

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Tahap I yaitu pembuatan ekstrak buah alpukat, buah alpukat dibersihkan dikupas kulitnya lalu dipotong menjadi beberapa bagian, selanjutnya daging alpukat yang sudah dipotong akan dikeringkan. Setelah didapatkan serbuk buah alpukat maka dilakukan maserasi, hasil yang didapatkan kita pekatkan menggunakan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental. Lalu sari tersebut diformulasikan menjadi sebuah sediaan *lotion* dan di uji ke-efektifannya. Tahap II uji mutu fisik sediaan, uji sifat fisik sediaan *lotion* buah alpukat dilakukan dengan menguji organoleptis dari sediaan *lotion*. Tahap III efektivitas sediaan *lotion*, ke-efektifan sediaan *lotion* menggunakan DPPH yang dilarutkan menggunakan metanol yang kemudian diukur panjang gelombangnya.

1. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan Januari – Februari 2023

2. Tempat penelitian

a. Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

3.

a. Pembuatan ekstrak buah alpukat, serta penapisan fitokimia dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

b. Pembuatan formulasi *lotion* ekstrak buah alpukat dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Universitas Ngudi Waluyo

c. Uji DPPH dilaksanakan di Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo.

B. Subjek Penelitian

Buah alpukat yang digunakan sebagai bahan utama adalah jenis “alpukat mentega” yang didapatkan di Pasar Bandungan. Kriteria dari buah alpukat yaitu kulit yang berwarna hijau atau ada yang warnanya hijau kemerahan dan saat digoyang – goyang terdengar suara biji buah yang menandakan bahwa alpukat tersebut sudah matang dan sudah dipastikan bahwa sampel tersebut merupakan buah alpukat yang satu jenis dipastikan dengan cara determinasi.

C. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini meliputi :

1. Ekstrak buah alpukat

Ekstrak buah alpukat berasal dari simplisia buah alpukat yang sudah diekringkan, kemudian dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut 96% selama 2 hari setelah itu residu dilakukan remaserasi selama 1 hari dan dilanjutkan dengan evaporasi.

2. Skrining uji Fitokimia

Uji ini dilakukan dengan pereaksi asam asetat, natrium hidroksida, dan aluminium klorida yang ditambahkan sampel ekstrak buah alpukat.

3. *Lotion*

Emolient yang ber-basis *oil in water* (O/W) dengan penambahan ekstrak buah alpukat di dalam 4 formulasi dengan kosentrasi yang berbeda.

4. Uji mutu fisik *lotion*

Uji yang dilakukan dengan melihat sediaan *lotion* dari mulai penampilan fisik, pH, homogenitas, daya sebar, dan daya lekat sudah memenuhi persyaratan *lotion*.

5. Uji aktivitas antioksidan

Uji yang dilakukan dengan metode DPPH sampel *lotion* ekstrak buah alpukat menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah formulasi dengan konsentrasi ekstrak buah alpukat yang berbeda yaitu 0,05%, 0,1%, dan 0,15%.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kestabilan fisik sediaan *lotion* yang meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, dan uji aktivitas antioksidan.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah pembuatan sediaan *lotion* yang memiliki perbedaan jumlah bahan yang diformulasikan.

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Gelas ukur, *beaker glass*, sendok tanduk, kaca objek, pipet tetes, batang pengaduk, mortir, stamper, blender, kertas saring, labu ukur, neraca analitik (Ohaus), *rotary evaporator*, pH meter (Ohaus Starter 300), stopwatch, viskometer Brookfield DV2T, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, alat uji DPPH, Spektrofotometer UV-Vis.

2. Bahan

a. Bahan – bahan yang digunakan antara lain ekstrak buah alpukat, asam stearat, setil alkohol, parafin cair, lanolin, gliserin, nipagin, trietanolamin (TEA), pewangi, dan

aquadest.

- b. Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH : DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil), etanol 96%, vitamin C.

F. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman sebagai tahap awal yang dilakukan sebelum menuju tahap lebih lanjut dalam proses penelitian. Determinasi tanaman yaitu proses dalam menentukan nama/jenis tumbuhan secara spesifik. Buah Alpukat didapatkan pada bulan Desember 2022. Sampel Buah Alpukat (*Persea americana*, Mill) dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

2. Pembuatan simplisia

Buah alpukat yang sudah setengah masak dipisahkan terlebih dahulu dengan bijinya. Kemudian dirajang kecil – kecil menggunakan pisau. Buah alpukat yang telah dirajang, dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di bawah sinar matahari dengan di tutup kain hitam supaya menghindari paparan matahari secara langsung hingga mendapatkan hasil yang diinginkan. Selanjutnya dilakukan sortasi kering, guna memisahkan benda asing yang tidak dibutuhkan (Marsidi dkk., 2019). Setelah disortasi kering dilakukan penghancuran simplisia dengan cara di blender untuk didapatkan serbuk daging buah alpukat. Setelah halus kemudian diayak menggunakan mesh 40 (Andi Wijaya, 2022).

