

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental karena menggunakan variasi konsentrasi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) pada formula lotion untuk mengetahui pengaruhnya terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dan terhadap sifat fisik lotion.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Prodi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, yang dilaksanakan pada bulan September – Oktober 2023.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.)

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung yang digunakan yaitu sifat fisik lotion (pH, daya sebar, viskositas dan daya lekat) dan nilai IC₅₀

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali yang digunakan yaitu suhu pengeringan sampel daun kersen pada suhu 50°C, kriteria daun dan kecepatan pengadukan dalam pembuatan lotion.

D. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah suatu cairan kental yang diperoleh dengan melarutkan serbuk dalam pelarut etanol 70% melalui

proses maserasi..

2. Lotion merupakan sediaan semi padat yang terdiri dari fase minyak dan fase air yang dibuat dalam variasi konsentrasi ekstrak daun kersen.
3. IC₅₀ merupakan suatu konsentrasi yang dapat meredam 50% radikal bebas.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan meliputi ayakan 40 mesh, alat uji daya lekat, alat uji daya sebar, alat – alat gelas, cawan porselin, grinder (Fomac), homogenizer (IKA T25), hot plate (IKA C-MAG HS 7), mikropipet, *moisture analyzer* (Ohaus MB90), mortir dan stamper, pH meter (Hanna), rak tabung, Spektrofotometer UV-Vis (genesys 10S UV-VIS), timbangan analitik (Ohaus PX224/E), viskometer Brookfield.

2. Bahan

Bahan yang digunakan terdiri dari alumunium foil, asam stearat (farmasetis), akuades (teknis), Bouchardat (p.a), daun kersen (*Muntingia calabura* L.), Dragendorff (p.a), DPPH (p.a), etanol 70% (teknis), FeCl₃ (p.a), gliserin (p.a), HCl (p.a), kuersetin (p.a), Mayer (p.a), Magnesium (p.a), metil paraben (farmasetis), metanol (p.a), metilen biru (teknis), parafin cair (farmasetis), setil alkohol (farmasetis), trietanolamin (farmasetis).

F. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi daun kersen

Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi bertujuan untuk memastikan kebenaran sampel daun kersen (*Muntingia calabura* L.)

2. Penyiapan

Sampel daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dipilih dengan kriteria daun yang segar, berwarna hijau, daunnya tidak terlalu tua, terletak di urutan 3 sampai 5 dari pucuk tanaman. Sampel diambil di area jalan pinggir sawah Desa

Gamping, Kecamatan Nogotirto, Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Selanjutnya sortasi basah dilakukan dengan tujuan untuk membersihkan/menyingkirkan kotoran yang berada pada daun kersen. Sampel dicuci hingga bersih, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Daun yang sudah kering, diserbuk menggunakan grinder. Selanjutnya pengayakan dilakukan dengan ayakan nomor mesh 40 sampai diperoleh serbuk halus daun kersen (Pambudi *et al.*, 2021)

3. Ekstraksi daun kersen

1 kg serbuk daun kersen dimaserasi dalam pelarut etanol 70% sebanyak 10 L dengan perbandingan 1:10. Hasil maserasi didiamkan selama 3×24 jam dan dilakukan pengadukan tiap 6 jam sekali selama 5 menit dan disimpan di tempat yang gelap. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring sampai mendapatkan filtrat. Filtrat hasil maserasi selanjutnya dipekatkan dengan dipanaskan dengan pananas air pada suhu 45°C hingga didapatkan hasil ekstrak kental. Ekstrak kental yang sudah didapat selanjutnya dilakukan perhitungan rendemen dengan rumus pada persamaan 1 (Depkes RI, 2000).

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

4. Karakterisasi ekstrak daun kersen

a. Organoleptis

Pengujian organoleptis digunakan untuk mengamati warna, bau, bentuk dan konsistensi ekstrak (Putri *et al.*, 2022)

b. pH

1 gram ekstrak daun kersen dilarutkan dengan akuades 10 mL. Campuran diukur pH-nya menggunakan pH meter (Putri *et al.*, 2022).

c. Penetapan kadar air

1 gram ekstrak daun kersen ditambahkan ke dalam *moisture analyzer* pada suhu 105°C. Nilai kadar air yang tertera, dicatat (Hanif *et al.*, 2018).

d. Skining Fitokimia

1) Uji Flavonoid

0,5 gram sampel ekstrak kental daun kersen dilarutkan dalam 10 mL akuades. Campuran tersebut ditambahkan 3 tetes HCl 2N dan 0,02 mg serbuk magnesium. Campuran dipanaskan dalam tabung reaksi selama 5 menit. Perubahan warna merah menunjukkan ekstrak positif mengandung flavonoid. Cara pembuatan HCl 2N dapat dilihat pada lampiran 4.

