

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi dalam penelitian ini adalah gel buah apel (*Pyrus malus* L.) dengan *gelling agent* carbopol 940 dan gliserin yang berbeda-beda konsentrasinya.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah gel ekstrak buah apel (*Pyrus malus* L.) dengan basis carbopol 940 dan gliserin yang telah dioptimasi.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah gel ekstrak buah apel (*Pyrus malus* L.) yang dibuat formulasi dengan konsentrasi yang berbeda antara carbopol 940 dan gliserin, melalui pengujian stabilitas fisik gel dengan berbagai parameter pengujian.

##### **2. Definisi operasional variabel utama**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pembentuk gel optimasi carbopol 940 dan gliserin dengan konsentrasi yang berbeda- beda dengan metode *simplex lattice design*.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah cara pembentukan gel, kondisi penelitian, kondisi laboratorium penelitian.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah stabilitas fisik gel

(homogenitas, viskositas, daya sebar dan daya lekat), jumlah basis yang paling optimum, faktor mana yang berpengaruh dalam pembuatan gel dan apakah gel yang dihasilkan masih memiliki aktivitas antioksidan.

### **C. Bahan dan Alat**

#### **1. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah apel yang diperoleh di jl. Diponegoro No. 10. Desa Tulungrejo, kecamatan Bumiaji, kota Batu, Jawa Timur, etanol 70%, carbopol 941, gliserin, DPPH, trietanolamin, metil paraben, karboksimetil selulosa, aquades, metanol p.a.

#### **2. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca gram kasar, neraca gram halus, disc mill, gelas ukur, beaker glass, Erlenmeyer, tabung reaksi, corong kaca, ayakan no 40, oven, botol maserasi, wadah gel, viscometer Rion VT-04, mortir dan stamfer, alat uji daya lekat, alat uji daya sebar, water bath, vakum rotary evaporator dan alat uji pH.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Determinasi dan identifikasi tanaman**

Menetapkan kebenaran sampel buah apel dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada buah apel yang dibuktikan di Laboratorium Morfologi dan Sistematika Tumbuhan, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

## **2. Pengambilan bahan**

Pengambilan sampel dilakukan pada waktu siang hari, saat sinar matahari maksimal dan fotosintesis maksimal sehingga kandungan kimianya juga maksimal. Dicuci dengan air lalu bahan dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C sampai cukup kering.

## **3. Pembuatan serbuk**

Sebanyak 5,1 kg buah apel (*Pyrus malus* L.) yang telah kering setelah dioven diserbuk dengan mesin penyerbuk, kemudian diayak dengan ayakan no 40. Serbuk yang tidak terayak dihaluskan lagi sampai semua serbuk terayak. Setelah itu serbuk ditimbang lagi untuk menentukan perhitungan bobot persen kering terhadap bobot basah.

## **4. Penetapan kadar air**

Penetapan kadar air serbuk buah apel dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta. Metode penetapan kadar air serbuk buah apel dilakukan menggunakan alat *moisture balance* dengan penimbangan sebanyak  $\pm$  2 gram serbuk buah apel selama 4 menit, susut pengeringan dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terkandung di dalam serbuk buah apel.

## **5. Pembuatan ekstrak etanol buah apel**

Menimbang 100 gram serbuk kering lalu dimasukkan ke dalam botol 1000 ml dan ditambah 750 ml pelarut etanol 70%. Campuran serbuk kering dan etanol 70% ditutup dan disimpan selama 5 hari dengan sesekali dikocok 3 kali sehari

berulang-ulang (Voigt 1995), kemudian disaring dengan kain flanel lalu pelarut diuapkan dalam *vakum rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental.

### 6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol buah apel

Identifikasi senyawa dengan KLT pada penelitian kali ini dilakukan pada ekstrak buah apel. Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak buah apel. Senyawa yang diidentifikasi yaitu vitamin C, flavonoid, dan tanin.