3. Pembuatan ekstrak buah alpukat (*Persea americana*, Mill)

Serbuk buah alpukat yang sudah tersedia kemudian dimaserasi menggunakan

etanol 95% dengan perbandingan 1:10 b/v. Serbuk buah alpukat ditimbang 300 gram kemudian dimasukkan ke dalam toples. Selanjutnya dilakukan maserasi dengan menambahkan 3000 mL dan diaduk perlahan. Ekstrak didiamkan selama 2 hari kemudian disaring hingga diperoleh ekstrak hasil maserasi. Setelah didapatkan hasil maserasi kemudian dilakukan proses remaserasi dengan pelarut sebanyak 300 mL dan didiamkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, ekstrak disaring hingga diperoleh ekstrak hasil remaserasi (Sanjaya *et al.*, 2020). Maserat selanjutnya dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* (Marsidi dkk., 2019). Ekstrak hasil penguapan selanjutnya diuapkan kembali di *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Sanjaya *et al.*, 2020).

4. Uji Bebas Etanol

Ekstrak ditambah dengan 2 tetes H_2SO_4 pekat lalu ditambah dengan 1 mL CH_3COOH 0,5 N lalu dipanaskan. Hasil negatif bila tercium bau khas ester (Kurniawati, 2015). Hasil positif etanol ditandai dengan perubahan warna jingga menjadi hijau kebiruan (Adiningsih *et al.*, 2021).

5. Uji Kadar Air

Sebanyak 3 gram simplisia ditimbang seksama dan dimasukkan ke dalam kurs porselen bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu $105^{\circ}C$ selama 30 menit dan telah ditara. Simplisia diratakan dalam kurs porselen dengan menggoyangkan krus hingga merata. Masukkan ke dalam oven, buka tutup kurs, panaskan pada temperatur $100^{\circ}C$ sampai dengan $105^{\circ}C$, timbang dan ulangi pemanasan sampai didapat berat yang konstan (Pratiwi *et al.*, 2013).

6. Skrining Fitokimia Ekstrak Buah Alpukat

a. Pemeriksaan steroid/triterpenoid

Sampel dicampur dengan asetat anhidrat ditambah H_2SO_4 pekat dan asetat anhidrat. Perubahan warna hijau-biru menunjukkan adanya steroid, dan jika perubahan warna merah-ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Ikalinus *et al.*, 2015).

b. Pemeriksaan flavonoid

Ekstrak buah alpukat sebanyak 1 mL ditambah beberapa tetes pereaksi NaOH 10%, reaksi positif jika terjadi perubahan warna orange/jingga (Ikalinus *et al.*, 2015).

c. Pemeriksaan fenolat

FeCl 1% ditambahkan ekstrak buah alpukat hingga terjadi perubahan warna, lalu warnanya dibandingkan dengan ekstrak murni, maka akan tampak warna lebih hitam jika positif (Ikalinus *et al.*, 2015).

d. Pemeriksaan tanin

Sampel dididihkan dengan 20 mL air lalu disaring. Ditambahkan beberapa tetes FeCl 1% dan terbentuknya warna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Ikalinus *et al.*, 2015).

e. Pemeriksaan saponin

Sampel dididihkan dengan 20 mL air dalam penangas air. Filtrat dikocok dan didiamkan selama 15 menit. Terbentuknya busa yang stabil berarti positif terdapat saponin (Ikalinus *et al.*, 2015).

7. Formulasi *Lotion* Ekstrak Buah Alpukat (*Persea americana*, Mill)

Formulasi *lotion* ekstrak buah alpukat dibuat dengan variasi dengan konsentrasi 0,05%, 0,1%, dan 0,15% b/v. Basis *lotion* merupakan sediaan tanpa adanya ekstrak buah alpukat sedangkan formulasi F1, F2, dan F3 merupakan formulasi yang mengandung

ekstrak buah alpukat.

