

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas An Nuur. Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai Juni tahun 2023.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan cara pengujian stabilitas fisik pada sediaan *spray gel* ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*). Ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) didapatkan dari ekstraksi dengan metode maserasi, kemudian ekstrak diuji kandungan senyawa kimia aktif.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah tanaman daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) yang diambil dari perkebunan belimbing manis yang berada di Desa Tarub, Kecamatan Tawangharjo, Kabupaten Grobogan.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bagian daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) yang berwarna hijau, segar, dan tidak berlubang.

3. Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik sampling purposive, yaitu merupakan teknik sampel dengan pertimbangan tertentu.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dari penelitian ini adalah uji stabilitas fisik sediaan *spray gel* ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*).

2. Klasifikasi Variabel Utama

a. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung. Dalam penelitian ini variabel bebasnya adalah ekstrak etanol daun belimbng manis (*Averrhoa carambola L.*) yang digunakan dalam pembuatan sediaan *spray gel*.

b. Variabel Tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel yang berdasarkan akibat dari variabel utama. Dalam penelitian ini variabel tergantungnya adalah uji skrining fitokimia pada ekstrak etanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*).

c. Variabel Terkendali

Variabel ini merupakan variabel yang diperlukan untuk referensi penelitian selanjutnya sehingga perlunya ditetapkan kualifikasinya agar hasilnya tepat. Variabel terkendali dari penelitian ini adalah uji stabilitas fisik sediaan *spray gel*.

E. Definisi Operasional Variabel Utama

1. Daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*)

Sampel daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) diperoleh dari perkebunan di Desa Tarub Kecamatan Tawangharjo Kabupaten

Grobogan. Untuk pemilihan sampel diambil daun yang sudah tua, segar, dan pengambilan daun di waktu pagi hari.

2. Serbuk

Pembuatan serbuk dengan cara pengumpulan sampel, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, dan sortasi kering.

3. Ekstrak etanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*)

Pada penelitian ini untuk memperoleh ekstrak daun belimbing manis dilakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dan pelarut yang digunakan adalah etanol 70%.

4. Pengujian kandungan senyawa kimia ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) menggunakan uji skrining fitokimia dan uji KLT.
5. Pembuatan sediaan *spray gel* dengan konsentrasi ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) dibuat berbeda yaitu 0,5%, 1%, dan 15%.
6. Uji stabilitas sediaan *spray gel* merupakan kemampuan suatu produk untuk mempertahankan sifat dan karakteristiknya agar sama dengan yang dimilikinya pada saat dibuat dalam batasan yang ditetapkan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan.
7. Uji stabilitas fisik yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu uji organoleptik, uji pH, uji viskositas, uji pola penyemprotan, uji waktu kering, uji homogenitas, uji sentrifugasi, dan uji *cycling test*.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu oven, sentrifugator, viskometer, timbangan analitik, lemari pendingin, indikator pH universal, gelas beker, gelas ukur, tabung sentrifugasi, pipet volume, pipet tetes, batang pengaduk, spatula, kaca preparat, mistar, *stopwatch* dan botol semprot.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu ekstrak daun belimbing manis, Na-CMC, propilen glikol, DMDM Hydantoin aquadest, plastik mika, tisu, asam klorida 2 N, Dragendoff, H_2SO_4 2N, $FeCl_3$, metanol, magnesium, HCL pekat, anhidrat asetat dan asam sulfat pekat.

G. Jalannya Alur Penelitian

1. Determinasi Tanaman Belimbing Manis (*Averrhoa carambola L.*)

Tahap awal dalam penelitian ini adalah determinasi tanaman daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta kemungkinan tercampur bahan tanaman lain.

2. Persiapan Simplicia dan Pengeringan Bahan

Pengumpulan bahan yang dilakukan dengan cara mengambil bagian daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) yang berwarna hijau dan segar. Selanjutnya dilakukan sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, penggilingan dan pembuatan ekstrak.

3. Susut Pengeringan

Susut pengeringan dilakukan untuk memberikan gambaran rentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Metode dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* dengan cara memasukan serbuk ke dalam alat *moisture balance*. Susut pengeringan yang baik adalah kurang dari 10%.

4. Pembuatan Ekstrak

Proses ekstraksi daun belimbing manis dilakukan menggunakan metode maserasi. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara menimbang 1000 gr serbuk daun belimbing manis ke dalam bejana maserasi menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 10000 ml dengan rasio bahan : pelarut sebesar 1:10. Kemudian diamkan selama 18 jam

pada 6 jam pertama aduk sesekali. Kemudian filtrat dipisahkan dari endapan menggunakan corong Butchner yang dilapisi kertas saring, lalu ulangi kembali dengan memberikan pelarut 5000 ml pada maserat tadi (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Kemudian ekstrak yang didapatkan dikentalkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C (Aisyah, 2019).

5. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan 0,5 gr ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) dan ditambahkan 8 tetes H_2SO_4 2N dan ditetesi dengan reagen *Dragendroff* sebanyak 3 tetes. Hasil ditandai dengan endapan jingga pada reagen *Dragendroff* (Rukmini *et al.*, 2019).

b. Uji Flavonoid

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5 gr dan ditambahkan 2 ml metanol yang sudah dipanaskan terlebih dahulu lalu dianginkan. Campuran tadi ditambahkan 0,1 gr magnesium dan 0,5 ml HCL pekat. Diketahui mengandung senyawa flavonoid jika terdapat perubahan warna kuning jingga (Alamsyah *et al.*, 2014).

c. Uji Tanin

Teteskan sampel sejumlah 3 tetes $FeCl_3$ 1%. Jika menunjukan warna hijau kehitaman maka mengandung tanin (Alamsyah *et al.*, 2014).

d. Uji Saponin

1 ml ekstrak ditambahkan 10 ml air panas lalu didingankan dan dikocok selama 1 menit. Hasil positif ditunjukan dengan buih atau busa selama kurang lebih 10 menit. Busa akan menjadi stabil jika ditetesi larutan asam klorida 2 N sebanyak 1 tetes (Alamsyah *et al.*, 2014).

e. Uji Steroid/Triterpenoid

Ekstrak dilarutkan dengan n-heksana dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 tetes anhidrat asetat dan kemudian 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya steroid ditandai dengan munculnya warna biru sedangkan adanya triterpenoid akan ditandai dengan timbulnya warna merah (Abtian *et al.*, 2019).

6. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase diam yang dipakai yaitu siliki GF₂₅₄ ukuran 10x2 cm, kemudian diaktifkan dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 15 menit. Ekstrak etanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) ditotolkan pada fase diam dengan pipa kapiler. Untuk fase gerak pada setiap senyawa diidentifikasi berdasarkan golongan senyawa:

a. Golongan Alkaloid

Fase gerak : Etil asetat : methanol : air (6:4:2)

Baku pembanding : Piperin

Penampak noda : Perekensi *dragendorff* akan timbul warna coklat atau jingga setelah penyemprotan perekensi *dragendorff* menunjukan adanya alkalois dalam ekstrak (Devi, 2020).

b. Golongan Flavonoid

Fase gerak : n-butanol: asam asetat: air (4:1:5)

Penampak noda : Noda amonia

Baku pembanding : Kuersetin

Pengamatan pada sinar UV₃₆₅ sebelum diuapkan dengan ammonia, jika positif menampakan warna ungu gelap, fluoresensi biru muda, dan tidak tampak. Penampakan noda dengan ammonia menunjukan warna kuning, hijau kuning, atau coklat, biru muda, merah atau jingga, fluoresensi hijau kuning, atau hijau biru, fluoresensi biru muda terang hingga muda dengan tipe flavonoidnya (Hanani, 2014).

c. Golongan Tanin

Fase gerak : metanol:air (6:4)

Penampak noda : Pereaksi FeCl_3 5%

Buku pembanding : Katekin

Reaksi positif ditunjukan dengan terbentuknya noda berwarna hitam (Banu, 2014).

d. Golongan Saponin

Fase gerak : Kloroform : methanol : air (13:7:2)

Penampak noda : *Lieberman Bouchardat*

Buku pembanding : sapogenin

Jika timbul warna hijau setelah penyemprotan *Lieberman Bouchardat* menunjukan adanya senyawa saponin jenis steroid dalam ekstrak (Nafisah *et al.*, 2014).

e. Golongan Triterpenoid

Fase gerak : n-heksan : etil asetat (4:1)

Penampak noda : anisaldehid asam sulfat

Buku pembanding : β -sitosterol

Hasil positif triterpenoid / steroid apabila timbul warna ungu-merah atau ungu setelah pereaksi anisaldehid asam sulfat (Budi *et al.*, 2020).

Setelah itu masing - masing dimasukkan ke dalam chamber dan dibiarkan sampai jenuh. Lalu chamber dijenuhkan dengan kertas saring setelah jenuh silika GF_{254} yang sudah ditotol dimasukkan kedalam chamber, setelah noda sampai pada batas atas lempeng kemudian diambil dan diamati hasil bercak noda dibawah sinar UV_{254} nm dan UV_{366} nm. Kemudian fase gerak disemprot dengan menggunakan pereaksi semprot yaitu pereaksi amonia untuk golongan Flavonoid, penyemprotan pereaksi *Dragendorff* untuk golongan alkaloid, reaksi *Lieberman burchard* untuk deteksi golongan saponin, penyemprotan reaksi FeCl_3 untuk deteksi golongan tannin dan penyemprotan pereaksi anisaldehid asam sulfat untuk deteksi triterpenoid. Lalu Nilai

Rf (Retention faktor) dan HRF dihitung dari bercak yang didapat. Harga Rf dihitung dengan menggunakan perbandingan sebagaimana persamaan sebagai berikut (Gandjar, 2013).

