

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental untuk mengetahui karakteristik fisik dan aktivitas antioksidan sediaan krim ekstrak etanol 96% menggunakan metode *2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl* (DPPH).

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta selama Mei hingga Juli 2025.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel independen: variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% daun kelor (*Moringa oleifera* L).
2. Variabel dependen: karakteristik sediaan (organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat), dan nilai *Inhibition Concentration* 50% (IC₅₀).
3. Variabel kontrol: suhu pengeringan daun kelor, waktu ekstraksi, suhu peleburan, kecepatan pengadukan krim, dan waktu pengadukan krim.

D. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak daun kelor adalah hasil ekstraksi daun kelor berupa cairan kental yang diperoleh dari proses *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) menggunakan pelarut etanol 96%.
2. Krim ekstrak etanol dari daun kelor adalah formulasi semi-padat dari hasil kombinasi fase minyak dan fase air, dengan variasi konsentrasi ekstrak daun kelor yang digunakan.

3. *Inhibition Concentration 50%* (IC_{50}) merupakan parameter yang mengindikasikan jumlah konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menetralkan radikal bebas DPPH.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Cawan porselin, *grinder* (Fomac), sendok kayu, *hot plate* (IKA C-MAG HS 7), tabung reaksi (Iwaki), rak tabung, spatula, ayakan 60 *mesh* (test sieve), neraca analitik (Ohaus PA2202), neraca analitik (Ohaus PX224/E), mikroskop (*Olympus CX23*), mikro pipet (Eppendorf), cawan porselin, pH meter (Hanna), *viscometer* (*Brookfield DV1*), wajan, kompor (Maspion S-301), termometer, *homogenizer* (IKA T25), spektrofotometer UV-Vis (*genesys 10S UV-Vis*), dan sonikator (GT SONIC)

2. Bahan

Daun kelor, asam stearat (farmasetis), dimetikon (farmasetis), lanolin (farmasetis), vaselin album (farmasetis), gliserin (farmasetis), nipagin, nipasol (farmasetis), span 60 (farmasetis), tween 80 (farmasetis), propilenglikol, etanol 96% (teknis), etanol (p.a), Akuades (teknis), $FeCl_3$ (p.a), HCl (p.a), metilen biru (teknis), pereaksi *wagner* (p.a), pereaksi *dragendroff* (p.a), pereaksi *mayer* (p.a), serbuk Mg (p.a), *2,2-Diphenyl-1-Picrylhdrazyl* (DPPH) (p.a), vitamin C (p.a), *aluminium foil*.

F. Pelaksanaan Penelitian

1. Deteminasi Tanaman

Pada penelitian ini dilakukan proses determinasi pada daun kelor untuk memastikan taksonomi dari daun kelor. Hal ini berkaitan dengan karakteristik

morfologis pada tanaman. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Preparasi Sampel

Sampel diambil di kebun budidaya kelor yang berada di Jl. Bakulan RT 01, Desa Trirenggo, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta, dimana secara geografis terletak pada titik koordinat 07°44' 04" - 08° 00' 27" LS dan 110° 12' 34" -110° 31' 08" BT. Daun kelor dipanen pada pagi hari jam 05.00-07.00 WIB. Daun kelor muda sebanyak 10 kg yang berwarna hijau dipisahkan dari batang dengan menyerut daun dari bagian ujung kepangkal tangkai, daun yang berwarna kuning dipisahkan. Daun dibersihkan dengan air mengalir sampai benar-benar bersih, dikeringanginkan kemudian dilanjutkan pengeringan dengan oven selama 24 jam pada suhu 50°C sampai diperoleh simplisia kelor hancur jika diremas dengan tangan. Setelah itu dimasukkan ke dalam *grinder* untuk dihaluskan hingga menjadi simplisia serbuk. Selanjutnya serbuk simplisia diayak menggunakan ayakan 60 *mesh*, ditimbang dan disimpan dalam wadah yang bersih, kering serta kedap udara (Kristina *et al.*, 2022)

3. Proses ekstraksi daun kelor menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE)

Direndam 100 g serbuk daun kelor dengan etanol 96% sebanyak 1000 mL perbandingan 1:10, lalu diekstraksi pada suhu 30°C selama 45 menit menggunakan sonikator. Proses ekstraksi dilakukan 9 kali sehingga total simplisia yang digunakan adalah 900 gram. Kemudian difiltrasi lalu diuapkan filtrat menggunakan kompor dengan suhu 50°C agar memperoleh ekstrak kental daun kelor (Hikmawanti & Fatmawati, 2019). Ekstrak yang didapatkan ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Awal Simplisia}} \times 100\%$$

