

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tablet ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*)

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah sediaan tablet ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan menggunakan bahan tambahan variasi kombinasi Avicel PH 101 dan laktosa F1 tanpa zat aktif (50% : 50%), F2 (50% : 50%), F3 (75% : 25%), dan F4 (25% : 75%).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama pada penelitian ini adalah tablet.

Variabel utama yang kedua pada penelitian ini adalah sediaan tablet ekstrak daun salam dengan variasi kombinasi Avicel PH 101 dan laktosa.

Variabel utama yang ketiga pada penelitian ini adalah uji sifat fisik granul dan tablet ekstrak daun salam.

Variabel utama keempat pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan tablet ekstrak daun salam dengan menggunakan metode DPPH.

2. Klasifikasi variabel utama

2.1 Variabel bebas : Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu perbandingan konsentrasi Avicel PH 101 dan laktosa dengan menggunakan metode granulasi basah pada F1 tanpa zat aktif (50% : 50%), F2 (50% : 50%), F3 (75% : 25%), dan F4 (25% : 75%).

2.2 Variabel tergantung : Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu uji sifat fisik granul, uji fisik tablet, dan uji antioksidan DPPH

2.3 Variabel terkontrol : Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu waktu pencampuran bahan, nomor ayakan, volume penambahan bahan pengikat, berat tablet, susut pengeringan granul, metode pengujian granul, metode pengujian tablet, lokasi pemesanan bahan yang akan digunakan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun salam adalah daun yang didapat dari kebun di dusun Bangoan, Toyogo, Sambungmacan, Sragen, Jawa Tengah. Karakteristik populasi dan sampel daun salam yang segar berwarna hijau.

Kedua, ekstrak daun salam adalah ekstrak yang dimaserasi dengan etanol 96% selama 48 jam.

Ketiga, sediaan tablet adalah pembuatan sediaan tablet dengan menggunakan variasi kombinasi Avicel PH 101 dan laktosa.

Keempat, variasi kombinasi Avicel PH 101 dan laktosa pada sediaan tablet adalah F1 tanpa zat aktif (50% : 50%), F2 (50% : 50%), F3 (75% : 25%), dan F4 (25% : 75%).

Kelima, uji sifat fisik granul dan tablet adalah meliputi uji organoleptik, uji waktu alir granul, uji sudut diam, uji indeks pengetapan, uji susut pengeringan, uji keseragaman ukuran, uji keragaman bobot, uji kekerasan, uji kerapuhan, uji waktu hancur.

Keenam, uji aktivitas antioksidan ekstrak daun salam dan sediaan tablet adalah uji yang dilakukan dengan menggunakan metode DPPH dan besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} .

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu blender, *rotary evaporator*, waterbath, mortar, stamper, ayakan mesh no 60, ayakan mesh no 16 dan 18, moisture balance, oven, kurs porselin, neraca analitik, flow tester granul, *stop watch*, *tap density tester*, jangka sorong, *hardness tester*, *friability tester*, *disintegration tester*, mesin tablet *single punch*, spektrofotometer UV-VIS, tabung reaksi, botol coklat maserasi, jar kaca, pipet volume, pipet tetes, batang pengaduk, aluminium foil, buret, labu tentukur, gelas ukur dan alat gelas lainnya.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu sebagai berikut ekstrak daun salam, etanol 96% dan bahan tambahan yaitu PVP, laktosa, talk, Mg stearat, *explotab*, Avicel PH 101, akuades, reagen DPPH (*1,1-diphenil-2-picrylhydrazil*), pereaksi bouchardat, pereaksi mayer, asam sulfat pekat, asam anhidrat, amil alkohol, air panas, HCl 2N, $FeCl_3$, methanol *p.a.*, vitamin C, dan alkohol.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman salam (*Syzygium polyanthum*)

Determinasi dalam penelitian ini berfungsi untuk mengetahui kesesuaian sampel tanaman salam. Determinasi berlangsung dengan pencocokan secara morfologis. Ciri-ciri tanaman salam sesuai dengan literatur yang dilakukan Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pembuatan serbuk daun salam (*Syzygium polyanthum*)

Daun salam segar sebanyak 4.600 gram yang sudah dipanen, dicuci bersih di bawah air mengalir, kemudian melakukan sortasi basah untuk memisahkan daun salam yang masih segar dengan kotoran yang masih tertinggal. Langkah selanjutnya memotong daun salam menjadi irisan tipis agar mudah dikeringkan. Irisan daun salam dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam dan dihaluskan dengan menggunakan blender sampai menjadi serbuk (Sanjaya *et al.*, 2020), kemudian mengayak serbuk menggunakan ayakan mesh no 60 (Iskandar *et al.*, 2019). Serbuk yang diperoleh sebanyak 1.100 gram yang selanjutnya dibuat ekstrak daun salam menggunakan metode maserasi.

