

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental untuk mengevaluasi pengaruh variasi konsentrasi ekstrak daun kersen terhadap sifat fisik krim dan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH.

#### **B. Lokasi dan Waktu**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Farmasi (S-1), Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Waktu pelaksanaan penelitian adalah bulan Mei 2023 hingga Juli 2023.

#### **C. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas : variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% daun kersen (*Muntingia calabura* L.)
2. Variabel Terikat : sifat fisik krim (pH, daya lekat, daya sebar, viskositas), dan nilai IC<sub>50</sub>
3. Variabel terkontrol : Kriteria daun, suhu pengeringan, durasi ekstraksi, suhu peleburan, kecepatan pengadukan krim, dan waktu pengadukan krim.

#### **D. Definisi Operasional Variabel**

1. Ekstrak daun kersen merupakan suatu cairan kental yang diperoleh dengan melarutkan serbuk dalam pelarut etanol 70% melalui proses maserasi, kemudian dilakukan proses penguapan.
2. Krim ekstrak daun kersen merupakan suatu sediaan semi padat yang terbuat dari fase minyak dan fase air dengan variasi kandungan ekstrak daun kersen.
3. IC<sub>50</sub> adalah parameter yang menunjukkan konsentrasi terendah senyawa antioksidan yang bisa meredam radikal bebas DPPH.

## E. Alat dan Bahan

### 1. Alat-alat

Oven, sonikator (cole parmer), grinder (Fomac), spektrofotometer UV-Vis (*genesys 10S UV-VIS*), viscometer (*Brookfield DV1*), Homogenizer (IKA T25), centrifuge (Hettich EBA), moisture analyzer (Ohaus MB90), kompor (Maspion S-301), wajan, hot plate (IKA C-MAG HS 7), mikroskop (*olympus CX23*), neraca analitik (Ohaus PA2202), neraca analitik (Ohaus PX224/E), pH meter (Hanna), bejana kaca, wajan, cawan porselin, mikro pipet (Eppendorf), sendok kayu, dan alat-alat gelas lainnya

### 2. Bahan

Daun kersen, gliserin (farmasetis), asam stearat (farmasetis), propil paraben (farmasetis), metil paraben (farmasetis), setil alkohol (farmasetis), trietanolamin (farmasetis), DPPH (p.a), kuersetin, metien biru (teknis), pereaksi Mayer (p.a), pereaksi Dragendorf (p.a), pereaksi Bouchardat (p.a), Magnesium (p.a), HCl (p.a), FeCl<sub>3</sub>, akuades, etanol 70% (teknis), metanol (p.a), aluminium foil dan kertas saring.

## F. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Determinasi Tanaman

Daun kersen dideterminasi di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan keaslian dari simplisia daun kersen yang akan digunakan dalam penelitian.

### 2. Penyiapan Simplisia

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) diambil di daerah persawahan Ambarketawang, Kecamatan Gamping, Kabupaten Sleman. Daun yang dipetik harus sesuai kriteria yaitu daun mendatar, mempunyai tepi bergerigi, terletak pada nomor 3, 4 dan 5 dari pucuk dan dipisahkan dari tangkainya. Daun disortir basah pada air mengalir (agar bebas dari sisa kotoran). Daun yang telah disortir, dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C. Selanjutnya daun yang telah kering

dihaluskan menggunakan grinder sampai diperoleh serbuk. Serbuk simplisia tersebut diayak dengan ayakan 40 mesh (Magdalena & Kusnadi, 2015).

### 3. Ekstraksi Daun Kersen

Sebanyak 1000 g serbuk daun kersen dimaserasi dengan etanol 70% sebanyak 10 L selama 3x24 jam. Pengadukan ekstrak dilakukan 6 jam sambil sesekali di aduk, lalu didiamkan selama 18 jam. Selanjutnya hasil maserasi disaring, dan didapatkan filtrat. Selanjutnya filtrat dipekatkan dengan dipanaskan pada suhu 45°C untuk memperoleh ekstrak kental. Rendemen dapat dihitung berdasarkan ekstrak kental yang diperoleh. Perhitungan rendemen dilakukan menggunakan persamaan 1.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat akhir (berat ekstrak kental)}}{\text{berat awal (berat serbuk simplisia)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

### 4. Karakterisasi Ekstrak Etanol Daun Kersen

#### a. Uji Organoleptis

Pengamatan dilakukan terhadap bentuk, warna, dan bau ekstrak (Najib et al. 2018).

