

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental. Penelitian eksperimental bertujuan untuk mengetahui karakteristik fisik sediaan emulgel ekstrak daun kelor dengan variasi konsentrasi *gelling agent* berdasarkan parameter organoleptik, pH, daya sebar, daya lekat, homogenitas, dan viskositas. Tahap selanjutnya, dilakukan uji aktivitas antioksidan ekstrak dan sediaan emulgel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dengan metode DPPH berdasarkan parameter nilai IC₅₀.

B. Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari-Juni 2024

Lokasi penelitian dilakukan di beberapa Laboratorium :

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan dan pengujian ekstrak daun kelor sediaan emulgel dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kelor yang berasal dari daerah Ungaran Jawa Tengah. Sampel yang dipakai pada penelitian ini ekstrak etanol daun kelor.

D. Definisi Operasional

1. Sediaan emulgel antioksidan ekstrak daun kelor merupakan salah satu bentuk sediaan topikal yang berupa gabungan dari sediaan emulsi dan gel yang diformulasikan dengan variasi konsentrasi *gelling agent* karbopol 940 0,25%, 0,75% dan 1%.

2. Uji karakteristik fisik adalah mengevaluasi sifat fisik dari sediaan emulgel yang meliputi organoleptik, pH, daya sebar, daya lekat, dan viskositas.
3. Spektrofotometer UV-Vis merupakan alat pengukur nilai absorbansi untuk menghitung nilai IC_{50} .
4. IC_{50} merupakan nilai yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan sediaan emulgel.

E. Variabel Penelitian

Variabel yang diteliti dalam penelitian ini yaitu variabel bebas dan variabel terikat :

1. Variabel independen (bebas).
Variasi konsentrasi *gelling agent* karbopol-940 0,25%, 0,75% dan 1%.
2. Variabel dependen (terikat).
 - a. Karakteristik emulgel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) berdasarkan parameter organoleptik, pH, daya sebar, daya lekat, homogenitas dan viskositas.
 - b. Uji aktivitas antioksidan emulgel ekstrak daun kelor menggunakan metode DPPH dengan parameter IC_{50} .

F. Pengumpulan Data

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah object glass, gunting, pisau, sendok, labu ukur (Iwaki Pyrex), batang pengaduk, kertas saring whatman 42, *moisture analyzer* (Ohaus), spatula, pipet ukur, penggaris, spektrofotometri (Shimidzu), kuvet, pipet tetes, cawan porselen, tabung reaksi dan rak tabung, gelas ukur (Iwaki Pyrex), *aluminium foil*, beaker glass (Iwaki Pyrex), kaca objek, pH meter (Ohaus), neraca digital (Ohaus), blender, bejana maserasi, *waterbath* (Memmert), penangas air, viskometer brookfield, alat uji daya lekat, daya sebar, *rotary evaporator* (RE 2000E).

2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kelor, yang berasal dari daerah Ungaran Timur, etanol p.a DPPH (*2,2- difenil-1-pikrilhidrazil*) (Pharmaceutical Grade), karbopol 940 (Farmasetika), aquadest, tween 80 (Farmasetika), span 80 (Farmasetika), propilen glikol (Farmasetika), magnesium (Mg) (pro analisa), parafin cair (Farmasetika), TEA (Triethanolamine) (Farmasetika), HCl pekat (pro analisa), metil paraben (Farmasetika), propil paraben (Farmasetika), FeCl₃ (pro analisa), pereaksi mayer (pro analisa), kuersetin (pro analisa).

G. Prosedur Kerja

1. Determinasi tumbuhan

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian yaitu daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). Sebelum dilakukan ekstraksi, tumbuhan terlebih dahulu dideterminasi untuk mengidentifikasi ketepatan spesies. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro.