3. Karakteristik serbuk daun salam (*Syzygium polyanthum*)

3.1. Uji organoleptik serbuk daun salam. Pemeriksaan organoleptik serbuk daun salam dilakukan dengan cara melihat sifat fisik serbuk yang meliputi bentuk, warna dan bau.

3.2. Uji susut pengeringan serbuk daun salam. Susut pengeringan merupakan salah satu parameter non spesifik yang bertujuan untuk memberikan batasan maksimal (rentang) jumlah senyawa yang hilang selama proses pengeringan (Depkes RI, 2000). Penetapan susut pengeringan menggunakan alat *moisture balance* yang telah diatur suhunya menjadi 105°C dengan serbuk 2 g, nilai konstan ditandai dengan bunyi alarm pada alat, dilakukan sebanyak 3x replikasi dengan syarat kelembapan $\leq 10\%$ (KemenKes RI, 2017).

4. Pembuatan ekstraksi daun salam (*Syzygium polyanthum*)

Metode yang digunakan adalah metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan sampel berupa serbuk daun salam sebanyak 1 kg dalam bejana maserasi dan menggunakan perbandingan 1:10 dalam wadah tertutup dan terlindung dari sinar matahari selama 48 jam, kemudian menyaring filtrat dengan kain flannel untuk memisahkan ekstrak cair dan ampas, kemudian dilanjutkan dengan penyari dengan

menggunakan kertas saring, lalu melakukan remaserasi menggunakan ampas dengan setengah pelarut awal, memekatkan ekstrak cair yang telah digabung menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental, serta menimbang ekstrak kental yang didapat dan menghitung randemenya (KemenKes RI, 2017).

5. Karakteristik ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*)

5.1 Uji organoleptik ekstrak daun salam. Pemeriksaan organoleptik ekstrak daun salam dilakukan dengan cara melihat sifat fisik ekstrak yang meliputi bentuk, warna dan bau.

5.2 Uji kadar air ekstrak daun salam. Kadar air merupakan parameter untuk menentukan kadar air sisa setelah proses pengeringan (Voight, 1994). Tujuan penetapan kadar air adalah untuk menetapkan batas atas atau kisaran kadar air suatu bahan. Kadar air dapat ditentukan dengan metode gravimetri. Ekstrak daun salam ditimbang 10 g, kemudian dikeringkan pada suhu 105° selama 5 jam dan dimasukkan dalam wadah yang telah ditara, lalu dikeringkan dan ditimbang dengan selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (KemenKes RI, 2017).

6. Uji skrining fitokimia serbuk dan ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*)

6.1. Identifikasi flavonoid. Ekstrak dan serbuk daun salam masing-masing ditimbang sebanyak 1 gram. Ekstrak dan serbuk daun salam dimasukkan ke dalam beaker glass ditambahkan dengan 100 mL air suling dan dididihkan selama 15 menit, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh diambil sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan serbuk magnesium, 1 mL HCl dan 2 mL amil alkohol, kemudian dikocok dan dibiarkan memisah. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Marjoni, 2016).

6.2. Identifikasi alkaloid. Serbuk dan ekstrak daun salam masing-masing ditimbang sebanyak 1 gram ditambah 2 tetes NH₃ dan 5 mL kloroform, kemudian disaring. Filtratnya ditambahkan asam sulfat 2 M. Lapisan asam yang terbentuk ditetesi dengan 3 pereaksi. Uji positif alkaloid dengan larutan pereaksi *Dragendorff* akan menghasilkan warna orange, larutan pereaksi *Mayer* akan menghasilkan warna putih, dan pereaksi *Wagner* akan menghasilkan warna coklat (Masaenah, *et al.*, 2019).

