

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini yaitu daun sirsak (*Annona muricata* L) yang tumbuh di daerah Kota Batu Jawa Timur.

2. Sampel

Daun sirsak (*Annona muricata* L) memiliki bentuk telur atau lanset, tepi rata, ujung runcing, pertulangan menyirip, pangkal runcing, panjang tangkai 5 mm dan berwarna hijau kekuningan. Daun sirsak pada penelitian ini menggunakan daun yang segar berwarna hijau atau hijau muda.

Daun sirsak (*Annona muricata* L) pada penelitian ini digunakan dalam bentuk ekstrak, dengan cara daun sirsak dikeringkan dibawah sinar matahari atau menggunakan oven hingga kering. Daun yang sudah dikeringkan diserbuk menggunakan blender dan diayak menggunakan mesh nomor 60, lalu diekstraksi menggunakan metode maserasi dan dilakukan pemekatan untuk mendapatkan ekstrak kental daun sirsak. Ekstrak kental tersebut yang akan digunakan dalam penelitian ini.

B. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi perubahan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variasi konsentrasi propilen glikol pada sediaan gel ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L) yaitu konsentrasi (5%, 10%, 15%).

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan pada sediaan gel ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) dengan menggunakan DPPH serta mutu fisik dan stabilitas dari sediaan gel yang dibuat dengan variasi propilen glikol.

3. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dapat diartikan sebagai variabel yang mempengaruhi yang mempengaruhi variabel tergantung atau hasil penelitian. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L), proses pembuatan sediaan gel,

kesterilan alat dan keadaan laboratorium serta bahan yang digunakan saat penelitian berlangsung.

4. Definisi Operasional Variabel

Pertama, ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) adalah ekstrak yang diperoleh dari serbuk daun sirsak yang dimaserasi menggunakan etanol 70%.

Kedua, gel ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) adalah gel yang dibuat dengan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) 2,8% menggunakan humektan propilen glikol dengan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15%.

Ketiga, uji mutu fisik sediaan gel ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) adalah uji organoleptis, pH, homogenitas, viskositas, daya lekat, daya sebar dan uji stabilitas metode *cycling test*.

Keempat, uji aktivitas antioksidan yang dimaksud dalam penelitian ini adalah uji aktivitas antioksidan yang menggunakan metode DPPH dengan spektrofotometri Uv-Vis.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Tabung silinders, timbangan analitik, glass ukur, botol jar, kurs porselin, glass beaker, tabung reaksi, batang pengaduk, mortir dan stamper, alumunium foil, labu ukur, vial, *vacuum rotary evaporator*, water bath, viskometer, pH meter, pipet volume, pipet tetes, spatula, sudip, objek glass, corong kaca, kaca bulat berdiameter, oven, Spektrofotometer Uv-Vis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L), etanol 70%, DPPH (1,1 *Diphenyl-2-picrylhydrazyl*), gel pasaran, metanol p.a, rutin, karbopol 940, TEA (*Triethanolamine*), nipagin, nipasol, na EDTA, gliserin, propilen glikol, aquades, reagen Mayer, Dragendorff, H₂SO₄, HCl 2N, FeCl₃ 5%, HCl pekat, serbuk Magnesium.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Daun sirsak dalam penelitian ini yang digunakan yaitu dari daerah Kota Batu, Jawa Timur. Determinasi ini dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu Jawa Timur.

Tujuan untuk dilakukannya determinasi ini yaitu untuk menentukan jenis atau nama tanaman tersebut secara spesifik, karena proses pemanfaatannya tanaman mempunyai berbagai varietas sehingga tanaman harus dilakukan determinasi.

2. Pembuatan Serbuk Daun Sirsak

Helaian daun sirsak dibersihkan dari kotoran dan tulang daunnya, dicuci dengan air bersih, ditiriskan, dan kemudian ditimbang berat basahya. Daun sirsak kemudian dikeringkan di lemari pengering dengan suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ hingga kering. Daun yang sudah dikeringkan diserbuk menggunakan blender dan diayak menggunakan mesh nomor 60, lalu disimpan dalam wadah kering yang tertutup rapat (Surbakti, 2019).

3. Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

Serbuk daun sirsak ditimbang sebanyak 1,2 kg, kemudian diekstraksi menggunakan etanol 70% sebanyak 12.000 mL dengan metode maserasi. Serbuk dimasukan kedalam maserator dan ditambahkan pelarut. Serbuk direndam selama 6 jam pertama sambil digojok sesekali, lalu didiamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara filtrasi, selanjutnya dilakukan remaserasi dengan pelarut yang sama dan jumlah volume setengah dari volume pelarut pertama. Maserat yang diperoleh dikumpulkan, kemudian dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai diperoleh massa kental.

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat}}{\text{Bobot yang diekstraksi}} \times 100\%$$

4. Pengukuran Susut Pengeringan Serbuk Daun Sirsak

Menimbang sebanyak 2 gram serbuk daun sirsak, lalu dimasukan ke dalam krus porselen yang sudah ditara, kemudian dimasukkan kedalam oven selama 30 menit pada suhu 105°C . Serbuk simplisia dimasukkan ke dalam kurs porselin dan ditimbang krus beserta tutupnya. Kurs porselin yang berisi simplisia dengan tutup terbuka kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 2-4 jam pertama selanjutnya dilakukan selama 1 jam hingga diperoleh bobot konstan dengan hasil penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,5 mg. Sebelum setiap proses pengeringan, kurs dimasukan ke dalam desikator hingga suhu ruang. Syarat susut pengeringan tidak boleh melebihi batas yaitu 10%. Kemudian hitung persentase susut pengeringan dengan rumus:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{Berat susut pengeringan}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

5. Identifikasi Fitokimia Ekstrak Daun Sirsak

5.1 Uji Alkaloid. Sampel ekstrak daun sirsak diambil sebanyak 0,5 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan HCl 2N dan dibagi menjadi dua tabung reaksi, kemudian masing-masing tabung diberikan pereaksi Mayer dan Dragendroff. Sampel menunjukkan positif mengandung alkaloid yaitu menghasilkan endapan putih atau kuning (pereaksi Mayer), endapan jingga (pereaksi Dragendroff) (Depkes., 1987).

5.2 Uji Flavonoid. Sampel ekstrak daun sirsak diambil sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 0,01 gram serbuk Magnesium dan ditambahkan 10 tetes HCl pekat, sampel menunjukkan positif mengandung flavonoid yaitu larutan berwarna jingga, merah muda atau merah (Depkes., 1987).

5.3 Uji Saponin. Sampel ekstrak daun sirsak diambil sebanyak 1 gram masukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dimasukkan 10 mL air panas, lalu didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Sampel menunjukkan positif mengandung saponin jika membentuk buih setinggi 1 cm selama tidak kurang dari 10 menit dan dengan penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes., 1987).

5.4 Uji Tanin. Sampel ekstrak daun sirsak diambil sebanyak 1 g dan ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 5%. Sampel menunjukkan positif menghasilkan warna ungu atau hitam yang kuat (Depkes., 1987).

6. Identifikasi Senyawa Flavonoid Dalam Ekstrak Etanol Daun Sirsak Dengan Metode KLT

Sampel ekstrak daun sirsak dilarutkan dengan sedikit pelarutnya, kemudian lempeng KLT yang menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ diaktifasikan dengan suhu 105°C selama 30 menit . Baku pembanding yang digunakan dalam identifikasi flavonoid yaitu rutin. Plat KLT menggunakan fase gerak yang terdiri dari Etil asetat : Metanol : Air (3,75:0,75:0,5), kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* dan dibiarkan tertutup hingga jenuh. Totolkan ekstrak yang sudah dilarutkan dan rutin di atas tanda bawah pada plat KLT, kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* dan elusi sampai tanda bagian atas plat KLT. Kemudian plat KLT diambil dan dikeringkan. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya bercak warna kuning (FHI ed II., 2017).

