

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan dari kumpulan elemen yang memiliki sejumlah karakteristik umum, yang terdiri dari beberapa bidang untuk di teliti dan digunakan untuk membuat beberapa kesimpulan. Populasi dalam penelitian merupakan ini adalah lotion fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 70% dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.).

Sampel merupakan suatu sub kelompok dari populasi yang dipilih untuk digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu lotion fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 70% dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan variasi konsentrasi fraksi 5%, 10%, dan 15%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah *lotion* fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) melalui uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH serta uji mutu fisik lotion dengan berbagai parameter pengujian.

Variabel utama yang diidentifikasi lebih dulu dapat dikelompokkan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung dengan beberapa perubahan yang dilakukan. Variabel bebas yang dimaksud adalah *lotion* fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang dibuat dalam berbagai konsentrasi untuk perbandingan.

3. Definisi operasional dan variabel utama

Pertama, daun belimbing wuluh yang digunakan adalah tanaman yang berasal dari tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang diperoleh dari daerah Sukoharjo.

Kedua, serbuk dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) adalah serbuk dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang dipanen dan dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran dan cemaran, dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C sampai kering. Serbuk diayak dengan ayakan nomor 40 dan serbuk yang diperoleh digunakan untuk penelitian.

Ketiga, ekstrak etanol 70% adalah ekstrak yang diperoleh dari maserasi serbuk daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan pelarut etanol 70%.

Keempat, fraksi etil asetat diperoleh dari fraksinasi ekstrak etanol 70% dengan pelarut etil asetat. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan rotary evaporator.

Kelima, lotion daun belimbing wuluh adalah hasil pencampuran fraksi daun belimbing wuluh dengan basis *lotion*.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Bahan-bahan kimia yang digunakan asam stearat, paraffin liquidum, gliserin, setil alkohol, trietanolamin, aquadest, etanol 70%, etil asetat dan DPPH.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, neraca elektrik, erlenmeyer, gelas kimia, tabung reaksi, gelas ukur, botol kaca transparan, mikropipet, spatula, mortir dan stamfer, batang pengaduk, wadah lotion, sendok tanduk, ayakan nomor 40, lempeng kaca, dua buah gelas benda berukuran.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman dan identifikasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kedudukan dan jenis tanaman dalam klasifikasi tanaman. Selain itu, determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang diperiksa dalam penelitian sesuai dengan tanaman yang dimaksud sehingga menghindari kesalahan pemilihan bahan tanaman.

Penetapan kebenaran daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada terhadap pustaka dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

2. Pengumpulan bahan

Sampel yang di peroleh di daerah Sukoharjo, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan adalah daun belimbing wuluh segar yang berwarna hijau tua.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Daun belimbing wuluh yang telah dikeringkan dengan oven suhu 40°C kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 60. Hasil ayakan ditimbang dengan timbangan elektrik dan disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat.

4. Identifikasi serbuk daun belimbing wuluh

4.1. Organoleptik serbuk. Proses identifikasi serbuk daun belimbing secara organoleptis meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa dari serbuk daun belimbing wuluh.

4.2. Penetapan kadar lembab. Penetapan kadar lembab ini dilakukan dengan alat moisture balance yang diawali dengan penimbangan serbuk daun belimbing wuluh sebanyak ± 2 gram, kemudian ditunggu hingga kadarnya konstan dimana kadar lembab ditunjukkan dalam satuan persen.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Serbuk daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dimaserasi dengan pelarut etanol 70% bagian cairan penyari. Diamkan pada temperatur kamar selama 5 hari sambil sesekali dikocok sehingga penarikan senyawa simplisia dapat maksimal, kemudian disaring dengan kain flanel. Hasil saringan yang berupa

ampas dicuci dengan pelarut etanol 70% sehingga diperoleh sari dari serbuk daun belimbing wuluh. Filtrat hasil ekstraksi dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental dan memiliki bobot konstan.

6. Pembuatan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Fraksinasi etil asetat dilakukan dengan mensuspensikan ekstrak etanol 70% yang telah diperoleh dengan 100 ml air dan 100 ml etil asetat sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah. Diperoleh lapisan etil asetat yang dipisahkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi etil asetat.