6.3. Identifikasi tanin. Serbuk dan ekstrak daun salam masing-masing ditimbang sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam beaker glass ditambahkan dengan 10 mL air suling, kemudian disaring dan dipanaskan. Filtrat yang diperoleh di ambil sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan besi (III) klorida. Hasil positif tannin ditunjukkan dengan filtrat menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman (Dirjen Pom, 1995).

6.4. Identifikasi steroid/ triterpenoid. Serbuk dan ekstrak daun salam masing-masing ditimbang sebanyak 1 gram dimasukkan cawan penguap ditambahkan 5 mL etanol 70% dan dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit, kemudian dilakukan penyaringan dalam keadaan panas. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan dalam penangas air hingga kering. Filtrat yang sudah kering kemudian ditambahkan air hingga membentuk 2 lapis CHCl_3 dan air. Lapisan CHCl_3 diambil kemudian dikeringkan dalam plat tetes ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard (3 tetes asam asetat anhidrat dan ditambahkan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat). Hail steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid positif apabila terbentuk warna merah atau ungu (Depkes RI, 1979).

6.5. Identifikasi saponin. Serbuk dan ekstrak daun salam masing-masing ditimbang sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam beaker glass dilarutkan dengan etanol 96% sampai larut, lalu dipanaskan dan disaring menggunakan kertas saring, setelah itu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 mL, kemudian menambahkan 10 mL air dan panaskan selama 2-3 menit, selanjutnya didinginkan, setelah dingin kocok kuat selama 10 detik. Hasil positif saponin menunjukkan dengan terbentuknya buih yang konstan selama tidak kurang 10 menit setinggi 1-10 cm dan pada penambahan HCl 2 N buih akan hilang (Depkes RI, 1995).

6.6. Identifikasi vitamin C. Serbuk dan ekstrak kental daun salam diambil sebanyak 1 mL kemudian menambahkan 5 mL akuades digojok, selanjutnya menambahkan 10 mL KMnO_4 0,1%. Sampel positif menunjukkan adanya senyawa vitamin C muncul warna coklat (Yuliasuti, 2019).

7. Formulasi dan pembuatan sediaan tablet

Pada penelitian ini dibuat 4 formula tablet dengan konsentrasi ekstrak yang sama pada setiap formulasi. Komponen yang divariasi adalah variasi laktosa dan Avicel PH 101 dengan perbandingan

konsentrasi sebagai berikut F1 tanpa zat aktif (50% : 50%), F2 (50% : 50%), F3 (75% : 25%), dan F4 (25% : 75%) lihat pada tabel 4. Pembuatan tablet dengan ekstrak daun salam ditambahkan Avicel PH 101 dan laktosa dengan jumlah konsentrasi yang berbeda diaduk hingga homogen. Explotab ditambahkan, diaduk sampai tercampur. PVP (polivinil pirolidon) kemudian dikembangkan dengan aquades, lalu PVP yang sudah dikembangkan dituangkan sedikit demi sedikit kedalam campuran sambil diaduk sampai membentuk masa yang siap di granulasi. Massa granul diayak dengan ayakan mesh no 16 kemudian mengeringkan granul dengan oven pada suhu 40°C sampai granul kering. Granul yang sudah kering diayak dengan ayakan mesh no 18, kemudian ditambahkan dengan mg stearate dan talk sebagai bahan pelicin, selanjutnya dilakukan uji mutu fisik granul. Granul yang sudah dilakukan uji mutu fisik lalu dicetak pada mesin pencetak tablet *single punch*. Tablet yang sudah dicetak dilakukan uji mutu fisik tablet (Sawiji, 2019).

Tabel 4. **Rancangan formula tablet ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan variasi kombinasi Avicel PH 101 dan laktosa sebagai bahan pengisi (untuk satu tablet dalam mg)**

Bahan	F1 (mg)	F2 (mg)	F3 (mg)	F4 (mg)	Fungsi
Ekstrak daun salam	-	75	75	75	Bahan aktif
Laktosa	272,5	235	352	118	Pengisi
Avicel PH 101	272,5	235	118	352	Pengisi
Explotab	30	30	30	30	Penghancur
PVP	18	18	18	18	Pengikat
Mg Stearat	1	1	1	1	Pelicin
Talk	6	6	6	6	Pelicin
Bobot total	600	600	600	600	

8. Pemeriksaan sifat fisik granul

8.1. Uji organoleptik granul. Pengujian organoleptik dilakukan dengan cara mengamati bentuk, rasa, bau, dan warna (Depkes RI, 2014).

