BAB3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi, Laboratorium Kimia Farmasi, dan Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Prodi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi. Penelitian dilaksanakan selama 8 bulan, dari bulan November sampai Juli 2025.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik (ohaus), batang pengaduk (rofa), toples, waterbath (*Thermostat waterbath HH-60*), sudip, sendok tanduk (onii), aluminium foil (klin pak), pot ekstrak, mortir dan stemper (one med), wadah lotion, cawan porselen, gelas ukur (pyrex), beaker glass (pyrex), batang penjepit, kacaobjek (slides), pipet, dan spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu).

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah serbuk simplisia daun kelor, pati bengkuang, etanol 96%, asam stearat, setil alkohol, gliserin, parafin cair, Triethanolamin, metil paraben,aquadest, pereaksi DPPH, metanol.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratorium untuk mengetahui aktivitas antioksidan *hand and body lotion* ekstrak daun kelor dan amilum bengkuang dengan variabel sebagai berikut :

1. Variabel bebas adalah variabel yang memengaruhi atau yang menjadi sebab perubahan atau timbulnya variabel dependen (terikat). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah

ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan amilum bengkuang (*Pachyrhizus erosus* (L) Urb).

2. Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat, karena adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dan nilai IC_{50}.
3. Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga pengaruh variabel independent terhadap dependent tidak dipengaruhi faktor luar yang diteliti. Pada penelitian ini sebagai variabel kontrol adalah tempat pengambilan sampel, metode ekstraksi, metode pembuatan sediaan dan metode uji aktivitas antioksidan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Proses determinasi dilakukan pada tanaman untuk mengidentifikasi jenis dan memastikan kebenaran simplisia. Determinasi dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Prodi S-1 Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Tahapan Pembuatan Simplisia

Sampel daunkelor (*Moringa oleifera* Lam.) diambil di desa Kertabesuki Rt.01/01 Wanasari Brebes. Sampel yang digunakan adalah daun kelor segar sebanyak 6kg. Ekstrak dari daun yang tua dan muda menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat melawan radikal bebas, mencegah kerusakan oksidatif pada biomolekul utama, dan memberikan perlindungan yang sangat baik terhadap kerusakan oksidatif (Mbikay, 2012). Sampel daun kelor dibersihkan dibawah air yang mengalir, kemudian letakkan daun kelor diatas nampan, keringkan menggunakan panas matahari dengan ditutup kain hitam selama 3 hari. Jika sudah kering dipilah lalu dihaluskan daun kelor yang telah dikeringkan menggunakan blender (Senja *et al*., 2023).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor

Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Bahan baku simplisia serbuk daun kelor yang dibutuhkan adalah 500gram. Perbandingan antara simplisia serbuk daun kelor dan pelarut yang digunakan adalah 1:10 (500gram serbuk daun kelor : pelarut 5.000mL). Dibiarkan selama lima hari dan pengadukan dilakukan setiap hari. Setelah lima hari, sampel serbuk daun kelor yang direndam disaring dengan kertas saring untuk menghasilkan filtrat dan ampas. Kemudian, filtrat yang dihasilkan dari maserasi diuapkan dengan rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 60°C untuk menghasilkan ekstrak kental (Azis & Sellah Harselina, 2023).

Data yang diperoleh berupa rendemen ekstrak kemudian akan dianalisis secara deskriptif. Rendemen dihitung menurut (Aristyanti *et al*., 2017) dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Bahan Baku}} \times 100\%$$

3.4.4 Pengolahan Sampel Umbi Bengkuang

Sampel bengkuang diambil di Desa Gombong Kecamatan Warungpring Kabupaten Pemalang. Sampel yang digunakan adalah sampel bengkuang yang masih segar, tidak terserang hama dan berumur tua (tidak mengandung banyak air). Uji aktivitas antioksidan pernah dilakukan pada umbi bengkuang pada berbagai umur panen. Umbi yang digunakan pada umur panen 3, 4, dan 5 bulan dengan menggunakan pelarut metanol. Pada penelitian yang dilakukan tersebut menunjukkan umbi bengkuang pada umur panen 3 bulan dan 4 bulan memiliki aktivitas antioksidan yang lebih optimum dibanding bengkuang umur panen 5 bulan (Chandra *et al*., 2023).

