

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas An Nuur dan Laboratorium Kimia Universitas Kristen Satya Wacana. Determinasi dilaksanakan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Kalisoro, Kec. Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah pada Februari-Juli 2023.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk ke dalam penelitian eksperimental dengan pengujian kandungan antioksidan pada ekstrak daun jambu air (*Syzygium samarangense*) dengan metode DPPH. Proses yang dilakukan untuk mendapatkan ekstrak jambu air dilakukan dengan cara maserasi, kemudian diuji kandungan senyawa kimia. Setelah itu dibuat sediaan *face mist*, diuji evaluasi sediaan dan diuji antioksidannya. Pengujian antioksidan dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahap pertama adalah dengan membuat larutan DPPH, larutan blanko dan larutan standar induk. Setelah itu, dilakukan optimasi panjang gelombang maksimum DPPH. Tahap selanjutnya adalah pembuatan deret larutan standar, pembuatan variasi larutan uji, uji aktivitas antioksidan, dan perhitungan nilai IC_{50} .

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dari pengujian ini ialah tanaman daun jambu air (*Syzygium samarangense*) yang diambil dari perkebunan jambu air Desa Tambakan, Kecamatan Gubug, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang dipakai adalah daun jambu air (*Syzygium samarangense*) yang berwarna hijau, segar, dan tidak terserang hama.

3. Teknik Sampling

Teknik yang digunakan adalah teknik sampling *purposive*, yaitu sampel yang ditentukan setelah melakukan pertimbangan tertentu.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang berubah secara disengaja. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam pembuatan sediaan *face mist*.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung merupakan kriteria penelitian yang berpusat pada persoalan. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan ekstrak daun jambu air (*Syzygium samarangense*) pada sediaan *face mist* dengan konsentrasi yang berbeda menggunakan metode DPPH.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel tergantung pada penelitian adalah pembuatan ekstrak, peralatan yang digunakan, pembuatan *face mist*, dan laboratorium.

E. Definisi Operasional Utama

1. Daun jambu air (*Syzygium samarangense*) yang diambil dari perkebunan jambu air Desa Tambakan, Kecamatan Gubug, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah. Daun jambu air (*Syzygium samarangense*) dipilih yang berwarna hijau, segar, dan tidak terserang hama.
2. Serbuk daun jambu air (*Syzygium samarangense*) diperoleh dengan cara sampel yang telah diambil, dicuci, dirajang, dikeringkan, kemudian dilakukan penggilingan dan pengayakan. Setelah itu di uji kadar air dan susut pengeringan.
3. Ekstrak daun jambu air (*Syzygium samarangense*) didapat dari proses perendaman serbuk dengan pelarut etanol 70% yang dipekatkan pada suhu 40°C. Setelah itu di uji bebas etanol.

4. Pengujian kandungan senyawa kimia ekstrak daun jambu air (*Syzygium samarangense*) menggunakan skrining fitokimia dan Kromatografi Lapis Tipis.
5. Pembuatan sediaan *face mist* dengan konsentrasi ekstrak 3 gram sebagai FI, 5 gram sebagai FII dan 7 gram sebagai FIII.
6. Uji evaluasi sediaan untuk mengetahui mutu fisik dari sediaan *face mist* yang telah dibuat, dengan perbedaan konsentrasi ekstrak yang berbeda.
7. Uji aktivitas antioksidan untuk mengetahui nilai IC_{50} yang digunakan untuk menganalisis seberapa kuat kandungan antioksidan yang dimiliki oleh ekstrak daun jambu air (*Syzygium samarangense*) pada sediaan *face mist* dengan konsentrasi ekstrak yang berbeda.
8. Metode DPPH Ialah prosedur pengujian antioksidan yang memiliki keunggulan seperti analisis yang sederhana dan lebih peka terhadap sampel dengan konsentrasi rendah, sehingga efektif untuk menganalisis kandungan antioksidan dalam ekstrak daun jambu air (*Syzygium samarangense*).