7. Rancangan Formulasi Gel Ekstrak Daun Sirsak

Tabel 2. Rancangan formulasi gel ekstrak daun sirsak

Bahan	Konsentrasi(%)				
	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Kontrol - Humektan	Kontrol - Ekstrak
Ekstrak daun sirsak	2,8	2,8	2,8	2,8	-
Karbopol 940	1	1	1	1	1
<i>Trietanolamin</i> (TEA)	1	1	1	1	1
Nipagin	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Nipasol	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Na EDTA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Gliserin	15	15	15	15	15
Propilen glikol	5	10	15	-	10
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Sumber : (Sholikha *et al.*, 2020.)

Keterangan :

Formula 1 (F1) : Sediaan gel ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi propilen glikol 5%

Formula 2 (F2) : Sediaan gel ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi propilen glikol 10%

Formula 3 (F3) : Sediaan gel ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi propilen glikol 15%

Kontrol (-) Humektan : Sediaan gel ekstrak daun sirsak tanpa konsentrasi propilen glikol

Kontrol (-) Ekstrak : Sediaan gel dengan propilen glikol 10% tanpa ekstrak

8. Pembuatan Gel

Ekstrak daun sirsak dibuat dalam sediaan gel. Pertama, basis gel dibuat dengan menimbang 1 g karbopol 940, kemudian terlebih dahulu dikembangkan di dalam mortar dengan 50 ml aquades panas. Campuran kemudian diaduk hingga konstan. *Trietanolamin* (TEA) ditambahkan ke dalam campuran sedikit demi sedikit untuk penyesuaian pH (4,5-6,5) untuk mendapatkan konsistensi gel yang diperlukan. Nipagin dan nipasol dimasukan kedalam beaker glass ke-1 dan dilarutkan menggunakan 5 mL propilen glikol. Pada beaker glass ke-2 Na EDTA dimasukan kedalam beaker glass ke-2 dan dilarutkan menggunakan 5 mL aquadest. Ekstrak sebanyak 2,8 g dimasukan ke dalam beaker glass dan volume dibuat ad 100 mL dengan menambahkan aquades yang tersisa. Larutan nipagin dan nipasol pada beaker glass ke-1 dicampurkan ke dalam basis gel dengan tetap dilakukan pengadukan dengan konstan. Larutan na EDTA ditambahkan secara perlahan-lahan ke dalam campuran. Gliserin dan sisa aquades ditambahkan ke dalam campuran sambil tetap diaduk hingga homogen.(Charissa *et al.*,2016).

9. Evaluasi dan Uji Sifat Fisik Sediaan Gel Ekstrak Etanol Daun Sirsak

9.1 Uji Organoleptik. Uji organoleptik dengan cara mengamati perubahan warna, bau, bentuk dari sediaan gel yang mengandung ekstrak etanol daun sirsak (Hakim *et al.*, 2020).

9.2 Uji Homogenitas. Gel diambil sebanyak 0,5 g dari masing-masing formula, kemudian diratakan di atas plat kaca menggunakan spatula. Sediaan diamati terlihat ada atau tidak partikel yang belum homogen. (Hakim *et al.*, 2020).

9.3 Uji pH. Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang dimasukkan ke dalam wadah sediaan gel. Kemudian dilihat nilai pH yang terukur pada layar, pH sediaan gel harus sesuai pada pH kulit yaitu 4,5-6,5 (Pratasik *et al.*, 2019).

9.4 Uji Viskositas. Alat yang digunakan untuk uji viskositas yaitu viskometer *Brookfield*. Dengan cara untuk melakukan pengujian yaitu sediaan Gel dimasukkan ke dalam wadah, selanjutnya dipasang dengan nomor spindel 6 yang digunakan untuk formula 1 sampai formula kontrol negatif humektan dan nomor spindel 7 digunakan untuk formula kontrol negatif ekstrak, kemudian dikunci berlawanan arah dengan jarum jam dan kemudian diturunkan ke dalam sediaan harus dalam posisi tengah hingga terendam dan nyalakan alat viscometer. Pengukuran menggunakan viskometer Brookfield dilakukan dengan kecepatan 30 rpm – 200 rpm. Masing-masing formula mempunyai kecepatan yang berbeda-beda, pada formula 1 memakai kecepatan 100 rpm, formula 2 memakai kecepatan 150 rpm, formula 3 memakai kecepatan 200 rpm, kontrol negatif humektan memakai kecepatan 95 rpm, kontrol negatif ekstrak memakai kecepatan 150 rpm. Setelah itu ditunggu sampai mendapatkan nilai viskometer yang diinginkan. (Nuraini, 2023).

