

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimen dengan kuersetin sebagai kontrol positif dan VCO sebagai basis sabun cair.

B. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium farmasetika, Teknologi sediaan Farmasi, Farmasi bahan alam Prodi Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2023 - Mei 2024

C. Objek penelitian

Objek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan sabun cair fraksi metanol bunga Flamboyan (*Delonix regia Raf.*).

D. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sediaan sabun cair fraksi metanol bunga Flamboyan (*Delonix regia Raf.*)

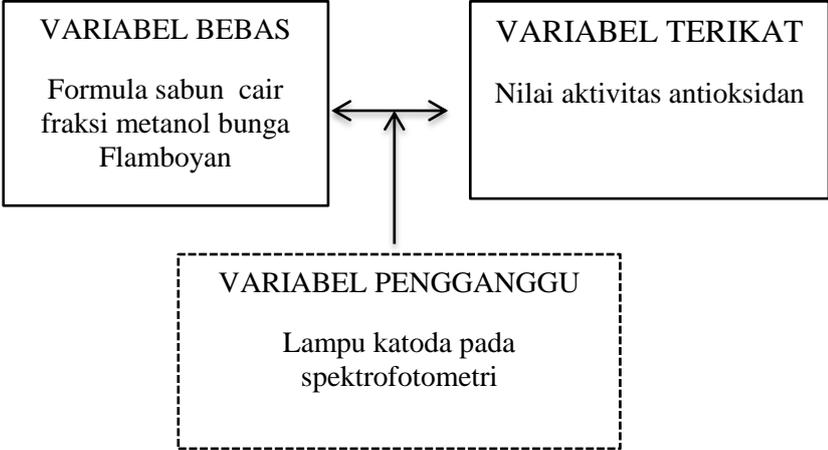
2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai aktivitas antioksidan.

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu dalam penelitian ini adalah lampu katoda dari spektrofotometri.

E. Kerangka konsep



Keterangan: : ~~—~~ yang diteliti

Gambar 1. Hubungan antar variabel

F. Definisi operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala
1	Bunga Flamboyan	Bunga yang diperoleh dari kelurahan Liliba kecamatan Oebobo kota Kupang	Nominal
2	Ekstrak bunga Flamboyan	Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk bunga Flamboyan menggunakan pelarut etanol 70%	Nominal
3	Fraksi metanol ekstrak bunga Flamboyan	Bagian yang dipisahkan dari ekstrak dengan pelarut metanol air (1:1 v/v)	Nominal
4	Sabun mandi cair bunga Flamboyan	Sabun cair yang diformulasikan menggunakan ekstrak bunga Flamboyan sebagai bahan aktifnya dengan VCO sebagai basis	Nominal
5	Aktivitas antioksidan	Kemampuan sabun cair ekstrak etanol bunga Flamboyan yang dapat meredam radikal DPPH (<i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>) berdasarkan nilai IC ₅₀	Rasio
6	IC ₅₀	Konsentrasi sampel sabun cair ekstrak etanol bunga Flamboyan yang dapat meredam 50% kadar DPPH	Rasio
7	AAI	Indeks pengujian yang diperoleh dari pengujian aktivitas antioksidan sabun cair fraksi metanol bunga Flamboyan berdasarkan metode DPPH	Rasio
8	Metode DPPH	Metode yang digunakan untuk menguji nilai aktivitas antioksidan dari sabun cair ekstrak etanol bunga Flamboyan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis	Nominal
9	Spektrofotometri uv-vis	Alat yang digunakan untuk melakukan pengukuran nilai aktivitas antioksidan sabun cair ekstrak etanol bunga Flamboyan	Interval

G. Alat dan bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan diantaranya seperangkat alat gelas (pyrex), timbangan analitik (shimadzu AUX 320), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu tipe UV-1700), pipet mikro (dragonlab), *rotary evaporator* (yuchengtech), cawan porselin, kertas saring, tissue (passeo), kain flannel, batang pengaduk (*pyrex*), pipet tetes (*pyrex*), aluminium foil, Hot plate (thermoFisher), bola hisap (D&N), Botol kaca.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl*, ekstrak bunga Flamboyan, KOH , VCO, minyak zaitun, asam stearate, gliserin, natrium lauril sulfat, cocomod DEA, NaCl, HPMC, oleum rosae, aquadest, alcohol 70% (pa Merck), HCl 2 N (pa Merck), reagen Meyer, FeCl₃ 3% (paMerck), NaOH, H₂SO₄, serbuk Zn.

H. Prosedur penelitian

1. Pengambilan bahan

Bunga Flamboyan diambil di Kelurahan Liliba, Kota Kupang

2. Pembuatan serbuk simplisia

Sampel bunga Flamboyan yang telah diambil dilakukan sortasi basah kemudian dicuci dengan air mengalir lalu ditimbang berat basahnya selanjutnya dikeringkan dibawah sinar matahari dan ditutup menggunakan kain hitam. Setelah kering dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan pengotor kemudian ditimbang untuk mengetahui berat

kering simplisia. Simplisia yang sudah kering dihaluskan dengan cara diblender kemudian diayak dengan ayakan No. 60 mesh lalu ditimbang sesuai kebutuhan (Depkes RI, 2008).