Bengkuang dicuci dengan menggunakan air mengalir yang bersih, lalu dibersihkan dan ditiriskan. Sebanyak 5000 gram bengkuang segar dipotong dadu, kemudian di blender hingga halus, peras lalu disaring. Hasil perasan dibiarkan bermalam sampai terbentuk endapan dan airnya dibuang. Endapan dikeringkan dalam oven suhu 50º selama 6 jam. Diperoleh serbuk pati bengkuang kemudian digerus menggunakan mortir. Hasilnya disimpan dalam wadah tertutup rapat sebelum digunakan untuk penelitian.

3.4.5 Standardisasi Ekstrak

Standardisasi ekstrak meliputi :

1. Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan dengan pengamatan langsung menggunakan panca indera yaitu bentuk, warna dan bau (Yusriyani, Syarifuddin K.A, 2022).

2. Susut Pengeringan

Timbang ekstrak dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol hingga ada lapisan 5–10mm. Ekstrak ditimbang sebanyak 1-2gram dalam botol timbang tertutup yang sebelumnya di panaskan pada suhu 105°Cselama 30 menit. Setelah ditara, biarkan botol dingin dalam eksikator hingga suhu kamar, kemudian dimasukkan kedalam pengering, buka tutupnya, dan keringkan pada suhu 105°C hingga bobotnya tetap (Depkes RI, 2000). Syarat parameter susut pengeringan adalah <10% (Fadhila *etal*., 2019).

3. Uji Kadar Air

Alat *moisture analyzer* diset pada suhu 105°C dan otomatis memeriksa ketika alat ditutup. Sebanyak 1,5gram ekstrak dimasukan kedalam alat. Pemanasan secara halogen akan menyala dan mulai memanaskan ekstrak hingga bobot konstan, setelah lampu mati berat ekstrak sudah konstan dan dilayarakan

ditampilkan kadar air dalam ekstrak (Depkes RI, 2000). Syarat uji kadar air yang ditetapkan adalah ≤10% (Depkes RI, 2000).

3.4.6 Skrining Fitokimia

Tahapan yang dilakukan pada skrining fitokimia sebagai berikut :

1. Uji Bebas Etanol

Reaksi berwarna jingga atau campuran ekstrak, kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$), dan asam sulfat (H_2SO_4) sampai ekstrak tidak mengandung etanol (Thaal *et al*., 2023).

2. Uji Flavanoid

1 gram ekstrak pekat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5mL etanol 96%. Setelah larut, ditambahkan 3 tetes HCl pekat, dan 15gram serbuk Mg. Warna merah atau merah muda, kuning dan oren ditunjukkan adanya flavonoid (Rosalina *et al*, 2019.).

3. Uji Terpenoid

1 gram ekstrak pekat dimasukkan kedalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan 2mL kloroform. Setelah larut, ditambahkan 3mL H_2SO_4. Adanya terpenoid menunjukkan terbentuknya warna cokelat, merah, ungu, biru dan hijau (Rosalina *et al*, 2019).

4. Uji Fenolik

1 gram ekstrak pekat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 tetes $FeCl_3$ 1%. Warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam pekat menunjukkan adanya fenol (Rosalina *et al*, 2019).

5. Uji Saponin

Metode Forth digunakan untuk menguji Saponin. 2mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL akuades, dan dikocok

selama 30 detik untuk mengamati perubahan. Bentuk busa yang mantap (tidak hilang selama 30 detik) menunjukkan adanya saponin (Marliana *et al*., 2005).

6. Uji Alkaloid

1 gram ekstrak pekat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 3mL kloroform dan diaduk. Setelah larut, 3 tetes pereaksi Mayer ditambahkan. Adanya alkaloid menunjukkan terbentuknya pengendapan putih (Rosalina *et al*, 2019).

7. Uji Tanin

1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan FeCl3. Jika larutan mengandung senyawa tanin akan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua (Halimu et al., 2017).

3.4.7 Formulasi Sediaan *Hand And Body Lotion*

Formula yang digunakan dalam penelitian ini dimodifikasidari formula (Khoirun Nifa *et al*, 2023), pada formula tersebut bahan aktif yang digunakan adalah ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.). Pada penelitian ini, Formulasi modifikasi bahan aktif yang digunakan yaitu ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan Amilum Bengkuang (*Pachyrhizus erosus* (L) Urb). Formulasi *Hand and Body Lotion* ini disajikan dalam **Tabel 3.1**

Tabel 3. 1 Formulasi *Hand and Body Lotion* (Khoirun Nifa *et al*, 2023)

