

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah tablet hisap ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). Sampel pada penelitian ini adalah tablet hisap ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) menggunakan variasi konsentrasi PVP F1 (0%:13,8%), F2 (3%:13,2%), F3 (4%:12,2%), dan F4 (5%:11,8%).

B. Variabel Penelitian

1. Variabel utama

Variabel utama yang pertama pada penelitian ini adalah tablet hisap.

Variabel utama yang kedua pada penelitian ini adalah sediaan tablet hisap ekstrak daun kelor dengan variasi konsentrasi PVP.

Variabel utama yang ketiga pada penelitian ini adalah tablet hisap yang memenuhi persyaratan uji mutu fisik tablet.

Variabel utama keempat pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan tablet hisap ekstrak daun kelor dengan mutu fisik terbaik menggunakan metode DPPH.

2. Klasifikasi variabel utama

2.1 Variabel bebas. Konsentrasi PVP pada pembuatan tablet hisap dengan metode granulasi basah menggunakan variasi konsentrasi PVP dan manitol F1 (0%:13,8%), F2 (3%:13,2%), F3 (4%:12,2%), dan F4 (5%:11,8%).

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung mencakup uji mutu fisik granul, uji mutu fisik tablet, dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

2.3 Variabel terkontrol: variabel yang bisa dikontrol pada saat menjalankan penelitian sehingga dapat menetralkan pengaruhnya. Variabel terkontrol mencakup nomor ayakan, volume penambahan bahan pengikat, berat tablet, suhu pengeringan granul, metode pengujian granul, metode pengujian tablet, dan tekanan kompresi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) adalah daun didapatkan dari tanaman kelor di Dusun Watuburik, Kelurahan Wonorejo, Kecamatan Gondangrejo, Kabupaten Karanganyar.

Kedua, ekstrak daun kelor adalah ekstrak yang didapat dari simplisia daun kelor yang di maserasi dengan etanol 96% dan dilakukan pemekatan menggunakan *rotary evaporator*.

Ketiga, tablet hisap adalah sediaan padat yang melepaskan bahan obat dengan lambat dan melarut perlahan kurang dari 30 menit di dalam mulut.

Keempat, variasi bahan pengikat PVP adalah sediaan tablet hisap dibuat dengan menggunakan metode granulasi basah serta variasi konsentrasi PVP dan manitol F1 (0%:13,8%), F2 (3%:13,2%), F3 (4%:12,2%), dan F4 (5%:11,8%).

Kelima, tablet hisap yang memenuhi persyaratan uji mutu fisik tablet adalah tablet yang memenuhi persyaratan uji mutu fisik granul antara lain uji organoleptik granul, uji waktu alir granul, uji sudut diam granul, uji indeks pengetapan granul, uji susut pengeringan granul, dan memenuhi persyaratan uji mutu fisik tablet antara lain uji organoleptik tablet hisap, uji keseragaman ukuran tablet hisap, uji keseragaman bobot tablet hisap, uji waktu larut tablet hisap, uji kekerasan tablet hisap, uji kerapuhan tablet hisap, dan uji tanggap rasa tablet hisap.

Keenam, uji aktivitas antioksidan tablet hisap ekstrak daun kelor dengan mutu fisik terbaik adalah uji yang dilakukan dengan menggunakan metode DPPH dan kuatnya antioksidan dilihat dari nilai IC_{50} .

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan anatara lain labu ukur, gelas ukur, Erlenmeyer, beaker glass, timbangan neraca analitik, batang pengaduk, pipet ukur, pipet volume, pipet tetes, kertas saring, oven, aluminium foil, seperangkat alat maserasi, seperangkat alat *rotary evaporator*, wadah inert 1 liter, water bath, kaca arloji, tabung reaksi, rak tabung reaksi, mortir, stamfer, jangka sorong, corong, stopwatch, ayakan mesh no 60, ayakan mesh no 16, ayakan mesh no 18, spektrofotometer UV-Vis, *hardness tester*, *friability tester*, *disintegration tester*, mesin tablet *single punch*, *moisture balance*, blender, dan alat penunjang lainnya.