F. Jalan Penelitian

G. Alat dan Bahan

1. Alat

Oven, Blender, ayakan Mesh no.40, *moisture balance*, botol maserator, timbangan digital, kertas saring, *rotary evaporator*, lumpang, alu, botol *spray*, tabung reaksi, pipet tetes, *hotplate*, Sinar UV 366 nm dan 254 nm, *chamber*, silica gel GF₂₅₄/plat KLT, labu ukur, pH *Thermo Scientific*, piknometer, kertas mika, penggaris, labu ukur, botol vial, vortex, kuvet, botol gelap spektrovotometer UV-Vis.

2. Bahan

Daun jambu air (*Syzygium samarangense*), gliserin, PVP, aquadest, etanol 70%, etanol 95%, HCl 2N, serbuk magnesium, FeCl₃ 5%, n-butanol, asam asetat, air, ammonia, kuersetin, klorofom, *Liebermann-bouchard*, sapogenin, katekin, n-heksan, etilasetat, β -sitosterol, Serbuk DPPH, vitamin C, ekstrak daun jambu air (*Syzygium samarangense*).

1. Determinasi

Determinasi merupakan mencocokan, membandingkan, atau menyamakan tumbuhan satu dengan yang lain yang sudah dikenal sebelumnya (Suroso SKT, 2019). Daun jambu air (*Syzygium samarangense*) akan di determinasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Kalisoro, Kec. Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan dan Pengeringan Bahan

Pengumpulan bahan dilakukan dengan cara mengambil daun jambu air (*Syzygium samarangense*) yang segar, berwarna hijau, dan bebas dari penyakit. Selanjutnya, dilakukan sortasi basah dan dibersihkan supaya tidak ada kotoran, tiriskan daun kemudian potong kecil-kecil. Daun dikeringkan selama 7 hari, dengan cara menjemur daun dibawah sinar matahari dengan kain hitam sebagai penutup (Permatasari, 2016).

3. Kadar Air

Kadar air dilakukan agar kandungan air pada simplisia diketahui. Metode untuk uji kadar air menggunakan cara gravimetri. Serbuk ditimbang sebanyak 10 g, kemudian dikeringkan selama 5 jam dengan suhu 105°C, setelah itu serbuk ditimbang dan dikeringkan kembali selama 1 jam, dan ditimbang kembali. Kadar air yang baik adalah kurang dari 10% (Noviana, et.al., 2022).

4. Susut Pengeringan

Susut pengeringan digunakan untuk mendeskripsikan banyaknya senyawa yang lenyap pada proses pengeringan. Alat yang digunakan adalah *moisture balance*. Selama 10 menit alat dinyalakan dan dipanaskan, kemudian diatur menggunakan menu, dipilih metode yang akan dilakukan. Masukan dan ratakan ekstrak ke dalam wadah pada alat *moisture balance* kemudian tutup dan tunggu sampai lampu mati. Catat hasil dan hitung rata-ratanya. Saat suhu alat mencapai 30°C matikan alatnya (Fadhila N.Z., et.al., 2021).

5. Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi daun jambu air (*Syzygium samarangense*) menggunakan metode maserasi. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara simplisia di destruksi atau dihancurkan dengan *food processor* sampai lumat dan disaring menggunakan ayakan mesh nomor 40. Setelah itu, ditimbang sebanyak 1 kg serbuk simplisia kering dan 10L (10000 ml) pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1 : 10, kemudian dimasukan ke dalam botol maserasi. Perendaman dilakukan selama 18 jam, saat 6 jam pertama aduk sesekali. Maserat disaring, kemudian maserasi kembali dengan pelarut sebanyak 1 : 5 (5L/5000 ml). Pengentalan ekstrak dilakukan dengan *rotary evaporator* kemudian dihitung rendemen yang diperoleh dengan rumus (Kementerian Kesehatan RI, 2017) :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

6. Uji Bebas Etanol

Tambahkan H_2SO_4 dan CH_3COOH pada ekstrak kemudian dipanaskan. Apabila tercium bau khas eter, maka ekstrak mengandung etanol (Kurniawati, 2015).