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh zat yang diteliti}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

7. Formulasi Sediaan *Spray Gel*

Formulasi pembuatan sediaan *spray gel* pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan *Spray Gel*

Bahan	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	Fungsi Bahan
Ekstrak etanol daun belimbing manis	0,5	1	1,5	Zat aktif
Na-CMC	0,3	0,3	0,3	<i>Gelling agent</i>
Propilen glikol	15	15	15	Humektan
DMDM hydantoin	0,6	0,6	0,6	Pengawet
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	Pelarut

8. Prosedur Pembuatan *Spray Gel*

Pembuatan *spray gel* dimulai dengan menyiapkan alat dan bahan kemudian ditimbang bahan-bahan yang dibutuhkan sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Na-CMC sebagai *gelling agent* didispersikan ke dalam sebagian air panas dan dihomogenkan hingga membentuk massa gel yang transparan (campuran 1). Pada wadah terpisah, ekstrak etanol daun belimbing manis dilarutkan dengan propilen glikol dan ditambahkan DMDM Hydantion kemudian diaduk hingga homogen (campuran 2). Campuran 1 ditambahkan ke dalam campuran 2 kemudian diaduk hingga benar-benar tercampur dan ditambahkan aquadest hingga batas 100 ml.

9. Uji Stabilitas Fisik Sediaan *Spray Gel*

a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan cara melihat tampilan fisik dari sediaan, meliputi tekstur, warna, dan aroma.

b. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan cara mengukur pH sediaan menggunakan ph universal. Kertas pH universal dicelupkan ke dalam sediaan sebanyak 20 ml dan dilakukan pengamatan terjadinya perubahan warna pada pH. Warna yang muncul pada kertas pH universal kemudian dicocokan dengan warna pada indikator pH yang terdapat pada kemasan pH universal (Pujiastuti A *et al.*, 2019).

c. Uji Viskositas

Pengujian viskositas menggunakan viskometer Rion VT-04. Sediaan dimasukkan ke dalam gelas beker sebanyak 100 ml, rotor yang digunakan yaitu rotor nomor 3, kemudian dicelupkan ke dalam sediaan hingga alat menunjukkan nilai viskositas sediaan. Nilai viskositas yang ditunjukkan pada alat viskometer merupakan nilai viskositas sediaan (Hayati *et al.*, 2019).

d. Uji Pola Penyemprotan

Pengujian ini dilakukan dengan cara sediaan disemprotkan pada selembar plastik mika dengan jarak 3 cm, 5 cm, dan 10 cm. Diamati kondisi semprotan dan diameter dari pola semprot yang terbentuk. Diameter dari pola semprot yang terbentuk diukur menggunakan penggaris. Setelah sediaan disemprotkan, lembar plastik mika ditimbang dan dihitung bobot sediaan yang menempel pada plastik mika sebagai banyaknya sediaan yang keluar (gram) setiap semprot (Fitriansyah *et al.*, 2016).

e. Uji Waktu Kering

Pengujian waktu kering dilakukan dengan cara *spray gel* disemprotkan langsung pada sisi dalam dari lengan bawah sekitar

0,11-0,25 gram kemudian dihitung waktu menggunakan *stopwatch* hingga sediaan yang disemprotkan menjadi kering (Fitriansyah *et al.*, 2016).

f. Uji Homogenitas

Pengujian ini dilakukan dengan cara *spray gel* untuk setiap formula disemprotkan pada kaca objek sekitar 0,11-0,25 gram kemudian diamati sebaran partikel yang terbentuk secara visual untuk partikel tidak larut (Salwa *et al.*, 2020).

g. Uji Sentrifugasi

Pengujian ini dilakukan sebanyak satu kali awal sediaan dibuat. Sediaan sebanyak 10 ml dimasukan ke dalam tabung sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit (Cendana *et al.*, 2021).

h. *Cycling test*

Pengujian ini dilakukan selama enam siklus dimana satu siklus dilakukan dengan cara sediaan disimpan di dalam suhu lemari pendingin $4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam kemudian diletakkan ke suhu $40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam sehingga setiap siklus terdiri atas dua hari. Setelah satu siklus selesai dilihat apakah ada perubahan pada organoleptik, pH, dan viskositas dari sediaan (Nawangsari *et al.*, 2021).

