

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan keseluruhan subjek penelitian. Populasi penelitian ini ialah sediaan daun matoa yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel pertama di penelitian ini ialah daun matoa segar, berwarna hijau, tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua serta bebas dari hama.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama di penelitian ini merujuk pada sekelompok variabel yang terdiri atas variabel bebas, variabel terkontrol, serta variabel terikat. Pada konteks penelitian ini, variabel utama mencakup mutu fisik dan aktivitas antioksidan pada sediaan gel ekstrak etanol daun matoa yang menggunakan Carbopol 940 dan Na-CMC sebagai *gelling agent* dengan menggunakan metode DPPH.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dibagi atas tiga yakni variabel bebas, variabel terkontrol, variabel terikat.

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat diubah-ubah agar dipelajari pengaruhnya pada variabel terikat. Variabel bebas di penelitian ini ialah variasi konsentrasi carbopol 940 dan Na-CMC sebagai *gelling agent* dalam formula sediaan gel ekstrak etanol daun matoa.

Variabel terkontrol ialah faktor-faktor yang memengaruhi variabel terikat dan perlu dikendalikan atau diatur kualitasnya agar hasil penelitian tidak terjadi variasi yang tidak diinginkan dan dapat direplikasi dengan akurasi oleh peneliti lain. Dalam penelitian ini, variabel terkontrol meliputi prosedur pembuatan sediaan gel ekstrak etanol daun matoa dan kondisi penelitian.

Variabel terikat yang menjadi fokus utama dan kriteria evaluasi. Variabel terikat yang diteliti mencakup kualitas fisik serta aktivitas antioksidan dari sediaan gel ekstrak etanol daun matoa dengan

carbopol 940 sebagai agen pembentuk gel, menggunakan metode DPPH.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun matoa didapat dari tanaman matoa (*Pometia pinnata*) yang memiliki ciri daun bercorak hijau, utuh, bersih dari penyakit yang diperoleh dari Tawangmangu.

Kedua, ekstrak etanol daun matoa ialah hasil maserasi serbuk daun matoa dengan pelarut etanol 96% selama 24 jam kemudian disaring dan dipekatkan.

Ketiga, variasi carbopol 940 serta Na-CMC adalah variasi sebagai *gelling agent* dengan konsentrasi (1,5%:1,5%), (1%:2%), serta (2%:1%).

Keempat, uji mutu fisik sediaan gel ekstrak etanol daun matoa ialah dengan melihat organoleptis, homogenitas, viskositas, daya sebar, pH serta stabilitas.

Kelima, aktivitas antioksidan sediaan gel adalah aktivitas antioksidan sediaan gel dengan metode DPPH dan menggunakan kuersetin.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang dipergunakan yakni alat penggiling, ayakan mesh nomor 40, timbangan analitik, botol maserasi, *beaker glass*, gelas ukur, alat saring, corong, batang pengaduk, *vacuum rotary evaporator* (IKA® RV 10), labu destilasi, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), *moisture balance*, mortir dan stamper, erlenmeyer, labu tentukur, pipet volume, *waterbath* (Memert), sudip, lempeng kaca, *object glass*, *stopwatch*, oven, pH meter *viscotester* VT 04 (Rion co. Ltd) dan botol ukuran 100 mL.

2. Bahan

Bahan yang dipergunakan yaitu daun matoa, etanol 96%, carbopol 940, Na-CMC, triethanolamine, gliserin, propylene glycol dan aqua DM, nipagin, metanol, HCL 2 N, Magnesium, FeCl₃, pereaksi dragendorff, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, kuersetin, DPPH, dan etanol *p.a.*

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi daun matoa

Proses awal di penelitian ini ialah memverifikasi keaslian sampel daun matoa yang akan digunakan. Identifikasi dilakukan dengan memperhatikan ciri-ciri morfologis yang khas pada tanaman matoa. Identifikasi tanaman matoa dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu.