2. Pembuatan serbuk simplisia daun kelor

Proses pembuatan simplisia daun kelor diawali dengan mengumpulkan daun kelor dan mensortasi basah untuk membersihkan daun kelor dari pengotor. Tahap selanjutnya, mencuci daun kelor menggunakan air bersih dan mengalir untuk menghilangkan tanah atau bahan pengotor yang melekat, kemudian dilakukan pengeringan dibawah sinar matahari ditutup menggunakan kain hitam bertujuan untuk melindungi senyawa yang terkandung didalam daun kelor sehingga tidak langsung terkena oleh sinar matahari dan menyebabkan rusaknya senyawa aktif. Proses selanjutnya, penghalusan simplisia menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan mesh 40 agar diperoleh serbuk halus.

3. Pemeriksaan karakteristik simplisia

Uji kadar air simplisia dilakukan dengan cara menimbang 3 g simplisia ke dalam alat *moisture analyzer*. Selanjutnya jumlah kadar air akan muncul pada alat secara otomatis. Kadar air yang ditetapkan untuk menjaga mutu simplisia adalah <10% (Wandira *et al.*, 2023).

4. Pembuatan ekstrak daun kelor

a. Ekstraksi menggunakan metode maserasi

Pembuatan ekstrak daun kelor simplisia dengan perbandingan 1:10 daun kelor sebanyak 600 g dimasukkan ke dalam wadah dan dimaserasi selama 3 hari (1:5) dan remaserasi 3 hari dengan perbandingan (1:5) menggunakan total pelarut etanol 96% sebanyak 6 liter hingga simplisia terendam secara merata. Wadah maserasi ditutup dan disimpan. Pada proses maserasi dan remaserasi dilakukan sesekali pengadukan untuk meratakan konsentrasi zat aktif dalam pelarut sehingga dapat mempercepat kontak pelarut dengan serbuk dan ditaruh ditempat terlindung dari sinar matahari. Tahap selanjutnya, disaring dan dipisahkan antara filtrat dan residunya (Azis & Harselina, 2023). Ekstrak etanol yang telah diperoleh kemudian dipekatkan dengan cairan penyari dalam rotary evaporator 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental (Azijah *et al.*, 2023).

b. Uji kadar air ekstrak

Uji kadar air ekstrak dengan cara menimbang 1 g ekstrak kemudian dimasukkan dalam lempeng logam alat *moisture analyzer* dan ratakan, kemudian tunggu sampai alat berbunyi menandakan analisis sudah selesai. Syarat kadar air ekstrak yaitu $\leq 10\%$ (Utami *et al.*, 2020).

c. Rendemen ekstrak

Rendemen ekstrak merupakan perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Rendemen ekstrak merupakan parameter untuk menilai suatu

mutu ekstrak. Ekstrak yang kental selanjutnya dihitung persentase rendemennya dengan menggunakan persamaan rumus :

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

Persentase rendemen diperoleh dari hasil perhitungan berat ekstrak dibagi dengan berat simplisia dalam satuan persen. Menurut FHI syarat rendemen ekstrak kental yang baik tidak kurang dari 10% (Putri *et al.*, 2023).

5. Skrining fitokimia

Uji skrining fitokimia atau uji kandungan metabolit sekunder dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan metabolit sekunder pada tanaman. Uji kandungan metabolit sekunder dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak daun kelor.

- a. Uji alkaloid dilakukan dengan cara 1 mL ekstrak ditambahkan 2 tetes larutan pereaksi mayer, reaksi positif ditandai dengan endapan menggumpal berwarna putih atau kuning (Husni *et al.*, 2019).
- b. Uji flavonoid sampel ekstrak sebanyak 2 gram ditambahkan air panas dan dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan serbuk magnesium dan HCl pekat sebanyak 1 mL kemudian dikocok. Hasil positif terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Wulan Kusumo *et al.*, 2022).
- c. Uji saponin sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas dan dikocok dengan cepat. Timbulnya busa yang stabil hingga lebih dari 10 menit menunjukkan adanya saponin (Husni *et al.*, 2019).
- d. Uji tanin dilakukan dengan cara 1 mL ekstrak yang telah dipanaskan ditambahkan dengan pereaksi FeCl₃ sebanyak 3 tetes. Jika terjadi perubahan warna biru atau hijau kehitaman, maka hasilnya menunjukkan positif (Yulia *et al.*, 2022).

