

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan dari bulan Januari - April 2025 di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Instrumen Prodi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah ELISA *reader* (*All Seng*), Spektrofotometri UV-Vis (*Shimadzu*), rotary evaporator (*IKA*), oven (*Yenaco*), waterbath (*Biobase*), Furnace (*YKY*), vortex, botol maserasi, blender (*Philips*), tabung reaksi (*pyrex*), cawan porselen, gelas ukur (*pyrex*), corong (*pyrex*), mikropipet, microplate, rak tabung, timbangan analitik (*Joanlab*), labu ukur (*pyrex*), gelas kimia (*pyrex*), batang pengaduk, pipet tetes, kertas saring, alumunium foil, dan stik pH.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.), asam askorbat, etanol 96%, aquadest, NaOH, KH_2PO_4 , oksalat 1%, kalium ferrisianida 1%, FeCl_3 1%, asam trikloroasetat (TCA) 10%, dapar fosfat (0,2 M pH 6,6), serbuk Mg, HCl 2N, pereaksi *mayer*, pereaksi *wagner*, pereaksi dragendorff, HCl pekat, etanol 96%.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan metode eksperimental dan menganalisis jumlah aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dalam sampel ekstrak daun mangga

arum manis (*Mangifera indica* L.) sebagai zat aktif dalam sediaan serum, dengan variable sebagai berikut:

a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) dengan konsentrasi ekstrak pada formulasi serum 0%, 10%, 15%, 20%, dan kontrol positif.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai IC_{50} pada sediaan serum ekstrak daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.), uji organoleptik, uji pH, uji homogenitas, uji daya sebar, uji daya lekat, dan uji viskositas.

c. Variabel Terkendali/Terkontrol

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah metode maserasi dan penimbangan bahan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tumbuhan daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) dilakukan untuk memastikan kebenaran tumbuhan yang akan digunakan dalam penelitian. Determinasi dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Program Sarjana Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Pengambilan Sampel

Daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) yang akan digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Desa Gandasuli, Kecamatan Brebes, Kabupaten Brebes. Dengan kriteria daun yang diambil adalah

daun mangga arum manis yang sudah tua, segar, dan tidak rusak. Daun yang sudah tua memiliki kandungan flavonoid yang lebih tinggi dari pada daun muda.

3.4.3 Preparasi Sampel

Daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) sebanyak 4 kg dilakukan sortasi basah dengan mencuci sampel menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Kemudian dirajang dan dikeringkan sampel menggunakan oven pada suhu 50°C. Setelah daun kering, daun dihaluskan menggunakan blender sampai menghasilkan serbuk halus (Hanifah et al., 2023).

3.4.4 Pembuatan Ekstrak Daun Mangga Arum Manis

Daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) sebanyak 700 g yang telah dihaluskan di maserasi dengan etanol 96% dengan perbandingan adalah 1:5, di maserasi selama 3×24 jam. Kemudian dipisahkan antara residu dan filtratnya menggunakan kertas saring. Kemudian residu dimaserasi kembali dengan etanol 96% selama 1×24 jam. Filtrat hasil perendaman pertama ditambahkan filtrat hasil perendaman kedua lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak kental (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak Kental (gram)}}{\text{Bobot Simplisia Awal (gram)}} \times 100\%$$

3.4.5 Standardisasi Ekstrak

a. Penetapan Susut Pengeringan

Ditimbang 1 gram ekstrak dalam botol timbang dangkal bertutup, yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan sudah ditara. Sebelum ditimbang, ratakan ekstrak dengan menggoyangkan botol hingga membentuk lapisan setebal kurang lebih 5 mm sampai 10 mm, kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan dibuka tutupnya, dikeringkan pada suhu 105°C selama 30 menit. Setelah itu didinginkan dalam keadaan tertutup dalam eksikator hingga suhu ruang (Depkes RI, 2017). Perhitungan penetapan susut pengeringan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ Susut pengeringan} = \frac{(\text{Bobot awal} - \text{Bobot akhir})}{\text{Bobot awal}} \times 100\%$$

b. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara gravimetri. Sebanyak 1 g ekstrak ditimbang seksama dalam wadah yang sudah ditara. Ekstrak dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam, kemudian ditimbang. Pengeringan ekstrak dilanjut dan ditimbang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2017). Perhitungan kadar air menggunakan rumus sebagai berikut: (Veninda et al., 2023)

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \%$$

Keterangan :

A = bobot sampel sebelum dikeringkan.