7. Identifikasi ekstrak daun belimbing wuluh

7.1. Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan mengamati meliputi warna, bau, dan bentuk ekstrak.

7.2. Identifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak daun belimbing wuluh

7.2.1. Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 ml air panas dan didihkan selama 5 menit, filtrat diambil dan digunakan untuk pengujian. Dalam tabung reaksi, filtrat ekstrak ditambahkan 0,5 g serbuk Mg, 1 ml HCl pekat, dan 1 ml amil alkohol, dan dikocok kuat. Uji positif flavonoid menghasilkan warna kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol (Agustina 2011).

7.2.2. Identifikasi tanin. Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 ml air panas, didihkan selama 5 menit, dan disaring. Sebagian filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan oleh warna hijau kehitaman.

7.2.3. Identifikasi saponin. Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 ml air panas dan didihkan selama 5 menit, filtrat disaring dan digunakan untuk pengujian. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup kemudian dikocok selama 10 detik dan didiamkan selama 10 menit. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

7.3. Identifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak dan fraksi daun belimbing wuluh secara KLT. Kromatografi Lapis Tipis dilakukan dengan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan menggunakan beberapa fase gerak

untuk menentukan fase gerak terbaik. Sampel yang dilakukan KLT adalah pembandingan, ekstrak etanol 70%, dan fraksi etil asetat.

8. Rancangan formula *lotion* dari fraksi daun belimbing wuluh

Formulasi lotion dibuat tiga variasi perbandingan fraksi etil asetat daun belimbing wuluh. Rancangan formula lotion daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 1. Rancangan formula *lotion* fraksi daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Bahan	Formula I (%)	Formula II (%)	Formula III (%)	Formula IV (%)	Formula V (%)
Fraksi etil asetat	-	-	5	10	15
Rutin	-	12,939	-	-	-
Asam stearat	2	2	2	2	2
Paraffin	3	3	3	3	3
Gliserin	10	10	10	10	10
Cetil alkohol	3	3	3	3	3
Nipagin	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Nipasol	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Trietanolamin	2	2	2	2	2
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

9. Pembuatan sediaan *lotion* fraksi daun belimbing wuluh

Pembuatan formula dilakukan dengan membagi bahan-bahan yang digunakan menjadi dua bagian, yaitu bahan yang larut dalam fase air dan bahan yang larutan dalam fase minyak. Bahan yang larut air diantaranya gliserin, trietanolamin, nipagin, dan aquadest. Bahan yang larut minyak yaitu asam stearat, paraffin, nipasol, dan cetil alkohol dimasukkan ke dalam cawan penguap. Kedua fase dipanaskan dan diaduk pada suhu 70 - 75°C secara terpisah hingga homogen. Kemudian kedua fase dicampur pada suhu 70°C hingga homogen dan mencapai suhu 40°C. Selanjutnya, fraksi dimasukkan ke dalam campuran pada suhu 35°C kemudian dilakukan pengadukan selama kurang lebih satu menit.

10. Pengujian mutu fisik *lotion* dari fraksi daun belimbing wuluh

10.1. Uji organoleptis

Pengujian dilakukan secara visual dengan melihat bentuk, warna, dan bau sediaan. Tujuan uji organoleptis adalah untuk mengetahui warna dan bau *lotion* sesuai dengan fraksi yang digunakan (Arifin 2010).

10.2. Uji homogenitas

Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan menggunakan *object glass*. Sediaan dioleskan pada *object glass* kemudian diamati apakah sediaan menunjukkan suasana yang homogen, ditandai dengan tidak terlihat butiran-butiran kasar (Lubis 2012).

10.3. Uji viskositas

Viskositas *lotion* diukur dengan *viscotester* dan masing-masing formula direplikasi sebanyak tiga kali. Sebanyak kurang lebih 30 gram dimasukkan ke dalam mangkuk *viscotester*, kemudian spindle dipasang dan rotor dijalankan. Hasil viskositas dicatat setelah jarum menunjukkan angka yang stabil, pengukuran viskositas dilakukan setiap minggu selama 1 bulan (Bayuaji dkk. 2012).