6. Rancangan Formulasi Sediaan Emulgel Ekstrak Daun Kelor

Sediaan yang digunakan pada penelitian ini untuk membuat sediaan formulasi emulgel adalah ekstrak daun kelor, yang dimana persentase formula *gelling agent* terdiri dari F1 0,25%, F2 0,75% dan F3 1% (Wijaya & Lina, 2021). Formula sediaan emulgel merupakan hasil modifikasi dari penelitian (Djuwarno *et al.*, 2021). Pada penelitian tersebut menggunakan variasi konsentrasi ekstrak daun kelor sebesar 4, 5, dan 6 %. Formula sediaan emulgel dapat dilihat pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Formula Sediaan Emulgel Ekstrak Daun Kelor

Bahan	Konsentrasi (%)			Fungsi
	F1	F2	F3	
Ekstrak daun kelor	5	5	5	Zat aktif
Karbopol-940	0,25	0,75	1	Gelling agent
TEA	5 tetes	5 tetes	5 tetes	<i>Alkalizing agent</i>
Propilen glikol	10	10	10	Humektan
DMDM Hydantoin	0,6	0,6	0,6	Anti mikroba
Parafin cair	10	10	10	Emolien
Span 80	1,4	1,4	1,4	Fase minyak
Tween 80	3,6	3,6	3,6	Fase air
Aquadestilata	ad 100	ad 100	ad 100	Pembawa

Keterangan :

F1 = Formula dengan konsentrasi *gelling agent* 0,25%

F2 = Formula dengan konsentrasi *gelling agent* 0,75%

F3 = Formula dengan konsentrasi *gelling agent* 1%

Pembuatan sediaan emulgel dengan menggunakan variasi konsentrasi *gelling agent* karbopol untuk mengetahui pengaruh aktivitas antioksidan pada sediaan emulgel tersebut.

7. Pembuatan Sediaan Emulgel

Sediaan emulgel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dibuat beberapa variasi konsentrasi *gelling agent* yaitu F1 0,25%, F2 0,75% dan F3 1%. Karbopol 940 dikembangkan dengan menambahkan aquades 69 mL, diaduk sampai homogen, kemudian melarutkan DMDM Hydantoin ke dalam propilen glikol dan

menambahkannya ke dalam karbopol-940. Emulsi fase minyak dibuat dengan mencampur parafin cair dengan span 80 pada suhu 70° C, diaduk sampai homogen. Fase air dibuat dengan melarutkan tween 80 dan ekstrak daun kelor ke dalam aquades pada suhu 70° C, diaduk sampai homogen. Fase minyak ditambahkan ke fase air, kemudian ditambahkan sisa aquades sambil diaduk menggunakan ultra turrax dengan kecepatan 300 rpm selama 15 menit. Kemudian emulsi yang terbentuk ditambahkan ke dalam basis gel dan dihomogenkan dengan menggunakan ultra turrax 400 rpm selama 20 menit dan ditetesi TEA sebanyak 5 tetes hingga terbentuk massa emulgel.

8. Uji karakteristik Sediaan Emulgel

Pemeriksaan uji karakteristik sediaan emulgel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) terdiri atas organoleptik, pH, daya sebar, daya lekat, homogenitas dan viskositas sebagai berikut :

a. Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan terhadap setiap formula emulgel dilihat setiap bentuk fisiknya. Pemeriksaan organoleptik meliputi warna, bentuk, bau dan rasa sediaan pada saat diaplikasikan ke kulit. Dicatat hasil pengamatan organoleptik.

b. Uji pH

Pengujian pH basis emulgel menggunakan pH meter yang sudah dikalibrasi. Emulgel ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian di larutkan dengan 50 mL aquadest ke dalam *beaker glass* kemudian celupkan elektroda ke dalam *beaker glass*, kemudian tunggu beberapa menit hasil pH meter akan muncul secara otomatis (Lubapepita Triananda & Wijaya, 2021). Sediaan emulgel sesuai dengan pH fisiologis kulit yaitu 4,5-8,0 (Ardhana *et al.*, 2024).