B = bobot sampel setelah dikeringkan.

c. Penetapan Kadar Abu Total

Ditimbang 1 g ekstrak etanol daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara. Sampel kemudian dilakukan pemijaran secara bertahap hingga suhu 600°. Kemudian abu didinginkan dan ditimbang sampai bobot tetap. Kadar abu total dihitung terdapat berat bahan uji dan dinyatakan dalam %b/b (Depkes RI, 2017). Perhitungan kadar abu total menggunakan rumus sebagai berikut: (Veninda et al., 2023)

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 = bobot krus kosong (gram)

W_1 = bobot krus + ekstrak (gram)

W_2 = bobot krus + ekstrak setelah diabukan (gram)

d. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang didapatkan dari hasil kadar abu total dididihkan dengan 25 mL HCl encer selama 5 menit. Bagian abu yang tidak larut asam dikumpulkan dengan cara disaring menggunakan kertas saring, kemudian dicuci dengan air panas. Setelah itu pijarkan dalam krus sampai bobot tetap pada suhu 800±25°. Kadar abu yang tidak larut

asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam %b/b (Depkes RI, 2017).

$$\text{Kadar Abu Tidak Larut Asam} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 = bobot krus kosong (gram)

W_1 = bobot ekstrak (gram)

W_2 = bobot krus + abu yang tidak larut asam (gram)

3.4.6 Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ekstrak etanol daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) sebanyak 0,5 g ditambahkan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dibagi ke dalam 3 tabung. Pada tabung pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi *mayer*, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning (Lestari et al., 2021). Pada tabung kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi *wagner*, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan kecoklatan. Pada tabung ketiga ditambahkan 2 tetes pereaksi *dragendorff*, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan orange (Nurjanah et al., 2022).

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) dilarutkan dalam etanol, sebanyak 1 mL sampel ditambahkan 0,5 g serbuk magnesium dan ditambahkan 10 tetes HCl

pekat. Reaksi positif menghasilkan larutan berwarna jingga, merah muda atau merah (Lestari et al., 2021).

c. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) dilarutkan dalam 10 mL air suling, ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 1%. Reaksi positif terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan terbentuknya senyawa tannin (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

d. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) ditambahkan 10 mL air suling, dikocok 10 detik. Reaksi positif terbentuknya buih selama tidak kurang dari 10 detik menunjukkan adanya senyawa saponin (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

3.4.7 Pengujian Antioksidan

a. Larutan dapar fosfat 0,2 M pH 6,6

Larutan 2 g NaOH dilarutkan dengan aquadest hingga 250 mL dalam labu takar, kemudian 6,8 g KH_2PO_4 dilarutkan dengan aquadest hingga 250 mL dalam labu takar. Selanjutnya, pipet sebanyak 16,4 mL NaOH dan dicampurkan 50 mL KH_2PO_4 ke dalam labu takar, diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan aquadest hingga 200 mL (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

b. Larutan oksalat 1%

Sebanyak 1 g asam oksalat diencerkan menggunakan aquadest dalam labu takar 100 mL (Maryam et al., 2015).

c. Larutan kalium ferrisianida 1%

Sebanyak 1 g kalium ferrisianida diencerkan menggunakan aquadest dalam labu takar 100 mL (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

d. Larutan FeCl_3 0,1 %

Sebanyak 0,1 g FeCl_3 diencerkan menggunakan aquadest dalam labu takar 100 mL (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

e. Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%

Sebanyak 10 g asam trikloroasetat (TCA) diencerkan menggunakan aquadest dalam labu takar 100 mL (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

f. Pembuatan larutan blanko

Dipipet 1 mL larutan dapar fosfat 0,2 M pH 6,6 dan 1 mL kalium ferrisianida 1% ke dalam labu ukur 5 mL. Kemudian di inkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C, setelah di inkubasi ditambahkan 1 mL larutan TCA dan divortex. Kemudian diambil 1 mL bagian atas dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, ditambahkan 1 mL aquadest dan 0,5 mL larutan FeCl_3 0,1 %, dan ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas. Kemudian di diamkan selama 30 menit (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

g. Penentuan panjang gelombang maksimal

Dipipet sebanyak 1 mL larutan asam askorbat konsentrasi 100 ppm, ditambahkan 1 mL larutan dapar fosfat 0,2 M pH 6,6 dan 1 mL larutan ferrisianida 1% ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL TCA 10%, kemudian *divortex*. Setelah *divortex* larutan bagian atas dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan 1 mL aquadest, 0,5 mL larutan FeCl₃ 0,1%, dan ditambahkan dengan etanol 96% sampai tanda batas. Setelah itu didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya diukur serapan panjang gelombang maksimum (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024). Mengukur serapan asam askorbat pada rentang panjang gelombang 400-800 nm (Amin et al., 2024).

h. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) metode FRAP

Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan ke dalam 10 mL etanol 96%. Dibuat larutan stok ekstrak etanol daun mangga arum manis dengan konsentrasi 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm, dan 100 ppm dengan cara masing-masing dipipet 0,6 mL; 0,7 mL; 0,8 mL; 0,9 mL; dan 1,0 mL pada labu takar 10 mL. Kemudian masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL, ditambahkan 1 mL larutan dapar fosfat 0,2 M pH 6,6 dan 1 mL larutan kalium ferrisianida 1%. Setelah itu diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL TCA 10%, kemudian *divortex*. Setelah *divortex* larutan bagian

atas dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan 1 mL aquadest dan 0,5 mL larutan FeCl₃ 0,1%, dan ditambahkan dengan etanol 96% sampai tanda batas. Setelah itu didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

1) Penentuan Persen Inhibisi

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan persen inhibisi yang dihitung berdasarkan rumus: (Putri and Mahfur, 2023)

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

2) Penentuan IC₅₀

Besarnya aktivitas antioksidan ditentukan dengan nilai IC₅₀ yang dihitung menggunakan persamaan regresi linear.

$$y = bx + a$$

Keterangan:

- y = 50
- x = konsentrasi larutan uji
- a = tetapan slope
- b = tetapan intersep

3) Penentuan kapasitas antioksidan

$$\text{Kapasitas antioksidan} = \frac{\text{Konsentrasi sampel} \times \text{volume sampel}}{\text{Bobot Ekstrak (g)}} \times fp$$

Keterangan:

- Konsentrasi sampel atau nilai x (mgAAE/L)

- Volume sampel (L)
- fp = Faktor pengenceran
- Bobot ekstrak (gram)

3.4.8 Formulasi Serum Ekstrak Daun Mangga Arum Manis

Berikut ini tabel formulasi sediaan serum yang digunakan.

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Serum Ekstrak Daun Mangga Arum Manis

Komposisi	Konsentrasi (%)				Kegunaan	Literatur
	F0	FI	FII	FIII		
Ekstrak daun mangga arum manis	-	10	15	20	Antioksidan	(Nurdianti et al., 2020)
Xanthan gum	0,5	0,5	0,5	0,5	Basis serum	(Suleman et al., 2023)
Natrium Benzoat	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengawet	(Suleman et al., 2023)
Trietanolamin	1,0	1,0	1,0	1,0	Penetral pH	(Suleman et al., 2023)
Propilen glikol	15	15	15	15	Humektan	(Suleman et al., 2023)
<i>Oleum rosae</i>	qs	qs	qs	qs	Pewangi	(Hanifah et al., 2023)
Aquadest ad	100	100	100	100	Pelarut	(Suleman et al., 2023)

3.4.9 Pembuatan Serum Ekstrak Daun Mangga Arum Manis

Xanthan gum dilarutkan dengan aquadest hingga terbentuk massa serum, kemudian natrium benzoat dilarutkan dengan sedikit aquadest dan dicampurkan dengan massa serum. Selanjutnya ditambahkan propilen glikol dan trietanolamin, kemudian ditambahkan ekstrak etanol daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) ke dalam massa serum dan ditambahkan *oleum rosae* di aduk hingga homogen. Setelah itu dimasukkan ke dalam wadah serum (Suleman et al., 2023).