4. Evaluasi karakteristik ekstrak etanol daun kelor

a. Uji Organoleptis

Pada uji ini, diamati warna, tekstur, dan aroma dari ekstrak (Octavia *et al.*, 2023).

b. Uji pH

Sejumlah 1 g sampel ditimbang dan dilarutkan dengan akuades sejumlah 10 mL, kemudian digunakan alat pH meter untuk mengukur pH ekstrak (Okzelia & Mardiyah, 2023).

c. Skrining Fitokimia

1) Uji Senyawa Flavonoid

Sejumlah 1 g ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan akuades panas sejumlah 10 mL, kemudian diaduk dan difiltrat. Sebanyak 1 mL filtrat dilarutkan dengan 0,2 g serbuk magnesium dan HCl pekat 5 tetes. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua atau merah bata (Yulia. *et al.*, 2022).

2) Uji Senyawa Saponin

Sejumlah 500 mg sampel dilarutkan menggunakan 10 mL akuades, setelah itu digojog 10 detik. Hasil positif ditandai dengan timbulnya buih yang tidak hilang (Yulia. *et al.*, 2022).

3) Uji Senyawa Tanin

Sejumlah 1 g sampel dilarutkan dengan 5 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Jika muncul warna hijau kehitaman maka sampel mengandung senyawa tanin (Yulia. *et al.*, 2022).

4) Uji Senyawa Alkaloid

Sejumlah 10 mg sampel dilarutkan dengan asam klorida 2N sejumlah 1 mL. Setelah itu ditambahkan 9 mL air, kemudian dipanaskan selama 2 menit menggunakan penangas air, lalu didinginkan dan difiltrasi.

Hasil positif ditandai dengan terbentuknya perubahan pada uji coba beberapa pereaksi berikut:

- a) 3 tetes hasil saringan dicampurkan dengan reagen Mayer 2 tetes. Hasil positif terlihat jika muncul endapan putih kekuningan
- b) 3 tetes hasil saringan dicampurkan dengan reagen Dragendroff 2 tetes. Jika muncul endapan merah jingga, maka hasil positif
- c) 3 tetes hasil saringan ditambahkan dengan reagen Wagner 2 tetes. Jika terbentuk endapan kuning, maka hasil positif (Yulia. *et al.*, 2022)

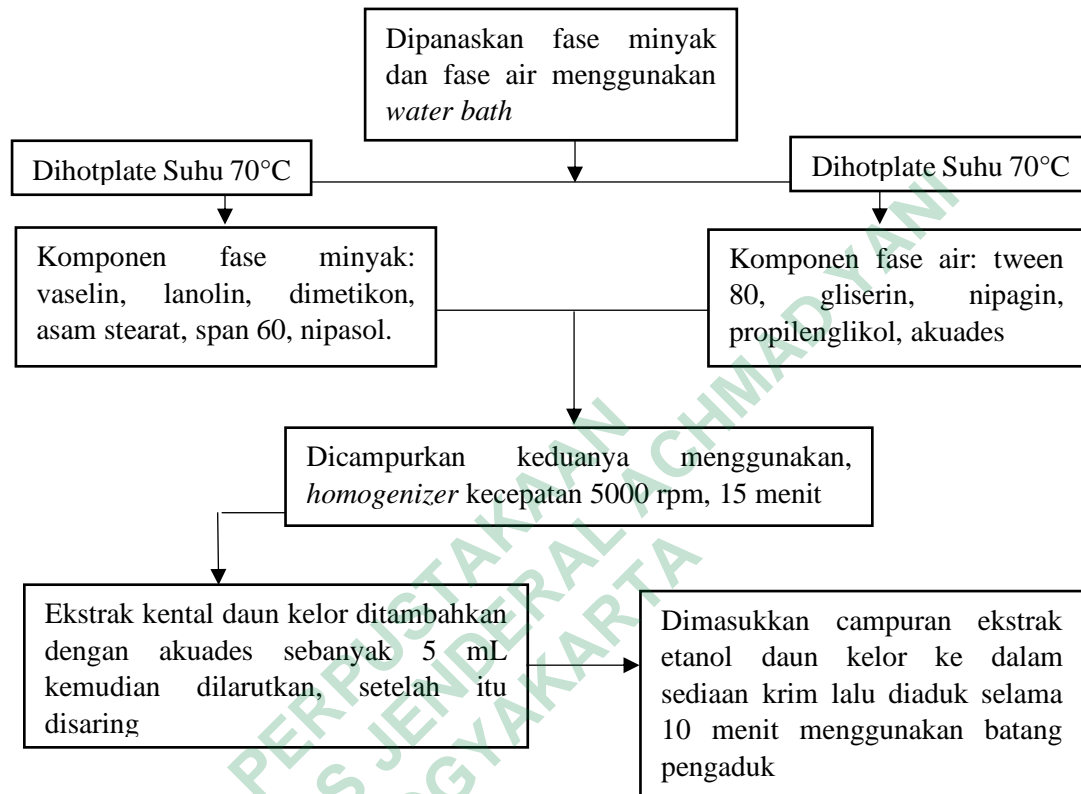
5. Formulasi Krim dari Ekstrak Etanol Daun Kelor