c. Uji daya sebar

Sebanyak 0,5 g emulgel diletakkan di atas dua lempeng kaca bundar kemudian ditutup dengan kaca bundar lain yang telah ditimbang kemudian dibiarkan selama 1 menit. Dilakukan pengukuran diameter emulgel yang menyebar. Penambahan beban 50 g, 100 g, 150 g, 200 g dan 250, dilakukan secara berurutan dengan waktu 1 menit dan dilakukan pengukuran diameter pada setiap hasil penyebaran sediaan dan dicatat hasil rata-rata penyebaran sediaan. Persyaratan uji daya sebar dalam penggunaan untuk sediaan semisolid berkisar 5-7 cm.

d. Daya lekat

Sebanyak 0,5 g emulgel kemudian diletakkan diatas kaca objek. Beban sebesar 1 kg diletakkan di atas kaca objek untuk memberikan daya tekan terhadap emulgel yang telah dibuat selama 5 menit. Beban diangkat kemudian dicatat waktu sampai kedua kaca objek terlepas. Persyaratan daya lekat emulgel yang baik adalah lebih dari 2-300 detik (Febrianie, 2021).

e. Homogenitas

Sebanyak 0,5 g emulgel diletakkan diantara permukaan dua kaca objek. Beban 50 g diletakkan selama 1 menit, kemudian diamati butiran kasar pada kaca objek, bila tidak terdapat butiran kasar maka sediaan emulgel (Chandra & Rahmah, 2022). Uji homogenitas bertujuan untuk melihat partikel pada sediaan emulgel ekstrak daun kelor agar dapat memberikan kualitas yang baik pada saat digunakan.

f. Viskositas

Sebanyak 30 gram dimasukkan ke dalam pot salep, uji viskositas sediaan dilakukan dengan menggunakan alat viskometer *Brookfield* dengan kecepatan 12 rpm untuk mengetahui tingkat kekentalan suatu sediaan. Cara pengukuran viskositas dengan meletakkan sediaan emulgel pada bagian bawah alat uji pada viskometer, kemudian celupkan spindle nomor 7 hingga tanda batas spindle, atur

kecepatan yang digunakan dan viskometer dijalankan, kemudian nilai viskositas dari emulgel akan terbaca (Lubapepita Triananda & Wijaya, 2021). Standar viskositas sediaan emulgel berkisar antara 6.000-50.000 cps (Wandira *et al.*, 2023).

g. Sentrifugasi

Sebanyak 5 gram sampel emulgel ditempatkan dalam tabung sentrifugasi dan disentrifugasi 3750 rpm selama 30 menit kemudian diamati terjadi pemisahan atau tidak pada sediaan (Priani *et al.*, 2014).

9. Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Emulgel Ekstrak daun kelor

a. Pembuatan larutan stok DPPH

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 4 mg, kemudian dimasukkan ke labu ukur 100 mL dicukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas, didapatkan konsentrasi 40 ppm.

b. Penentuan panjang gelombang

Larutan DPPH 40 ppm dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450-550 nm dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mendapatkan absorbansi $\pm 0.2-0,8$. Panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi paling besar merupakan panjang gelombang maksimum DPPH.

c. Penentuan *Operating Time*

Larutan DPPH dibaca absorbansinya pada panjang gelombang yang diperoleh dibaca dari menit ke 1-30 (Bakti *et al.*, 2019). Hasil stabil yang diperoleh pada menit ke 15-30 (Suwarni & Cahyadi, 2016).

d. Pembuatan larutan blanko DPPH

Larutan blanko DPPH dibuat dengan cara memipet larutan baku. DPPH 40 ppm sebanyak 3 mL dan dicukupkan etanol pa 2 mL. Kemudian diukur pada panjang gelombang yang diperoleh (Jumawardi *et al.*, 2021).

e. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Kuersetin ditimbang 10 mg, kemudian dilarutkan ke dalam labu ukur sampai 10 mL dengan etanol p.a sehingga didapatkan larutan baku 1000 ppm. Tahap selanjutnya, diencerkan menjadi 100 ppm dengan memipet 1 mL baku kuersetin dan cukupkan dengan etanol pa 10 mL. Larutan 100 ppm dibuat seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dengan memipet masing-masing 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 dan dicukupkan dengan etanol pa pada labu ukur 10 ml. Masing-masing seri kuersetin diukur sebanyak 2 ml kuersetin dan 3 ml larutan DPPH. Campuran dihomogenkan dan ditutup aluminium foil diinkubasi selama *operating time*. Kemudian diukur pada panjang gelombang yang telah ditentukan yaitu 516.0 (Jumawardi *et al.*, 2021).

f. Pengujian antioksidan ekstrak daun kelor

Pembuatan larutan stok ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) sampel ekstrak daun kelor ditimbang 10 mg, ditambah dengan pelarut etanol p.a pada labu ukur 100 mL, sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan 100 ppm dipipet 1, 2, 3, 4, dan 5 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas labu 10 mL, Selanjutnya dibuat 5 seri pengenceran dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm.

Larutan seri konsentrasi ekstrak daun kelor masing-masing diambil sebanyak 2 mL, ditambahkan 3 mL larutan stok DPPH. Larutan didiamkan ditempat gelap selama *operating time* kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 516,5 (Bakti *et al.*, 2019).

g. Uji Aktivitas antioksidan Sediaan Emulgel Ekstrak Daun Kelor

Emulgel ditimbang 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 100 mL etanol p.a hingga homogen, didapatkan konsentrasi 100 ppm. Larutan dibuat konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm dengan memipet masing-masing 1, 2, 3, 4, dan 5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Masing-masing larutan uji dipipet 2 mL dan ditambahkan 3 mL larutan DPPH 40 ppm lalu dihomogenkan. Larutan diinkubasi selama *operating time* 30 menit. Baca absorbansi panjang gelombang maksimum yang diperoleh 516,5 (Bakti *et al.*, 2019).

H. Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis data kuantitatif untuk mengetahui potensi antioksidan yang terkandung dalam ekstrak dan sediaan daun kelor dengan cara mengukur absorbansinya dengan metode DPPH dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Analisis data kualitatif berupa data deskriptif dalam bentuk tabel dan grafik. Data hasil pengamatan karakteristik fisik sediaan emulgel dan uji aktivitas antioksidan ekstrak dan sediaan emulgel daun kelor dianalisis menggunakan program SPSS. Berdasarkan data hasil penelitian, dilakukan analisis statistik, analisis statistik normalitas dilakukan menggunakan uji (*Shapiro-Wilk*) hasil signifikansi $>0,05$ maka H_0 diterima, bila hasil signifikansi $<0,05$ maka H_0 ditolak (Gaspersz & Salamor, 2021). Jika pada pengujian normalitas didapatkan hasil tidak normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu *Kolmogorov-Smirnov* apabila nilai $<0,05$ maka H_0 ditolak (Quraissy, 2022). Uji homogenitas digunakan uji (*Levene*) jika hasil signifikansi $<0,05$ maka H_0 ditolak atau data tidak berdistribusi homogen. Jika data tidak berdistribusi homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Bila data yang dihasilkan $<0,05$ dari uji *Kruskal Wallis* maka kelompok data mempunyai perbedaan yang bermakna dan H_1 diterima (Rosidah *et al.*, 2014). Untuk hasil data berdistribusi normal dan homogen, selanjutnya diuji One way ANOVA untuk melihat perbedaan signifikan. Selanjutnya

dilakukan uji akhir uji *Post Hoc LSD* untuk melihat perbedaan kelompok secara signifikan. Apabila menunjukkan signifikansi $<0,05$ maka dinyatakan signifikan (Hariningtyas & Aisyah, 2016).