9.5 Uji Daya Lekat. Sediaan gel diambil sebanyak 0,5 gram kemudian diletakan di atas objek glass, lalu letakkan objek glass yang lainnya diletakan di atas gel, diberi beban 1 kg selama 5 menit. Objek glass tersebut dipasang pada alat uji yang diberi beban 80 gram, kemudian beban dilepaskan dan dicatat waktunya ketika objek glass terlepas. Syarat daya lekat yang baik yaitu lebih dari 1 detik (Nuraini, 2023.).

9.6 Uji Daya Sebar. Sediaan gel diambil sebanyak 0,5 gram kemudian diletakkan diatas kaca bulat yang berdiameter 15 cm, lalu kaca lainnya diletakan di atas gel dan didiamkan selama 1 menit, setelah itu

ditambahkan beban 50 gram beban didiamkan selama 1 menit dan selanjutnya letakan beban 100 gram dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian ukur diameter sebar gel (Seru *et al.*, 2021.).

9.7 Uji Cycling Test. Pada uji *cycling test* dilakukan sebanyak 6 siklus pada kisaran 12 hari dengan mengamati adanya perubahan atau tidak pada sediaan sesudah dan sebelum melakukan *cycling test*. Uji *cycling test* dilakukan dengan cara menyimpan sediaan gel selama 24 jam pada suhu rendah 4°C, lalu sediaan gel dipindahkan pada suhu tinggi 4°C selama 24 jam dalam perlakuan ini disebut satu siklus dan stabilitas sediaan dengan mengamati perubahan secara organoleptis, pH dan viskositas (Nuraini, 2023.).

10. Pembuatan Larutan

10.1 Larutan DPPH. Larutan DPPH dibuat dengan cara serbuk DPPH ditimbang sebanyak 15,8 mg dilarutkan menggunakan metanol p.a, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu dikocok hingga larut dan didapatkan konsentrasi larutan induk 158 ppm (Hotimah *et al.*, 2023).

10.2 Larutan Rutin. Rutin ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan menggunakan metanol dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas dan didapatkan konsentrasi 100 ppm. pembuatan larutan standar dipipet sebanyak 0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL, dan 1 mL dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur 10 mL dan tambahkan metanol sampai tanda batas, kemudian di pipet 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL selanjutnya ditambahkan 1 mL DPPH kemudian ditambahkan menggunakan metanol p.a sampai tanda batas, lalu dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometri (Yulia *et al.*, 2024.).

11. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Daun Sirsak

Sampel ekstrak daun sirsak dibuat untuk larutan induk dengan cara memasukkan 10 mg ekstrak daun sirsak dalam labu ukur 100 mL dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas, lalu dikocok sampai homogen dan didapatkan konsentrasi 100 ppm. Pembuatan larutan standar sampel dipipet sebanyak 2, 4, 6, 8, dan 10 mL dari larutan induk, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas, kemudian dikocok sampai homogen. Larutan kemudian di pipet 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL ditambahkan 1 mL DPPH lalu ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas, dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometri (Dewi *et al.*, 2024.).

12. Penetapan Panjang Gelombang DPPH

Larutan DPPH dengan konsentrasi 158 ppm dipipet sebanyak 2 mL, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambah metanol *p.a* (Hotimah *et al.*, 2023). Larutan dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur serapan panjang gelombang antara 400-600 nm dengan spektrofotometer Uv-Vis sehingga didapatkan panjang gelombang maksimum. Kisaran panjang gelombang DPPH yaitu 515-520 nm (Erika *et al.*, 2023).