3. Maserasi serbuk simplisia bunga Flamboyan

Sebanyak 500 gram serbuk simplisia bunga Flamboyan ditimbang kemudian dimaserasi dengan 3.750 ml etanol 70% pada suhu kamar selama tiga hari, lalu disaring dengan sesekali pengadukan. Pengadukan bertujuan untuk menghomogenkan konsentration larutan. Ampas hasil maserasi kemudian dilakukan remaserasi dengan menggunakan 1.250 ml etanol 70% pada suhu kamar selama dua hari, lalu disaring. Ekstrak yang didapat selanjutnya digabungkan dan disaring menggunakan kertas saring. Kemudian pelarut dihilangkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 60⁰, Kemudian dipekatkan di water bath hingga mendapatkan ekstrak kental berupa cairan kemudian ditimbang dan dihitung rendemannya (Depkes RI, 2008)

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

4. Fraksi metanol air ekstrak etanol 70% bunga Flamboyan

Fraksinasi ekstrak etanol 70% bunga Flamboyan dengan partisi cair-cair. Setiap 5 gram ekstrak kental diencerkan dengan 25 ml. metanol:air (1:1 v/v), diaduk hingga homogen, ditambahkan n-heksana (1:1 v/v) dalam jumlah yang sama dalam corong pisah, dikocok kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Fraksi n-heksana dipisahkan sedangkan fraksi metanol-air difraksinasi lagi dengan etil asetat (1:1 v/v). Fraksi etil

asetat dan fraksi metanol-air kemudian dipisahkan. Fraksinasi dilakukan sampai diperoleh fraksi yang jernih. Setiap fraksi dipekatkan dengan waterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh fraksi yang kental. Pada penelitian ini digunakan fraksi metanol-air.

5. Skrining fitokimia

a. Identifikasi alkaloid

Ke dalam 0,5 g ekstrak kental ditambahkan 2 mL etanol 70% kemudian diaduk. Campuran disaring dan ke dalam filtrat ditambahkan sedikit air panas. Setelah dingin diambil dan dibagi menjadi 3 tabung, kemudian ditambahkan pereaksi Dragendorf, Meyer, dan Wagner. Keberadaan alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan merah pada pereaksi Dragendorf, dan endapan coklat pada endapan pereaksi Wagner (Forestryana & Arnida, 2020).

b. Identifikasi flavonoid

Sebanyak 0,1 g ekstrak kental dilarutkan dalam 10 mL etanol kemudian dibagi ke dalam empat tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai kontrol positif, tabung kedua berisi sampel ditambah NaOH, tabung ketiga berisi sampel ditambah H₂SO₄ pekat, dan tabung keempat berisi sampel ditambah serbuk Mg. Perubahan warna yang terjadi pada tabung kedua, ketiga dan keempat diamati dan dibandingkan dengan tabung kontrol positif. Jika terjadi perubahan warna, maka sampel positif mengandung

flavonoid (Tjitda & Nitbani, 2019)

c. Identifikasi tannin

Sampel sebanyak 20 mg dididihkan selama 3 menit dengan akuadest diambil 5 ml selanjutnya ditambahkan 1-2 tetes larutan FeCl₃. Jika terjadi perubahan warna coklat kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Handayani *et al.*, 2023)

d. Identifikasi saponin

Sampel ditimbang sebanyak 0,5 g dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin (Kiko *et al.*, 2023).

6. Formulasi sabun cair ekstrak etanol bunga Flamboyan

Tabel 1: formula sabun cair ekstrak bunga Flamboyan

Bahan	Formula		Khasiat
	FI	FII	
Ekstrak bunga	0,5%	1%	Bahan aktif
KOH	25%	25%	Basa pembentuk pasta sabun atau alkali
VCO	15%	15%	Basis minyak
Minyak zaitun	5%	5%	Pelembab
Asam stearate	0,5%	0,5%	Penetral/penstabil/pengeras
Gliserin	5%	5%	Pelembut/humektan
Natrium lauril sulfat	2%	2%	Surfaktan/pembentuk busa
Cocomid DEA	3%	3%	Penstabil busa
NaCl	0,2	0,2	Penetral PH
HPMC	1%	1%	Pengental
Oleum rosae	0.40%	0,40%	Pengaroma
Aquadest hingga	100 ml	100 ml	pelarut

(Modifikasi formula sabun padat (Aty, Y Efenti 2023))