2. Bahan

Bahan uji yang digunakan yaitu serbuk daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dan ekstrak daun kelor. Bahan kimia yang digunakan, antara lain serbuk daun kelor kering, etanol 96%, reagen mayer, reagen

bourchardat, asam sulfat pekat, HCl 2N, FeCl₃ 1%, serbuk Mg, HCl 2%, asam stearat anhidrat, aquades, reagen KM_nO₄, reagen DPPH, metanol p.a, dan tablet hisap vitamin C.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.)

Determinasi daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) bertujuan untuk membuktikan kebenaran identitas tanaman yang digunakan dalam penelitian. Determinasi berlangsung dengan pencocokan secara taksonomi, morfologi, dan persamaan jenis tanaman kelor yang sesuai literatur. Determinasi dilakukan oleh Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pembuatan serbuk daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.)

Air mengalir digunakan untuk mencuci daun kelor segar sebanyak 9 kg, kemudian melakukan sortasi basah untuk membersihkan kotoran yang menempel pada daun, mengiris tipis-tipis daun kelor agar mudah kering, selanjutnya mengoven irisan daun kelor pada suhu 40⁰C selama 10 jam. Serbuk daun kelor diperoleh dengan menghaluskan dengan blender dan serbuk di ayak dengan ayakan mesh no 60 (Anas *et al.*, 2016).

3. Karakteristik serbuk daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.)

3.1. Uji organoleptik serbuk daun kelor. Uji organoleptik dilakukan dengan memeriksa bentuk, bau, rasa, dan warna serbuk daun kelor.

3.2. Uji susut pengeringan serbuk daun kelor. Uji susut pengeringan dilakukan dengan menimbang serbuk daun kelor sebanyak 2 gram lalu memasukkan serbuk dalam alat *moisture balance* yang telah diatur suhunya 105⁰C. Uji susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 kali sampai nilai konstan yang ditandai dengan alarm pada alat *moisture balance*. Uji susut pengeringan bertujuan untuk memberi batasan pada senyawa yang hilang akibat proses pengeringan (Depkes RI, 2000). Syarat uji susut pengeringan pada daun kelor adalah tidak lebih 10% (Kemenkes RI, 2017).

4. Pembuatan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.)

Metode yang digunakan adalah maserasi dengan menimbang sebanyak 1,5 kg serbuk daun kelor dengan perbandingan serbuk daun kelor dan etanol 1:10 (Kemenkes RI, 2017). Pelarut etanol 96% yang digunakan untuk maserasi pertama sebanyak 15 liter. Maserasi pertama

dilakukan dengan etanol 96% selama 1x24 jam, dengan pengadukan sesekali setelah itu disaring dan didapat maserat satu. Ampas yang tersisa waktu penyaringan maserat satu dimaserasi lagi menggunakan etanol 96% dengan jumlah etanol setengah kali jumlah etanol maserasi pertama yaitu 7,5 liter. Maserasi kedua dilakukan selama 1x24 jam (Kemenkes RI, 2017). Larutan maserasi disaring dan mendapat maserat kedua. Maserat pertama dan maserat kedua dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sampai menjadi ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan dihitung rendemennya. Rendemen dihitung untuk menentukan perbandingan jumlah ekstrak yang diperoleh pada saat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan untuk mengetahui banyaknya senyawa yang terkandung dalam ekstrak (Kemenkes RI, 2017).

5. Karakteristik ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.)

5.1 Uji organoleptik ekstrak daun kelor. Uji organoleptik dilakukan dengan memeriksa bentuk, warna, dan bau ekstrak daun kelor.

5.2 Uji kadar air ekstrak daun kelor. Uji kadar air ekstrak menggunakan metode gravimetri dengan menimbang 10 gram ekstrak lalu memasukkan ke dalam botol timbang. Botol timbang yang sudah berisi ekstrak dioven pada suhu 105⁰C selama 5 jam, kemudian mendinginkan botol timbang dalam desikator dan menimbang botol timbang. Botol timbang dioven kembali selama 1 jam, setelah itu mendinginkan botol timbang dalam desikator dan menimbang botol timbang kembali sampai mendapatkan berat yang konstan (Depkes RI, 1989). Ekstrak daun kelor mempunyai kadar air tidak lebih dari 10% (Kemenkes RI, 2017).