#### b. Uji *Moisture Content*

1 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan dalam cawan alumunium pada moisture analyzer. Lalu suhu alat diatur menjadi 105 °C. Nilai kelembaban akan keluar pada alat saat pengujian telah selesai (Hanum & Kaban, 2021).

#### c. Uji pH

1 g ekstrak daun kersen dilarutkan dalam 10 mL akuades. Lalu pH diukur menggunakan pH meter (Vonna et al., 2021).

#### d. Skrining fitokimia ekstrak etanol daun kersen

##### 1) Uji Flavonoid

40 mg ekstrak dilarutkan dengan 100 mL air panas. Lalu tabung dipanaskan selama kurang lebih 5 menit. Selanjutnya 0,05 mg magnesium dan 1 mL HCl 1 N ditambahkan. Perubahan larutan menjadi berwarna merah, menunjukkan adanya flavonoid (Cahyaningsih et al., 2019).

## 2) Uji Saponin

Sebanyak 40 mg ekstrak diambil, dan ditambahkan 10 mL akuadest ke dalam tabung reaksi. Lalu tabung digojog selama 10 detik, dan akan menghasilkan busa 1-10 cm. Selanjutnya 1 tetes HCl 1 N ditambahkan ke dalam tabung. Hasil positif mengandung saponin apabila buih tersebut tidak hilang (Rabima & Marshall, 2017).

## 3) Uji Tanin

Sebanyak 40 mg ekstrak dilarutkan ke dalam 4 mL air. Kemudian 2 mL ekstrak diambil, lalu  $\text{FeCl}_3$  10% ditambahkan sebanyak 2 tetes. Hasil positif mengandung tanin jika terjadi perubahan warna biru tua atau hitam kehijauan pada larutan (Cahyaningsih et al., 2019).

## 4) Uji Fenolik

40 mg ekstrak daun kersen dilarutkan dengan 10 mL akuades. Kemudian campuran dipanaskan selama 5 menit dan disaring. 5 mL filtrat diambil dan ditambahkan 10 tetes  $\text{FeCl}_3$  10%. Hasil berupa warna hitam pekat menunjukkan adanya fenolik (Sami et al., 2017).

## 5) Uji Alkaloid

0,5 g ekstrak ditambah dengan 9 mL akuades dan 1 mL HCl 1 N. Lalu larutan dipanaskan selama 2 menit dan disaring. Masing-masing tabung diberi 3 tetes filtrat. Lalu masing-masing tabung ditambahkan 2 tetes larutan Meyer, pereaksi Bouchardat, dan pereaksi Dragendorf. Jika positif mengandung alkaloid maka akan terdapat endapan putih atau kuning pada penambahan pereaksi Meyer, terdapat endapan berwarna coklat hingga hitam pada penambahan pereaksi Bouchardat, pada penambahan Dragendorf berupa endapan kuning jingga. Apabila 2 dari 3 reaksi tersebut positif, maka dapat dikatakan ekstrak mengandung alkaloid (Syahara & Siregar, 2019).

