

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian bersifat eksperimental yang dilakukan yang dilakukan di Laboratorium kimia farmasi program studi farmasi fakultas sains, teknologi, dan kesehatan Universitas Sahid Surakarta untuk meneliti aktivitas antioksidan dari sampel hasil formulasi *vanishing cream* ekstrak etanol daun jeruk purut dengan menggunakan metode DPPH.

3.2 Populasi Sampel Penelitian

a. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk purut yang diambil dari desa Dompnyongan, Kecamatan Jogonalan, Kabupaten Klaten.

b. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% yang ditambahkan kedalam formulasi *vanishing cream* dengan konsentrasi 5%, 7,5%, dan 10%

3.3 Instrumen Penelitian

a. Alat :Timbangan analitik, blender, benjana maserasi, oven (*mernert*), rotary evaporator (*bio base*), batang pengaduk,

alat-alat gelas (*pyrex*), batang pengaduk, penggaris, alat daya sebar, alat daya lekat, mikropipet, spektrofotometri *uv-vis* (*genesys 10*), kertas saring, cawan porselen, water bath, wadah krim, *alluminium foil* dan tisu.

b. Bahan : Daun jeruk purut yang diperoleh dari desa Dompoyongan, etanol 96% (medika), dragendrof (*merk*), serbuk Mg, HCl pekat, FeCl_3 1% (*merk*), $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{O}$ (*merk*) petroleum eter (*merk*), asam stearat, trietanolamin, gliserin, ekstrak daun jeruk purut, *aqudest* (*brataco*), etanol pa, DPPH (*1,1-dyphenyl-2-picryl-hidrazyl*) (*Aldrich*), vitamin C.

3.4 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini ekstrak etanol daun jeruk purut yang mengandung minyak atsiri

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah skrinning fitokimia ekstrak etanol daun jeruk purut.

c. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah formulasi vanishing cream ekstrak etanol daun jeruk purut dengan konsentrasi 5%, 7,5%, 10% dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

3.5 Definisi Operasional

a. Konsentrasi ekstrak etanol 96% yang ditambahkan dengan konsentrasi sebanyak 5%, 7,5%, dan 10% pada formulasi *vanishing cream*.

b. Stabilitas fisik krim

Stabilitas fisik krim merupakan tolak ukur kelarutan bahan dasar dan bahan aktif dalam formulasi krim. Tolak ukur yang diuji dalam krim ini adalah:

- 1) Organoleptis yaitu berupa bau yang tidak berubah pada saat pembuatan maupun penyimpanannya.
- 2) Homogenitas yaitu tekstur krim yang homogen dan tidak terdapat butiran kasar pada krim.
- 3) Daya Sebar yaitu krim mudah merata saat dioleskan
- 4) Daya Tercuci yaitu krim mudah terbilas dengan air tanpa meninggalkan rasa lengket dikulit
- 5) Stabilitas yaitukrim tetap stabil pada saat penyimpanan dalam suhu ruang dan mengalami kerusakan bentuk formulasi dengan timbulnya perpisahan fase pada krim.

c. Aktivitas Antioksidan didapatkan dengan melakukan uji kualitatif dan uji kuantitatif.

a. Uji kualitatif dilakukan dengan mengamati terjadinya perubahan warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning.

- b. Uji kuantitatif dilakukan ketika sediaan krim yang positif berubah warna menjadi ungu diteruskan dengan melakukan uji menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui hambatan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal bebas DPPH sebanyak 50% konsentrasi awal sehingga semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidan semakin besar (Mendhekar *et al.*, 2017).

3.6 Rencana Jalannya Penelitian

3.6.1 Pengumpulan sampel

Daun tanaman jeruk purut yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari daerah Dompuyongan, Jogonalan, Klaten.

3.6.2 Determinasi sampel

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi yang berada di Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Kec. Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah 57127.

3.6.3 Skrinning fitokimia dalam uji tabung

a. Identifikasi golongan flavonoid

Menimbang 2 gram serbuk kemudian masukkan kedalam beaker glass dan tambahkan 20 ml air kemudian panaskan kurang lebih 20 menit. Tambahkan 2 ml sampel kedalam tabung reaksi, 3 tetes HCL pekat pada tabung reaksi. Setelah itu tambahkan sedikit serbuk Magnesium pada tabung reaksi dan amati perubahan

reaksi. Warna merah tua menandakan adanya senyawa flavonoid (Minarno, 2015).

b. Identifikasi Tanin

Menimbang 5 mg serbuk kemudian masukkan kedalam beaker glass dan tambahkan 40 ml air kemudian panaskan selama 5 menit. Masukkan 2 ml sampel pada tabung reaksi kemudian tambahkan FeCl_3 1% pada tabung reaksi yang berisi sampel kemudian amati perubahan warna. Warna hijau, biru tua kehijauan, dan hijau kehitaman menandakan adanya tanin (Minarno, 2015).

