

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental untuk mengevaluasi pengaruh variasi konsentrasi ekstrak metanol daun kelor terhadap sifat fisik masker gel *peel-off* dan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH.

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

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2024 hingga Juni 2024 yang bertempat pada laboratorium Baham Alam, Prodi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

### **C. Populasi Sampel**

#### 1. Populasi

Penelitian ini menggunakan daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) yang diperoleh dari Dusun Kersan, Tirtonirmolo, Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul Daerah Istimewa Yogyakarta.

#### 2. Sampel

Sampel uji yang digunakan adalah daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) yang diambil bagian daun segar dengan cara dipetik satu-persatu dari batang daunnya.

### **D. Variabel Penelitian**

#### 1. Variabel bebas

Variasi konsentrasi ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk).

#### 2. Variabel terikat

Sifat fisik gel *peel-off* (daya sebar, pH, daya lekat), dan nilai IC<sub>50</sub>.

#### 3. Variabel terkontrol

Suhu pengeringan ekstrak pada oven, waktu ekstraksi, suhu pengembangan gel dan kecepatan pengadukan gel.

### E. Definisi Operasional

1. Ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) merupakan suatu cairan kental yang diperoleh dengan merendam serbuk dalam pelarut metanol melalui proses maserasi kemudian dilakukan proses penguapan.
2. Gel *peel-off* merupakan sediaan semi padat yang berbentuk gel dan diaplikasikan ke kulit wajah.
3. IC<sub>50</sub> adalah parameter yang menunjukkan konsentrasi terendah senyawa antioksidan yang bias merendam radikal bebas.

### F. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat penelitian yang digunakan yaitu bejana, batang pengaduk, spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific), grinder simplisia, timbangan analitik (Ohaus), hotplate (IKA C-MAG HS 7), mikropipet (Ependroff), tabung reaksi, rak tabung reaksi, ayakan 40 mesh dan alat gelas lainnya.

#### 2. Bahan

Bahan penelitian yang digunakan yaitu simplisia daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) , DPPH (p.a), metanol (teknis), akuades, kertas saring, pereaksi Wagner, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendrof, HCl 2N, serbuk magnesium, FeCl<sub>3</sub>, asam asetat glasial (p.a), asam sulfat pekat (p.a), n-butanol (teknis), asam klorida, kuarsetin (Sigma Aldrich, St. Lois, USA), HPMC (farmasetis), PVA (farmasetis), metil paraben (farmasetis), propil paraben (farmasetis), dan gliserin (farmasetis).

### G. Pelaksanaan Penelitian

#### 1. Determinasi tanaman dan pengumpulan bahan

Determinasi daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan , yang bertujuan untuk mengetahui keaslian dari daun kelor yang akan digunakan pada penelitian ini.

## 2. Persiapan sampel

Daun kelor dicuci bersih dengan menggunakan air mengalir, kemudian diangin-anginkan. Sortasi basah dilakukan pada daun kelor bertujuan untuk memisahkan antara pengotor yang melekat atau menempel terhadap sampel. Daun kelor dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga daun kelor kering yang ditandai dengan mudahnya daun hancur apabila diremas. Daun kelor yang telah kering diserbuk menggunakan grinder untuk mendapatkan serbuk daun kelor. Serbuk yang didapat kemudian diayak dengan ayakan 40 mesh (Sreelatha *et al.*, 2009).