2. Persiapan sampel

Daun matoa yang dipergunakan di penelitian ini ialah daun matoa segar. Setelah diambil, daun-daun tersebut disortir dan ditimbang sebanyak 6 kg. Selanjutnya, daun-daun tersebut dicuci dengan air dan kemudian diiris-iris. Proses pengeringan dilakukan dengan pemanasan di bawah sinar matahari selama 3 hari.

3. Pembuatan serbuk daun matoa

Daun matoa yang melalui proses pengeringan selanjutnya dijadikan serbuk dengan cara digiling menggunakan alat penggiling. Serbuk daun matoa diayak menggunakan pengayak mesh 60. Hasil serbuk halus ditempatkan pada wadah kering serta tertutup rapat. Serbuk yang telah dihaluskan ditimbang menggunakan neraca analitik sesuai dengan bahan yang dibutuhkan untuk dilakukan pembuatan ekstrak (Martiningsih *et al.*, 2016).

4. Penetapan susut pengeringan

Proses penentuan susut pengeringan serbuk daun matoa dilaksanakan dengan mempergunakan alat moisture balance. Langkahnya adalah menimbang 2 gram serbuk daun matoa dan menempatkannya di dalam alat moisture balance. Selanjutnya, tunggu hingga angka muncul pada layar alat dan catat hasilnya dalam bentuk persentase yang tertera di layar moisture balance (BPOM, 2015).

5. Penetapan kadar air serbuk daun matoa

Sejumlah 10 gram serbuk daun matoa dimasukkan ke dalam labu alas bulat, kemudian ditambahkan 100 ml toluena yang sudah dijenuhkan terlebih dahulu, pastikan semua bahan terendam dengan baik. Alat destilasi bidwell sterling dipasang serta pemanasan dilakukan menggunakan api yang rendah. Proses pemanasan dihentikan saat tidak ada lagi air yang mengalir ke tabung *Receiver*. Volume air yang telah terdestilasi dapat diukur pada skala tabung *Receiver* (Ditjen POM, 2017).

6. Pembuatan ekstrak etanol daun matoa

Proses ekstraksi dilakukan pada suhu kamar dan terlindung dari sinar matahari langsung melalui maserasi, menggunakan pelarut etanol 96% untuk ekstraksi. Setelah ditimbang 500 gram daun matoa yang dihaluskan, ditambahkan 5000 mililiter etanol 96%. Diaduk sesekali, bubuk direndam selama enam jam sebelum dibiarkan selama delapan belas jam. Bejana maserasi dibungkus dengan alumunium foil lalu diberi lakban hitam pada tutupnya. Hasil maserasi dipisahkan dengan cara filtrasi. Remaserasi, yang melibatkan pengulangan proses ekstraksi maserasi setidaknya satu kali, dilakukan dengan menggunakan jenis pelarut yang sama tetapi dengan setengah volume pelarut sebelumnya. Maserat yang terkumpul selanjutnya dilakukan evaporasi vakum putar untuk mendapatkan ekstrak kental yang berasal dari daun matoa (Ditjen POM, 2017). Dihitung rendemen yang didapatkan dengan rumus :

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat simplisia (g)}} \times 100\%$$

7. Penetapan kadar air ekstrak menggunakan metode gravimetri

Ekstrak etanol daun matoa ditimbang sejumlah 10 gram, dimasukkan dalam wadah yang sudah ditera (W_1) berikutnya di oven dan dikeringkan selama 5 jam di suhu 105°C kemudian ditimbang. Pengeringan dilanjutkan selang waktu 1 jam dan ditimbang kembali (W_2) hingga didapatkan dari kedua penimbang selisih bobot tidak lebih dari 0,25 % (Ditjen POM, 2017). Penetapan kadar air ekstrak bisa dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(W_1 - W_2)}{(W_1 - W_0)} \times 100\%$$

8. Skrining fitokimia

8.1. Preparasi larutan uji. Larutan uji dibuat dengan cara ekstrak dan serbuk dengan etnaol perbandingan 1:10. Ekstrak dan serbuk ditimbang masing-masing 1 gram kemudian di larutkan menggunakan etanol sebanyak 10 mL.