2) Uji Alkaloid

0,5 gram sampel ekstrak kental daun kersen dilarutkan dalam 10 mL akuades. Kemudian ditambahkan HCl 2N 1 mL dan 9 mL akuades. Campuran dipanaskan selama 2 menit. Selanjutnya campuran didinginkan dan disaring. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 3 tetes filtrat dan 2 tetes pereaksi Bouchardat, Mayer dan Dragendrof. Hasil positif jika terdapat endapan warna putih atau kuning pada reagen Mayer, terdapat endapan berwarna coklat sampai hitam pada penambahan reagen Bouchardat, dan terdapat endapan kuning jingga dengan penambahan reagen Dragendrof. Ekstrak positif mengandung alkaloid jika dua dari tiga reagen menghasilkan reaksi positif (Syahara & Siregar, 2019).

3) Uji Saponin

0,5 gram sampel ekstrak kental daun kersen dilarutkan dengan 10 mL akuades panas dan diaduk selama 10 detik, hingga terbentuk busa. Selanjutnya campuran ditambahkan 1 tetes HCl 2N. Ekstrak positif mengandung saponin jika buih tidak hilang selama 10 menit setelah penambahan HCl (Syahara & Siregar, 2019).

4) Uji Tanin

0,5 gram sampel ekstrak kental daun kersen dilarutkan dengan 4 mL akuades, dan ditambahkan 2 tetes FeCl_3 1%. Perubahan warna biru kehijauan atau perubahan warna biru kehitaman menandakan ekstrak

positif mengandung tanin. Cara pembuatan FeCl_3 1% dapat dilihat pada lampiran 4 (Hadi & Permatasari, 2019).

5) Uji Fenolik

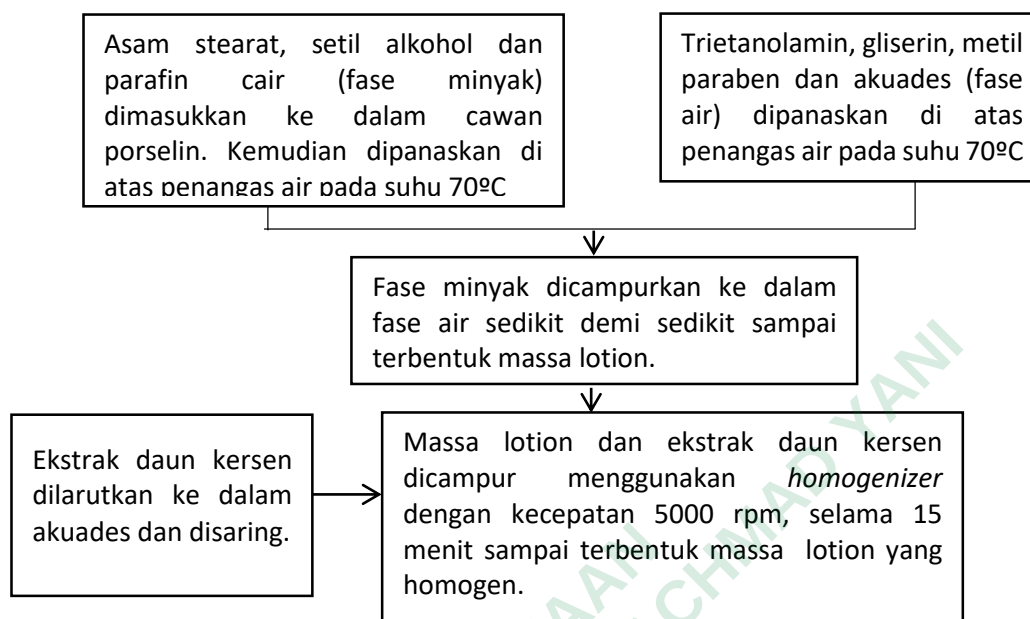
0,5 gram sampel ekstrak kental daun kersen dilarutkan dengan 10 mL akuades. Campuran dipanaskan selama 5 menit. Selanjutnya campuran digojog dan disaring. 10 tetes FeCl_3 1% ditambahkan ke dalam campuran. Ekstrak positif mengandung fenolik jika menunjukkan adanya perubahan warna hitam pekat (Sami *et al.*, 2017).