8.2. Uji waktu alir granul. Uji waktu alir granul dilakukan dengan cara menimbang granul sebanyak 100 gram, granul dimasukkan ke dalam corong yang bagian bawahnya tertutup. Penutup dibuka dan stopwatch dihidupkan hingga semua granul keluar dari corong dan membentuk tumpukan pada kertas grafik, kemudian alat pencatat waktu dimatikan (Voight, 1994).

8.3. Uji sudut diam granul. Uji sudut diam granul dilakukan dengan cara menimbang 100 gram granul, granul dimasukkan ke dalam

corong yang bagian bawahnya tertutup. Penutup dibuka hingga semua granul keluar dari corong dan membentuk tumpukan pada kertas grafik. Granul yang membentuk tumpukan kemudian diukur tinggi dan diameter kerucutnya. Waktu alir granul memenuhi syarat apabila sudut diam kurang dari 30° dan tidak melebihi 40° (Syofyan, 2015).

8.4. Uji indeks pengetapan granul. Uji indeks pengetapan granul dilakukan dengan memasukkan ke dalam gelas ukur 100 mL, kemudian gelas ukur berisi granul dipasangkan pada alat pengetapan dan rotor dinyalakan. Granul diketuk sebanyak 500 kali ketukan. Dicatat volume awalnya dan volume perolehan sesudah diketuk, kemudian dihitung selisih nilai indeks pengetapan (Lukman *et al.*, 2013).

8.5. Uji susut pengeringan granul. Uji susut pengeringan dilakukan dengan cara menimbang granul sebanyak 2 g dimasukkan kedalam *moisture balance*, kemudian menekan tombol star dan ditunggu sampai alarm bunyi yang menandakan nilai konstan. Uji susut pengeringan dilakukan 3x replikasi, persyaratan susut pengeringan granul yang baik yaitu 3-5% (Voight, 1995).

9. Pemeriksaan sifat fisik tablet

9.1. Uji organoleptik tablet. Uji organoleptik dilakukan dengan cara mengamati bentuk, rasa, bau, dan warna dari tablet yang dihasilkan (Kepala BPOM R1, 2014).

9.2. Uji keseragaman ukuran tablet. Tablet sebanyak 20 diukur tebal dan diameternya menggunakan jangka sorong dengan teliti, kemudian menghitung nilai ketebalan dan diameter rata-ratanya (Alawiyah, 2012).

9.3. Uji keragaman bobot tablet. Tablet sebanyak 20 ditimbang satu persatu pada timbangan analitik. Bobot rata-rata tiap tablet dihitung (Rashati, 2017).

9.4. Uji kekerasan tablet. Tablet diambil sebanyak 10 untuk dilakukan uji kekerasan tablet secara acak, kemudian diuji kekerasannya menggunakan alat *hardness tester* (Hadisoewignyo, 2013).

9.5. Uji kerapuhan tablet. Tablet diambil sebanyak 20 dibersihkan dari debu yang melekat pada tablet, lalu dimasukkan ke dalam alat *friability tester*. Alat kemudian diputar dengan kecepatan 25 rpm (100 putaran) selama 4 menit. Tablet selanjutnya dikeluarkan dari alat dan dibersihkan dari debu, kemudian ditimbang. Presentase

kehilangan bobot sebelum dan sesudah perlakuan dihitung (Rashati, 2017).

9.6. Uji waktu hancur tablet. Air dimasukkan dan diatur suhunya sampai $37^{\circ}\pm 2^{\circ}$. Tablet diambil sebanyak 6 dimasukkan pada setiap tabung keranjang alat *disintegration tester*. Pada akhir pengujian, semua tablet diamati untuk memastikan bahwa semua tablet telah hancur sempurna dan syarat waktu hancur tablet tidak lebih dari 15 menit untuk tablet tidak bersalut (Noorjannah & Noval, 2020).