6. Skrining fitokimia serbuk dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.)

6.1. Identifikasi flavonoid. Ekstrak dan serbuk daun kelor masing-masing ditimbang 1 gram kemudian menambahkan 10 mL aquadest lalu dididihkan selama 5 menit dan menyaring dalam keadaan panas. Larutan yang sudah tersaring menambahkan 0,1 gram serbuk magnesium, 1 mL asam klorida pekat, dan 2 mL amil alkohol, setelah itu dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Ekstrak dan serbuk mengandung flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Djoko *et al.*, 2020).

6.2. Identifikasi alkaloid. Ekstrak dan serbuk daun kelor masing-masing ditimbang 1 gram kemudian menambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air suling. Cairan yang sudah tercampur dipanaskan selama 2 menit, kemudian dinginkan dan saring menggunakan kertas saring. Ekstrak dan serbuk yang sudah dilarutkan diteteskan sebanyak 3 tetes pada dua kaca arloji. Kaca arloji pertama menambahkan 2 tetes reagen Mayer jika sampel mengandung alkaloid maka terbentuk endapan putih atau kuning. Kaca arloji kedua menambahkan 2 tetes reagen Bourchardat jika sampel mengandung alkaloid maka terbentuk endapan coklat (Ditjen Pom, 2008).

6.3. Identifikasi tanin dan polifenol. Ekstrak dan serbuk ditimbang masing-masing 1 gram. Ekstrak dan serbuk dilarutkan etanol 96% sampai larut, setelah itu disaring menggunakan kertas saring. Ekstrak dan serbuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi, setelah itu menambahkan larutan besi (III) sebanyak 3 tetes. Warna biru atau hitam kehijauan pada larutan menunjukkan adanya tanin dan polifenol (Cahyani *et al.*, 2019).

6.4. Identifikasi steroid/ triterpenoid. Ekstrak dan serbuk daun kelor ditimbang sebanyak 1 gram. Ekstrak dan serbuk dimasukkan cawan dan menambahkan 5 ml etanol 70%, setelah itu dipanaskan diatas waterbath selama 2 menit dan menyaring dalam keadaan panas. Ampas yang tersisa di kertas saring dipanaskan menggunakan cawan diatas waterbath sampai kering. Ampas yang sudah kering ditambahkan CHCl_3 sampai larut, dan memasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan ditambahkan air sampai membentuk 2 lapisan CHCl_3 dan air. Lapisan CHCl_3 diambil menggunakan pipet tetes dan diletakkan di dropplate 3 tetes, setelah itu menambahkan reagen 3 tetes asam asetat anhidrat dan menambahkan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat. Ekstrak dan serbuk mengandung steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau biru, sedangkan jika mengandung triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau ungu (Depkes RI, 1979).

6.5. Identifikasi saponin. Ekstrak dan serbuk daun kelor ditimbang sebanyak 1 gram. Ekstrak dan serbuk dilarutkan menggunakan etanol 96% sampai larut, setelah itu disaring menggunakan kertas saring. Cairan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan menambahkan aquadest lalu dikocok secara vertikal selama 10

detik. Busa yang terbentuk setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang 10 menit menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

6.6. Uji kandungan vitamin C pada ekstrak daun kelor.

Ekstrak yang sudah dilarutkan mengambil sebanyak 1 mL, kemudian menambahkan 5 mL aquadest lalu digojok. Larutan yang sudah tercampur, kemudian menambahkan KMnO_4 0,1% sebanyak 10 mL. Sampel positif mengandung vitamin C bila muncul warna coklat (Yuliasuti, 2019).

7. Formulasi dan pembuatan sediaan tablet hisap

Pada penelitian ini dibuat 4 formula tablet hisap dengan konsentrasi ekstrak yang sama pada setiap formula. Komponen yang divariasi PVP dan manitol dengan konsentrasi F1 (0%:13,8%), F2 (3%:13,2%), F3 (4%:12,2%), dan F4 (5%:11,8%). Ekstrak kental dikeringkan menggunakan aerosil sampai kering, kemudian menambahkan laktosa dan explotab diaduk sampai homogen. Manitol dan aspartam ditambahkan pada campuran, mengaduk sampai homogen. PVP dikembangkan menggunakan aquadestilata, lalu menuangkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran sambil mengaduk sampai membentuk masa yang siap di granulasi. Massa granul diayak menggunakan ayakan mesh no 16, kemudian mengeringkan granul menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 45 menit. Granul yang sudah kering diayak menggunakan ayakan mesh no 18, selanjutnya melakukan uji mutu fisik granul. Granul ditambahkan Mg stearat dan talk sebagai bahan pelicin, lalu mencetak granul menggunakan mesin pencetak tablet *single punch*. Tablet yang sudah dicetak diuji mutu fisik tablet (Sawiji, 2019).