8.2. Uji flavonoid. 1 mL pada setiap larutan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 mL etanol. Tabung reaksi tersebut dipanaskan selama 5 menit, lalu larutan dipipet serta dimasukkan ke tabung reaksi yang lain. Berikutnya, ditambahkan serbuk magnesium sejumlah 0,5 gram serta 3 tetes HCl pekat. Jika terbentuk warna jingga hingga merah, hal ini menampilkan adanya flavonoid. Sedangkan, bila terbentuk warna jingga hingga merah

keunggulan, hal ini menampilkan adanya flavanon. (Kusumawati *et al.*, 2018).

8.2. Uji saponin. 1 mL pada setiap larutan uji ditambahkan 5 mL air panas, dinginkan berikutnya kocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasilnya terbentuk busa kurang dari 10 detik berarti positif mengandung saponin, bila terbentuk buih setinggi 1-10 cm tidak kurang dari 10 menit pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, busa tidak hilang (Zaky *et al.*, 2021).

8.3. Uji tanin. 1 mL pada setiap larutan uji dimasukkan dalam tabung reaksi berikutnya dikocok dengan air panas sebanyak 10 mL sampai homogen kemudian ditambahkan FeCl₃ 2-3 tetes. Hasilnya jika berwarna hijau sampai biru kartinya positif tanin katekol sementara biru kehitaman artinya positif tanin pirogalol (Zaky *et al.*, 2021)

8.4. Uji terpenoid dan steroid. 1 mL pada masing-masing larutan uji dimasukkan ke tabung reaksi kemudian dikocok dengan sedikit ditambahkan eter. Ambil lapisan eter dan aplikasikan pada plat tetes, kemudian biarkan mengering. Sesudah kering, tambahkan dua tetes asam asetat anhidrat serta satu tetes asam sulfat pekat. Jika hasilnya menghasilkan warna oranye, merah, atau kuning, menunjukkan keberadaan terpenoid. Namun, jika menghasilkan warna hijau, menandakan keberadaan steroid. (Zaky *et al.*, 2021).

9. Rancangan formula

Berikut rancangan formula gel ekstrak etanol daun matoa dilihat di tabel:

Tabel 2. Formula Gel Ekstrak Etanol Daun Matoa (Sidoretno *et al.*, 2021)

Bahan	Konsentrasi (%)			Kegunaan
	F1	F2	F3	
Ekstrak daun matoa	0,1	0,3	0,5	Zat aktif
Vitamin C	-	-	-	Pembanding
Carbopol 940	1	1	2	<i>Gelling agent</i>
Na-CMC	1	2	1	<i>Gelling agent</i>
Propilenglikol	1,5	1,5	1,5	Humektan
Gliserin	1	1	1	Emollient
TEA	0,1	0,1	0,1	Alkalisasi
Nipagin	0,01	0,01	0,01	Pengawet
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Zat tambahan

Tabel 3. Rancangan Formula Gel Ekstrak Etanol Daun Matoa

Bahan	Konsentrasi (%)					Kegunaan
	F0 (-)	F1	F2	F3	F4(+)	
Ekstrak daun matoa	-	1	1	1	-	Zat aktif
Kuersetin	-	0,01	-	-	1	Pembanding
Carbopol 940	1,5	1,5	1	2	1,5	<i>Gelling agent</i>
Na-CMC	1,5	1,5	2	1	1,5	<i>Gelling agent</i>
Propilenglikol	10	10	10	10	10	Humektan
Gliserin	15	15	15	15	15	Emollient
TEA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Alkalizing
Nipagin	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	Pengawet
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Zat tambahan