Bahan	Sediaan %				Range (Rowe *et al*., 2009)	Kegunaan
	F0	F1	F2	F3		
Ekstrak Daun Kelor	0	1	3	5	-	Antioksidan
Amilum Bengkuang	0	5	3	1	-	Antioksidan, Agen pemutih
Asam Stearat	10	10	10	10	1-20%	Emulgator
Setil Alkohol	6	6	6	6	2-10%	Emulgator
Parafin Cair	16,5	16,5	16,5	16,5	1-32%	Emolient
Gliserin	30	30	30	30	30%	Humektan

Triethanolamin	3	3	3	3	2-4%	Buffer
Metil Paraben	0,3	0,3	0,3	0,3	0,02-0,3%	Pengawet
Oleum Rosae	2	2	2	2	-	Pengaroma
Aquadest	32,2	26,2	26,2	26,2	-	Pelarut

3.4.8 Pembuatan Sediaan *Hand and Body Lotion*

Siapkan bahan baku (Asam stearat, setil alkohol, paraffin cair, Gliserin,Triethanolamin, metal paraben, aquadest) dan bahan tambahan ekstrak daun kelor dan amilum bengkuang yang diperlukan untuk membuat lotion. Semua bahan yang digunakan ditimbang terlebih dahulu sesuai dengan takaran yang diperlukan. Cawan pertama dengan fase air (TEA, gliserin, dan aquadest) dilarutkan diatas penangas. Cawan kedua dengan fase minyak (Asam stearat, setil alkohol,dan paraffin cair) dan metil paraben ditambahkan dilarutkan di atas penangas. Fase air ditambahkan ke dalam fase minyak dengan pengadukan hinggaterbentuk basis *body lotion*. Ekstrak daun kelor dan amilum bengkuang ditambahkan kedalam basis *body lotion* dengan pengadukan selama kurang lebih 1 menit hingga terbentuk *body lotion* yang homogen.

3.4.9 Pengujian Mutu Fisik Sediaan *Hand and Body Lotion*

1. Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan dengan pengamatan langsung menggunakan panca indera yaitu bentuk, warnadan bau (Senja *et al*., 2023).

2. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menyebarkan sediaan secara merata pada kertas uji pH dan melihat perubahan warnanya. Warna yang dihasilkan sesuai dengan indikator pH pada kemasan pH universal (Pujiastuti & Kristiani, 2019). Rentang pH lotion berkisar antara 4,0-7,5 (Aswal *et al*., 2013).

3. Uji Homogenitas

Tujuan dari uji ini adalah untuk mengetahui apakah ada butiran kasar pada sediaan atau apakah bahan aktif dan eksipien tercampur secara merata. Sampel *hand and body lotion* disimpan antara kedua kaca objek. Jika tidak terdapat partikel kasar atau gumpalan, sediaan dianggap homogen. Jika terlihat persamaan warna yang merata, sediaan dianggap homogen (Mardikasari *etal*., 2017).

4. Uji Daya Sebar

Uji daya sebar dilakukan untuk mengetahui potensi penyebaran pada kulit, yang harus memenuhi syarat antara 5 dan 7 cm. *Hand and body lotion* ditimbang sebanyak 0,5gram dan ditempatkan di tengah kaca objek. Kemudian, di atas sediaan diletakkan kaca objek lain dan ditambahkan beban seberat 50 gram. Diamkan selama 1 menit, lalu dicatat diameter dan luas penyebarannya. Tambahkan beban kelipatan seberat 50 gram hingga mencapai 200 gram (Pujiastuti & Kristiani, 2019).

5. Uji Daya Lekat

Uji ini bertujuan untuk mengetahui sediaan dapat bertahan pada kulit sesuai kondisi selama >1detik atau tidak <4 detik (Mardikasari et al., 2017). 0,5gram sediaan diletakan pada kaca objek, kaca objek lainnya diletakkan di atas sediaan tersebut. Kemudian, sediaan diberi beban 1kg dan diamkan selama 3 menit. Selanjutnya, jumlah waktu yang diperlukan untuk kaca terlepas waktu dicatat (Ulfa *et al*., 2019).

6. Uji Viskositas

Sifat alir dan tingkat kekentalan pada pengukuran diukur melalui uji ini. Viskositas sediaan *hand body lotion* harus 2.000-50.000cPs dengan

kecepatan 60rpm dan spindle nomor 4 (Putri, 2022). Nilai viskositas sediaan pada kecepatan berbeda, seperti 5, 10, 20, dan 50rpm, digunakan untuk menentukan jenis aliran (Mursyid, 2017).

