

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan dan Alat Penelitian

1) Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah kaplet salut film campuran ekstrak etanol 70% herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dan biji mahoni (*Swietenia mahagoni* Jacq.) dengan perbandingan 2:1 yang diproduksi dalam skala pilot oleh PT. Balatif, Malang, Jawa Timur.

2) Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96% teknis, n-heksana p.a. (E Merck), kloroform p.a. (E Merck), etil asetat p.a. (E Merck), asam asetat anhidrat p.a. (E Merck), asam sulfat p.a. (E Merck).

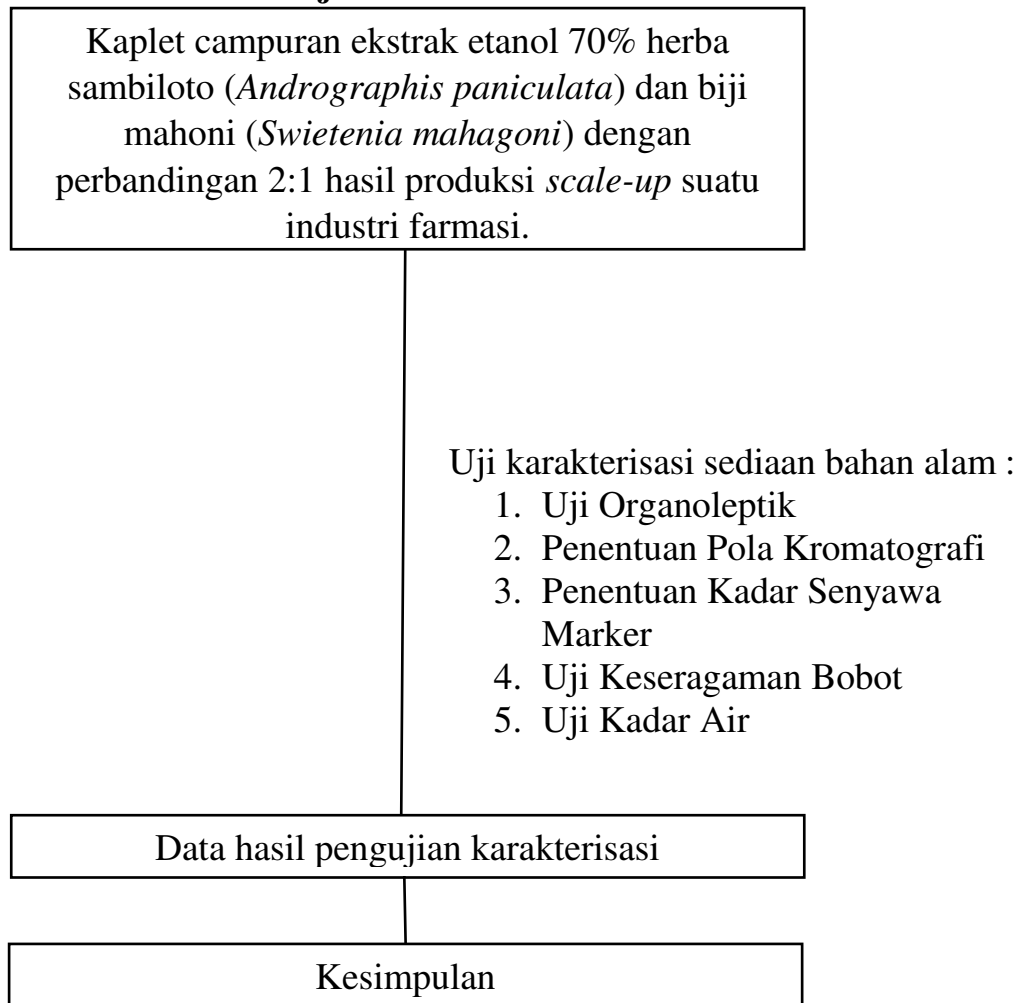
3) Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik (OHAUS), alat uji waktu hancur, alat untuk penetapan kadar air, KLT-densitometer (CAMAG TLC scanner 3).