## 3. Pembuatan ekstrak metanol daun kelor

Proses ekstraksi pada sampel dilakukan dengan metode maserasi dengan perbandingan 1 : 10. Sebanyak 1000 gram serbuk simplisia daun kelor, dimasukkan ke dalam toples kaca, dan ditambahkan dengan pelarut metanol sebanyak 10 liter. Hasil maserat diaduk sampai serbuk simplisia benar-benar terendam. Toples ditutup rapat dan disimpan di tempat yang gelap. Ekstrak didiamkan selama 72 jam sambil dilakukan beberapa kali pengadukan. Lalu maserat disaring sampai didapatkan filtrat 1. Ampas diremaserasi dengan metanol dan didiamkan selama 24 jam dengan sesekali diaduk. Hasil remaserasi disaring dan diperoleh filtrat 2. Kedua filtrat dicampur, dan dipekatkan dengan menggunakan kompor listrik pada suhu 45° C untuk memperoleh ekstrak kental. Rendemen dapat dihitung berdasarkan ekstrak kental yang diperoleh (Nurjanah *et al.*, 2011). Perhitungan rendemen dilakukan menggunakan persamaan (1).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat ekstrak simplisia}} \times 100 \% \dots \dots \dots (1)$$

## 4. Karakterisasi ekstrak metanol daun kelor

### a. Organoleptis

Pengujian ini dilakukan dengan mengamati warna, bau sampel, dan tekstur yang terdapat pada ekstrak metanol daun kelor. Pengujian ini bertujuan untuk mengidentifikasi ciri khas yang terdapat pada ekstrak daun kelor (Istiana *et al.*, 2021).

b. Uji *moisture content*

Sebanyak 2 gram ekstrak ditimbang dan dimasukkan dalam cawan aluminium pada moisture analyzer. Suhu diatur menjadi 105<sup>0</sup> C. Nilai yang muncul pada alat saat pengujian telah selesai dicatat (Purwaningsih *et al.*, 2014).

c. Uji pH

Sebanyak 1 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 mL akuades. Lalu pH diukur menggunakan pH meter (Purwaningsih *et al.*, 2014).

d. Skrinning fitokimia

1) Flavonoid

Sebanyak 50 mg ekstrak daun kelor dilarutkan dengan 100 mL air panas. Tabung dipanaskan selama 5 menit. Larutan ditambahkan 50 mg magnesium dan 1 mL HCl. Perubahan larutan menjadi berwarna merah, menunjukkan adanya flavonoid (Djarot *et al.*, 2020).

2) Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun kelor ditambah dengan 9 mL akuades dan 1 mL HCl 2 N. Lalu larutan dipanaskan selama 2 menit dan disaring. Masing-masing tabung diberi 3 tetes filtrat. Lalu masing-masing tabung ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, dan pereaksi Dragendorf. Jika positif mengandung alkaloid maka akan terdapat endapan putih atau kuning pada penambahan pereaksi Mayer, terdapat endapan berwarna coklat kemerahan pada penambahan pereaksi Wagner, dan pada penambahan pereaksi Dragendorf terbentuk endapan kuning jingga. Apabila 2 dari 3 reaksi tersebut positif, maka dapat dikatakan ekstrak mengandung alkaloid (Pardede, A., 2013).

3) Tanin

Sebanyak 50 mg ekstrak daun kelor dilarutkan ke dalam 4 mL air. Kemudian 2 mL ekstrak diambil, lalu ditambahkan 2 tetes FeCl<sub>3</sub> 10%. Hasil positif mengandung tanin jika terjadi perubahan warna biru tua atau hitam kehijauan pada larutan (Djarot *et al.*, 2020).

## 4) Saponin

Sebanyak 50 mg ekstrak daun kelor ditambahkan 10 mL akuades ke dalam tabung reaksi. Lalu larutan digojok selama 10 detik, dan akan menghasilkan busa 1-10 cm. Selanjutnya 1 tetes HCl 2N ditambahkan ke dalam tabung. Hasil positif mengandung saponin apabila buih tersebut tidak hilang (Djarot *et al.*, 2020).