**Tabel 2. Identifikasi dengan KLT**

| Senyawa   | Fase diam            | Fase gerak   | Pereaksi semprot     | Hasil pustaka       | Daftar pustaka |
|-----------|----------------------|--|----------------------|---------------------|----------------|
| Vitamin C | Silika gel<br>GF 254 | n- butanol<br>: asam<br>asetat : air<br>(4 : 1 :5) | Dragendorf           | Orange              | Depkes 1992    |
| Flavonoid | Silika gel<br>GF 254 | n- butanol<br>: asam<br>asetat : air<br>(4 : 1 :5) | Larutan sitro borat  | Kuning              | Hartanti 2008  |
| Tanin     | Silika gel<br>GF 254 | n- heksan:<br>etil asetat<br>(3 : 7)               | FeCl <sub>3</sub> 1% | Kuning<br>kehitaman | Depkes 1987    |

### 7. Rancangan formulasi gel ekstrak buah apel

Formula standar (Saifullah 2008)

R/ carbopol 941 0,5 (%b/b)

Gliserin 10 (%b/b)

Trietanolamin 0,5 (%b/b)

Pengawet q.s. (%b/b)

Aquadest ad 100 (%b/b)

**Tabel 3. Rancangan formula sediian gel buah apel secara *Simplex Lattice Design***

| Bahan               | Formula I<br>(g) | Formula II<br>(g) | Formula III<br>(g) |
|---------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| Ekstrak buah apel   | 10               | 10                | 10                 |
| <b>Carbopol 940</b> | 5                | 2,5               | 0                  |
| <b>Gliserin</b>     | 0                | 2,5               | 5                  |
| trietanolamin       | 0,5              | 0,5               | 0,5                |
| Metil paraben       | 0,2              | 0,2               | 0,2                |
| CMC                 | 2                | 2                 | 2                  |
| aquadest            | 82,3             | 82,3              | 82,3               |
| Berat gel           | 100              | 100               | 100                |

## 8. Pembuatan sediaan gel

Karboksimetilselulosa dikembangkan ke dalam aquadest panas 20 kalinya pada *beaker glass*. Nipagin dilarutkan dengan aquadest dalam mortir dan ditambahkan gliserin, diaduk sampai homogen. Carbopol 940 ditambahkan pada campuran tersebut sambil terus diaduk dengan cepat. Hasil pengembangan CMC dan trietanolamin ditambahkan ke dalam campuran, kemudian diaduk dengan pengadukan ringan sampai diperoleh massa gel yang transparan. Ditambahkan ekstrak buah apel dan sisa aquadest ke dalam campuran, lalu diaduk sampai didapatkan sediaan gel yang homogen.

## 9. Penentuan formula optimum

Formula optimum dipilih berdasarkan nilai total respon yang paling besar.

Total respon dapat dihitung dengan rumus :

$$R_{\text{total}} = R^1 + R^2 + R^3 + \dots + R^n$$

$R^{1,2,3,\dots,n}$  adalah respon dengan parameter yang kita tentukan sesuai dengan desain yang kita inginkan. Bobot  $R^1 R^2 R^3$  dan seterusnya ditentukan oleh peneliti dengan jumlah bobot total yang sama dengan 1. Pada penelitian ini digunakan 3

respon dari sifat fisik gel yang dianggap penting yaitu daya lekat gel (detik), daya sebar gel (cm), dan viskositas (dPas).

## **10. Pembuatan gel dari formulasi optimum**

Karboksimetilselulosa dikembangkan ke dalam aquadest panas 20 kalinya pada *beaker glass*. Nipagin dilarutkan dengan aquadest dalam mortir dan ditambahkan gliserin, diaduk sampai homogen. Carbopol 940 ditambahkan pada campuran tersebut sambil terus diaduk dengan cepat. Hasil pengembangan CMC dan trietanolamin ditambahkan ke dalam campuran, kemudian diaduk dengan pengadukan ringan sampai diperoleh massa gel yang transparan. Ditambahkan ekstrak buah apel dan sisa aquadest ke dalam campuran, lalu diaduk sampai didapatkan sediaan gel yang homogen.

## **11. Pengujian stabilitas fisik gel optimum ekstrak buah apel**

**11.1. Uji organoleptis.** Uji organoleptis gel meliputi uji warna, bau dan konsistensi gel untuk mengetahui secara fisik keadaan gel. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mendeskripsikan warna, bau dan konsistensi dari sediaan gel yang sudah bercampur dengan basis, sediaan yang dihasilkan sebaiknya memiliki warna yang menarik, bau yang menyenangkan dan kekentalan yang cukup agar nyaman dalam penggunaan. Pengujian dilakukan setelah sediaan gel dibuat dalam satu hari (Voigt 1994).

**11.2. Uji homogenitas gel.** Ekstrak buah apel yang telah dibuat sediaan gel diuji homogenitasnya dengan dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan yang cocok, maka harus menunjukkan suasana yang homogen. Pengujian dilakukan setelah sediaan gel dibuat dalam satu hari.