4.2. Formulasi Sediaan Kaplet

Ekstraksi dan pembuatan sediaan kaplet dilakukan oleh PT. Balatif, Malang, Jawa Timur dengan keterangan bahan dan proses pembuatan terlampir (**Lampiran 1**).

4.3. Skema Prosedur Kerja



Gambar 4.1 Skema Prosedur Kerja

4.4. Prosedur Kerja Karakteristik Sediaan Bahan Alam

1. Uji Organoleptik

Pada pengujian organoleptik dilakukan untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa. Pengamatan bentuk meliputi bentuk kaplet bersalut film. Pengamatan warna meliputi warna hijau. Pengamatan bau meliputi tidak berbau atau berbau sedikit aromatik. Sedangkan untuk pengamatan rasa meliputi pahit, kelat dan lain-lain (Depkes, 2000).

2. Penentuan Pola Kromatografi

a. Fase Gerak 1 (kloroform : etanol)

Pada penetapan pola kromatografi dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sebagai berikut:

Fase gerak : Kloroform : Etanol (9:1)

Fase diam : Silika gel GF-254

Larutan uji : Kaplet yang ditimbang setara dengan 1000,0 mg, dilarutkan dalam etanol P dan divortex selama 10 menit. Cairan dimasukkan ke labu ukur 10,0 ml dan ditambahkan etanol P sampai batas tanda.

Deteksi : Sinar UV 254 nm, panjang gelombang maksimum 232 nm.

1) Pembuatan dan penjenjuran eluen:

b. Volume eluen dihitung 20 ml dengan perbandingan Kloroform : Etanol (9:1).

c. Eluen diukur sesuai dengan perhitungan (kloroform 18 ml dan etanol 2 ml).

d. Eluen yang telah diukur, dimasukkan ke dalam chamber yang telah dilapisi kertas saring, ditutup dan dibiarkan sampai jenuh (sampai kertas saring terbasahi)

- 2) Plat KLT disiapkan dengan ukuran panjang dan lebar masing-masing 10 cm dan 3 cm dengan ketentuan :

Batas bawah penotolan = 1,5 cm

Batas atas eluasi = 0,5 cm

Jarak totalan tepi kiri dan kanan plat = 1.0 cm

Jarak antar totalan = 1,0 cm

- 3) Larutan uji ditotolkan sebanyak 10,0 μ l (replikasi 3 kali) dengan jarak 1,5 cm dari tepi bawah lempeng dan dibiarkan mengering.
- 4) Lempeng yang telah diberi totalan dimasukkan kedalam bejana yang sudah dijenuhkan dengan pelarut.
- 5) Bejana ditutup dan dibiarkan sistem hingga fase gerak bergerak sampai batas atas jarak rambat.
- 6) Lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di lemari asam.
- 7) Lempeng dilihat di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm. Jarak tiap bercak diukur dan dicatat, selanjutnya harga Rf ditentukan.
- 8) Lempeng dilakukan analisis menggunakan densitometer dengan panjang gelombang maksimum 232 nm.

b. Fase Gerak 2 (n-heksana : etil asetat)

Pada penetapan pola kromatografi dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sebagai berikut:

Fase gerak : N-heksana : Etil asetat (7:3)

Fase diam : Silika gel GF-254

Larutan uji : Kaplet yang ditimbang setara dengan 1000,0 mg, dilarutkan dalam etanol P dan divortex selama 10 menit. Cairan

dimasukkan ke labu ukur 10,0 ml dan ditambahkan etanol P sampai batas tanda.

Larutan pembanding: Stigmasterol yang ditimbang sebanyak 10,0 mg dan dilarutkan dalam 10,0 ml etanol.