10. Uji antioksidan ekstrak dan tablet daun salam menggunakan metode DPPH

10.1. Pembuatan larutan DPPH. Pembuatan larutan DPPH dilakukan dengan cara menimbang serbuk DPPH sebanyak 15,8 mg, kemudian dilarutkan ke dalam methanol *p.a* hingga 100 mL maka diperoleh konsentrasi larutan 0,4 mM. Larutan tersebut ditutup menggunakan aluminium foil (Sadeli, 2016).

10.2. Pembuatan larutan induk kontrol positif. Pembuatan larutan induk tablet pembanding dilakukan dengan cara menimbang 100 mg dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, lalu ditambahkan methanol *p.a* sampai tanda batas 100 mL dan dikocok hingga homogen, kemudian disaring dan dimasukkan botol 100 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1.000 ppm (Erlinda, 2020). Pada konsentrasi tersebut dibuat seri konsentrasi sebesar 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm dengan cara memipet 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL lalu ditambahkan methanol *p.a* hingga tanda batas dan ditunggu sesuai OT. Larutan induk ekstrak daun salam kemudian dibaca serapan absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis, dilakukan 3 kali replikasi (Erlinda, 2020).

10.3. Pembuatan larutan induk ekstrak daun salam. Pembuatan larutan induk ekstrak daun salam dengan cara menimbang ekstrak daun salam 75 mg dilarutkan dengan methanol *p.a* ke dalam labu ukur 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi 750 ppm. Konsentrasi ekstrak daun salam dari 750 ppm dibuat seri konsentrasi sebesar 15 ppm, 30 ppm, 45 ppm, 60 ppm, dan 75 ppm dengan cara memipet 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL, kemudian dimasukkan labu ukur 25 mL, lalu ditambahkan methanol *p.a* hingga

tanda batas dan ditunggu sesuai OT. Larutan induk ekstrak daun salam kemudian dibaca serapan absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis, dilakukan 3 kali replikasi (Erlinda, 2020).

10.4. Pembuatan larutan induk tablet. Pembuatan larutan induk tablet dilakukan dengan cara mengambil tablet, kemudian digerus dan ditimbang sebanyak 600 mg, kemudian dilarutkan dengan methanol *p.a* ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian disaring dan dimasukkan botol 100 mL dan diperoleh konsentrasi 6.000 ppm. Konsentrasi tablet ekstrak daun salam dari 6.000 ppm dibuat seri konsentrasi sebesar 60 ppm, 120 ppm, 180 ppm, 240 ppm, dan 300 ppm dengan cara memipet 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL, kemudian dimasukkan labu ukur 50 mL, lalu ditambahkan methanol *p.a* hingga tanda batas dan ditunggu sesuai OT. Larutan induk tablet kemudian dibaca serapan absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis, dilakukan 3 kali replikasi (Erlinda, 2020).

10.5. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH 0,4 Mm. Penentuan panjang gelombang (λ) dengan cara memipet 1 mL larutan DPPH dimasukkan labu takar 5 mL, kemudian ditambahkan methanol *p.a* hingga tanda batas. Larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 400-600 nm untuk mendapatkan absorbansi $\pm 0,2-0,8$, nilai λ maksimal terdapat pada rentang 515-520 nm (Erlinda, 2020).