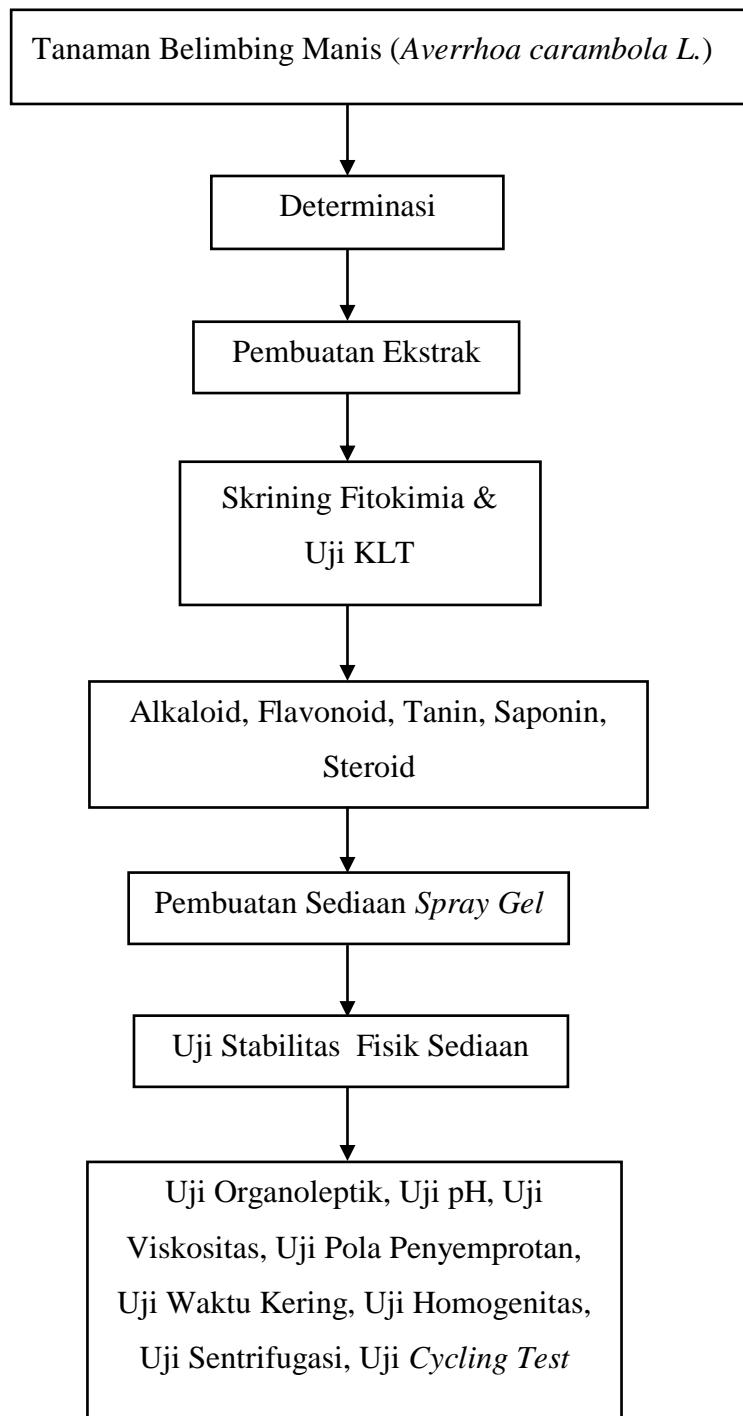
H. Analisis Data

Analisis data hasil pengujian sediaan *spray gel* meliputi uji organoleptik, uji pH, uji viskositas, uji pola penyemprotan, uji waktu kering, uji homogenitas, uji sentrifugasi, dan *cycling test*. Sebagai alat statistika parametrik, maka untuk dapat menggunakan rumus ANOVA harus terlebih dahulu perlu dilakukan uji asumsi meliputi normalitas dan homogenitas. Data hasil uji organoleptik dianalisis menggunakan tabulasi data. Uji pH, uji viskositas, uji pola penyemprotan, uji waktu kering, uji homogenitas, uji sentrifugasi, dan uji *cycling test* dilakukan dengan

menggunakan uji *one way* ANOVA menggunakan program IBM SPSS *Statistic* ver. 26 (Anindhita *et al.*, 2020).

I. Kerangka Konsep

Gambar 3.1 Kerangka Konsep



J. Hipotesis

1. Ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) memiliki kandungan senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid.
2. Ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) dapat dijadikan sediaan *spray gel*.
3. Pada formulasi yang tertinggi konsentrasi ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) mempunyai uji stabilitas yang baik.

K. Kerangka Penelitian

Gambar 3.2 Kerangka Penelitian