## 5) Fenolik

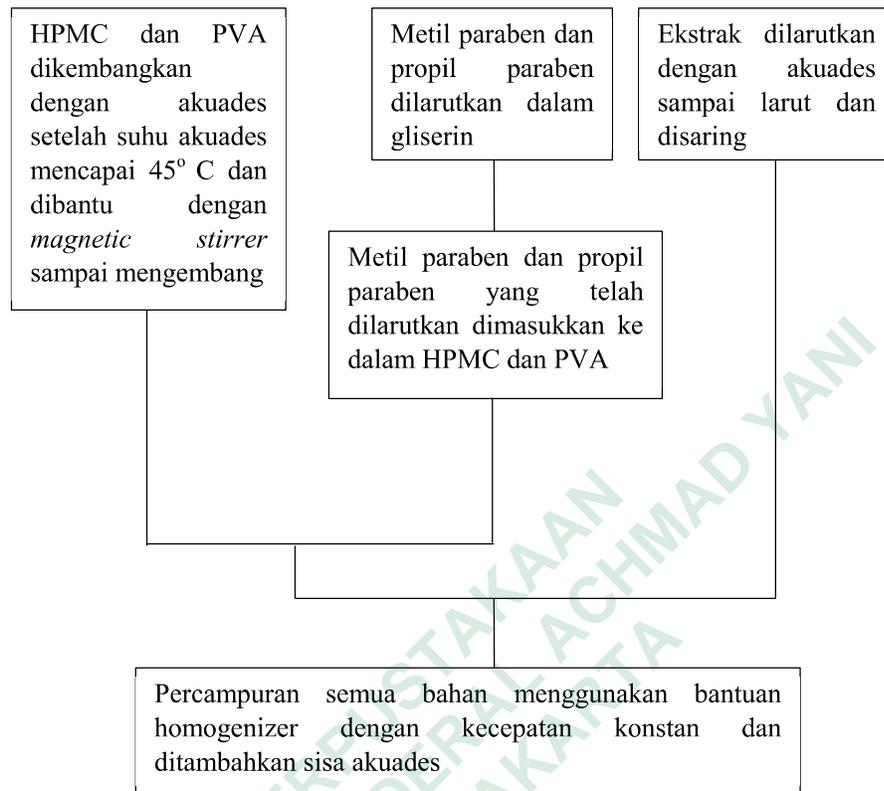
Sebanyak 50 mg ekstrak daun kelor dilarutkan dengan 10 mL akuades. Kemudian campuran dipanaskan selama 5 menit dan disaring. 5 mL filtrat diambil dan ditambahkan 10 tetes FeCl<sub>3</sub> 10%. Hasil berupa warna hitam pekat menunjukkan adanya fenolik (Djarot *et al.*, 2020).

5. Formulasi masker gel *peel-off* ekstrak daun kelor

Variasi konsentrasi ekstrak daun kelor yang digunakan adalah 0,25 g, 0,5 g, dan 1 g. Pemilihan konsentrasi ekstrak tersebut berdasarkan hasil dari (Hidayati *et al.*, 2019). Gel yang dibuat terdiri dari 3 formula (F1, F2, F3) dengan variasi konsentrasi ekstrak metanol daun kelor dan 1 formula (F0) sebagai kontrol. Formula gel daun kelor yang digunakan mengacu pada penelitian (Hidayati *et al.*, 2019) yang dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Formula Masker Gel *peel-off* Ekstrak Daun Kelor (Hidayati *et al.*, 2019)**

Bahan	Konsentrasi (% b/b)			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak daun kelor	-	0,25	0,5	1
HPMC	4	4	4	4
PVA	8	8	8	8
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02
Gliserin	11	11	11	11
Akuades ad	100	100	100	100



**Gambar 5. Prosedur Pembuatan Masker Gel *Peel-Off* Daun Kelor**

6. Evaluasi fisik sediaan masker gel *peel-off*

Evaluasi fisik yang dilakukan terhadap masker gel *peel-off* meliputi:

a. Uji organoleptik

Pengujian ini dilakukan dengan cara mengamati sediaan berdasarkan bentuk, warna, dan aroma. Parameter gel yang baik adalah bentuknya yang kental, berwarna bening/transparan dan bau khas.