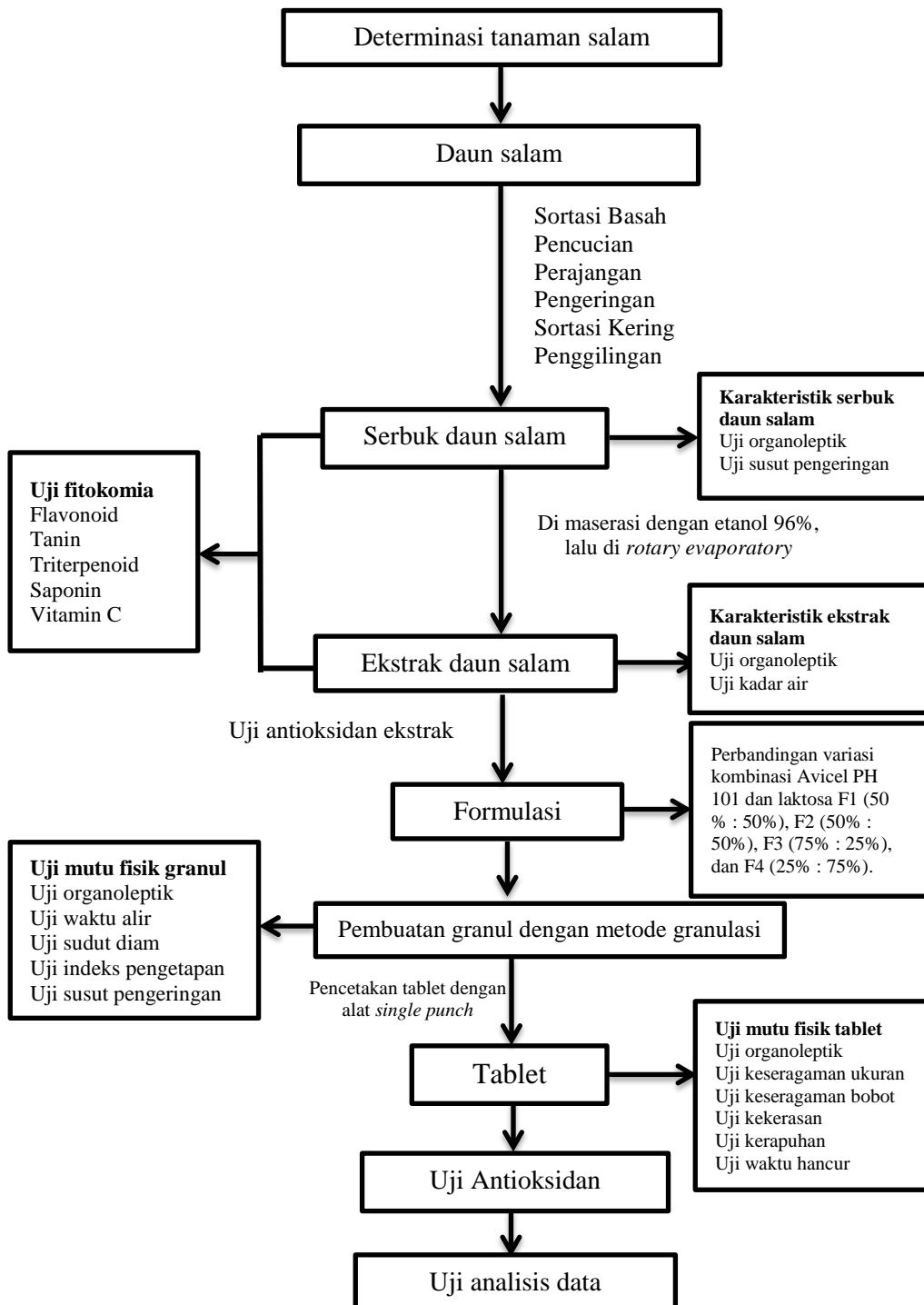
10.6. Penentuan *operating time* larutan DPPH 0,4 mM. Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mengambil larutan induk ekstrak daun salam dan tablet sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian menambahkan methanol *p.a* 3 mL dan menambahkan larutan DPPH 1 mL kemudian diukur absorbansinya pada menit ke 0 hingga 60 pada λ maksimal yang sudah diperoleh sampai mendapatkan absorbansi yang paling stabil (Erlinda, 2020).

10.7. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Uji aktivitas antioksidan diukur dengan cara mengambil 1 mL ekstrak daun salam dan tablet dari masing-masing 5 seri pengenceran dimasukkan labu ukur 5 mL, ditambahkan 1 mL DPPH, lalu ditambahkan methanol *p.a* sampai tanda batas. Larutan yang sudah tercampur kemudian diinkubasi dengan *operating time* yang didapat lalu dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Erlinda, 2020).

E. Analisis Hasil

Analisis data dengan uji distribusi normal menggunakan (*Shapiro-wilk*) untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak, jika data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka akan dilanjutkan dengan uji non parametik. Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka akan dilanjutkan dengan uji parametik varian satu arah (ANOVA). Uji *Post Hoc* dilakukan untuk melihat apakah terdapat perbedaan antara aktivitas antioksidan ekstrak daun salam dan aktivitas antioksidan tablet ekstrak daun salam. Nilai-nilai yang dianggap signifikan secara statistik ditunjukkan dengan nilai ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna.

F. Alur Penelitian



Gambar 3. Alur penelitian