7. Uji Kandungan Kimia

a. Pemeriksaan Flavonoid

Tambahkan 5 ml aquades pada 0,5 gram ekstrak, dipanaskan dalam waktu 5 menit dan saring. Hasil penyaringan dikocok setelah penambahan 0,1 serbuk Mg dan 1 ml HCL. Apabila positif menghasilkan warna kuning, merah, atau jingga (Dewi, *et. al*, 2021).

b. Pemeriksaan Saponin

Tambahkan 10 ml air panas pada 2 ml ekstrak, kocok selama 1 menit. Tambahkan 2 tetes HCL 2 N, tunggu selama 7 menit, apabila busa tetap stabil maka hasil positif mengandung saponin (Wijaya, *et.al.*, 2014).

c. Pemeriksaan Tanin

Siapkan 5 ml ekstrak, kemudian teteskan 2-3 tetes FeCl_3 , apabila positif mengandung tannin, larutan berubah warna menjadi hijau tua (Manongko, 2020).

d. Pemeriksaan Triterpenoid

Ekstrak kental dilarutkan dengan n-heksan, diambil 2 ml. Pada tabung reaksi yang berisi campuran ekstrak dan n-heksan ditambahkan 1 ml CH_3COOH glasial dan 1 ml H_2SO_4 . Hasil positif triterpenoid apabila terdapat cincin biru atau hijau (Fajriaty, *et.al.*, 2018).

e. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Siapkan fase diam silica gel GF₂₅₄/plat KLT dengan panjang 6,5 cm dan lebar 3 cm. Bersihkan menggunakan metanol, kemudian lakukan aktivasi dengan oven pada suhu 105°C selama 30 menit. Untuk penotolan pada silica gel, dibuat sebanyak 10 ml ekstrak dan dilarutkan dengan 1 ml etanol

1) Identifikasi Senyawa Flavonoid

Fase gerak yang digunakan adalah n-butanol : asam asetat : air dengan perbandingan (4:1:5). Penampak noda uap yang digunakan adalah ammonia dengan baku pembanding kuersetin. Hasil menunjukkan terbentuknya noda berwarna biru pada lampu UV 366 nm dan berwarna hitam pada lampu UV 254 nm. Pada hasil setelah penguapan ammonia, menghasilkan warna bercak berwarna biru (Jawa, *et.al.*, 2021).

2) Identifikasi Senyawa Saponin

Fase gerak klorofom : metanol : air (10:7:4). Baku pembanding yang digunakan adalah sapogenin. Apabila terjadi pembentukan warna hijau kekuningan pada UV 366 nm dan 254 nm dan setelah penyemprotan *Lieberman-Bouchard* menghasilkan warna hijau kuning, maka hasil dinyatakan positif mengandung saponin (Zaini *et.al.*, 2020).

3) Identifikasi Senyawa Tanin

Siapkan fase gerak metanol : air dengan perbandingan (6:4).

Penampak noda yang digunakan adalah pereaksi FeCl_3 5%. Baku pembanding yang digunakan adalah katekin. Apabila terbentuk noda hitam pada lampu UV 366 nm dan 254 nm dan setelah penyemprotan FeCl_3 5% menghasilkan warna hitam, maka dinyatakan positif mengandung tanin (Yuda, *et.al*, 2017).

4) Identifikasi Senyawa Triterpenoid

Siapkan fase gerak n-heksan : etilasetat (5:5) dengan baku pembanding β -sitosterol. Penampak noda *Lieberman Bouchard*. Hasil positif apabila timbul noda bercak warna biru pada lampu UV 366 nm (Chotimah, *et.al*, 2020) dan hitam pada lampu UV 254 nm (Yuda, *et.al*, 2017), setelah disemprot *Lieberman Bouchard* menghasilkan warna hitam (Fajriaty, *et.al.*, 2018).