10. Pembuatan sediaan gel

Gel dibuat dengan cara menyiapkan basis gel terlebih dahulu. Masukkan \pm 20 mL aquades ke dalam beaker glass, kemudian taburkan *gelling agent* carbopol dispersikan dan dan diaduk hingga tidak terdapat gumpalan serbuk carbopol, kemudian ditambah TEA (bilas wadah TEA dengan aquades, masukkan air bilasan ke campuran basis carbopol), aduk kembali hingga terbentuk basis gel yang jernih dan kental. Masukkan \pm 20 mL aquadest taburkan *gelling agent* Na-CMC didispersikan dan aduk perlahan hingga tidak terdapat gumpalan serbuk Na-CMC dan terbentuk basis gel. Basis carbopol dan Na-CMC dicampur kemudian ditambahkan dengan gliserin dan diaduk *ad* homogen. Nipagin dilarutkan dalam propilen glikol aduk *ad* larut, selanjutnya diencerkan ekstrak dengan campuran nipagin dan propilen glikol aduk kembali *ad* homogen. Basis dan ekstrak dihomogenkan menjadi kemudian diaduk, selanjutnya tambahkan dengan sisa aquades hingga 100 gram aduk *ad* homogen, lalu simpan di 3 wadah berbeda untuk dilakukan uji mutu fisik, uji aktivitas antioksidan, dan uji stabilitas (Sidoretno *et al.*, 2021).

11. Evaluasi mutu fisik sediaan gel

11.1 Uji organoleptik. Uji organoleptis dijalankan guna melihat sediaan secara fisik dengan cara melaksanakan pengamatan terhadap bentuk, konsistensi, warna, dan aroma (Effendi *et al.*, 2019).

11.2. Uji homogenitas. Uji homogenitas dijalankan guna melihat apakah sediaan yang sudah disiapkan memiliki homogenitas yang baik. Gel dioleskan pada kaca objek serta diamati untuk mendeteksi adanya partikel kasar. Sebuah sediaan dikatakan homogen bila tidak terdapat partikel kasar atau gumpalan bahan yang terlihat (Effendi *et al.*, 2019).

11.3. Uji pH. Uji pH dijalankan mempergunakan alat pH meter digital pada suhu ruang. Pengujian dijalankan dengan cara pH meter yang sudah dikalibrasi dengan cairan kalibrator dan di pastikan elektroda dalam keadaan bersih. Sampel gel dimasukkan kedalam beaker glas kemudian celupkan elektroda pH meter ke dalam cairan sampel, berikutnya ditunggu sampai alat menampilkan pH stabil. Pengamatan dilakukan sebelum dan sesudah pengujian stabilitas (Bainunniza, 2022).

11.4. Uji viskositas. Uji viskositas gel dijalankan mempergunakan alat Viskometer Brokfield. Viskometer dipasang pada klemnya secara horizontal atau tegak lurus terhadap arah klem. Spindel dipilih sesuai nomor yang cocok kemudian dipasang ke viskotester dengan mengunci berlawanan arah dengan jarum jam. Sampel gel yang akan diuji dimasukkan kedalam mangkuk, kemudian diletakkan spindel di tengah mangkuk yang berisi gel, kemudian nyalakan alatnya. Hasil viskositas gel dapat diketahui dengan hasil pembacaan skala yang ditunjukkan alat tersebut (Bainunniza, 2022).

11.5. Uji daya sebar. Uji daya sebar dijalankan guna menjamin pemerataan gel saat diaplikasikan di kulit sesudah gel telah dibuat. Timbang 0,5 gram gel dan letakkan di tengah alat extensometer berbentuk kaca bulat. Timbang juga kaca yang lain yang berfungsi sebagai penutup, catat bobotnya. Tempatkan kaca penutup di atas sediaan semi padat dan biarkan selama 1 menit. Ukur diameter sediaan semi padat yang melebar dengan mengambil rata-rata panjang diameter dari beberapa sisi. Tambahkan beban tambahan seberat 50 gram, biarkan selama 1 menit, serta catat diameter sediaan semi padat yang melebar seperti sebelumnya. Lanjutkan dengan menambahkan beban tambahan sebanyak 50 gram setiap kali (hingga mencapai total beban tambahan 250 gram), dan catat diameter yang melebar setelah 1 menit

12. Uji stabilitas sediaan gel

Pengujian ini bertujuan guna mengevaluasi stabilitas sediaan gel melalui variasi suhu penyimpanan. Metode pengujian yang digunakan adalah metode cycling test. Gel disimpan di suhu 4°C selama 24 jam, kemudian pada suhu ruang selama 24 jam. Pengamatan dilaksanakan setelah 6 siklus pengujian serta melibatkan penilaian terhadap perubahan fisik gel, termasuk aspek organoleptik, homogenitas, pH, viskositas, dan daya sebar (Wulandhari, 2022).