Tabel 3. 1 Formul *Lotion* Ekstrak Buah Alpukat (*Persea americana.*, Mill)

Nama Bahan	Fungsi Bahan	Formulasi (%)			
		Basis (F0)	F1	F2	F3
Ekstrak alpukat	Zat aktif	-	0,05	0,1	0,15
Gliserin	humektan	7	7	7	7
Parafin cair	Emolient	3	3	3	3
Asam Stearat	<i>Emulsifying agent</i>	2	2	2	2
Lanolin	Emolient	1	1	1	1
Setil Alkohol	Pengemulsi	1	1	1	1
Trietanolamin (TEA)	<i>Emulsifying agent</i>	1	1	1	1
Pewangi	Pengaroma	0,15	0,15	0,15	0,15
Nipagin	Pengawet	0,12	0,12	0,12	0,12
Aquadest ad	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

(Dinurrosifa & Indriyanti, 2022)

8. Pembuatan *lotion* ekstrak buah alpukat (*Persea americana.*, Mill)

Pada pembuatan *lotion* ekstrak buah alpukat ini dibedakan menjadi 2 fase, yaitu fase minyak serta fase air. Bahan – bahan yang termasuk fase minyak (asam stearat, setil alkohol, paraffin cair dan lanolin) dan fase air (gliserin, nipagin, dan trietanolamin, dan aquadest).

Fase minyak dan fase air dipanaskan hingga suhu 70 – 80°C. setelah semuanya melebur, fase air dan fase minyak kemudian digabungkan dalam mortar panas dan diaduk perlahan – lahan hingga terbentuk basis *oil in water* (O/W). kemudian ditambahkan ekstrak buah alpukat (*Persea americana.*, Mill) serta pengaroma diaduk hingga homogen dan dimasukkan wadah *lotion*. Untuk sediaan F1, F2, dan F3 mengandung ekstrak buah alpukat dengan konsentrasi yang bervariasi (Iskandar *et al.*, 2021).

9. Evaluasi Stabilitas Sediaan *Lotion* Ekstrak Buah alpukat

a. Uji Organoleptis

Pengamatan organoleptis sediaan *lotion* meliputi pengamatan terhadap warna, tekstur, dan bau dari sediaan *lotion*. Pemeriksaan sediaan dilakukan dengan cara pengamatan karakteristik secara visual meliputi bentuk, warna, bau, konsistensi dan homogenitas dari formula (Cahyani & Erwiyani, 2022).

b. Uji Homogenitas

Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan menggunakan gelas objek. *lotion* ditimbang 0,5 gram kemudian dioleskan pada kaca objek dan diamati adanya butiran kasar secara visual (Cahyani & Erwiyani, 2022)

c. Uji pH

Lotion ditimbang 1 gram, lalu ditambahkan aquadest 10 mL kemudian *lotion* diukur pH nya menggunakan pH meter. pH yang baik yaitu pH yang mendekati pH kulit yaitu 4,5-6,5. Nilai pH yang ditunjukkan dicatat dan direplikasi sebanyak 3 kali (Erwiyani *et al.*, 2021).

d. Uji Daya Sebar

Lotion ditimbang 500 mg lalu diletakkan ditengah kaca bulat berskala kemudian ditutup dengan menggunakan kaca bulat yang telah ditimbang dan diketahui bobotnya selama 5 menit serta dicatat diameter penyebarannya. Beban ditambah seberat 50 g selama 1 menit, dicatat diameter penyebarannya. Beban ditambah seberat 100 g sampai konstan, dicatat diameter penyebarannya. Replikasi dilakukan 3 kali. Dilakukan uji yang sama untuk formula lain (Arbie *et al.*, 2021)

e. Uji Daya Lekat

Sebanyak 500 mg *lotion* ditimbang lalu diletakkan diatas objek glass. Pada

kedua bagian ujung objek gelas dijepit dengan menggunakan penjepit, lalu diberikan beban 1 kg selama 5 menit. Objek gelas dipasang pada alat uji, dilepas dengan beban seberat 80 g dan waktu yang diperlukan untuk memisahkan kedua objek tersebut. Replikasi dilakukan 3 kali (Erwiyani *et al.*, 2021).

f. Uji Viskositas

Viskositas diukur menggunakan Viskometer Brookfield DV2T. Langkah pengujian yaitu dipasang spindle berukuran 64 pada gantungan spindle, diturunkan spindle sampai batas spindle tercelup kedalam sampel yang akan diukur viskositasnya, dinyalakan viskometer sambil menekan tombol, dibiarkan spindle berputar kemudian dibaca angka yang ditunjukkan pada layar viskometer tersebut kemudian dicatat. Nilai cP berada dalam range 10%-100%, Jika presentase dibawah 10% maka naikkan kecepatan atau ganti spindle dengan ukuran cakram yang lebih besar atau spindle dengan nomor kecil, jika presentase lebih dari 100% kurangi kecepatan dan mengganti spindle dengan ukuran cakram yang lebih kecil atau spindle dengan nomor besar (Cahyani & Erwiyani, 2022).

