumpulan daun wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff), selanjutnya dilakukan sortasi basah, pencucian daun, pengeringan dengan menggunakan oven suhu 60°C selama 6jam atau sampai kadar airnya <10%, selanjutnya dilakukan penyortiran dari benda-benda asing (sortasi kering), lalu dihaluskan dengan menggunakan blender, serbuk simplisia yang sudah didapat diayak menggunakan ayakan mesh No. 40 (Depkes RI, 1980). Simpan serbuk simplisia dalam wadah bersih, kering dan terhindar dari sinar matahari, selanjutnya dilakukan pengamatan organoleptik berupa warna, bentuk, bau, rasa dan dilakukan uji standardisasi non spesifik.

3.6.2 Standardisasi (Kemenkes, 2017)

3.6.2.1 Kadar Air (Metode Gravimetri)

1. Timbang saksama lebih kurang 10 g sampel, masukkan ke dalam wadah yang telah ditara.
2. Keringkan pada suhu 105°selama 5 jam, dan timbang.
3. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{simplisia basah (g)} - \text{simplisia kering (g)}}{\text{simplisia basah (g)}} \times 100\%$$

3.6.2.2 Susut Pengerinan

1. Timbang saksama 1 sampai 2 g simplisia dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu penetapan dan ditara.
2. Ratakan bahan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 sampai 10 mm, masukkan dalam ruang pengering, buka tutupnya, keringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap.
3. Sebelum setiap pengeringan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam desikator hingga suhu ruang.

$$\text{Kadar Susut Pengerinan} = \frac{\text{simplisia basah (g)} - \text{simplisia kering (g)}}{\text{simplisia basah (g)}} \times 100\%$$

3.6.2.3 Kadar Abu Total

1. Menimbang 2-3 g sampel yang sudah dihaluskan dan dimasukkan ke dalam krus yang sudah ditara dan dipijarkan menggunakan oven dengan suhu 105°C selama 30 menit (setelah krus dipijarkan, krus didinginkan terlebih dahulu pada desikator hingga suhu ruang).
2. Pijarkan perlahan-lahan hingga menjadi abu menggunakan tanur dengan suhu 600°C, dinginkan krus hingga suhu ruang, timbang. (Jika cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang).
3. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{\text{Bobot Abu (g)}}{\text{Bobot awal (g)}} \times 100\%$$

3.6.2.4 Kadar Abu Tidak Larut Asam

1. Didihkan abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dengan 25mL asam klorida encer selama 5 menit.
2. Kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui kertas saring bebas abu.
3. Cuci dengan air panas, pijarkan dalam krus hingga bobot tetap pada suhu 600°C
4. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b.

$$\text{Kadar Abu Tidak Larut Asam} = \frac{\text{Bobot Abu (g)}}{\text{Bobot Simplisia (g)}} \times 100\%$$

3.6.2.5 Cemaran Mikroba (Angka Lempeng Total (ALT))

➤ **Pembuatan Media** (Depkes RI, 2000)

1. Media plate count agar (PCA) ditimbang sebanyak 2,45 gram
2. dicampurkan dengan aquadest dan dipanaskan hingga larutan kuning jernih.
3. disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C.

➤ **Sterilisasi Alat**

1. Peralatan dan media yang digunakan saat pengujian harus disterilkan terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya kontaminasi oleh mikroorganisme.
2. Peralatan yang terbuat dari kaca dan tahan terhadap panas di bungkus di dalam kertas coklat dan dimasukkan kedalam keranjang besi.

3. Peralatan yang telah terbungkus dimasukkan ke dalam autoklaf dengan proses sterilisasi menggunakan suhu 121°C (setelah suhu 121°C ditunggu dan pirtahankan suhunya agar tetap 121°C jika suhu naik api dimatikan dan jika suhunya turun maka api dinyalakan lagi supaya suhunya tetap 121°C) selama 15 menit, dengan tekanan pada autoklafnya 15.

➤ **Pengenceran**

1. Simplisia ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dicampurkan ke dalam 9mL NaCl 0,9 % dan dihomogenkan sehingga mendapatkan pengenceran 10^{-1} .
2. Selanjutnya dilakukan pengeceran serial pada pengenceran disiapkan empat tabung masing masing di isi 9 mL NaCl 0,9 %.
3. Pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung kedua lalu dihomogenkan dengan vortex sehingga mendapatkan pengenceran 10^{-2} .
4. Ambil sebanyak 1 mL pengenceran 10^{-2} . dipipet dan dimasukkan ke tabung ketiga di homogenkan menggunakan vortex hingga memperoleh 10^{-3} (dilakukan langkah yang sama sampai diperoleh pengenceran 10^{-5}).
5. Hasil pengenceran ini kemudian di tanam pada media pada cawan petri.

➤ **Cemaran Mikroba** (Depkes RI, 2000)

1. Siapkan alat dan bahan yang sudah disterilisasi.
2. Pipet 1mL dari setiap pengenceran kedalam cawan petri yang sudah disterilisasi (dengan menggunakan pipet yang berbeda setiap pengenceran)

3. Tuangkan media PCA yang sudah dicairkan ke dalam cawan petri.
4. Cawan petri yang sudah berisi media dan sampel digoyangkan hingga sampel tercampur merata (metode pour plate)..
5. Selanjutnya didiamkan hingga media memadat dan bungkus kembali cawan petri dengan kertas coklat.
6. Cawan petri dimasukkan kedalam lemari inkubator dengan suhu 35°C selama 24jam.
7. Setelah 24jam dicatat dan dihitung pertumbuhan koloni bakteri.

3.7 Analisis Data

Hasil penelitian menggunakan analisis deskriptif untuk membandingkan hasil standardisasi simplisia daun wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) dengan penelitian sebelumnya dengan acuan standardisasi simplisia daun wungu pada Farmakope Herbal Edisi II dan disajikan dalam bentuk tabel. Analisis deskriptif yang dilakukan mengacu pada proses dan aktivitas pengumpulan data melalui pengujian sampel. Data yang didapat dideskripsikan dengan dukungan studi kepustakaan sehingga lebih memperkuat analisis penelitian dalam membuat kesimpulan.