13. Pengujian aktivitas ekstrak antioksidan dengan DPPH

13.1. Penyiapan larutan stok DPPH (0,4 mM). Serbuk DPPH dengan berat 15,8 mg ditimbang dan berikutnya dimasukkan ke dalam labu tentukur berkapasitas 100 ml. Serbuk dilarutkan dalam etanol *p.a.* hingga mencapai tanda batas pada labu tentukur dan diperoleh larutan DPPH 0,4 mM (Wulandhari, 2022).

13.2. Pembuatan larutan stok kuersetin. Kuersetin ditimbang dengan seksama sejumlah 10 mg serta dilarutkan dengan etanol *p.a* sampai tanda batas labu tentukur 100 mL sehingga didapat konsentrasi 100 ppm. Larutan dibuat 5 seri pengenceran konsentrasi berturut-turut 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm dalam labu tentukur 10 mL berikutnya ditambah dengan etanol *p.a ad* tanda batas lalu homogenkan (Bainunniza, 2022).

13.3. Pembuatan larutan stok ekstrak etanol daun matoa. Ekstrak daun matoa ditimbang 100 mg dilarutkan dengan etanol *p.a* kemudian dimasukkan ke labu tentukur 100 mL *ad* tanda batas sehingga didapat konsentrasi yang diperoleh 1000 ppm, kemudian dilakukan pengenceran dari 1000 ppm ke 100 ppm dengan dipipet 10 ml dimasukkan labu tentukur 10 ml tambahkan etanol *p.a ad* tanda batas. Larutan stok dibuat 5 seri pengenceran konsentrasi berturut-turut 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm dalam labu tentukur 10 mL kemudian ditambah dengan etanol *p.a* sampai tanda batas lalu homogenkan dengan memipet 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL dan 5 mL (Bainunniza, 2022).

13.4. Pembuatan larutan stok sediaan gel daun matoa. Sediaan gel ekstrak daun matoa ditimbang 10 gram menggunakan kaca arloji kemudian bilas, dimasukkan dalam labu tentukur 100 ml kemudian dilarutkan dengan etanol *p.a* sampai tanda batas sehingga didapat konsentrasi 100.000 ppm, kemudian dilakukan pengenceran ke 1000 ppm kemudian diencerkan lagi ke 100 ppm. Larutan stok dibuat 5 seri pengenceran dengan konsentrasi berturut-turut dibuat 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm kedalam labu ukur 10 ml berikutnya ditambah dengan etanol *p.a* sampai tanda batas lalu homogenkan (Bainunniza, 2022).

13.5. Pembuatan larutan stok kontrol (+). Sediaan gel sebanyak 1gram dilarutkan menggunakan sedikit etanol *p.a* dimasukkan kedalam labu tentukur 100 mL berikutnya tambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas pada labu tentukur sehingga diperoleh

konsentrasi 100 ppm. Larutan stok dibuat 5 seri pengenceran dengan konsentrasi berturut-turut 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm serta 50 ppm kedalam labu tentukur 10 mL berikutnya ditambah dengan etanol *p.a* sampai tanda batas lalu homogenkan dengan memipet 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4, ml 5 ml. (Bainunniza, 2022).

13.6. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH.

Diambil sejumlah 1 mL larutan DPPH, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas. Kemudian gojok *ad* homogen dan diamati absorbansi pada panjang gelombang 500-600 nm (Bainunniza, 2022).

13.7. Penetapan *operating time*. Larutan DPPH sejumlah 1 mL diambil kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, ditambahkan etanol *p.a* ad tanda batas, digojok sampai homogen selama 1 menit serta diukur absorbansinya pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 pada panjang gelombang maksimal yang sudah didapat sampai didapatkan absorbansi yang stabil dan tidak terlihat adanya penurunan absorbansi (Bainunniza, 2022).