c. Identifikasi golongan steroid dan triterpenoid

Menimbang 1 gram serbuk yang telah dimaseri dengan 20 ml eter selama 2 jam dengan wadah tertutup, kemudian disaring dan diambil filtratnya. Mengambil 5 ml dari filtrat kemudian diupkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu. Kemudian menambahkan 2 tetes larutan asam asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah, hijau, ungu, dan akhirnya biru menunjukkan adanya senyawa steroid dan triterpenoid (Djamil, 2014).

d. Identifikasi golongan minyak atsiri

Menimbang 1 gram serbuk kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang ditambahkan 10 ml pelarut petroleum eter dan pasang corong yang telah diberi lapisan kapas dan dibasahi air pada mulut

tabung. Panaskan selama 30 menit diatas penangas air kemudian dinginkan kemudian saring menggunakan kertas saring. Filtrat yang terbentuk kemudian diuapkan pada cawan penguap hingga mengering dan residu yang diperoleh dilarutkan dengan 5 ml pelarut alkohol kemudian saring dengan kertas sarinf. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap hingga residu tercium bau aromatik yang menunjukkan adanya senyawa golongan minyak atsiri (Djamil, 2014).

e. **Identifikasi golongan alkaloid**

Menimbang 1 gram sampel dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 ml HCL dan 9 ml aquadest kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit. Filtrat yang telah diperoleh kemudian diambil masing- masing sebanyak 1 ml dan dimasukkan pada 2 tabung reaksi yang berbeda. Tabung pertama ditambahkan dengan pereaksi meyer dan pada tabung kedua ditambahkan pereaksi dragendrof. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan atau kekeruhan (Djamil, 2014).

3.6.4 Pembuatan ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C)

Sebanyak 800 gram simplisia daun jeruk purut yang telah diserbuk, dimaserasi dengan 4 liter etanol 96%. Didiamkan 3 x 24 jam setelah itu disaring dan maserat hasil ekstraksi dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 60 °C sampai diperoleh ekstrak kental (Qonitah

F, 2019). Kemudian dipekatkan lagi menggunakan *waterbath* untuk kemudian dihitung % rendeman menggunakan rumus:

$$\% \text{Rendeman} = \frac{\text{bobot total ekstrak}}{\text{bobot total simplisa}} \times 100\% \quad (\text{Yuliani, 2016}).$$

3.6.5 Pembuatan sediaan

a. Pembuatan sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C).

Sediaan *vanishing cream* yang dibuat dengan bahan aktif ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D. C).

Tabel 3.1 Komponen Formulasi Ekstrak Daun Jeruk Purut

Komposisi bahan	Konsentrasi (%)			Manfaat
Ekstrak daun jeruk purut	5	7,5	10	Zat aktif
Asam stearate	15	15	15	Zat tambahan
Gliserin	5	5	5	Humektan dan emolien
Trietanolamin	2	2	2	Zat tamhaban
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Pelarut

Sumber : (Maimunah , 2017) dan Kodeks Kosmetika Indonesia (1993)

Asam stearat (fase minyak) dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu 70° C hingga melebur (campuran A) dan Trietanolamin, gliserin, dan aquadest (fase air) dipanaskan diatas *waterbath* dengan suhu 70° C (campuran B). Setelah semua melebur, masukkan campuran A sedikit demi sedikit kedalam campuran B, kemudian aduk hingga diperoleh krim seperti putih susu yang homogen, menambahkan Ekstrak etanol daun jeruk purut yang telah dilarutkan dengan aquadest kedalam basis *vanishing cream*, kemudian aduk hingga homogen.

b. Evaluasi stabilitas fisik *vanishing cream*

1) Uji organoleptis

Mengamati warna, bau, dan penampilan *vanishing cream* pada saat selesai diformulasikan meliputi warna, bau, dan tampilan sediaan (Kuncari *et al.*, 2014).

2) Uji pH

Mengambil *vanishing cream* secukupnya kemudian larutkan dengan aquadest secukupnya kemudian ukur menggunakan pH stik (Tranggono dan Latifa, 2007).

3) Uji homogen

Menimbang *vanishing cream* 1 g kemudian diletakkan pada kaca objek dan dioleskan secara merata dan tipis pada kaca. Sediaan harus homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Depkes RI, 1979).

4) Uji daya sebar

Menimbang 1 gram *vanishing cream* kemudian diletakkan ditengah cawan petri yang berada dalam posisi terbalik. Kemudian metakkan cawan petri lain diatas krim selama 1 menit, kemudian diukur diameternya dan menambakan beban tambahan selama 1 menit diatasnya dan mengukur diameternya (Ugandar & Deivi, 2013).

5) Uji daya lekat

Menimbang 1 gram *vanishing cream* kemudian meletakkannya pada plat kaca. Membalik kaca objek sehingga kedua sisi plat menyatu dan beri beban awal sebesar 250 gram selama 5 menit kemudia lepaskan, lalu beri beban pelepasan sebesar 80 gram dan catat waktu terlepasnya kaca objek tersebut (Ariem et al., 2020).