8. Pembuatan Sediaan *Face Mist*

Formulasi acuan *face mist* yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Face Mist

Nama Bahan	Komposisi				Kegunaan
	F0 (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	
Ekstrak daun jambu air	-	3	5	7	Zat Aktif
Gliserin	20	20	20	20	Pelembab, Bahan tambahan
PVP	4	4	4	4	Basis
Aquadest	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	

Face mist dibuat dengan cara menyiapkan alat dan bahan kemudian ditimbang. Mortir dipanaskan terlebih dahulu, setelah itu masukan ekstrak daun jambu air (*Syzygium samarangense*) ke mortir. Larutkan PVP dan gliserin

dalam air panas, kemudian masukan ke dalam mortar yang berisi ekstrak. Gerus sampai homogen, dan masukan ke dalam botol *spray*. Setelah itu, tambahkan aquadest sampai 100 ml (Apristasari, 2018).

9. Evaluasi Sediaan (Mutu Fisik)

a. Uji Organoleptik

Pengujian dilakukan dengan mengamati warna, aroma, dan bentuk dari preparat sampel (Herliningsih *et.al.*, 2021).

b. Uji pH

Dilakukan untuk mempertahankan standar pH kulit yang baik berkisar 4,5-6,5. Alat yang digunakan adalah pH *Thermo Scientific* (Herliningsih; *et.al.*, 2021).

c. Uji Bobot Jenis

Dilaksanakan dengan menimbang dan menghitung bobot dari W1 sebagai piknometer kosong, W2 sebagai piknometer yang diisi aquadest, dan (W3) sebagai piknometer yang berisi sampel dan dihitung hasil bobot jenisnya dengan rumus (Herliningsih *et.al.*, 2021) :

$$\text{Bobot jenis} = \left(\frac{W_1 + W_2}{W_1 + W_3} \right)$$

Nilai bobot jenis yang memenuhi standar jika bobot jenis *face mist* lebih tingi dari bobot jenis air, yaitu 1 g/mL (Herliningsih *et.al.*, 2021).

d. Uji Daya Semprot

Sediaan disemprot dengan jarak 5 cm pada kertas mika, dan diukur menggunakan penggaris untuk mengetahui daya sebar dengan diameter sebagai parameter (Fitriansyah, 2016).

e. Uji Waktu Kering

Menghitung waktu cairan yang disemprotkan pada lengan bagian dalam sampai mengering. (Firmansyah, 2016).

10. Uji Antioksidan

a. Pembuatan Larutan

1) Larutan DPPH

Membuat larutan DPPH 0,1 mM dengan melarutkan 2 mg serbuk DPPH dengan 50 ml etanol 95%. Simpan kedalam botol gelap (Pamungkas, D.K., 2016).

2) Larutan Blanko

Homogenkan 2 ml larutan DPPH 0,1 mM dengan 1 ml etanol p.a. Inkubasi pada suhu kamar (25-30°C) selama setengah jam (Utami, 2020).

3) Larutan standar induk Vitamin C 100 ppm

Larutkan 10 mg asam askorbat (vit.C) dengan etanol p.a, homogenkan dan cukupkan sampai 100 ml sebagai larutan induk (Asjur A.V.,*et.al* 2022).

b. Optimasi Panjang Gelombang Maksimum DPPH

2 ml larutan DPPH 0,1 mM dan 1 ml etanol p.a. dikocok dengan vortex dan dituang ke dalam kuvet. Ukur serapan pada panjang gelombang 400-800 nm (Ikhlas N., 2020).