Tabel 4. Formula tablet hisap ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dengan konsentrasi variasi PVP dan manitol (untuk satu tablet dalam mg)

Bahan	F1 (mg)	F2 (mg)	F3 (mg)	F4 (mg)
Ekstrak daun kelor	200	200	200	200
Aerosil	100	100	100	100
Manitol	83,2	79,2	73,6	71,2
Laktosa	124,8	118,8	110,4	106,8
PVP	-	18	24	30
Aspartam	50	50	50	50
Talk	12	12	12	12
Magnesium stearat	6	6	6	6
Explotab	24	24	24	24
Berat total tablet	600	600	600	600

8. Pemeriksaan sifat fisik granul

8.1. Uji organoleptik granul. Granul diperiksa mengenai bentuk, warna, bau, dan rasa pada granul.

8.2. Uji waktu alir granul. Waktu alir granul dilakukan dengan menimbang 100 gram granul, kemudian menempatkan granul pada corong uji waktu alir, alat dalam keadaan tertutup. Alat uji dibuka tutupnya, mencatat waktu alir granul.

8.3. Uji sudut diam granul. Uji sudut diam pada granul diukur dengan menimbang sebanyak 25 gram granul. Pengukuran sudut diam secara horizontal pada timbunan granul yang terbentuk.

8.4. Uji indeks pengetapan granul. Uji Pengetapan pada granul dilakukan dengan memasukkan granul ke dalam gelas ukur 100 mL. Pengujian dengan diketuk 500 kali menggunakan alat. Volume sebelum diketuk dan setelah diketuk dicatat dan menghitung presentasi uji indeks pengetapan granul.

8.5. Uji susut pengeringan granul. Uji susut pengeringan granul menggunakan alat *moisture balance*, menimbang granul 2 gram pada wadah *aluminium foil* yang telah tersedia dan menekan tombol *start*. Hasil susut pengeringan akan ditunjukkan dengan %.

9. Pemeriksaan sifat fisik tablet hisap ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.)

9.1. Uji organoleptik tablet hisap. Uji organoleptik tablet hisap dilakukan dengan memeriksa warna, bentuk, bau, dan rasa tablet hisap.

9.2. Uji keseragaman ukuran tablet hisap. Uji keseragaman ukuran tablet mengambil 10 tablet secara acak dari setiap formula. Tablet dari setiap formula diukur panjang, lebar dan ketebalan menggunakan jangka sorong (Depkes RI, 1979).

9.3. Uji keseragaman bobot tablet hisap. Uji keseragaman tablet dengan menimbang 20 tablet, kemudian menghitung bobot rata-rata tiap tablet. Tablet mempunyai bobot menyimpang tidak lebih dari 2 tablet (BPOM RI, 2019).

9.4. Uji kekerasan tablet hisap. Uji kekerasan tablet diukur dengan mengambil 10 tablet acak dari setiap formula yang sudah dibuat. Setiap tablet diuji dengan tekanan terhadap diameter tablet. Tablet diuji menggunakan skala uji kekerasan tablet dalam satuan kg.

9.5. Uji kerapuhan tablet hisap. Uji kerapuhan tablet diukur dengan membersihkan 20 tablet dari debu dan menimbang tablet,

kemudian memasukkan ke dalam alat *friability tester*. Alat *friability tester* dengan kecepatan berputar 25 rpm sebanyak 100 putaran. Tablet hisap yang sudah diuji ditimbang ulang, kerapuhan dihitung dengan menghitung bobot tablet yang hilang ketika diuji (Depkes RI, 2014).

9.6. Uji waktu larut tablet hisap. Uji waktu larut dilakukan dengan mengambil tablet dari setiap formula, setelah itu diuji pada responden. Pengujian dimulai dari waktu tablet hisap masuk ke dalam mulut responden dan sampai tablet hisap habis (Hadisoewignyo dan Fudholi, 2016).