**11.3. Uji viskositas.** Uji viskositas gel dilakukan dengan menggunakan alat viscometer *Cup and Bob*. Viscometer VT-04 E RION., LTD dipasang klemnya dengan arah horizontal atau tegak lurus dengan arah klem. Rotor dipasang pada viskotester dengan menguncinya berlawanan dengan arah jarum jam. Mangkuk diisi dengan sampel gel yang akan diuji setelah itu masukkan rotor tepat berada di tengah-tengah mangkuk yang berisi gel, kemudian alat dihidupkan. Rotor mulai berputar dan dan jarum penunjuk viskositas secara otomatis akan bergerak menuju ke kanan kemudian setelah stabil, viskositas dibaca pada skala dari rotor yang digunakan. Satuan yang digunakan menurut JLS 28809 standar viskositas yang telah dikalibrasi adalah *desipascal-second* (d Pas). Pengujian ini direplikasi sebanyak tiga kali. Pengujian pertama dilakukan setelah sediaan gel dibuat dalam satu hari. Sediaan gel kemudian disimpan dan diuji lagi viskositasnya setelah satu bulan.

**11.4. Uji daya sebar gel.** Uji ini dilakukan dengan menggunakan alat-alat seperti sepasang cawan petri, anak timbang gram dan *stop watch* kemudian dilakukan dengan cara menimbang 0,5 g gel, diletakkan dengan kaca yang lainnya, diletakkan kaca tersebut di atas massa gel dan dibiarkan 1 menit. Diameter gel yang menyebar (dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi) diukur, kemudian ditambahkan 50 g, 100 g, 150 g, 200 g, sebagai bahan tambahan, setiap penambahan beban didiamkan selama 1 menit sesudah itu dicatat diameter gel yang menyebar seperti sebelumnya. Pengujian dilakukan setelah sediaan gel dibuat dalam satu hari.

**11.5. Uji daya lekat gel.** Uji ini dilakukan dengan menggunakan alat- alat

seperti alat tes melekat gel. Dua gelas obyek, *stopwatch*, anak timbangan gram dan dilakukan dengan cara melekatkan gel secukupnya di atas gelas obyek yang lain di atas tersebut kemudian ditekan dengan beban 500 g selama 5 menit kemudian pasang obyek gelas pada alat tes kemudian dilepaskan beban berat 20 g dan dicatat waktu sampai kedua obyek tersebut terlepas diulangi cara di atas pada masing-masing formula sebanyak 3 kali. Pengujian dilakukan setelah sediaan gel dibuat dalam satu hari.

**11.6. Uji pH gel.** Uji ini dilakukan dengan menggunakan alat pH meter dengan cara mencelupkan batang detektor ke dalam larutan gel yang terbuat dari 1 gram gel ditambah 9 ml aquades. Pengujian dilakukan setelah gel dibuat dalam satu hari.

## **12. Uji aktivitas penangkap radikal**

**12.1. Pembuatan larutan DPPH.** Menimbang seksama 15,8 mg DPPH, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda pada labu takar 100,0 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM, lalu labu takar dilapisi aluminum foil.

**12.2. Penentuan panjang gelombang maksimal.** Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1,0 ml ditempatkan di dalam vial 5,0 ml, kemudian ditambah metanol p.a sampai tanda, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-550 nm.

**12.3. Penentuan *operating time*.** Larutan stock DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 1,0 ml dan ditempatkan pada vial 5,0 ml, ditambahkan larutan ekstrak sampai tanda batas, kemudian divorteks selama 30 detik. Penentuan *operating time* dilakukan pada  $\lambda$  maksimum dengan interval waktu 5 menit sampai didapat absorbansi yang stabil dan tidak terlihat adanya penurunan absorbsi. Waktu yang

diperoleh digunakan juga untuk vitamin C.

**12.4. Uji aktivitas penangkap radikal.** Ekstrak dan gel diuji aktivitas penangkapan radikal terhadap radikal bebas DPPH yang telah diukur absorbansinya pada  $\lambda$  maks setelah waktu yang didapat dari *operating time*. Preparasi larutan yang akan diukur sebagai berikut: 50,0 ml sediaan gel buah apel, kemudian dilarutkan dengan etanol sampai tanda batas pada labu takar 50,0 ml dan 2,0 mg vitamin C dilarutkan dengan aquades sampai tanda batas pada labu takar 2,0 ml ditambahkan 1,0 larutan DPPH 0,4 mM, diinkubasi selama 30 menit kemudian dibaca absorbansinya pada  $\lambda$  maksimal. Pengujian dilakukan pada hari pertama.