Penampak noda : Liebermann-Buchard

Deteksi : Panjang gelombang maksimum 525 nm

1) Pembuatan dan penjenuhan eluen:

- a. Volume eluen dihitung 20 ml dengan perbandingan N-heksana : Etil asetat (7:3).
- b. Eluen diukur sesuai dengan perhitungan (n-heksana 14 ml dan etil asetat 6 ml).
- c. Eluen yang telah diukur, dimasukkan ke dalam chamber yang telah dilapisi kertas saring, ditutup dan dibiarkan sampai jenuh (sampai kertas saring terbasahi)

2) Plat KLT disiapkan dengan ukuran panjang dan lebar masing-masing 10 cm dan 3 cm dengan ketentuan :

Batas bawah penotolan = 1,5 cm

Batas atas eluasi = 0,5 cm

Jarak totalan tepi kiri dan kanan plat = 1.0 cm

Jarak antar totalan = 1,0 cm

- 3) Larutan uji ditotolkan sebanyak 20,0 μ l (replikasi 3 kali) dengan jarak 1,5 cm dari tepi bawah lempeng dan dibiarkan mengering.
- 4) Lempeng yang telah diberi totalan dimasukkan kedalam bejana yang sudah dijenuhkan dengan pelarut.
- 5) Bejana ditutup dan dibiarkan sistem hingga fase gerak bergerak sampai batas atas jarak rambat.
- 6) Lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di lemari asam.

- 7) Pernampak noda Liebermann-Buchard disemprotkan dan lempeng dipanaskan lebih kurang 10 menit.
- 8) Lempeng dilihat di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 366 nm. Jarak tiap bercak diukur dan dicatat, selanjutnya harga Rf ditentukan.
- 9) Lempeng dilakukan analisis menggunakan densitometer dengan panjang gelombang maksimum 525 nm.

3. Penentuan Kadar Senyawa Marker

a. Senyawa Andrografolida

Dilakukan dengan prosedur yang sama dengan pola kromatografi menggunakan fase gerak 1 dan dilanjutkan dengan prosedur sebagai berikut:

- 1) Larutan uji ditotolkan sebanyak 10,0 μ l dan larutan pembanding sebanyak 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 dan 3,5 μ l dengan jarak 1,5 cm dari tepi bawah lempeng dan dibiarkan mengering.
- 2) Lempeng dimasukkan ke dalam bejana yang sudah dijenuhkan dengan pelarut.
- 3) Bejana ditutup dan dibiarkan sistem hingga fase gerak bergerak sampai batas atas jarak rambat.
- 4) Lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di lemari asam.
- 5) Lempeng dilihat di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm. Jarak tiap bercak diukur dan dicatat, selanjutnya harga Rf ditentukan.
- 6) Lempeng dilakukan analisis menggunakan densitometer dengan panjang gelombang maksimum 232 nm. Lalu dilakukan perhitungan dan diperoleh kadar senyawa marker dalam sampel.

b. Senyawa Stigmasterol

Dilakukan dengan dengan prosedur yang sama dengan pola kromatografi menggunakan fase gerak 2 dan dilanjutkan dengan prosedur sebagai berikut:

- 1) Larutan uji ditotolkan sebanyak 20,0 μ l dan larutan pembanding sebanyak 1,0; 2,0; 3,; 4,0; 5,0; 6,0 dan 7,0 μ l dengan jarak 1,5 cm dari tepi bawah lempeng dan dibiarkan mengering.
- 2) Lempeng dimasukkan ke dalam bejana yang sudah dijenuhkan dengan pelarut.
- 3) Bejana ditutup dan dibiarkan sistem hingga fase gerak bergerak sampai batas atas jarak rambat.
- 4) Lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di lemari asam.
- 5) Penampak noda Liebermann-Buchard disemprotkan dan lempeng dipanaskan lebih kurang 10 menit.
- 6) Lempeng dilihat di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 366 nm. Jarak tiap bercak diukur dan dicatat, selanjutnya harga Rf ditentukan.
- 7) Lempeng dilakukan analisis menggunakan densitometer dengan panjang gelombang maksimum 525 nm. Lalu dilakukan perhitungan dan diperoleh kadar senyawa marker dalam sampel.