7. Uji Tipe Emulsi

Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi jenis sediaan emulsi . Teteskan satu tetes metilen biru pada 0,5 gram sediaan pada gelas, lalu campurkan hingga rata. Syarat metilen biru dapat bercampur dengan metilen biru (terdispersi sempurna) (Subaidah et al., 2020).

8. Uji Hedonik

Tujuan uji hedonik adalah untuk mengetahui tingkat kesukaan responden terhadap sediaan *hand and body lotion* ekstrak daun kelor dan amilum bengkuang. Kuisioner diberikan kepada 20 responden, dan skala kesukaan terdiri dari tidak suka, agak suka, netral, suka, dan sangat suka (Pratiwi & Wulandari, 2021).

3.4.10 Pengujian Aktivitas Antioksidan

1. Pembuatan Larutan DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dimulai dengan membuat larutan pereaksi DPPH (2,2-*diphenyl*-1-*picrylhydrazil*) dengan konsentrasi 100ppm dalam pelarut metanol pro analisa. Dilakukan dengan menimbang 10mg serbuk DPPH dan kemudian menambah metanol ke labu takar 100mL hingga tanda batas. Larutan disimpan dalam botol gelap dengan alumunium tertutup. Selanjutnya, penetuan nilai panjang gelombang (λ). Dipipet 2mL larutan DPPH 100ppm ditambah dengan 2mL metaanol pro analisa. Diamati serapannya pada rentang 500-525nm dengan blanko aquadest (Khoirun Nifa *et al*, 2023).

2. Aktivitas Antioksidan Sediaan *Hand and Body Lotion*

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada sediaan *hand and body lotion* ekstrak daun kelor dan amilum bengkuang yang memiliki formula terbaik. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan diambil 5mL sampel dilarutkan dengan etanol pro analisa dalam labu ukur 10mL, sehingga diperoleh konsentrasi 500ppm sebagai larutan stok. Kemudian dibuat seri konsentrasi 10ppm dengan mengambil 0,2mL larutan stok, 20ppm dengan mengambil 0,4 mL larutan stok, 40 ppm dengan mengambil 0,8 mL larutan stok, 60 ppm dengan mengambil 1,2 mL larutan stok, dan 80 ppm dengan mengambil 1,6 mL larutan stok, masing-masing konsentrasi larutan seri ditambahkan 2mL larutan DPPH 100ppm. Setelah campuran digabungkan, simpan di tempat gelap selama 30 menit. Serapan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515,5nm (Aritonang, 2019).

Pengukuran daya antioksidan pembanding vitamin C dilakukan dengan menimbang vitamin C sebanyak 10mg dilarutkan dengan menggunakan etanol pro analisa sebanyak 100mL pada labu ukur 100mL, sehingga diperoleh konsentrasi 100ppm sebagai larutan stok. Kemudian dibuat seri konsentrasi 2ppm dengan mengambil 0,2mL larutan stok, 3ppm dengan mengambil 0,3mL larutan stok, 4ppm dengan mengambil 0,4mL larutan stok, 5ppm dengan mengambil 0,5mL larutan stok, 6ppm dengan mengambil 0,6mL larutan stok. Kemudian masing-masing larutan seri ditambahkan dengan 2mL larutan DPPH 100ppm dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515,5nm (Rizkayanti et al., 2017).

3. Pengukuran IC50

Pengukuran konsentrasi hambatan 50% (IC50). Hasil pengukuran diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis dihitung persentasenya dengan persamaan :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{A bsorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :
% Inhibisi : Persentase penangkapan radikal bebas DPPH
Abs Kontrol : Absorbansi DPPH
Abs Sampel : Absorbansi sediaan *hand and body lotion*

Nilai IC50, yang merupakan ukuran yang menunjukkan aktivitas antioksidan, adalah nilai yang menunjukkan besarnya konsentrasi senyawa sampel yang memiliki kemampuan untuk menghambat radikal bebas sebesar 50%. Nilai IC50 dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier, di mana y = a + bx yang diperoleh dari seri konsentrasi stok dan hasil pengukuran nilai serapan, di mana nilai a adalah potongan data nilai b adalah koefisien regresi (Khoirun Nifa *et al*, 2023). Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC50 kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (100-150), dan lemah (151-200). Semakin kecil nilai IC50 semakin tinggi aktivitas antioksidan (Badarinath *et al*., 2010).

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis dengan uji sediaan deskriptif, kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH terhadap sediaan *hand and body lotion* ektrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan amilum bengkuang (*Pachyrhizus erosus* (L) Urb).