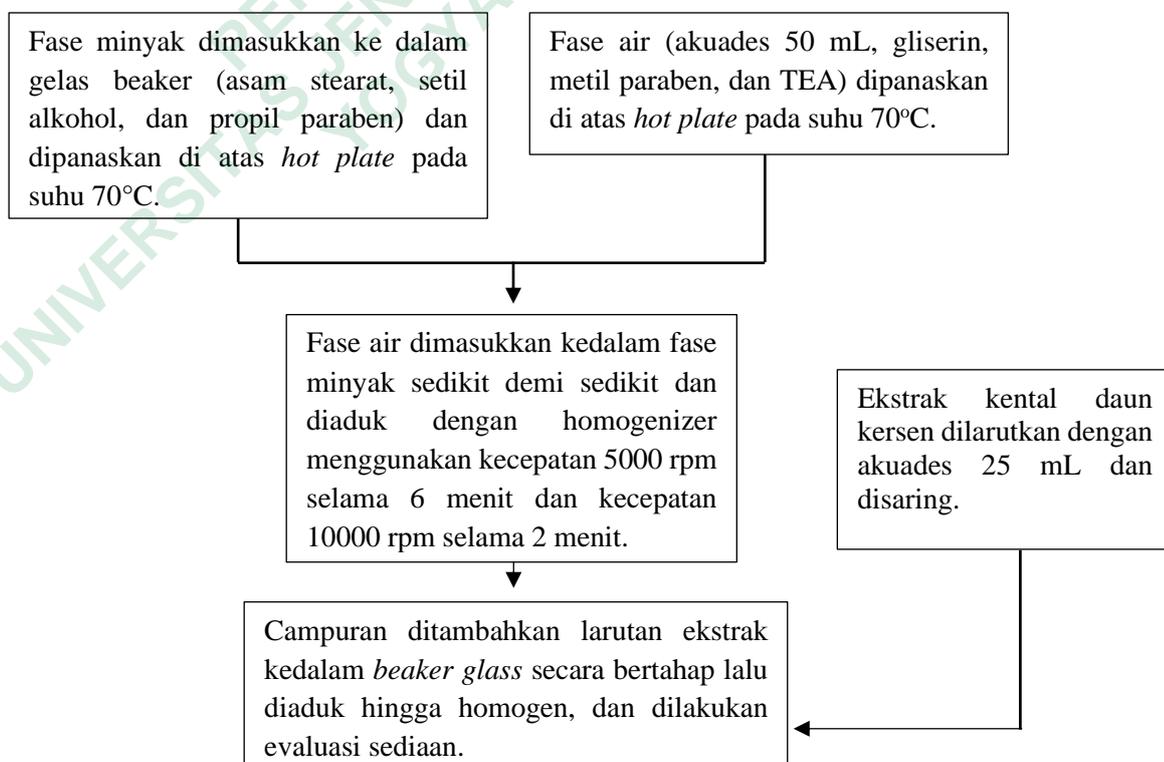
## 5. Formulasi Krim Ekstrak Etanol Daun Kersen

Sediaan krim menggunakan tiga variasi konsentrasi ekstrak daun kersen yang mengacu pada penelitian Sami dkk (2017), yaitu 0,3% ( $300 \times \text{IC}_{50}$ ); 0,6%

( $600 \times IC_{50}$ ); 0,9% ( $900 \times IC_{50}$ ). Pengambilan konsentrasi tersebut yaitu didasarkan pada hasil nilai  $IC_{50}$  10 ppm. Hasil perhitungan konsentrasi ekstrak daun kersen dapat dilihat pada lampiran 3. Formula krim daun kersen yang digunakan mengacu pada penelitian dari Puspitasari dkk (2018) yang ditunjukkan pada Tabel 3. Pembuatan krim ekstrak daun kersen dapat dilihat pada gambar 10.

**Tabel 3. Formula Krim Ekstrak Daun Kersen**

Bahan	kegunaan	Konsentrasi (% b/v)			
		F0	F1	F2	F3
Ekstrak daun kersen	Zat aktif	-	0,3	0,6	0,9
Asam stearate	Emulgator	10	10	10	10
Setil alkohol	Emulgator	3	3	3	3
TEA	Emulgator	2	2	2	2
Gliserin	Humektan	10	10	10	10
Propil paraben	Pengawet	0,05	0,05	0,05	0,05
Metil parabe	Pengawet	0,2	0,2	0,2	0,2
Aquadest	Pelarut	100	100	100	100



**Gambar 10. Cara Pembuatan Krim Ekstrak Daun Kersen**

## 6. Evaluasi fisik sediaan krim

### a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati warna, bau, dan tekstur dari sediaan krim. Pengujian dilakukan pada masing-masing formula (Pogaga et al., 2020).