13. Penentuan *Operating time*

Larutan ekstrak dan rutin dipipet sebanyak 1 mL, kemudian dimasukan kedalam labu ukur 5 mL, ditambah dengan metanol *p.a* sampai tanda batas. Selanjutnya larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum tiap menit selama 60 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Erika *et al.*, 2023).

14. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Larutan sampel ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm, dan larutan rutin dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm, kemudian diambil masing-masing 1 mL lalu tambahkan larutan DPPH 1 mL dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas. Larutan sampel ekstrak dan larutan rutin diinkubasi selama waktu yang didapat pada penentuan *operating time*, kemudian dibaca serapan absorbansinya (Dewi *et al.*, 2024).

15. Perhitungan Nilai IC₅₀

Untuk mengukur kemampuan sampel dalam menangkal radikal bebas, menggunakan nilai IC₅₀. Nilai ini menunjukkan berapa banyak sampel yang dibutuhkan untuk mengurangi aktivitas radikal bebas DPPH menjadi setengahnya. Nilai IC₅₀ didapat dari grafik yang menggambarkan hubungan antara jumlah sampel dan kemampuannya menghambat radikal bebas. Grafik ini dibuat dengan menggunakan persamaan garis lurus (regresi linier). Semakin tinggi persentase penghambatan, maka semakin kuat kemampuan antioksidan sampel tersebut (Dewi *et al.*, 2024).

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Blanko} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Blanko}} \times 100\%$$

E. Analisis data

Analisis yang dilakukan yaitu hasil yang didapatkan dihitung persentasenya dengan rumus peredaman

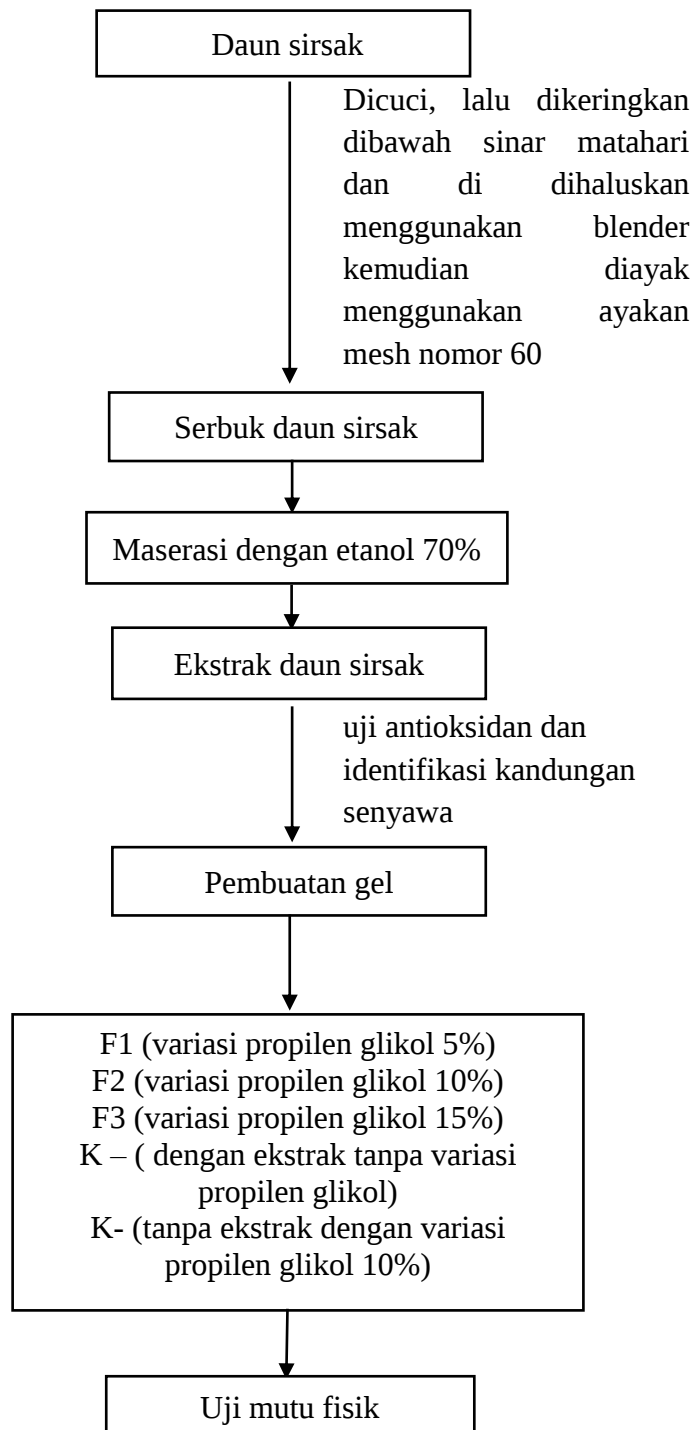
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Blanko}} \times 100\%$$