10.4. Uji daya sebar

Pengujian daya sebar dilakukan menggunakan dua kaca bulat. Ditimbang 0,5 gram sediaan *lotion* kemudian letakkan sediaan pada bagian tengah alat (kaca bulat). Salah satu kaca bulat ditimbang beratnya kemudian diletakkan di atas massa sediaan dan dibiarkan selama satu menit. Diameter sediaan yang menyebar diukur dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi. Ditambahkan beban tambahan sebesar 50 gram, kemudian didiamkan selama satu menit dan dicatat diameter sediaan yang menyebar. Penambahan beban terus dilakukan hingga beban tambahan mencapai 250 g. Lakukan tiga kali replikasi untuk tiap sediaan yang tersisa. Membuat grafik hubungan antara beban dan luas yang menyebar.

10.5. Uji daya lekat *lotion*

Pada pengujian ini, sediaan diletakkan di atas *object glass* yang telah ditentukan luasnya, kemudian diletakkan *object glass* yang lain di atas sediaan

tersebut dan ditekan dengan beban satu kg selama lima menit. *Object glass* dipasang pada alat uji, kemudian bebas seberat 80 g dilepaskan. Mencatat waktu yang dibutuhkan hingga kedua *object glass* dapat terlepas. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali.

10.6. Uji pH

Sediaan lotion diukur dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan menggunakan larutan dapar pH 4 dan pH 7. Ditimbang sebanyak 1 gram lotion dan diencerkan dengan 10 ml aquadest, kemudian pH meter dimasukkan pada bagian sensornya dan dibaca pH pada bagian monitor.

10.7. Cycling test

Sediaan disimpan pada suhu dingin $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (1 siklus). Percobaan ini diulang sebanyak 6 siklus lalu dilakukan pengamatan dan evaluasi yang dibandingkan dengan sediaan sebelumnya (Pambudi 2013).

10.8. Menentukan tipe emulsi

10.8.1. Metode warna. Uji ini menggunakan metode pewarna yaitu *methylen blue*. Pada *drupple plate*, masukkan sedikit sediaan lotion kemudian ditetesi dengan metilen *blue* dan diamati perubahan yang terjadi. Jika metilen *blue* menyebar secara merata, maka tipe emulsi adalah M/A, namun jika metilen *blue* terpisah, maka tipe emulsi adalah A/M (Arifin 2010).

10.8.2. Metode pengenceran. Uji ini dilakukan dengan memasukkan lotion yang telah dibuat ke dalam cawan, kemudian diencerkan dengan ditambahkan air. Jika lotion dapat diencerkan maka emulsi adalah minyak dalam air (Nonci dkk. 2016).

10.8.3. Metode daya hantar listrik. Metode ini dilakukan dengan memasukkan *lotion* yang telah dibuat kedalam *beaker glass* kemudian dihubungkan dengan rangkaian arus listrik. Apabila mampu menyala maka emulsi tipe minyak dalam air, namun apabila sistem tidak menghantarkan listrik maka emulsi tipe air dalam minyak (Pakki dkk. 2010).

10.8.4. Metode mikroskop. Penentuan tipe emulsi ini menggunakan beberapa tetes larutan bahan pewarna dalam air yakni *methylen blue* dan bahan

pewarna dalam minyak yakni Sudan III yang dicampurkan ke dalam sediaan *lotion*. Selanjutnya dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop. Apabila dengan *methylen blue* memberikan tekstur yang tampak rata dan tidak menggumpal, maka sediaan merupakan tipe emulsi minyak dalam air. Namun, apabila dengan Sudan III *lotion* menunjukkan tekstur yang halus dan tidak terdapat gumpalan maka sediaan merupakan tipe emulsi air dalam minyak.

11. Uji aktivitas penangkal radikal

Uji aktivitas penangkal radikal bebas atau antioksidan dilakukan pada fraksi etil asetat daun belimbing wuluh dan sediaan *lotion* fraksi etil asetat daun belimbing wuluh dengan DPPH yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum setelah waktu yang didapat dari *operating time*.