9.7. Uji tanggap rasa tablet hisap. Uji tanggap rasa tablet diukur dengan teknik sampling acak dengan 20 responden untuk memberikan tanggapan rasa pada tablet hisap daun kelor. Penilaian tanggap rasa dikelompokkan menjadi 3 yaitu tidak enak, biasa, dan enak. Tablet hisap daun kelor memenuhi syarat apabila 50% responden dapat menerima rasa tablet hisap daun kelor (Tajudin *et al.*, 2022).

10. Uji antioksidan tablet hisap ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) menggunakan metode DPPH

10.1. Pembuatan larutan DPPH. Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 15,8 mg, memasukkan serbuk ke dalam labu takar 100 mL lalu dilarutkan dengan metanol *pro analisis* sampai tanda batas 100 mL dengan itu diperoleh kadar 158 ppm. Larutan diletakkan pada suhu kamar dan terlindungi dari cahaya (Sari Erlinda., 2020).

10.2. Pembuatan larutan induk tablet hisap vitamin C. Tablet hisap vitamin C diambil 2 tablet dan digerus lalu menimbang sebanyak 10 mg kemudian memasukkan ke dalam labu takar 10 mL, menambahkan metanol *pro analisis* sampai tanda batas sehingga diperoleh kadar 100 ppm (Rizkayanti dan Jura, 2017).

10.3. Pembuatan larutan induk tablet hisap ekstrak daun kelor. Tablet hisap ekstrak daun kelor digerus. Tablet yang sudah digerus ditimbang sebanyak 600 mg kemudian memasukkan ke dalam labu takar 100 mL, kemudian menambahkan metanol *pro analisis* sampai tanda batas, sehingga diperoleh kadar 6000 ppm (Rizkayanti dan Jura, 2017).

10.4. Penentuan panjang gelombang larutan DPPH dan *operating time* larutan sampel. Larutan DPPH dipipet sebanyak 1 mL, menambahkan metanol *pro analisis* sampai tanda batas labu ukur 5 mL lalu homogenkan, kemudian mengukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 400–600 nm.

Nilai lamda maksimal DPPH ada pada rentang 515-520 nm. Pengukuran *operating time* dengan memipet 1 mL sampel, menambahkan 1 mL larutan DPPH, mencukupkan metanol *pro analisis* sampai tanda batas labu takar 5 mL, kemudian mengukur absorbansi (Sari Erlinda., 2020). Absorbansi diukur setiap 5 menit sekali dimulai dari menit ke-0 sampai menit ke-60. Waktu perendaman DPPH yang menghasilkan absorbansi paling stabil merupakan *operating time* (Hidayati *et al.*, 2017).