Tiga variasi konsentrasi ekstrak daun kelor yang digunakan mengacu pada penelitian Nifa *et al.*, (2023) yaitu 3%, 5%, dan 7% dengan didasarkan pada hasil nilai IC₅₀ dengan kategori antioksidan kuat dan sangat kuat. Sedangkan formula krim yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada penelitian Harun (2014). Formula krim yang akan dibuat, tercantum pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Komposisi Formula Krim Ekstrak Etanol Daun Kelor

Bahan	Fungsi	Konsentrasi (% b/v)		
		FI	FII	FIII
Ekstrak	Zat Aktif	3	5	7
Span 60	Emulgator	9,03	9,03	9,03
Tween 80	Emulgator	0,97	0,97	0,97
Asam Stearat	Basis	10	10	10
Dimetikon	Emolien	10	10	10
Lanolin	Emolien	13	13	13
Vaselin Album	Emolien	15	15	15
Nipagin	Pengawet	0,18	0,18	0,18
Nipasol	Pengawet	0,05	0,05	0,05
Gliserin	Humektan	10	10	10
Propilenglikol	Humektan	8	8	8
Akuades	Pelarut	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>

Pembuatan krim tipe *water in oil* (W/O) dari ekstrak daun kelor dilakukan melalui beberapa tahapan sebagaimana ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Skema Kerja Pembuatan Krim Ekstrak Etanol Daun Kelor (Harun, 2014)

6. Evaluasi Sifat Fisik Sediaan Krim Ekstrak Etanol Daun Kelor

a. Uji organoleptik

Evaluasi organoleptik pada sediaan dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan aroma yang dihasilkan (Husni *et al.*, 2019)

b. Uji homogenitas

Evaluasi homogenitas dilakukan dengan mengoleskan sediaan ke permukaan kaca transparan. Sediaan dianggap homogen jika tidak terdapat partikel kasar yang terlihat (Riadi *et al.*, 2024).

c. Uji pH

Sebanyak 1 g masing-masing sediaan ditimbang dan dilarutkan dengan 10 mL akuades, kemudian diukur menggunakan alat pH meter dengan mencelupkan alat ke dalam sediaan, lalu dicatat hasil yang muncul. Syarat nilai pH yaitu 4,5- 6,5 (Riadi *et al.*, 2024).

d. Uji daya sebar

Sejumlah 500 mg sediaan ditempatkan pada kaca bundar, diletakkan kaca bundar di atasnya. Kemudian didiamkan selama 5 menit lalu diletakkan beban pemberat dengan bobot 50 g di atasnya selama 60 detik, kemudian dicatat hasil diameter penyebarannya. Replikasi sebanyak 3 kali. Proses serupa diulang untuk beban dengan bobot 100 g, 150 g, dan 200 g. Kriteria daya sebar yang baik yaitu 5 hingga 7 cm (Hardiyanti, 2022).

e. Uji daya lekat

Sejumlah 500 mg sediaan ditempatkan pada preparat kaca, setelah itu preparat kaca lain ditempelkan hingga menyatu, kemudian diberi beban 1 kg dalam waktu 5 menit dan dipasangkan pada perangkat uji. Setelah pemberat 80g dilepas, dicatat waktu yang diperlukan hingga kedua preparat kaca terpisah, dan uji diulang tiga kali. Hasil memenuhi syarat jika daya lekat krim >4 detik (Rikadyanti *et al.*, 2020).

f. Uji viskositas

Pengukuran viskositas menggunakan viskometer *Brookfield* dengan menggunakan *spindle* nomor 7, dimasukkan ke dalam sediaan dan dijalankan dengan kecepatan 50 rpm. Syarat viskositas krim yang baik yaitu >5000 cPs (Harun, 2014).

g. Uji stabilitas krim dengan sentrifugasi (Stabilitas dipercepat mekanik)

Sejumlah 5 g sediaan dimasukan ke dalam tabung sentrifus, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Krim dikatakan

stabil apabila tidak terdapat pemisahan (Zulkarya & Hastuti, 2018). Perhitungan rasio pemisahan dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$F = \frac{H_u}{H_o}$$