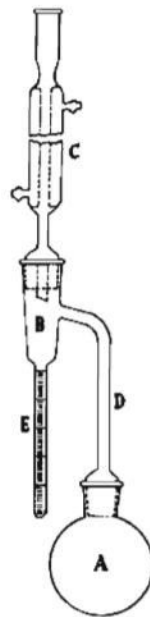
4. Keseragaman Bobot

Berdasarkan Peraturan Kepala BPOM nomor 32 tahun 2019 uji keseragaman bobot dilakukan dengan prosedur :

- 1) 20 kaplet diambil secara acak sebagai sampel.
- 2) Masing-masing kaplet ditimbang, dicatat hasilnya.
- 3) Rata-rata bobot, persentase penyimpangan bobot dan simpangan baku dihitung.
- 4) Kaplet yang memenuhi persyaratan (sesuai dengan persyaratan pada **Tabel II.1**) ditentukan.

5. Kadar Air

Alat yang digunakan yaitu labu 500 ml (A) dihubungkan dengan pendingin air balik (C) melalui alat penampung (B) yang dilengkapi dengan tabung penerima 5 ml (E) yang berskala 0,1 ml. Panaskan menggunakan pemanas listrik yang suhunya dapat diatur atau tangas minyak. Bagian atas labu tabung penyambung (D) sebaiknya dibungkus dengan asbes seperti tertera pada **Gambar 4.2** (Depkes, 2008).



Gambar 4.2 Alat Uji Kadar Air

Pereaksi yang digunakan adalah toluen jenuh air. Sejumlah toluen P dikocok dengan sedikit air, biarkan memisah dan buang lapisan air.

Prosedur dalam penetapan kadar air yaitu :

- 1) 50 kaplet yang setara dengan 25 gram diambil dan digerus sampai halus.
- 2) Kaplet yang sudah digerus ditimbang seksama sampai 25,0 gram (setara dengan bahan yang diperkirakan mengandung 1-4 ml air).

- 3) Sampel kaplet yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam labu kering (A) lalu ditambahkan batu didih secukupnya, rangkaian alat dipasang.
- 4) Toluene jenuh air sebanyak kurang lebih 200 ml dimasukkan ke dalam labu A melalui B dan setelah tabung penerima penuh. Kondensor dipasang.
- 5) Sampel dipanaskan selama 45 menit (waktu yang ditentukan berdasarkan optimasi).
- 6) Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluene jenuh air sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluene jenuh air.
- 7) Tabung penerima (E) didinginkan hingga suhu ruang (± 10 menit). Jika terdapat tetes air yang melekat, maka tabung pendingin (B) dan tabung penerima (E) digosok dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluene jenuh air hingga tetesan air turun. Volume air dibaca setelah air dan toluene memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b.

6. Uji Waktu Hancur

Prosedur penetapan waktu hancur berdasarkan Farmakope Indonesia Edisi V yaitu:

- 1) 6 kaplet secara acak diambil sebagai sampel.
- 2) Media (air) sebanyak 900 ml disiapkan pada beaker glass dan dipanaskan sampai suhu $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 3) Beaker glass yang berisi media dipasang di alat uji waktu hancur.
- 4) Satu kaplet dimasukkan pada masing-masing tabung dari keranjang.
- 5) Alat dijalankan dengan frekuensi tetap antara 29-32 kali per menit sampai batas waktu yang ditentukan (30 menit).

- 6) Alat dinaikkan dan dilihat apakah semua kaplet hancur sempurna (dengan ukuran yang dapat melewati kisi bagian bawah keranjang).
- 7) Hasil yang sesuai dengan persyaratan (untuk kaplet salut film ≤ 60 menit) ditentukan (BPOM, 2019).