### b. Uji pH

Sebanyak 1 g masing-masing formula dilarutkan dalam 10 mL akuades. Lalu pH diukur menggunakan pH meter. Persyaratan kriteria pH kulit adalah berkisar 4,5-6,5 (Pogaga et al., 2020).

### c. Uji Daya Sebar

Sebanyak 1 g masing-masing formula diletakkan di atas permukaan cawan petri bagian bawah yang sebelumnya sudah ditimbang. Lalu cawan petri tersebut ditimpa dengan cawan petri lainnya dan ditunggu 1 menit. Selanjutnya diameter krim diukur. Kemudian 50 g beban ditambahkan dan didiamkan 1 menit. Setelah itu diameter sebar krim diukur dari sisi vertikal, horizontal, dan diagonal. Pengukuran diameter dilakukan sampai beban tambahan mencapai 200 g. Ketentuan daya sebar yang bagus adalah 5-7 cm (Pogaga et al., 2020).

### d. Uji Daya Lekat

Sebanyak 250 mg masing-masing formula diletakkan di atas *objek glass* dan ditutup menggunakan *objek glass* lainnya. Kemudian beban seberat 1 kg ditambahkan di atasnya selama 5 menit. Kemudian tuas ditarik dan beban 80 gram di lepaskan. Saat tuas dilepaskan, waktu dicatat hingga kedua *objek glass* terpisah. Ketentuan daya lekat yang bagus adalah lebih dari 4 detik (Pogaga et al., 2020).

### e. Uji Viskositas

Krim dimasukkan ke dalam *beaker glass*. Lalu spindel nomor 6 dipasang dan rotor mulai dinyalakan. Hasil viskositas yang tertera dicatat. Pengukuran viskositas menggunakan viskometer Brookfield (Pratasik et al., 2019).

f. Uji Sentrifugasi krim (Stabilitas dipercepat)

5 g krim dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Lalu krim disentrifugasi selama 5 jam pada kecepatan 3750 rpm. Pengujian ini setara dengan penyimpanan krim selama 1 tahun. Krim dikatakan stabil apabila tidak terdapat pemisahan (Lachman, 1987). Perhitungan rasio pemisahan dapat dilihat pada persamaan (2):

$$F = \frac{H_u}{H_o} \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan:  $H_u$  : tinggi krim yang stabil

$H_o$  : tinggi awal krim

$F$  : Rasio pemisahan

g. Uji determinasi tipe krim

1) Metode pengenceran

Masing-masing formula krim dimasukkan ke dalam *beaker glass*, dan diencerkan dengan air. Jika krim tercampur maka tipe krim adalah M/A (minyak dalam air), sementara jika tidak tercampur maka tipe krim ialah A/M (air dalam minyak) (Pratasik et al., 2019).

2) Metode pewarnaan

1 tetes masing-masing formula krim ditambahkan ke dalam *object glass*. Lalu 2 tetes metilen biru ditambahkan, selanjutnya diamati dibawah mikroskop. Tipe emulsi merupakan A/M apabila emulsi terwarnai oleh metilen biru (Pratasik et al., 2019).

7. Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Krim

a. Pembuatan larutan induk DPPH 0,1 mM

Sebanyak 3,94 mg serbuk DPPH ditambahkan metanol p.a dalam labu ukur 100 mL. Larutan DPPH ditutup menggunakan alumunium foil (Ismail et al., 2015).

b. *Scanning* panjang gelombang maksimum

2 mL larutan induk DPPH diambil dan absorbansi larutan diukur pada rentang panjang gelombang 400-800 nm (Sami et al., 2017). Hasil didapatkan Panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 516 nm.