c. Pembuatan Deret Larutan Standar Vitamin C

Dibuat deret konsentrasi 10; 20; 30; 40 dan 50 ppm. Tambahkan 1 ml larutan DPPH 0,1 mM pada masing-masing labu ukur homogenkan dan inkubasi dengan suhu 30°C. Kemudian ukur serapan pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Asjur A.V.,*et.al* 2022)

d. Pembuatan Variasi Larutan Uji

Larutan induk 100 ppm dibuat dengan cara melarutkan etanol p.a dengan 10 mg *face mist*, cukupkan volume sampai 100 ml. Deret konsentrasi yang dibuat 10; 20; 30; 40 dan 50 ppm. Tiap konsentrasi dipipet sebanyak 2 ml ke dalam vial dan tiap konsentrasi ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,1 mM. Kocok dengan vortex dan diamkan pada suhu

kamar di tempat gelap selama setengah jam. Ukur absorban pada panjang gelombang maksimum (Asjur A.V.,*et.al* 2022).

e. Pengujian Antioksidan dengan Metode DPPH

Ukur serapan deret larutan sampel, deret larutan asam askorbat (Vit. C), dan blanko dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum. Nilai presentase hambatan DPPH dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\% \text{ absorbansi blanko-absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

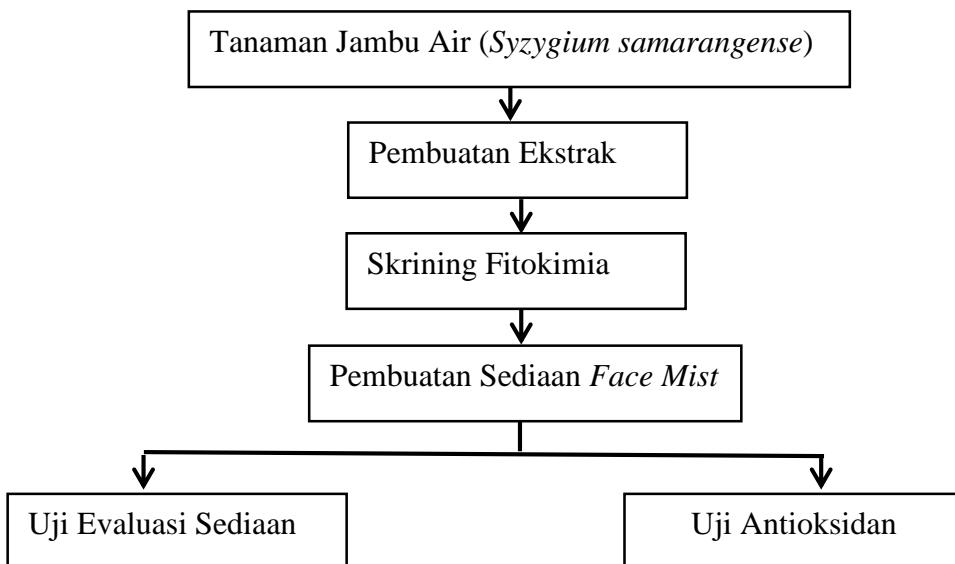
f. Perhitungan Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ diperoleh pada persamaan linear $Y = ax + b$ dengan konsentrasi (ppm) sebagai absis (X) dan nilai presentase inhibisi sebagai ordinat (Y) (Lidia, *et.al.*, 2019).

H. Analisa Data

Analisa data hasil pengujian sediaan *face mist* meliputi uji evaluasi sediaan dan uji antioksidan, menggunakan program IBM SPSS *Statistic ver. 25*. Data hasil uji SPPS yang dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan syarat data terdistribusi normal dan homogen dengan nilai signifikansi ≥ 0.05 . Jika data tidak normal dan homogen ≤ 0.05 , analisis dilakukan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann Whitne* (Halim, 2021).

I. Kerangka Konsep



J. Hipotesis

1. Ekstrak daun jambu air (*Syzygium samarangense*) dapat dibuat sediaan *face mist*.
2. Sediaan *face mist* ekstrak daun jambu air (*Syzygium samarangense*) dapat dibuat dengan mutu fisik yang baik.
3. Terdapat nilai IC₅₀ yang baik dalam formula sediaan *face mist*.

K. Kerangka Penelitian