13.8. Uji aktivitas antioksidan. Diambil masing-masing sebanyak 1 mL larutan stok ekstrak etanol daun matoa, larutan stok gel daun matoa, larutan stok kontrol positif gel kuersetin, serta baku kuersetin yang sudah dibuat 5 seri pengenceran, dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL berikutnya ditambahkan etanol *p.a* tanda batas. Selanjutnya pindahkan ke dalam vial dan digojog. Campuran di inkubasi selama *operating time* yang sudah didapat serta dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH. Absorbansi yang sudah didapat kemudian dipergunakan guna mengukur aktivitas penangkapan radikal bebas dari berbagai seri konsentrasi lainnya (Bainunniza, 2022).

E. Analisis Data

Antioksidan memiliki kemampuan untuk menetralkan aktivitas senyawa dari radikal bebas. Aktivitas penangkap radikal bebas dari ekstrak etanol daun matoa serta pembanding yang digunakan yaitu kuersetin yang dimodifikasi dalam bentuk sediaan gel (Martiningsih *et al.*, 2016). Dilakukan penentuan absorbansi dari formula 0, I, II, III serta kontrol positif dan kontrol negatif mempergunakan metode DPPH yang ditentukan mempergunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis serta digunakan sebagai pengukuran aktivitas antioksidan radikal bebas

dan dinyatakan dengan nilai IC₅₀. Persentase pengurangan radikal bebas DPPH pada sampel bisa dihitung dengan mempergunakan persamaan:

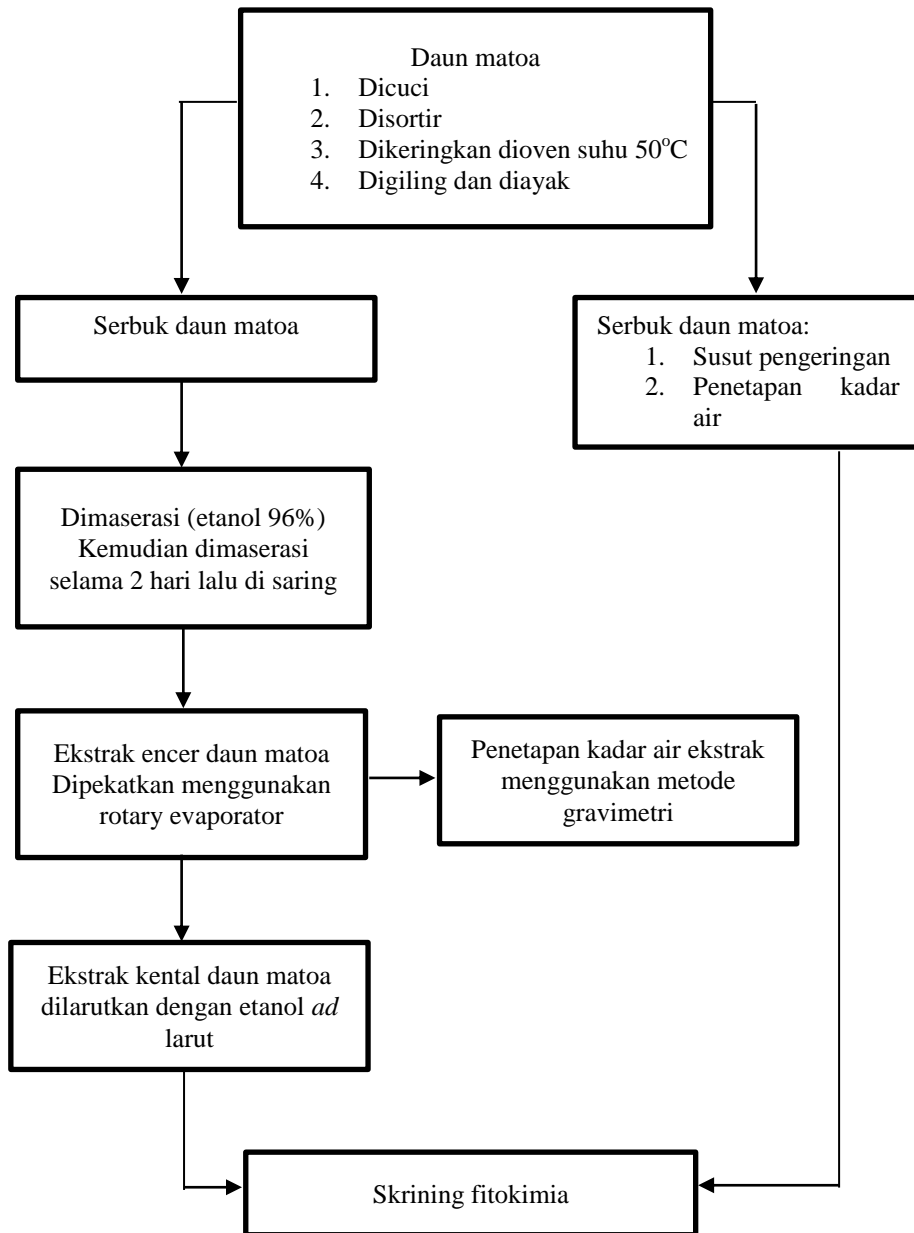
$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dapat dihitung dengan mempergunakan persamaan regresi linier, dimana konsentrasi sampel dipergunakan menjadi variabel bebas (sumbu X) dan persentase inhibisi sebagai variabel terikat (sumbu Y).