## **E. Metode Analisa**

Analisa hasil pengujian berbagai parameter tersebut dilakukan dengan dua cara yaitu:

### **1. Pendekatan teoritis**

Data yang diperoleh dibandingkan dengan persyaratan dalam Farmakope Indonesia dan kepustakaan lainnya.

### **2. Pendekatan statistik**

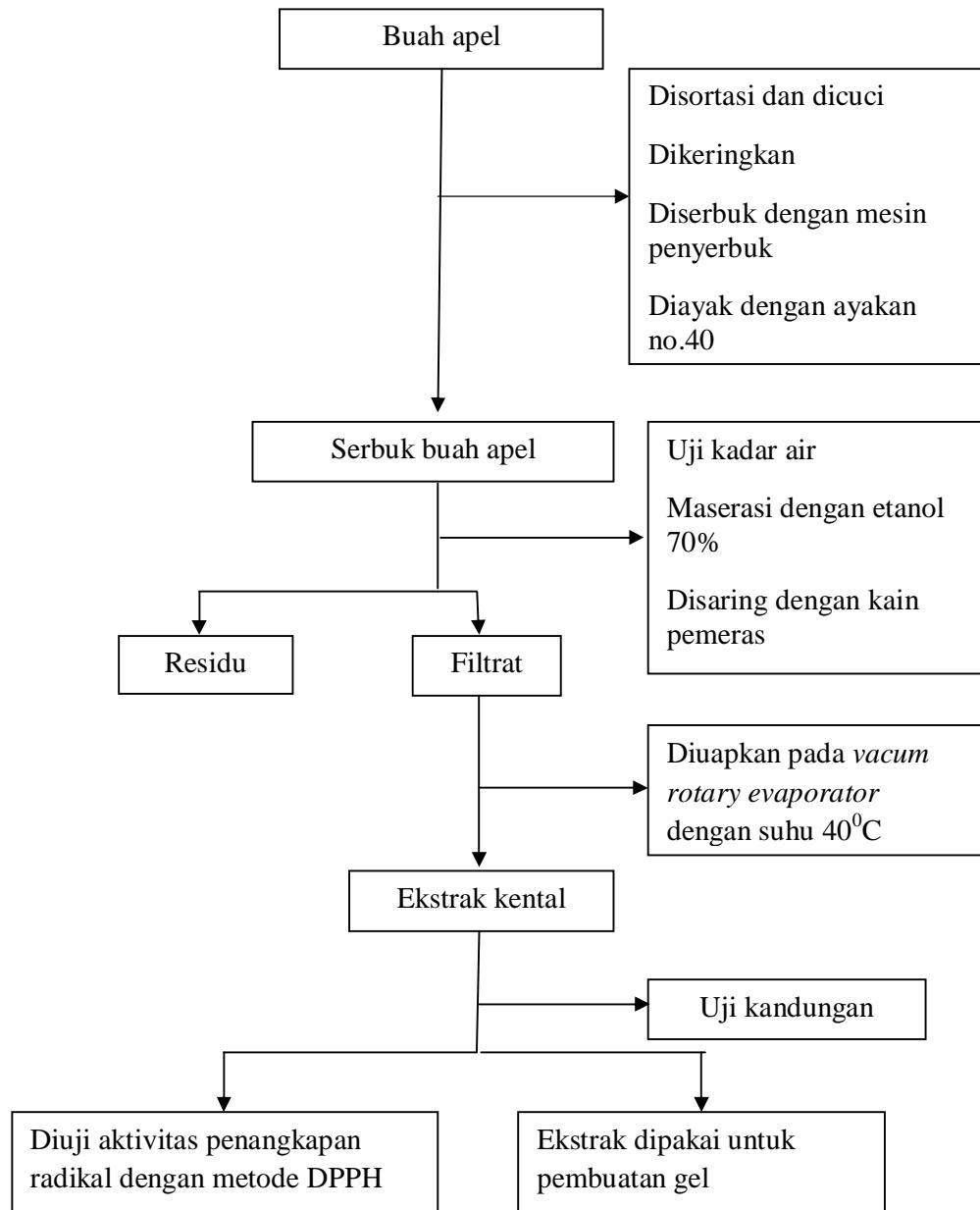
Hasil yang diperoleh dari percobaan dianalisis dengan pendekatan *Simplex Lattice Design*. Data yang diperoleh dari perhitungan *Simplex Lattice Design* (prediksi) dibandingkan dengan data hasil pengujian sesungguhnya dengan uji-t (T-test). Jika data yang didapat terdistribusi normal, analisis data kuantitatif dilakukan secara statistik dengan menggunakan metode independent T test dengan

taraf kepercayaan (*signification level*) 95%. Pengujian dilakukan dengan menggunakan program SPSS versi 18.