Keterangan: H_u = tinggi krim yang stabil

H_o = tinggi awal krim

F = rasio pemisahan

7. Penentuan potensi antioksidan krim ekstrak etanol 96% daun kelor

a. Penyiapan larutan stok DPPH (0,1 mM)

Sejumlah 3,94 mg DPPH (0,1 mM) dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu ukur 100 mL, kemudian digojok hingga larutan homogen berubah warna menjadi ungu, lalu dipindahkan ke botol kaca gelap dan ditutup menggunakan *aluminium foil* (Putri, 2023)

b. *Scanning* panjang gelombang maksimum DPPH

Dipipet 2 mL larutan DPPH (0,1 mM) ke dalam tabung reaksi, kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 400-600 nm (Putri, 2023). Panjang gelombang maksimum DPPH yang diperoleh yaitu 518 nm.

c. Penentuan *operating time* DPPH

Sejumlah 2 mL larutan DPPH (0,1 mM) ditambahkan dengan 1 mL larutan vitamin C 6 ppm, kemudian diukur absorbansinya pada menit ke 0-60 (Putri, 2023). Penentuan *operating time* menggunakan panjang gelombang maksimum.

d. Penyiapan larutan stok pembanding vitamin C (100 ppm)

Sebanyak 10 mg vitamin C ditimbang dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga tanda batas volume 100 mL. Kemudian diencerkan larutan stok vitamin C konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm dan 8 ppm, 10 ppm dengan memipet 100 μ L; 200 μ L; 300 μ L; 400 μ L, 500 μ L setelah itu ditempatkan

masing-masing pada labu takar 5 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas (Hidayati & Masykuroh, 2023).

e. Penyiapan larutan sampel krim (1000 ppm)

Ditimbang 10 mg dari masing-masing konsentrasi krim dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga tanda batas volume 10 mL lalu disonikasi selama 5 menit, kem (Putri, 2023).

f. Penentuan antioksidan larutan pembanding vitamin C

Dipipet 1 mL dari sampel dan masing-masing larutan ke dalam tabung reaksi yang telah dibungkus *aluminium foil*, kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH (0,1 mM), lalu didiamkan selama *operating time* pada tempat gelap. Dibaca serapannya pada gelombang maksimum. Dihitung nilai % inhibisi dan IC₅₀ dari masing-masing konsentrasi (Putri, 2023).

g. Penentuan antioksidan larutan sampel krim

Dipipet 1 mL dari masing-masing larutan krim ke dalam tabung reaksi yang telah dibungkus *aluminium foil*, kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH (0,1 mM), lalu didiamkan selama *operating time* pada tempat gelap. Dibaca serapannya pada gelombang maksimum. Dihitung nilai % inhibisi dan IC₅₀ dari masing-masing konsentrasi (Putri, 2023).

G. Teknik Pengolahan dan Analisis Data

1. Cara Pengolahan Data Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH

Digunakan data dari sampel FI, FII, FIII dan larutan pembanding vitamin C dengan berbagai konsentrasa untuk menghitung nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi larutan sampel yang mampu menghambat 50% aktivitas DPPH (Hidayati & Masykuroh, 2023). Perhitungan % inhibisi dapat ditentukan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi DPPH} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan % inhibisi dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linear (x,y) agar mendapatkan IC₅₀ dimana x konsentrasi (ppm) dan y sebagai % inhibisi (Hikmawanti & Fatmawati, 2019). IC₅₀ sampel pembanding diperoleh dengan rumus, yaitu:

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y : Absorban

x : Konsentrasi (ppm)

a : Intersep

b : Slope

2. Analisis Data

Penelitian ini menganalisis data dengan uji normalitas menggunakan Shapiro Wilk dan uji homogenitas dengan Levene's. Jika data terdistribusi normal dan homogen, analisis dilakukan uji *One Way Anova* menggunakan SPSS, untuk membandingkan % penangkapan radikal bebas DPPH dan sifat fisik krim pada tiga konsentrasi ekstrak. Jika data tidak normal atau homogen, analisis menggunakan metode non parametrik yaitu Kruskal Wallis. Pada uji Shapiro-Wilk dan Levene's , jika nilai *probability* (p) $\geq 0,05$ maka data dianggap terdistirbusi normal dan homogen, setelah itu dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dengan syarat $p < 0,05$ maka ada perbedaan signifikan antara kelompok sampel uji. Namun jika data tidak terdistribusi normal dan homogen, digunakan uji Kruskal Wallis dengan syarat $p < 0,05$ (Hidayati & Masykuroh, 2023).