11.1. Uji pendahuluan. Dalam 3 buah tabung reaksi, masing-masing ditambahkan dengan larutan DPPH, larutan Rutin 1 mg/mL, larutan fraksi etil asetat daun belimbing wuluh 5mg/mL, larutan *lotion* F1, F2, F3, F4 dan F5 5mg/mL sebanyak 1,0 mL kemudian ditambah dengan metanol *p.a* sebanyak 3 mL. Larutan tersebut kemudian divortex selama 30 detik dan didiamkan selama 30 menit. Setelah 30 menit, warna larutan diamati. Replikasi sebanyak 3 kali.

11.2. Pembuatan larutan stok DPPH. Ditimbang dengan seksama serbuk DPPH 15,8 mg, kemudian dilarutkan dalam metanol *p.a* sampai tanda batas pada labu takar 100 mL. Sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM. Labu takar ditutup dengan *aluminium foil*.

11.3. Pembuatan larutan stok fraksi etil asetat daun *Averrhoa bilimbi* L.. Ditimbang dengan seksama fraksi etil asetat sebanyak 40 mg dilarutkan dalam metanol *p.a* ad tanda batas dalam labu takar 100 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 400 ppm, selanjutnya dibuat seri pengenceran 200 ppm; 100 ppm; 50 ppm; 25 ppm; dan 12,5 ppm.

11.4. Pembuatan larutan stok pembanding Rutin. Sebanyak 5 mg rutin dilarutkan dengan metanol *p.a* sampai tanda batas pada labu takar 100 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 50 ppm, selanjutnya dibuat seri pengenceran 25 ppm; 12,5 ppm; 6,25 ppm; 3,125 ppm; dan 1,563 ppm.

11.5. Pembuatan larutan stok basis lotion (kontrol negatif). Ditimbang dengan seksama 100 mg basis lotion, selanjutnya dilarutkan dengan metanol *p.a* sampai tanda batas pada labu takar 100 mL. Sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan basis lotion dibuat seri pengenceran 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm; dan 31,25 ppm.

11.6. Pembuatan larutan stok lotion pembanding Rutin (kontrol positif). Ditimbang dengan seksama 5 mg sediaan lotion pembanding Rutin, selanjutnya dilarutkan dengan metanol *p.a* hingga tanda batas dalam labu takar 100 mL. Sehingga diperoleh konsentrasi 50 ppm. Larutan lotion pembanding Rutin dibuat seri pengenceran 25 ppm; 12,5 ppm; 6,25 ppm; 3,125 ppm; dan 1,563 ppm.

11.7. Pembuatan larutan stok lotion fraksi etil asetat daun *Averrhoa bilimbi* L.. Ditimbang dengan seksama 100 mg sediaan lotion fraksi etil asetat daun belimbing wuluh, selanjutnya dilarutkan dalam metanol *p.a* hingga tanda batas pada labu takar 100 mL. Sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan lotion fraksi etil asetat daun belimbing wuluh dibuat seri pengenceran 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm; dan 31,25 ppm.

11.8. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maksimum). Larutan stok DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam vial 5 mL, kemudian ditambahkan 4,0 mL metanol *p.a* dan dikocok hingga homogen. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 – 600 nm.

11.9. Penentuan *operating time* (OT). Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1,0 mL dimasukkan dalam vial 5,0 mL, kemudian ditambahkan dengan metanol *p.a* sebanyak 4 mL, selanjutnya divorteks selama 30 detik. Penentuan *operating time* dilakukan pada panjang gelombang maksimum dan absorbansi dibaca mulai dari menit 0 sampai menit didapatkan nilai absorbansi yang stabil pada menit tertentu. *Operating time* ditentukan dari grafik antara waktu pembacaan dan absorbansi hingga diperoleh absorbansi yang paling stabil.