5. Formulasi lotion ekstrak daun kersen.

Variasi konsentrasi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) mengacu pada penelitian Sami dkk (2017), dimana nilai IC_{50} ekstrak daun kersen sebesar 6,8249 $\mu\text{g/ml}$ (0,00068249 g/100 ml). Variasi konsentrasi ekstrak daun kersen yang digunakan dalam lotion yaitu 0,3 g/100 ml ($500 \times \text{IC}_{50}$); 0,6 g/100 ml ($1000 \times \text{IC}_{50}$); 0,9 g/100 ml ($1500 \times \text{IC}_{50}$). Lotion yang dibuat yaitu 3 formula dengan variasi konsentrasi ekstrak daun kersen dan 1 formula sebagai basis/ kontrol. Komposisi formula lotion yang digunakan dapat dilihat pada tabel 3. Urutan cara pembuatan lotion dapat dilihat pada gambar 9

Tabel 1. Formulasi lotion ekstrak daun kersen (Auliasari et al., 2018)

Bahan	Konsentrasi (%b/v)			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak daun kersen	-	0,3	0,6	0,9
Asam stearat	2	2	2	2
TEA	0,5	0,5	0,5	0,5
Setil alkohol	3	3	3	3
Paraffin cair	5	5	5	5
Gliserin	5	5	5	5
Metil paraben	0,1	0,1	0,1	0,1
Akuades	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100



Gambar 1. Cara pembuatan lotion ekstrak daun kersen (Auliasari et al., 2018).

6. Evaluasi sifat fisik lotion ekstrak daun kersen.

a. Uji Organoleptis

pengujian yang dilakukan meliputi pengamatan warna, bau, bentuk dan konsistensi sediaan (Putri *et al.*, 2022).

b. Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas menggunakan kaca objek yang sudah diolesi sediaan untuk mengetahui apakah terdapat butiran-butiran halus pada sediaan (Putri *et al.*, 2022).

c. Uji Daya Sebar

0,25 gram sediaan lotion diletakkan di atas kaca arloji dan ditimpa dengan kaca arloji lainnya. Beban 50, 100, 150 dan 200 gram ditambahkan secara berurutan. Setiap penambahan beban, didiamkan selama 1 menit dan diukur diameter lotion yang tersebar. Daya sebar yang bagus adalah 5-7 cm (Putri *et al.*, 2022).

d. Uji Daya Lekat

0,25 gram lotion diletakkan di atas dua objek glass dan beban 1 kg

didiamkan selama 5 menit. Tuas ditarik dan dilepaskan beban 80 gram. Waktu kedua objek gelas terpisah dicatat. Daya lekat yang baik yaitu lebih dari 4 detik (Putri *et al.*, 2022).

e. Uji pH

1 gram lotion dilarutkan dalam 10 ml akuades untuk menentukan kadar pH menggunakan pH meter. Syarat pH kulit yang baik yaitu antara 4,0 – 8,0 (Putri *et al.*, 2022)

f. Uji Viskositas

20 gram lotion dimasukkan ke dalam beaker glass. Spindle nomer 4 dipasang dan diatur dengan kecepatan 10 rpm. Hasil viskositas dicatat. Nilai kekentalan lotion yang ideal 2000-50000 cPs (Putri *et al.*, 2022).

g. Uji Sentrifugasi lotion

5 gram sampel lotion dimasukkan ke centrifuge dengan kecepatan 3750 rpm dalam waktu 5 jam pada suhu ruang. Pengujian tersebut setara dengan penyimpanan lotion selama 1 tahun pada suhu ruang. Uji stabilitas lotion dapat dihitung menggunakan persamaan 2 (Lachman *et al.*, 1987).