10. Uji aktivitas antioksidan

a. Pembuatan DPPH (0,04 nM)

1) Penimbangan

Molaritas DPPH yang dibutuhkan adalah $0,04 \text{ nM} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

BM (Berat Molekul) DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 ml = 0,1 liter

Penimbangan DPPH = BM DPPH \times Vol larutan \times Molaritas DPPH

= $394,32 \text{ g/mol} \times 0,1 \text{ L} \times 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

$$= 15,8 \times 10^{-3} \text{ g} \rightarrow 15,8 \text{ mg}$$

2) Cara pembuatan larutan DPPH

Ditimbang serbuk DPPH dengan seksama sebanyak 15,8 mg, dimasukkan dalam labu takar 100 ml, dilarutkan dengan etanol sampai tepat 100 ml gojog ad homogen sehingga didapatkan konsentrasi 0,04 nM (Praditya, 2017).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Sebanyak 1 ml larutan DPPH dimasukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan dengan etanol sebanyak 3 ml lalu homogenkan. Masukkan dalam tabung reaksi dan inkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap, absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 – 550 nm untuk memperoleh absorbansi $\pm 0,2 - 0,8$. Panjang gelombang yang memperoleh paling tinggi merupakan panjang gelombang yang maksimal (Rahmatullah *et al.*, 2019).

c. Penentuan operating time DPPH

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara 1 ml larutan pembanding vitamin C ditambah 4 ml larutan DPPH, dicampur menggunakan stirer selama 1 menit dan ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal yang sudah diperoleh dengan interval pada waktu 2 mneit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Bakti *et al.*, 2017).

d. Pembuatan larutan vitamin C sebagai kontrol positif

Larutan seri kadar dibuat dengan menggunakan vitamin C sebagai baku standar dengan kadar 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Sebanyak 1 ml larutan standar ditambahkan 1 ml larutan standar vitamin C kemudian ad kan dengan etanol sampai tanda batas pada labu ukur 5 ml, kemudian didiamkan pada tempat yang terlindung

dari cahaya selama operating time yang diperoleh. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Bakti *et al.*, 2017).

e. Penentuan aktivitas antioksidan *lotion* ekstrak buah alpukat

Timbang 1,5 gram sediaan dari masing – masing formula, larutkan dengan 5 ml etanol dan masukkan dalam tabung sentrifuge. Sentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah disentrifuge pisahkan endapan hingga diperoleh larutan uji, kemudian tambahkan 2 ml DPPH dan dicukupkan volumenya hingga 10 ml dengan etanol dalam labu ukur. Selanjutnya masing – masing larutan diukur absorbansinya pada λ maksimum yang telah diperoleh sebelumnya (Rahmatullah *et al.*, 2019).

Persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dihitung dari larutan sampel kemudian ditetapkan nilai IC₅₀ menggunakan persamaan regresi linier yang didapat (Dinurrosifa & Indriyanti, 2022).

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengujian mutu fisik *lotion* ekstrak buah alpukat yang meliputi organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, viskositas dan efektifitas *lotion* yang kemudian dipaparkan secara deskriptif dan uji DPPH yang selanjutnya dibuat grafik untuk mendapatkan data panjanggelombang yang didapat.

Data hasil absorbansi masing – masing digunakan untuk mencari % inhibisinya. Rumus untuk mencari % inhibisi adalah sebagai berikut :

$$\%inhibisi = \frac{A\ blanko - A\ sampel}{A\ blanko} \times 100\%$$

Keterangan :

A blanko = Absorbansi pada DPPH tanpa sampel

A sampel = Absorbansi pada DPPH setelah ditambah sampel

Hasil perhitungan dimasukkan dalam persamaan linier dengan persamaan :

$$Y = aX + b$$

Keterangan:

Y = % Inhibisi

A = Gradien

X = Konsentrasi ($\mu g/ml$)

b = Konstanta

Persamaan linier yang dihasilkan digunakan untuk memperoleh nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi yang diperoleh pada saat % inhibisi sebesar 50 dari persamaan $Y = aX + b$. pada saat % inhibisi = 50, maka rumus untuk menghitung nilai IC_{50} persamaannya menjadi :

$$50 = aX + b$$

$$X = 50 - b / a$$

Harga X adalah IC_{50} dengan satuan $\mu g/ml$