Dari hasil perhitungan persen (%) peredaman dimasukkan kedalam persamaan linier dengan rumus

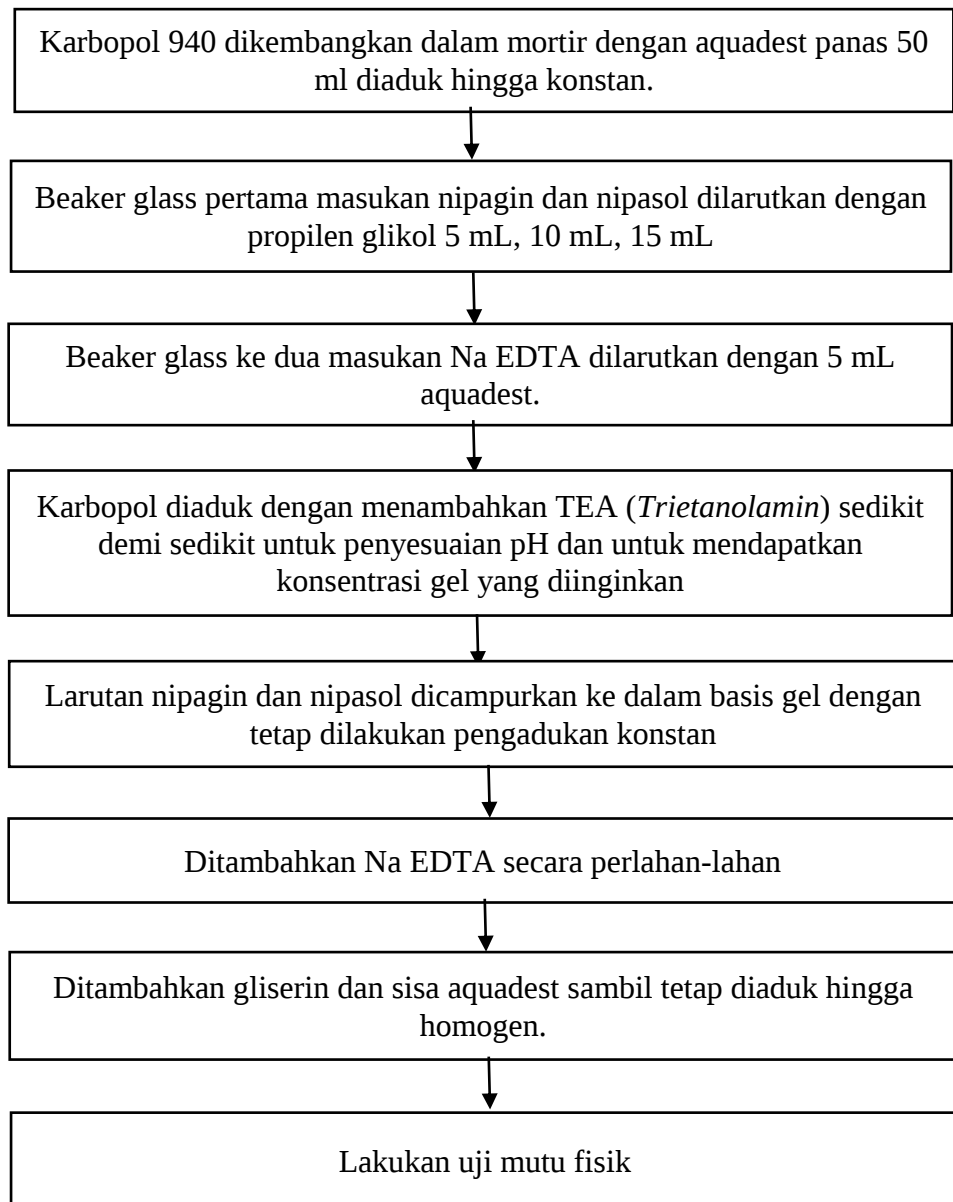
$$Y = aX + b$$

Persamaan linier yang dihasilkan digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} .