11.10. Uji aktivitas penangkal radikal. Pengujian aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH pada lotion daun belimbing wuluh yang diukur absorbansinya pada λ maksimum setelah waktu yang didapatkan dari *operating*

time. Preparasi larutan yang akan diukur antara lain: 4,0 mL larutan *lotion* daun belimbing wuluh kemudian ditambahkan 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM divorteks selama 30 detik dan didiamkan selama OT, ditempat yang tidak terkena cahaya secara langsung, kemudian dibaca absorbansinya pada λ maksimum. Pengujian pertama dilakukan pada minggu pertama setelah sediaan lotion dibuat kemudian diuji pada minggu terakhir selama *lotion* disimpan.

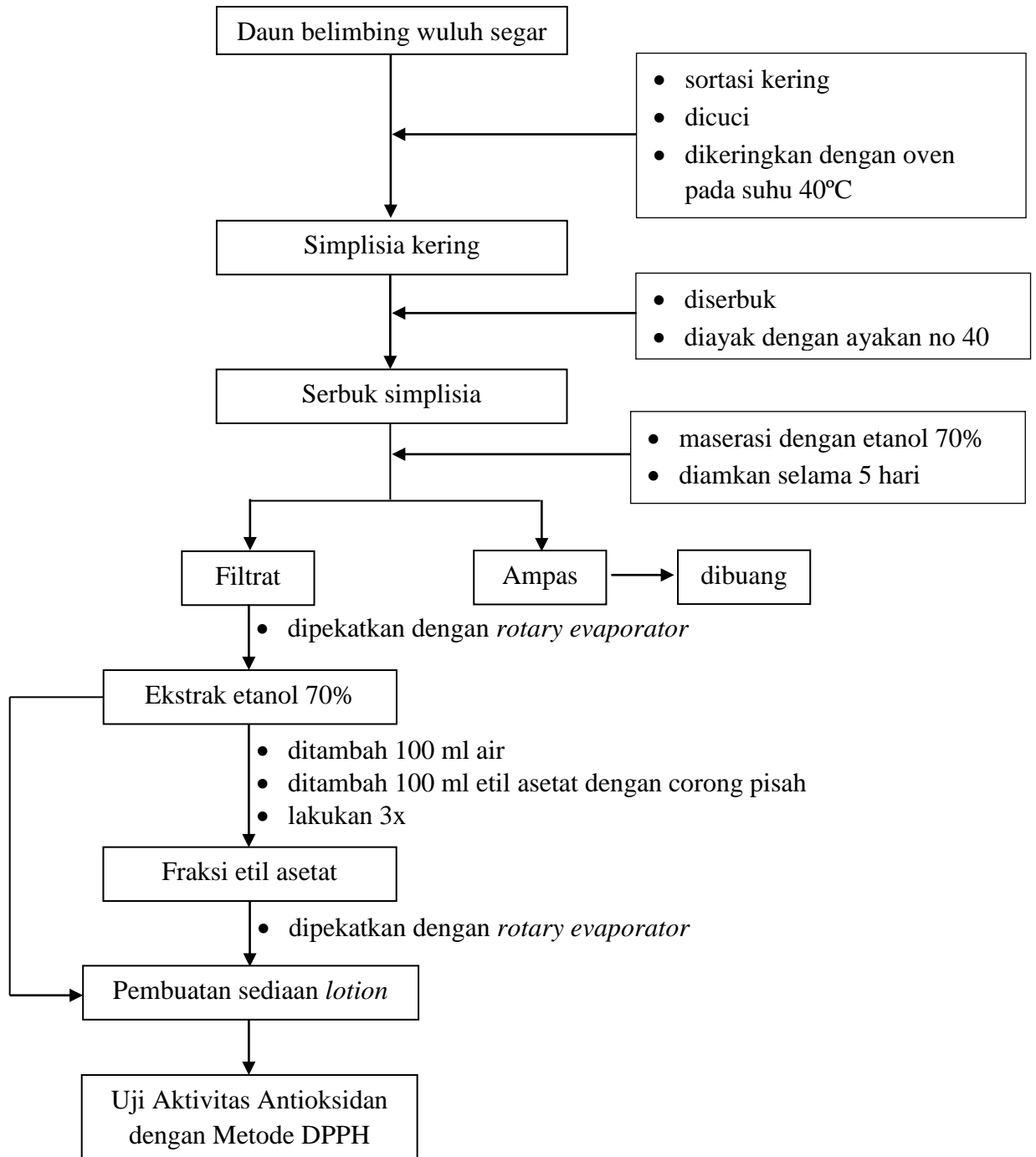
E. Analisa Hasil