3.4.10 Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Serum Ekstrak Etanol Daun Mangga Arum Manis (*Mangifera indica* L.) Metode FRAP

Sebanyak 10 mg serum ekstrak etanol daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) dilarutkan ke dalam 10 mL etanol 96%. Dibuat larutan stok serum ekstrak etanol daun mangga arum manis dengan konsentrasi 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm, dan 100 ppm dengan cara masing-masing dipipet 0,6 mL; 0,7 mL; 0,8 mL; 0,9 mL; dan 1,0 mL pada labu takar 10 mL. Kemudian masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL, ditambahkan 1 mL larutan dapar fosfat 0,2 M pH 6,6 dan 1 mL larutan kalium ferrisianida 1%. Setelah itu diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL TCA 10%, kemudian divortex. Setelah divortex larutan bagian atas dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan 1 mL aquadest dan 0,5 mL larutan FeCl₃ 0,1%. Setelah itu didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

3.4.11 Pembanding Uji Antioksidan Vitamin C

Ditimbang 10 mg asam askorbat, dilarutkan dengan etanol 96% dalam labu takar 10 mL. Dibuat larutan asam askorbat dengan konsentrasi 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm, dan 100 ppm dengan cara masing-masing dipipet 0,6 mL; 0,7 mL; 0,8 mL; 0,9 mL; dan 1,0 mL pada labu takar 10 mL. Dipipet sebanyak 1 mL larutan asam askorbat setiap konsentrasi, ditambahkan 1 mL larutan dapar fosfat 0,2 M pH 6,6 dan 1 mL larutan ferrisianida 1% ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi

selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL TCA 10%, kemudian divortex. Setelah divortex larutan bagian atas dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan 1 mL aquadest, 0,5 mL larutan FeCl₃ 0,1%. Setelah itu di diamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader (Purnamasari, Rohama, and Noval, 2024).

3.4.12 Evaluasi Mutu Fisik Sediaan

Uji mutu sediaan serum ekstrak daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L.) meliputi pengujian organoleptik, uji pH, homogenitas, uji daya sebar, uji daya lekat, uji viskositas, dan uji stabilitas.

a. Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan dengan pengamatan secara langsung secara organoleptik berupa tekstur, warna, dan bau (Hanifah, Sukmawati, and Amalia, 2023).

b. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH universal. Sebanyak 0,5 g serum diencerkan pada 5 mL aquadest, kemudian dicelupkan stik pH selama 1 menit (Syafitri et al., 2024). Nilai pH sediaan topikal harus berada dalam kisaran pH yang sesuai dengan pH normal kulit, yakni 4,5 - 6,5 (Suleman et al., 2023).

c. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan serum pada preparat kaca kemudian diamati apakah bahan-bahan

yang digunakan tersebut terdispersi merata pada lempeng kaca tersebut (Hanifah, Sukmawati, and Amalia, 2023).

d. Uji Daya Sebar

Pengujian daya sebar dengan cara sampel sebanyak 0,5 g diletakkan ditengah kaca. Diatas sediaan diletakkan pada kaca lain lalu didiamkan selama 1 menit dan dicatat diameter penyebarannya. Pengukuran dengan beban seberat 0 g - 200 g diatas kaca dan didiamkan selama 1 menit lalu dicatat diameter penyebarannya. Daya sebar pada serum sesuai evaluasi sekitar 5-7 cm dan dilakukan dengan 3 kali replikasi (Hikmah et al., 2023).

e. Uji Daya Lekat

Pengujian daya lekat dilakukan dengan menimbang sampel sebanyak 0,25 g yang kemudian diletakkan diantara 2 gelas objek pada alat uji daya lekat, kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit, beban diangkat dan catat waktu pelepasan gelas objek. Persyaratan uji daya lekat adalah >1 detik dan dilakukan 3 kali replikasi (Yusuf et al., 2017).

f. Uji Viskositas

Kekentalan sampel sediaan diukur dengan *viscometer Ostwald*, pengujian viskositas dilakukan dengan menempatkan sampel dalam viskometer hingga spindel terendam. Spindel diatur dengan kecepatan 60 rpm. Viskositas memenuhi persyaratan dalam pembuatan serum adalah 230-3000 cPs (Setiawan et al., 2023).

3.5 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*). Data hasil yang diperoleh akan diuji dengan menggunakan uji *one way* ANOVA. Analisis data diawali dengan uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas. Data harus terdistribusi normal dan homogen merupakan syarat yang harus terpenuhi untuk selanjutnya dilakukan uji *one way* ANOVA, jika data tidak memenuhi syarat maka dilakukan transformasi data agar data terdistribusi normal dan homogen. Apabila data setelah di transformasi tetap tidak memenuhi syarat, maka data di uji *Kruskal-Wallis*.