Data hasil perhitungan yang diperoleh dianalisis secara statistic menggunakan SPSS metode *one way* ANOVA dengan membandingkan aktivitas antioksidan pada setiap sampel untuk melihat apakah ada perbedaan nilai yang signifikan.

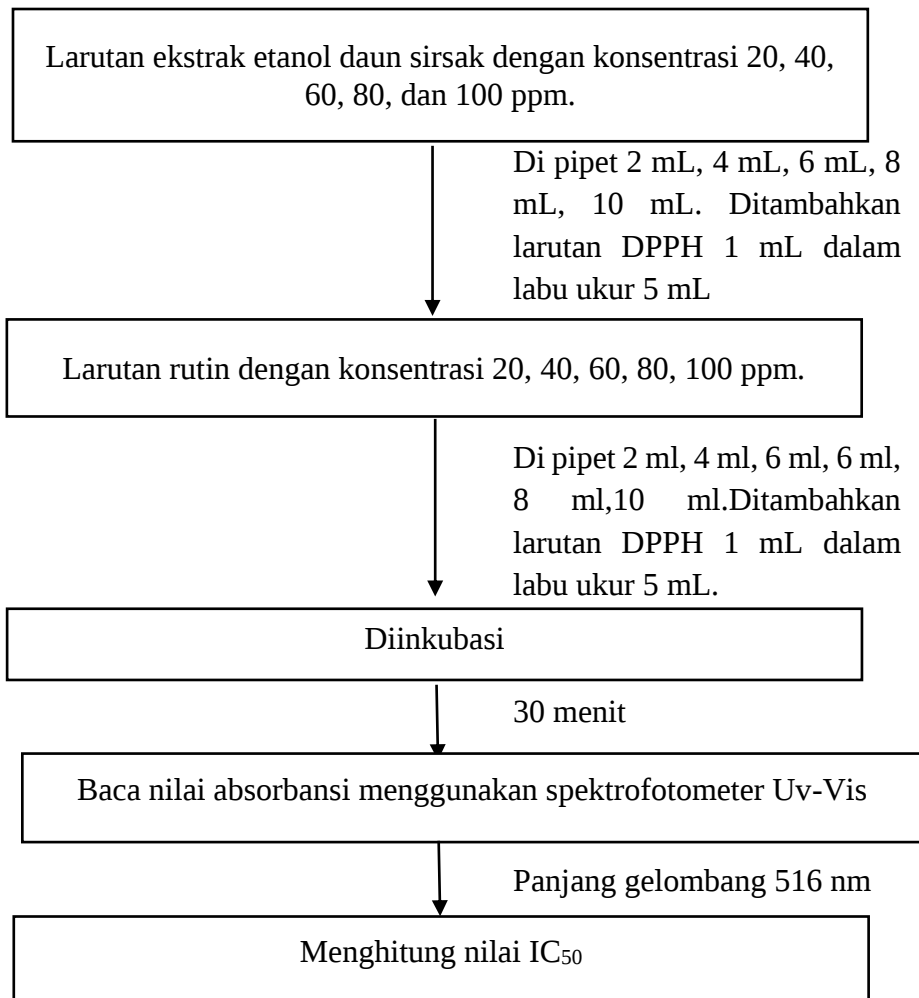
F. Skema rancangan jalannya penelitian**Gambar 10. Skema rancangan jalannya penelitian**

G. Skema pembuatan gel



Gambar 11. Skema pembuatan gel

H. Skema Pengujian Antioksidan



Gambar 12. Skema Pengujian Antioksidan