b. Uji pH

Pengujian pH dilakukan menggunakan pH meter. Sebanyak 1 g sediaan gel dilarutkan dengan akuades 10 mL. Kemudian pH meter dicelupkan dan hasil pH yang didapatkan dicatat (Wahyuni, 2015).

c. Uji daya sebar

Sebanyak 1 gram gel diletakkan di atas permukaan cawan petri pada bagian bawah yang sebelumnya sudah ditimbang. Cawan petri tersebut ditimpa dengan cawan petri lainnya dan ditunggu 1 menit, kemudian diameter gel diukur. Sebanyak 50 gram beban ditambahkan dan didiamkan selama 1 menit, kemudian diameter gel tersebut diukur. Pengukuran diameter dilakukan sampai beban tambahan mencapai 200 gram. Ketentuan daya sebar yang baik adalah 5-7 cm (Warninda *et al.*, 2016).

d. Uji daya lekat

Sebanyak 250 mg gel diletakkan di atas object glass dan ditutup menggunakan object glass lainnya. Beban seberat 1 kg ditambahkan di atasnya selama 5 menit. Kemudian tuas ditarik dan beban 80 gram dilepaskan. Saat tuas dilepaskan, waktu dicatat hingga kedua object glass terpisah. Ketentuan daya lekat yang bagus tidak lebih dari 4 detik (Harningsih, 2019).

e. Uji iritasi

0,5 gram gel sediaan masker gel *peel-off* dioleskan di bagian punggung lengan karena bagian lengan punggung atas termasuk bagian yang sensitif seperti halnya kulit wajah, dan ditunggu sampai 15 menit, kemudian dilihat ada tidaknya reaksi yang timbul dari sediaan masker timbul bintik-bintik kemerahan (Sopianti & Agustin, 2019).

f. Uji waktu mengering

0,2 gram gel dioleskan ke object glass hingga membentuk lapisan tipis. Ditunggu sampai gel kering dan dapat dikelupas. Dihitung waktu yang diperlukan dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Harningsing, 2019).

7. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun kelor sediaan masker gel *peel-off*

a. Pembuatan larutan induk DPPH 0,1 mM

Sebanyak 3,94 mg serbuk DPPH ditambahkan metanol p.a dalam labu takar 100 mL sampai tanda batas. Larutan menggunakan sonikator sampai larut dan ditutup labu takar menggunakan aluminium foil (Aminah *et al.*, 2016).

b. Scanning panjang gelombang maksimum

Sebanyak 2 mL larutan DPPH 0,1 mM, dimasukan kedalam kuvet. Lalu absorbansi larutan diukur pada rentang panjang gelombang 400-800 nm (Kusuma, 2020). Hasil panjang gelombang maksimal yang didapatkan adalah 516 nm.

c. Penetapan *operating time*

Sebanyak 2 mL DPPH diambil dengan menggunakan mikropipet ditambahkan 1 mL larutan kuersetin dimasukkan ke dalam kuvet dan digojok. Diamati absorbansi tiap 1 menit selama 60 menit pada panjang gelombang 516 nm (Rizkayanti., 2017). Hasil *operating time* yang didapatkan adalah pada menit ke-35.

d. Pengukuran serapan blanko DPPH

Diambil 2 mL larutan DPPH dengan menggunakan mikropipet dimasukkan ke dalam kuvet lalu dimasukkan ke dalam spektrofotometer dan diukur pada panjang gelombang yang telah ditentukan (Rizkayanti., 2017). Dalam penelitian ini diukur pada panjang gelombang 516 nm.

e. Pembuatan larutan induk kuersetin (100 ppm)

Ditimbang 10 mg kuersetin dilarutkan dengan metanol p.a pada labu takar 100 mL sampai tanda batas, lalu larutan dilarutkan menggunakan sonikator dan ditutup dengan aluminium foil sehingga didapatkan larutan konsentrasi 100 ppm (Apriandi, 2011).