c. Penetapan *operating time*

2 mL larutan DPPH diamati absorbansinya selama 60 menit. *Operating time* ditentukan setiap 1 menit dengan panjang gelombang 516 nm berdasarkan absorbansi yang stabil (Qonitah, 2020). Didapatkan hasil *Operating time* yaitu pada menit ke-37.

d. Pengukuran serapan blanko DPPH

2 mL larutan induk DPPH diambil, lalu didiamkan selama 60 menit, absorbansi diukur pada panjang gelombang 516 nm (Qonitah, 2020).

e. Pembuatan larutan induk ekstrak 100 ppm

5 mg ekstrak ditimbang seksama dan ditambah metanol p.a ke dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas (Sami et al., 2017).

f. Pembuatan seri konsentrasi larutan baku ekstrak

Seri larutan baku 2; 4; 6; 8; dan 10 ppm dibuat dari pemipetan 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 800  $\mu$ l, dan 1000  $\mu$ l larutan induk ekstrak dalam labu takar 5 mL, setiap labu takar ditambah metanol p.a sampai tanda batas (Sami et al., 2017).

g. Pembuatan seri konsentrasi larutan standar kuersetin 100 ppm

Dalam labu takar 10 mL, ditimbang 1 mg kuersetin dan dilarutkan dengan metanol p.a. Seri konsentrasi larutan kuersetin terdiri atas 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm dan 9 ppm (tabung dilapisi dengan aluminium foil). Selanjutnya metanol p.a ditambahkan sampai tanda batas labu takar 5 mL (Pogaga et al., 2020).

h. Pembuatan seri konsentrasi larutan dari krim ekstrak daun kersen

Sebanyak 10 mg sampel masing-masing formula krim ditimbang dan metanol p.a dimasukkan dalam labu takar 10 mL. Lalu seri konsentrasi larutan 50 ppm; 100 ppm; 150 ppm; 200 ppm; dan 250 ppm dibuat dengan pemipetan 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL; 2,5 mL; ke dalam labu takar 10 mL. Selanjutnya metanol p.a ditambahkan sampai tanda batas (Pogaga et al., 2020).

i. Penetapan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH

1 mL sampel (kuersetin, ekstrak daun kersen, krim masing-masing formula) dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 mL larutan

DPPH (tabung dilapisi dengan aluminium foil). Campuran digojog dan didiamkan selama 37 menit ditempat gelap. Absorbansi sampel diamati pada panjang gelombang 516 nm dan dihitung nilai IC<sub>50</sub> (Sami et al., 2017).

### G. Metode Pengolahan Data dan Analisis Data

#### 1. Metode Pengolahan Data Antioksidan Terhadap DPPH

Sampel yang di gunakan yaitu F1, F2, dan F3 yang kemudian dihitung nilai IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> merupakan parameter yang digunakan untuk melihat kemampuan antioksidan menggunakan metode DPPH. Nilai IC<sub>50</sub> (50% *Inhibition Concentration*) ialah konsentrasi yang mampu meredakan sebesar 50% aktivitas DPPH. Nilai IC<sub>50</sub> ditentukan dengan cara menghitung % inhibisi (Muthia et al., 2019). Perhitungan % inhibisi aktivitas radikal bebas dapat dilihat pada persamaan (3):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol DPPH} - \text{absorbansi sampel uji}}{\text{absorbansi kontrol DPPH}} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

#### 2. Analisis Data

Pada penelitian ini dilakukan analisis data pada uji normalitas yaitu menggunakan metode Shapiro Wilk dan uji homogenitas menggunakan metode Levene's. Apabila kedua pengujian tersebut normal maka analisis dapat dilakukan menggunakan uji *One Way Anova* yang diolah menggunakan aplikasi SPSS. Metode *One Way Anova* dipilih karena penelitian ini akan membandingkan % penangkapan radikal DPPH dan sifat fisik sediaan krim dari tiga variasi konsentrasi ekstrak. Jika data yang diperoleh tidak terdistribusi normal atau tidak homogen maka analisis dilakukan menggunakan metode statistik non parametrik seperti metode Kruskal Wallis.