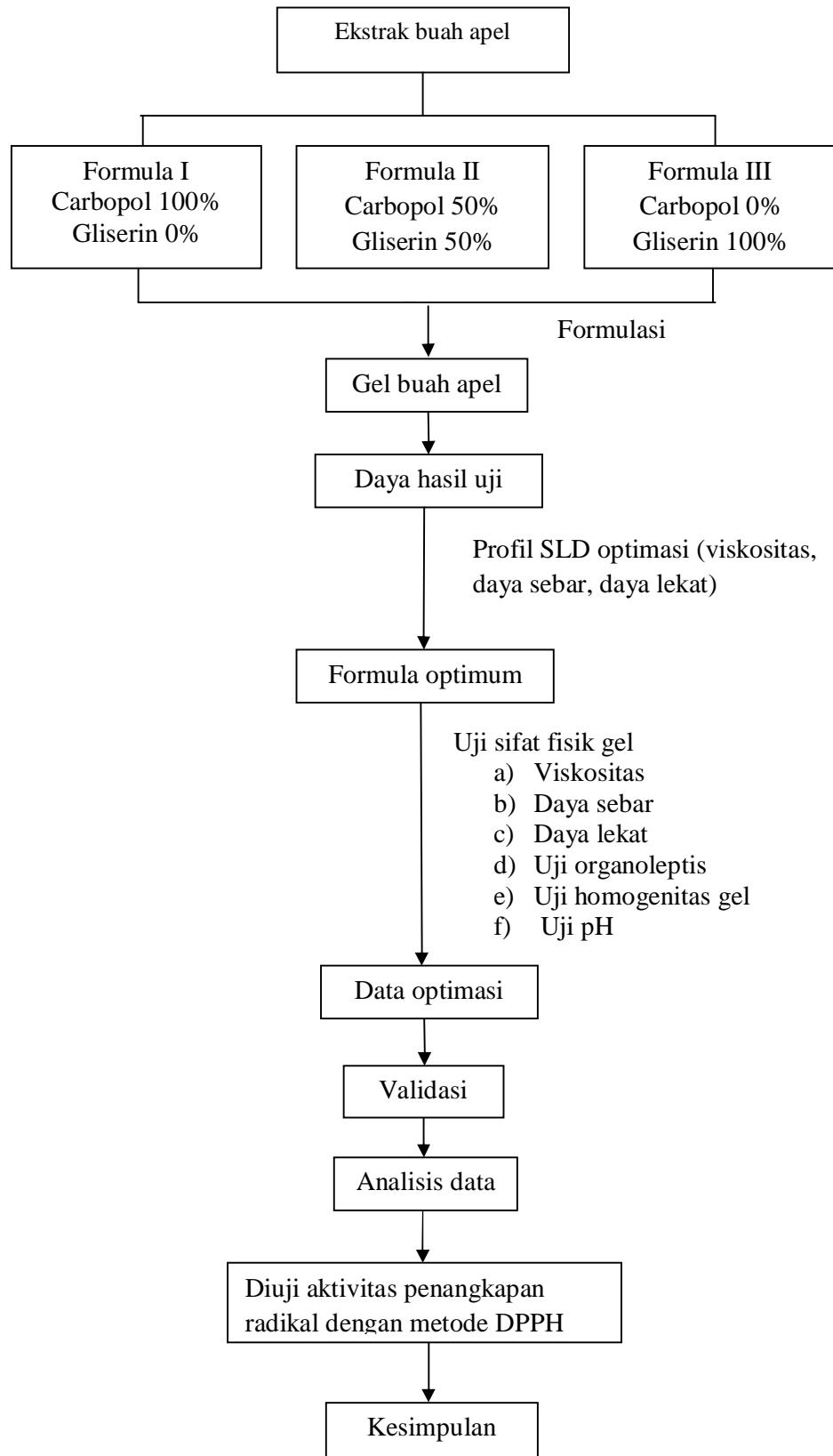
Aktivitas penangkapan radikal DPPH dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Peredaman (\%)} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Data aktivitas antioksidan radikal DPPH (%) dihitung dengan metode probit dari persamaan regresi linear dan ditentukan IC<sub>50</sub>-nya.



Gambar 7. Skema pembuatan ekstrak buah apel



Gambar 8. Skema penentuan formulasi optimum gel buah apel