Ketiga formula *lotion* diuji mutu fisiknya, meliputi organoleptis, homogenitas, viskositas, daya lekat, daya sebar, dan menentukan tipe emulsi. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun *Averrhoa bilimbi* L. dan formula *lotion* dilakukan uji statistik menggunakan metode ANOVA satu arah dengan kepercayaan 95%, dan perbedaan dengan uji Tukey. Pengujian ANOVA dilakukan menggunakan SPSS versi 17.0. Penentuan aktivitas penangkap radikal bebas dilakukan dengan penghitungan IC50 (Inhibitory Concentration). Nilai IC50 dapat dihitung berdasarkan rumus:

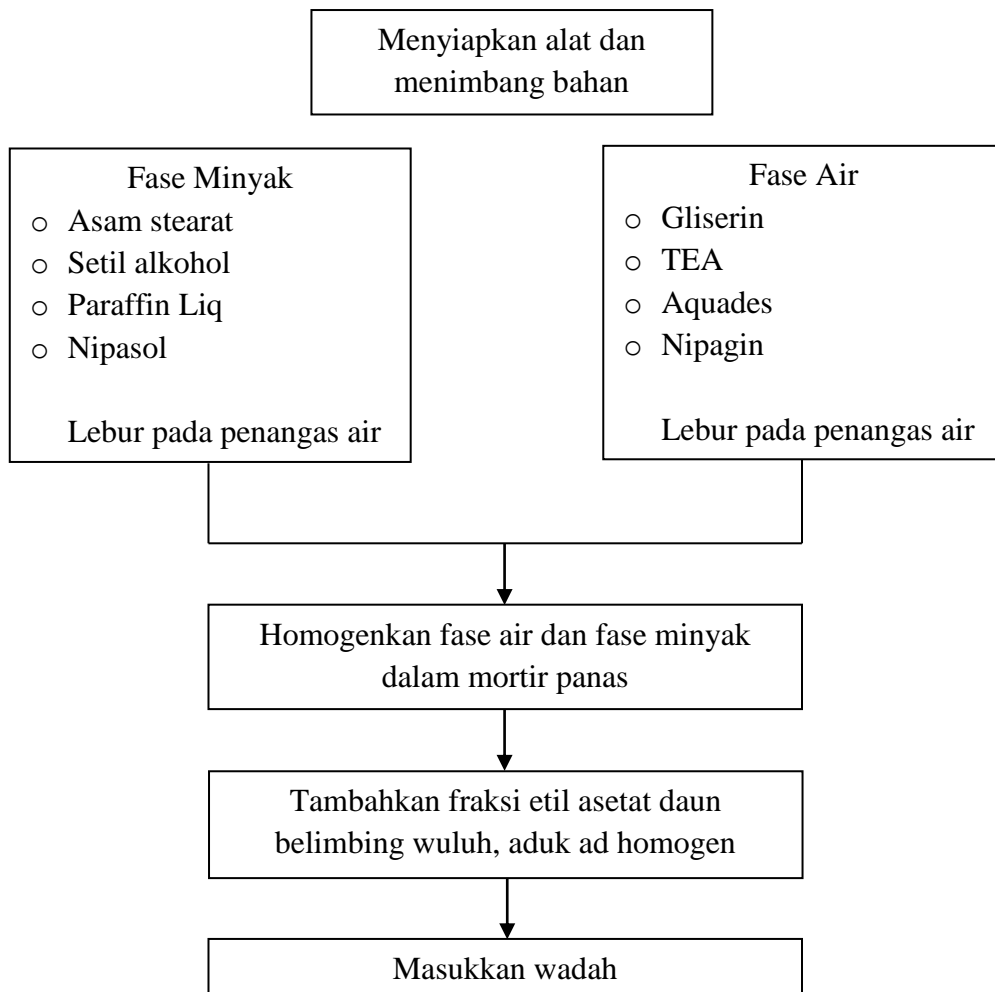
$$\text{Persentase peredaman} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs sampel}} \times 100$$

Regresi linier dari rentang konsentrasi ekstrak vs %peredaman DPPH digunakan untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang dapat meredam 50% DPPH (nilai IC50). Aktivitas peredaman radikal bebas ekstrak, didapat dengan perhitungan: (IC50 rutin / IC50 ekstrak) * 100% (Dipahayu dkk 2014).