Data yang diperoleh dari hasil pengujian organoleptis, homogenitas, daya sebar, viskositas, pH, serta stabilitas gel dianalisis secara statistik mempergunakan SPSS ver. 21. Uji normalitas mempergunakan Kolmogorov-Smimov guna mengetahui terdistribusi normal atau tidak, jika terdistribusi normal kemudian dilakukan analisis dengan menggunakan uji ANOVA.

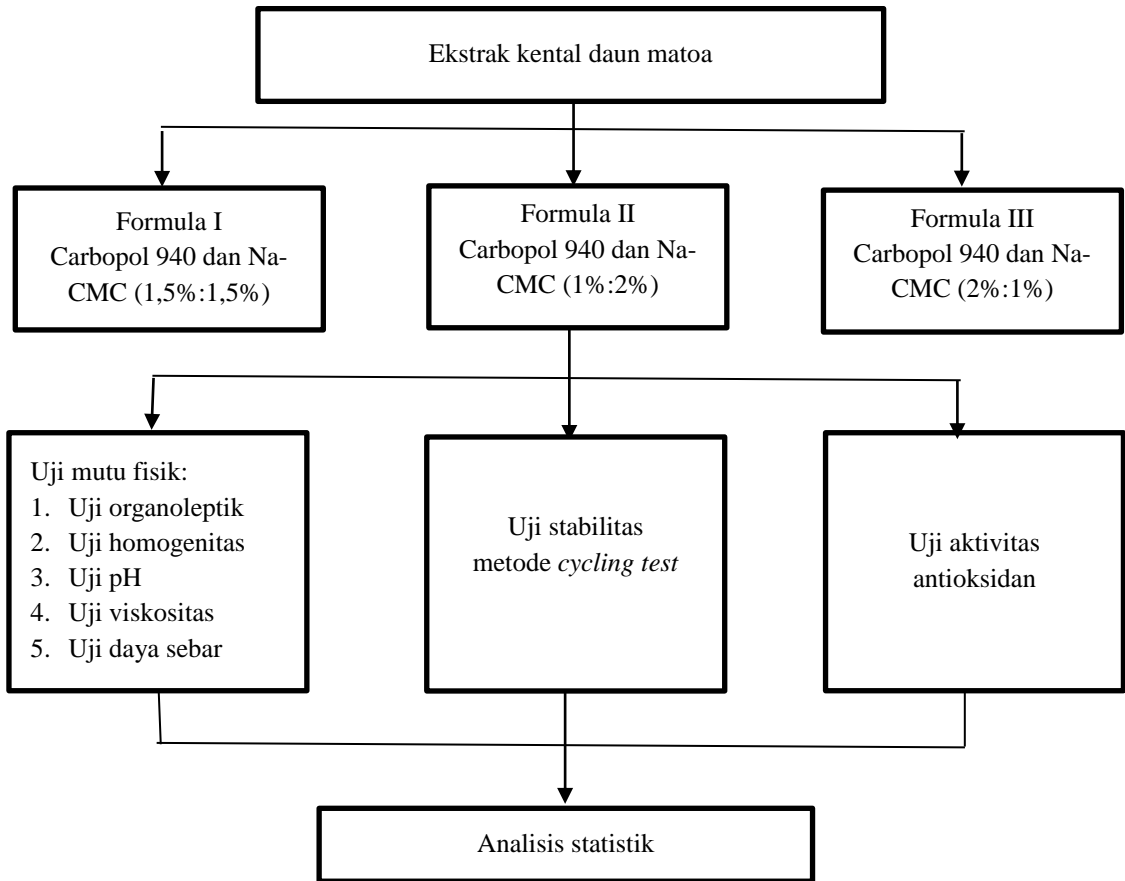
F. Skema Jalannya Penelitian

1. Skema pembuatan ekstrak daun matao



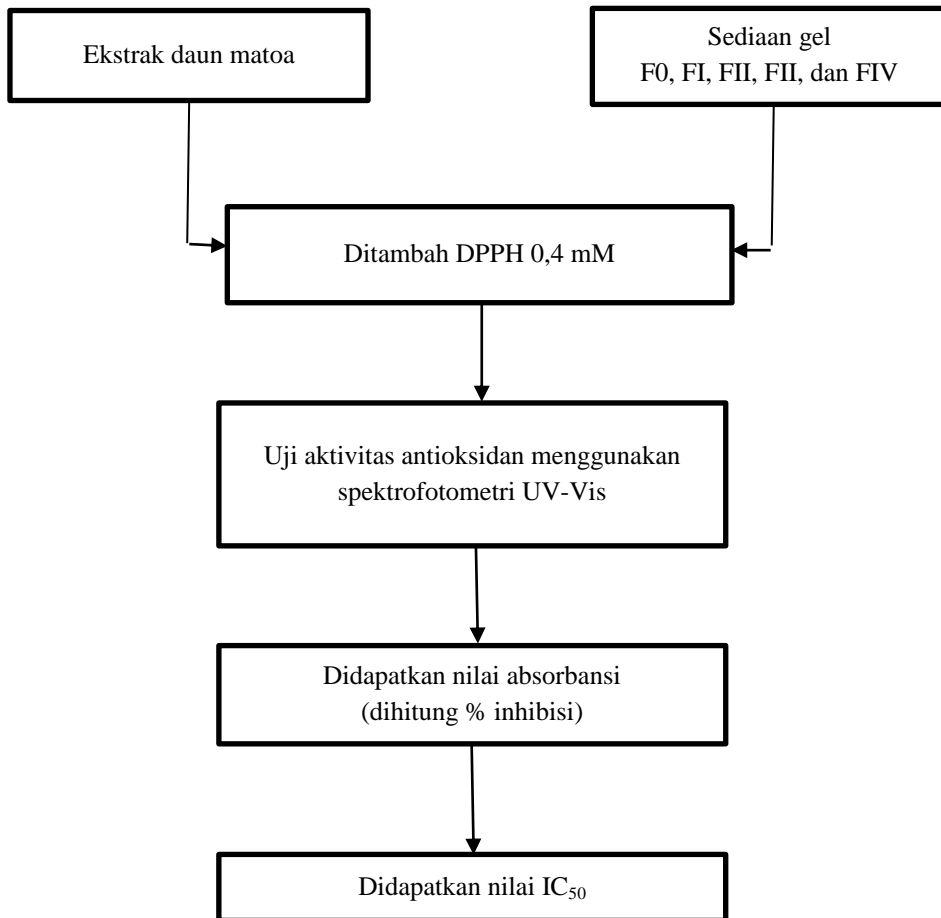
Gambar 13. Skema Pembuatan Ekstrak Daun Matao

2. Pembuatan sediaan gel daun matao



Gambar 14. Pembuatan Sediaan Gel Daun Matao

3. Skema uji antioksidan



Gambar 15. Skema Uji Aktivitas Antioksidan