

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan metode penelitian**

Adapun dalam skripsi ini, peneliti menggunakan pendekatan penelitian kuantitatif dengan metode eksperimental. Penelitian dilakukan dilaboratorium untuk membuat sediaan granul instan dari ekstrak daun kirinyuh (*Choromolaena odorata*) sebagai antioksidan.

#### **3.2 Waktu dan tempat penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Oktober 2024 sampai dengan bulan Juni 2025, yang akan dilaksanakan di laboratorium Farmasetika teknologi farmasi, Fakultas farmasi, Universitas Bhakti Kencana Bandung.

#### **3.3 Populasi dan sampel**

##### **3.3.1 Populasi**

Adapun populasi pada penelitian ini adalah formulasi sediaan granul instan dari ekstrak tumbuhan yang mengandung antioksidan.

##### **3.3.2 Sampel**

Sampel yang digunakan adalah ekstrak daun kirinyuh (*Choromolaena Odorata*) yang telah dikeringkan dan diolah menjadi bentuk granul instan. Jumlah sampel dan formula dapat bervariasi tergantung pada pengujian yang dilakukan, seperti variasi konsentrasi bahan tambahan atau eksipien seperti *Polivinil Pirolidon* (PVP), Manitol, Aspartam, Natrium benzoat, perasa, Aquadest

#### **3.4 Variabel penelitian**

##### **3.4.1 Variabel independen**

Konsentrasi ekstrak daun kirinyuh dan formula eksipien yang digunakan dalam pembuatan granul instan sebagai antioksidan.

##### **3.4.2 Variabel dependen**

uji organoleptik, uji laju alir, uji waktu larut, uji Ph, uji *Loss on Drying* (LoD), uji hedonik dan antioksidan dari sediaan granul instan.

### **3.5 Definisi Operasional**

#### **1. Preparasi**

Mengacu pada proses pembuatan atau formulasi sediaan granul instan dengan daun kirinyuh sebagai zat aktif.

#### **2. Evaluasi**

Merupakan pengujian yang dilakukan untuk menilai kualitas fisik dari sediaan granul instan yang dihasilkan. Evaluasi meliputi uji organoleptik, uji laju alir, uji kadar air, uji kerapatan ruahan, indeks kompresibilitas, uji waktu larut, penetapan pH, serta pengujian sediaan setelah dilarutkan dalam air melalui uji hedonik. Selain itu, aktivitas antioksidan juga akan diuji menggunakan metode DPPH.

#### **3. Sediaan Granul Instan**

Granul instan adalah sediaan yang berbentuk butiran bulat atau agregat berbentuk padat dengan ukuran berkisar antara 0,2 hingga 4,0 mm yang biasanya disajikan dengan cara diseduh (Husni *et al.*, 2020).

#### **4. Ekstrak Daun Kirinyuh**

Ekstrak yang dihasilkan dari daun kirinyuh yang diekstraksi menggunakan metode maserasi. Daun kirinyuh diketahui mengandung senyawa antioksidan yaitu flavonoid.

#### **5. Uji antioksidan**

Merupakan pengujian yang dilakukan untuk menilai kemampuan sediaan granul instan yang mengandung ekstrak daun kirinyuh dalam menangkal radikal bebas. Aktivitas antioksidan diukur menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), dengan mengamati kemampuan senyawa antioksidan dalam mereduksi radikal bebas yang ditunjukkan melalui perubahan warna dan penghitungan nilai inhibisi.

### **3.6 Teknik Pengumpulan Data**

Penelitian ini dilakukan metode eksperimental di laboratorium.

### 3.7 Instrumen Penelitian

#### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu mesh 12 dan 16, gelas ukur 100 mL, Mortir dan stemper, batang pengaduk, beaker glass, kertas saring, pipet tetes, timbangan analitik, spatel, stopwatch, oven, *Flow tester*, *tap density tester*, *moisture balance*, pH meter, magnetik stirer, spektrofotometri UV-Vis, dan alat gelas kaca yang biasa digunakan di lab.

#### 2. Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak daun kirinyuh sebagai zat aktif, dan eksipien/zat tambahan yaitu *Polivinil Pirolidon* (PVP), Manitol, Aspartam, Natrium benzoat, Perasa Jasmine, Aquadest. Untuk pengujian antioksidan yaitu serbuk DPPH, vitamin C dan metanol p.a.