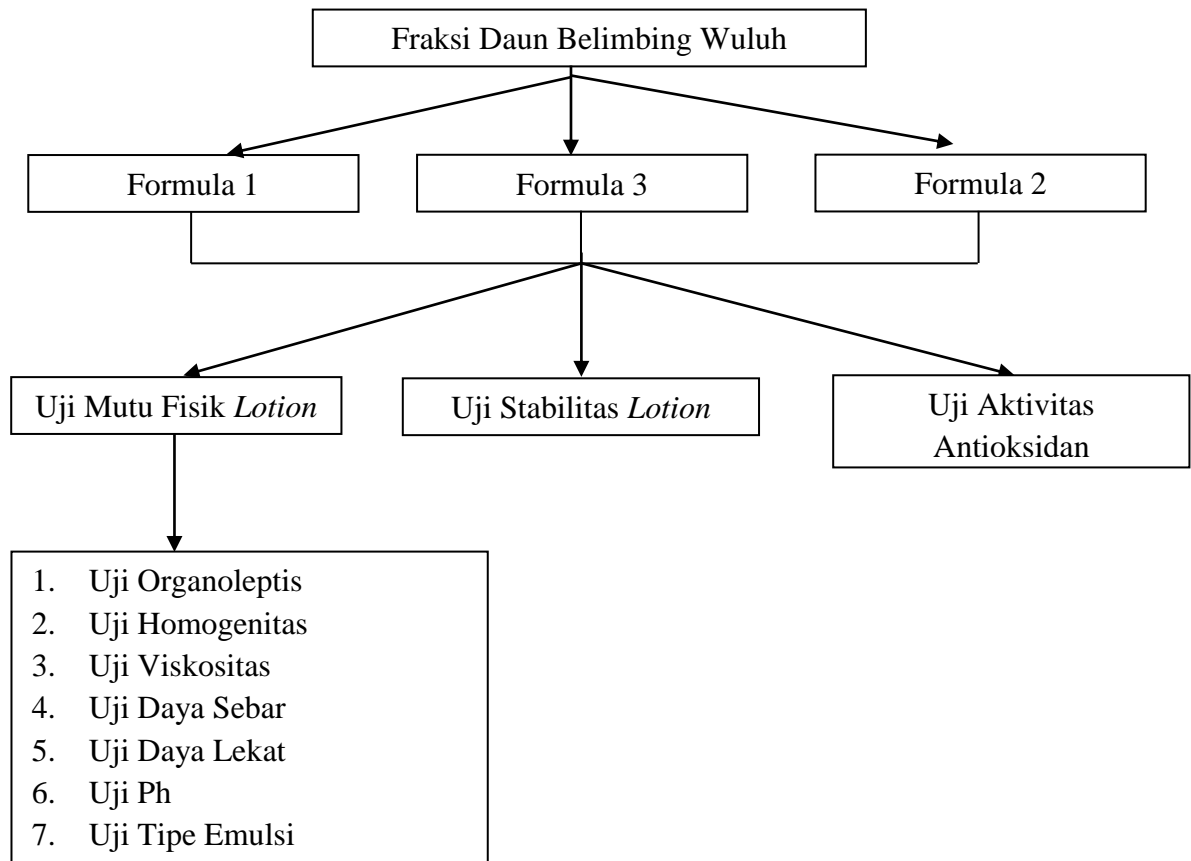
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 1. Skema Pembuatan Ekstrak dan Fraksi



Gambar 2. Skema Pembuatan *Lotion* Daun Belimbing Wuluh



Gambar 3. Skema Pengujian *Lotion* Daun Belimbing Wuluh