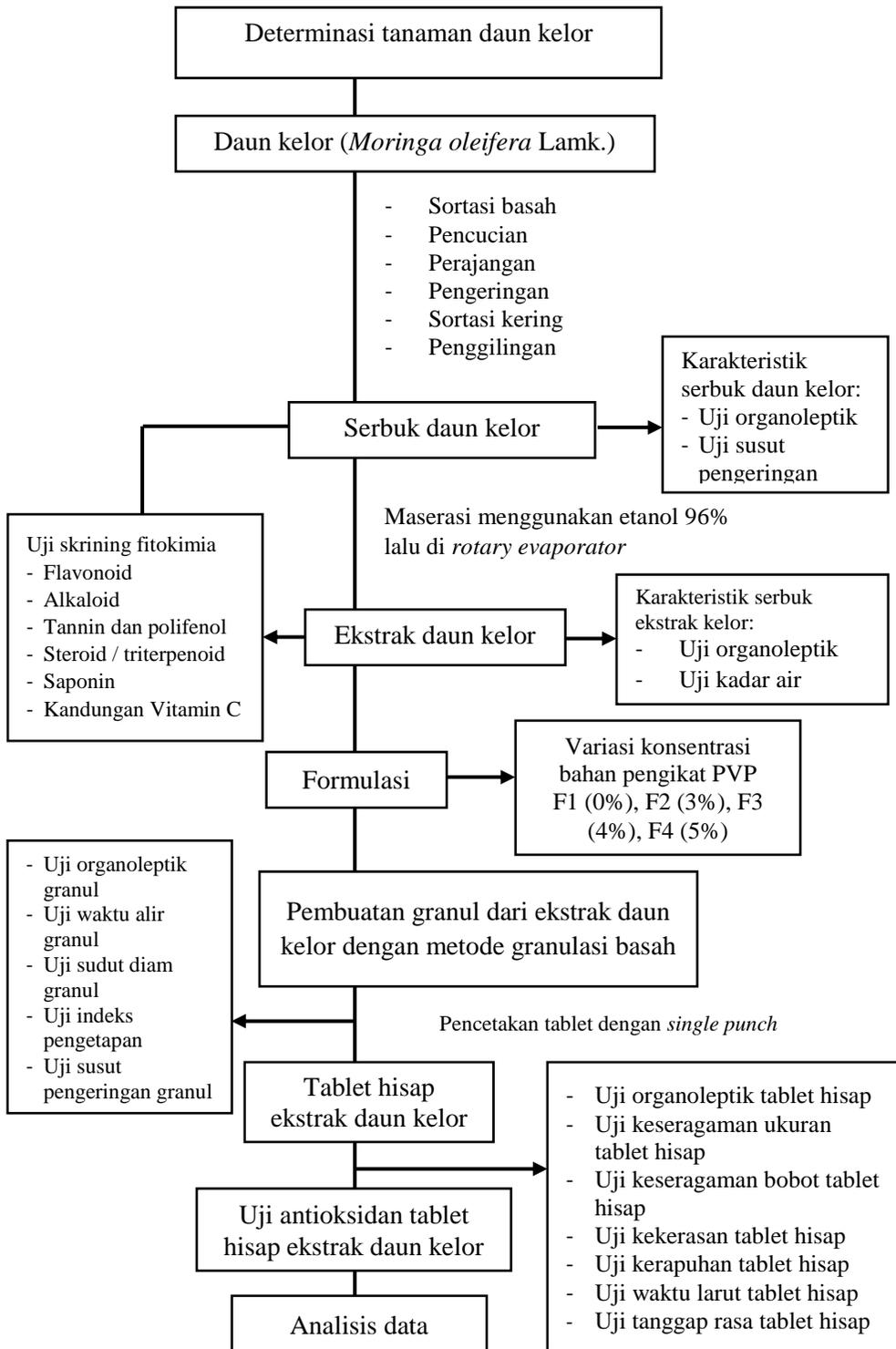
10.5. Pembuatan dan pembacaan absorbansi seri konsentrasi tablet hisap vitamin C. Pada kadar tablet hisap vitamin C 100 ppm akan memipet sebanyak 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL sehingga memperoleh konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Seri konsentrasi masing-masing diambil 1 mL, menambahkan 1 mL larutan DPPH, dan dicukupkan dengan metanol *pro analisis* sampai tanda batas labu takar 5 mL. Larutan yang sudah homogen lalu menunggu sesuai *operating time* lalu membaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Sari Erlinda., 2020).

10.6. Pembuatan dan pembacaan absorbansi seri konsentrasi tablet hisap ekstrak daun kelor. Pada kadar tablet hisap ekstrak daun kelor 6.000 ppm akan memipet sebanyak 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL sehingga memperoleh konsentrasi 60 ppm, 120 ppm, 180 ppm, 240 ppm, dan 300 ppm. Seri konsentrasi masing-masing diambil 1 mL, menambahkan 1 mL larutan DPPH, dan dicukupkan dengan metanol *pro analisis* sampai tanda batas labu takar 5 mL. Larutan yang sudah homogen lalu menunggu sesuai *operating time* lalu membaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Sari Erlinda., 2020).

11. Analisis data

Analisis data dengan uji distribusi normal menggunakan (Shapiro-Wilk) untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak, jika data tidak normal ($p < 0,05$) maka akan dilanjutkan dengan uji non parametrik. Uji parametrik satu arah (ANOVA) bisa dilakukan apabila data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Uji *Post Hoc* dilakukan untuk melihat perbedaan antara aktivitas antioksidan tablet hisap ekstrak daun kelor dan tablet hisap vitamin C yang ada dipasaran. Nilai yang dianggap signifikan secara statistik ditunjukkan dengan nilai ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna.

E. Alur Penelitian



Gambar 9. Alur penelitian