7. Prosedur pembuatan sabun

- a. Disiapkan alat dan bahan
- b. Ditimbang dan ukur semua bahan yang akan digunakan
- c. Lelehkan asam stearat dengan gliserin pada penangas air (camp 1)
- d. Siapkan wadah stainless, masukan VCO dan minyak zaitun, dipanaskan sampai suhu 40° C, tambahkan KOH yang sudah dilarutkan dengan aquadest 10 ml, diaduk hingga terbentuk pasta atau kondisi trace (campuran minyak dan KOH teremulsi dengan baik)(camp 2).panaskan selama 1 jam sambil diaduk setiap 15 menit.
- e. Tambahkan camp 1 yang telah dilelehkan kedalam camp 2 aduk hingga homogen (camp 3).
- f. Masukan cocamid DEA, Natrium lauryl sulfat yang dilarutkan dengan aquadest 32 ml
- g. Masukan HPMC yang telah dikembangkan dengan perbandingan 1:10 kedalam campuran 3
- h. Masukan NaCl yg sudah dilarutkan dengan air 0,6 ml
- i. Kemudian masukan ekstrak bunga Flamboyan sedikit demi sedikit sambil terus diaduk hingga homogen. Tambahkan oleum rosae 0,40 g aduk hingga homogen.
- j. Tambahkan aquadest Ad 100 ml
- k. Masukan sediaan sabun cair ekstrak bunga Flamboyan kedalam wadah.

8. Pengujian aktivitas antioksidan

1. Penyiapan larutan uji

Sabun cair fraksi metanol bunga flamboyan 50 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 95% sampai tanda batas pada labu ukur 50 ml, sehingga diperoleh konsentersasi 1000 ppm. Larutan sabun cair fraksi metanol bunga Flamboyan dari larutan induk tersebut dibuat seri konsentersasi pengenceran yaitu 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, dan 120 ppm.

2. Penyiapan larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang 10 mg, dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml, lalu ditambahkan etanol 95% sampai tanda batas hingga diperoleh larutan dengan konsentersasi 0,5 ppm

3. Penyiapan larutan pembanding

Larutan kuersetin dibuat dengan cara menimbang 10 mg serbuk kuersetin, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambah etanol 95% hingga tanda batas. Larutan ini disebut larutan induk dengan konsentrasi 200 ppm yang kemudian diencerkan menjadi konsentrasi yang lebih kecil yaitu 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm.

4. Penentuan panjang gelombang

Sebanyak 4 mL blanko yaitu etanol 95% dimasukkan kedalam vial, ditambahkan 1 mL larutan DPPH, lalu ditutup dan diukur pada

Panjang gelombang 515-520 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

5. Pengukuran absorbansi peredaman radikal DPPH

Blanko, larutan uji dan larutan pembanding yang dibuat dalam beberapa konsentrasi diambil sebanyak 4 mL ditambahkan 1 mL larutan DPPH dimasukkan dalam vial lalu dikocok. Larutan didiamkan selama 30 menit, kemudian dibaca serapannya pada Panjang gelombang maksimum. Blanko yang digunakan adalah etanol 95%.

9. Analisis data

Hasil pengukuran absorbansi dengan menggunakan meter UV-Vis digunakan untuk menghitung persentase (%) peredaman radikal bebas DPPH. persen peredaman radikal bebas DPPH dihitung dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan :

Absorbansi blanko : serapan radikal DPPH 0,1 mM

Absorbansi sampel : serapan sampel terhadap radikal 0,1 Mm

Daya aktivitas antioksidan peredaman radikal bebas DPPH (persentase peredaman), sabun cair ekstrak etanol bunga Flamboyan serta BHT, dianalisis dan masing-masing dihitung nilai IC₅₀ menggunakan analisis regresi linear :

$$y = a + bx$$

keterangan :

y = persentase aktivitas antioksidan

x = konsentrasi larutan uji

a = tetapan intersep (perpotongan garis di sumbu y)

Hasil perhitungan dimasukkan kedalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak sebagai absis (sumbu x) dan nilai persentase peredaman (aktivitas antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu y). Hasil analisis regresi linear berupa nilai x, dimasukkan kedalam rumus : $IC_{50} = \frac{a}{\ln(x)}$ dan ditentukan tingkat kekuatan antioksidan.

Perhitungan nilai AAI (Antioxidant Activity Index) digunakan untuk mengetahui index aktivitas antioksidan dengan rumus:

$$\text{Nilai AAI} = \frac{\text{konsentrasi (ppm)}}{IC_{50} \text{ sampel (ppm)}}$$

Parameter dari Nilai AAI berdasarkan Scherer & Godoy, (2009) yaitu: aktivitas antioksidan berdasarkan nilai AAI (Antioxidant Activity Index), dikatakan lemah sebagai antioksidan jika nilai $AAI < 0.5$, aktivitas antioksidan sedang jika $0,5 < AAI < 1.0$, aktivitas antioksidan kuat $1.0 < AAI < 2.0$ dan aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai $AAI > 2.0$ (Faustino *et al.*, 2010).