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

Keterangan :

H_o = tinggi emulsi awal

H_u = tinggi emulsi yang stabil pada waktu pengamatan

F = rasio pemisahan fase emulsi

7. Uji penangkapan radikal bebas DPPH ekstrak daun kersen dan lotion ekstrak daun kersen.

a. Pembuatan larutan DPPH (0,1 mM)

3,943 mg serbuk DPPH ditimbang dan ditambahkan metanol p.a kemudian dilarutkan dalam labu takar 100 mL (Nathanian *et al.*, 2020).

b. Scanning panjang gelombang

2 mL DPPH diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm (Susiloningrum & Sari, 2021). Hasil didapatkan pada panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 515 nm.

c. Penetapan operating time

2 mL larutan DPPH ditambahkan 1 mL kuersetin kemudian diamati absorbansinya selama 0-60 menit dengan interval waktu setiap 1 menit dengan panjang gelombang 515 nm, didapatkan absorbansi yang stabil pada waktu ke-20 menit (Susiloningrum & Sari, 2021).

d. Pengukuran serapan blanko DPPH

2 mL larutan induk DPPH, didiamkan selama 60 menit, absorbansi diukur pada panjang gelombang 515 nm (Susiloningrum & Sari, 2021).

e. Pembuatan larutan induk ekstrak daun kersen 100 ppm

5 mg sampel ekstrak daun kersen ditimbang kemudian dilarutkan ke dalam metanol p.a pada labu takar 50 mL (Sami *et al.*, 2017).

f. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak daun kersen

Larutan seri kadar konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm dibuat dengan pengambilan larutan induk ekstrak daun kersen 100 ppm sebanyak 500 μ L, 1000 μ L, 1,500 μ L, 2000 μ L dan 2,500 μ L. Masing-masing sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL. Pelarut yang digunakan adalah metanol p.a (Sami *et al.*, 2017).

g. Pembuatan seri konsentrasi larutan pembanding kuersetin

1 mg kuersetin ditambahkan ke dalam labu takar 10 mL untuk mendapatkan larutan induk kuersetin 100ppm. Selanjutnya dibuat seri larutan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm (Sukmawati *et al.*, 2018). Perhitungan pembuatan seri konsentrasi larutan pembanding kuersetin dapat dilihat pada lampiran 2.

h. Pembuatan seri konsentrasi larutan dari lotion ekstrak daun kersen

500 mg sampel lotion ekstrak daun kersen ditambahkan ke dalam labu takar 10 mL untuk memperoleh 450 ppm larutan induk. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 18 ppm, 45 ppm, 72 ppm, 99 ppm dan 126 ppm dengan pemipetan 0,2 mL; 0,5 mL; 0,8 mL; 1,1 mL dan 1,4 mL dalam labu takar 5 mL (konsentrasi yang digunakan telah dilakukan modifikasi) (Putri & Najib, 2022).

i. Uji penangkapan radikal bebas DPPH

Sebanyak 1 mL sampel ditambahkan 2 mL larutan DPPH ke dalam tabung reaksi yang sudah dilapisi aluminium foil. Selanjutnya sampel digojok dan diamati absorbansinya panjang gelombang 515 nm (Sami *et al.*, 2017).

G. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Metode analisis aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH

IC₅₀ (*Inhibition Concentration*) merupakan konsentrasi terkecil yang mampu meredam 50% radikal bebas DPPH (Pambudi *et al.*, 2021). Persentase inhibisi radikal DPPH dihitung menggunakan rumus pada persamaan 3. Adapun kategori IC₅₀ dapat dilihat pada tabel 4.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol DPPH} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol DPPH}} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

Tabel 2. Kategori IC₅₀ (Rosidah & Tjitraresmi, 2018).

Nilai IC ₅₀ (ppm)	Antioksidan
150-200	Lemah
100-150	Sedang
50-100	Kuat
<50	Sangat kuat

2. Analisis data

Data hasil pengujian yang sudah didapat, dianalisis normalitas dan homogenitasnya. Uji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk* digunakan karena jumlah sampel kurang dari 50. Uji homogenitas dapat dianalisis menggunakan *Leven's of Homogeneity of Variance*. Data yang terdistribusi normal dan homogen selanjutnya dianalisis menggunakan *One way ANOVA*. Data yang tidak terdistribusi normal dan tidak homogen selanjutnya data dianalisis menggunakan metode *Kruskal Walis*. *One Way ANOVA* digunakan untuk membandingkan sifat fisik lotion (daya sebar, daya lekat, pH dan viskositas) dan nilai IC₅₀ pada 3 variasi konsentrasi ekstrak daun kersen.