6) Uji daya tercuci

Mengoleskan formula *vanishing cream* sebanyak 1 g krim ditelapak tangan kemudian dicuci dengan air mengalir sambil membilas menggunakan tangan. Kemudian menghitung waktu krim tercuci. Pengujian daya tercuci berkaitan dengan tipe *cream* dimana tipe O/W lebih mudah tercuci daripada *cream* tipe W/O (Suhery et al, 2016).

7) Uji *freeze-thaw*

Formula *vanishing cream* ekstrak etanol daun jeruk purut disimpan dalam kondisi suhu -10°C selama 24 jam dan pada kondisi suhu ruangan selama 24 jam. Pengujian *freeze and thaw* dilakukan sebanyak tiga siklus. Pengamatan stabilitas (fase pemisahan) formula diamati secara visual adanya endapan sehingga tampak fase pemisahan yang terjadi (Avachat and Patel, 2015; Yuliani et al., 2016).

3.6.6 Uji aktivitas antioksidan metode DPPH

a. Larutan DPPH 0,4 mM

Menimbang sebanyak 15,7 mg DPPH kemudian masukkan kedalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga tanda batas lalu botol ditempatkan pada botol kaca berwarna gelap (Pogaga et al., 2020).

b. Pembuatan larutan blanko

Sebanyak 1 ml larutan DPPH 0,4 mM dipipet dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml kemudian dilarutkan menggunakan etanol p.a hingga ad tanda. Didiamkan pada suhu 25- 30°C selama kurang lebih 30 menit dan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm (Utami, 2018).

c. Pembuatan larutan pembanding vitamin C

Menimbang sebanyak 10 mg vitamin C yang dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml kemudian dilarutkan ke dalam etanol pa hingga batas tanda (1000 ppm). Larutan dibuat dengan menggunakan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dan ditambahkan 1 ml DPPH 0,4 mM yang diencerkan menggunakan etanol pa pada labu ukur 5 ml. Kemudian mengukur serapannya pada gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV-VIS (Moilati, 2020).

d. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ max)

Penetapan panjang gelombang optimum dilakukan menggunakan gelombang maksimum (λ max) sebagai penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH dilakukan dengan mengambil 1 ml larutan DPPH dari stok DPPH yang dibuat, kemudian ditambahkan 8 ml etanol pada labu ukur 10 ml kemudian dikocok homogen dan diukur serapannya yang diperoleh pada rentang λ 510-520 nm dengan blanko etanol (Yuliani, 2015).

e. Uji aktivitas antioksidan larutan uji (*cream*)

Menimbang sebanyak 10 mg *vanishing cream* kemudian dilarutkan dalam etanol 96% dalam labu ukur 10 ml hingga batas tanda (1000 ppm). Larutan krim yang sudah dibuat dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm yang kemudian masing-masing dipipet kedalam ukur 5 ml hingga tanda batas. Sampel krim kemudian dipipet sesuai perhitungan kemudian ditambahkan kedalam tabung reaksi yang berisi larutan DPPH sebanyak 1 mL kemudian ditutup dengan *aluminium foil* lalu divortex dan didiamkan selama 30 menit kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometri UV-VIS dengan panjang gelombang 517 nm dan menghitung presentase inhibisinya (Pogaga et al., 2020).

f. Perhitungan aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan presentase perendaman serapan DPPH:

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

Setelah didapatkan data yang dibutuhkan, dilakukan perhitungan aktivitas antioksidan radikal bebas DPPH(%) yang dihitung dengan persamaan $y = bx + a$ dengan perbandingan antara presentase perendaman (y) dengan log konsentrasi (x) dan kemudian ditentukan nilai IC50 yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas.

Tabel 3.2 Parameter aktivitas antioksidan

Intensitas	Nilai IC50
Sangat Kuat	<50 $\mu\text{g/ml}$
Kuat	50-100 $\mu\text{g/ml}$
Sedang	100-250 $\mu\text{g/ml}$
Lemah	250-500 $\mu\text{g/ml}$
Tidak Aktif	>500 $\mu\text{g/ml}$

(Sumber : Putri & Hidajati, 2015)

3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh yaitu stabilitas fisik sediaan *vanishing cream* dan aktivitas antioksidan terhadap sediaan *vanishing cream*. Data sifat fisik yang diperoleh yakni organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, dan daya tercuci yang kemudian dianalisis dengan menggunakan program SPSS 21 dengan uji *Shapiro-Wilk*, apabila data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji One Way ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan ketiga formula pada setiap uji aktivitas

antioksidan *vanishing cream* ekstrak etanol daun jeruk purut dengan vitamin C sebagai pembanding, tetapi jika data tidak terdistribusi normal atau tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji statistic non parametrik menggunakan uji *kruskal-wallis* dan *man-withney* (Effendi, 2017).