f. Pembuatan seri konsentrasi kuersetin

Seri konsentrasi 1; 2; 3; 4; dan 5 ppm dibuat dengan pengambilan 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 150  $\mu$ L, 200  $\mu$ L dan 250  $\mu$ L dengan menggunakan mikropipet dari larutan induk kuersetin 100 ppm, masing-masing dimasukkan dalam

labu takar 5 mL dan ditambahkan dengan metanol sampai tanda batas (Apriandi, 2011).

g. Pembuatan larutan induk ekstrak (100 ppm)

Sebanyak 5 mg ekstrak ditimbang seksama dan ditambah metanol p.a ke dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas. Larutan dilarutkan menggunakan sonikator dan ditutup dengan aluminium foil sehingga didapatkan larutan konsentrasi 100 ppm (Sami *et al.*, 2017).

h. Pembuatan seri konsentrasi larutan baku ekstrak

Seri konsentrasi 10; 20; 30; 40; dan 50 ppm dibuat dari pengambilan 500  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L, 1500  $\mu$ L, 2000  $\mu$ L, dan 2500  $\mu$ L dengan menggunakan mikropipet dari larutan baku ekstrak daun kelor 100 ppm, masing-masing dimasukkan dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan dengan metanol sampai tanda batas (Sami *et al.*, 2017).

i. Pembuatan larutan induk gel ekstrak daun kelor (1000 ppm)

Sebanyak 10 mg sampel masing-masing formula gel ditimbang dan ditambahkan metanol p.a ke dalam labu ukur 10 mL. Larutan dilarutkan menggunakan sonikator dan ditutup dengan aluminium foil sehingga didapatkan larutan konsentrasi 1000 ppm (Sami *et al.*, 2017).

j. Pembuatan seri konsentrasi larutan dari gel ekstrak daun kelor

Seri konsentrasi 25; 50; 75; 100; dan 125 ppm, dibuat dengan pengambilan 125  $\mu$ L; 250  $\mu$ L; 375  $\mu$ L; 500  $\mu$ L; dan 625  $\mu$ L dari larutan sampel masing-masing formula daun kelor 100 ppm dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan dengan metanol p.a sampai tanda batas (Ulfah, 2016).

k. Pengujian aktivitas antioksidan masker gel *peel-off* daun kelor

Sebanyak 1 mL dari masing-masing sampel (kuersetin, ekstrak daun kelor, gel masing-masing formula) ditambahkan 2 mL DPPH. Kemudian campuran diinkubasi selama *operating time* yaitu 35 menit dan diukur pada panjang gelombang maksimal yaitu 516 nm (Ulfah, 2016).

## H. METODE PENGOLAHAN DATA DAN ANALIS DATA

### 1. Metode pengolahan data antioksidan terhadap DPPH

Nilai  $IC_{50}$  merupakan parameter yang digunakan untuk melihat kemampuan antioksidan menggunakan metode DPPH. Nilai  $IC_{50}$  (50% Inhibition Concentration) ialah konsentrasi yang mampu meredamkan sebesar 50% aktivitas DPPH. Nilai  $IC_{50}$  ditentukan dengan cara menghitung % inhibisi (Ramadhani, 2019). Perhitungan % penghambatan aktivitas radikal bebas dapat dilihat pada persamaan (2).

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol DPPH}} \times 100 \% \dots (2)$$

### 2. Analisis data

Pada penelitian ini dilakukan analisis data pada uji normalitas yaitu menggunakan metode Kolmogorov Smirnov dan uji homogenitas menggunakan metode Levene's. Apabila data normal dan homogeny maka analisis dapat dilakukan menggunakan uji *One Way* Anova. Metode *One Way* Anova dipilih karena penelitian ini akan membandingkan % penangkapan radikal DPPH dan sifat fisik sediaan gel 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.