### 3.8 Rancangan formula

**Tabel 3. 1 Rancangan Formula**

Bahan	Fungsi	Komposisi (%)		
		FI	FII	FIII
Ekstrak Daun Kirinyuh	Bahan Aktif	3	3	3
PVP	Pengikat	1	3	5
Manitol	Diluen	20	20	20
Aspartam	Pemanis	1,5	1,5	1,5
Natrium benzoat	Pengawet	0,5	0,5	0,5
Jasmine	Perasa	5	5	5
Laktosa	Pengisi	69	67	65

### 3.9 Prosedur Penelitian

#### 3.9.1 Pengumpulan Bahan

Sampel yang digunakan berupa daun kirinyuh yang diperoleh dari daerah Yogyakarta.

#### 3.9.2 Determinasi

Determinasi dilakukan di Herbarium Jatinangor Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran (UNPAD).

### 3.9.3 Prosedur Skrining Fitokimia

Melakukan pengujian senyawa metabolit sekunder terhadap ekstrak etanaol daun kirinyuh (*Choromolaena odorata L*):

#### 1. Uji Flavonoid

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida (HCl) pekat, lalu tambahkan 0,5 mg serbuk magnesium (Mg), dan amil alkohol, apabila menghasilkan warna merah, kuning atau jingga, ekstrak positif mengandung flavonoid.

#### 2. Uji Alkaloid

Ekstrak 2 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 ml HCl 2N. Pengujian alkaloid dilakukan dengan 2 pereaksi. Untuk pereaksi Dragendorff, ambil 1 ml larutan dan tambahkan 5 tetes reagen. Jika muncul endapan merah bata itu menandakan adanya alkaloid. Selanjutnya, untuk reagen Mayer, ambil 1 ml larutan dan tambahkan 5 tetes reagen. Endapan putih menunjukkan keberadaan alkaloid.

#### 3. Uji Saponin

Ekstrak sebanyak 1g dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan 10 ml air hangat, kemudian ditutup dan kocok kuat selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 3 tetes HCl 2N. Hasil dinyatakan positif apabila buih yang terbentuk stabil setelah penambahan HCl 2N.

#### 4. Uji Tannin

Ekstrak 1g dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 3 tetes larutan Gelatin 1%. Sampel positif dengan terbentuknya endapan putih.

#### 5. Uji Steroid/Terpenoid

Ekstrak sebanyak 1g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 2 ml kloroform dan 10 tetes asam asetat glasial dan 3 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Lieberman-Burchad), apabila menghasilkan

warna biru sampai hijau, ekstrak positif mengandung steroid. Sedangkan terpenoid menghasilkan warna merah ungu.

#### **3.9.4 Pembuatan Sediaan Granul Instan**

1. Ditimbang ekstrak kental daun kirinyuh serta bahan tambahan/eksipien sesuai formula yang akan dibuat dengan penggunaan timbangan analitik
2. Hasil timbangan ekstrak kental kemudian dimasukan kedalam mortir lalu ditambahkan Manitol, aspartam, dan natrium benzoat dicampur secara bertahap dalam wadah hingga ekstrak menjadi kering
3. Ditambahkan Laktosa kedalam campuran tersebut dan diaduk hingga homogen.
4. Selanjutnya, perasa jasmine dan PVP ditambahkan secara perlahan ke dalam campuran bahan.
5. Aquadest disemprot kedalam campuran sambil diaduk hingga terbentuk massa yang dapat terkepal.
6. Masa kepala yang telah terbentuk kemudian diayak menggunakan *mesh* no. 12 hingga terbentuk granul dan simpan pada wadah yang datar
7. Kemudian, Granul yang dihasilkan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 6 jam.
8. Granul kering yang telah dikeringkan diayak kembali menggunakan *mesh* no. 16 untuk mendapatkan ukuran granul yang seragam.

#### **3.9.5 Evaluasi Sediaan Granul Instan**

##### **1. Uji Organoleptik**

Pengamatan organoleptik dilakukan dengan melihat sifat-sifat bahan mulai dari bau, bentuk, warna, dan rasa dari butiran yang diperoleh. Uji bau dilakukan dengan menempatkan butiran di telapak tangan dan menghirup aromanya. Uji bentuk dilakukan dengan memeriksa keseragaman bentuk butiran. Uji warna dilakukan dengan memeriksa warna yang tampak merata ( Solikhati *et al.*, 2022).

## 2. Uji laju alir

Dimasukkan granul ke dalam corong pada alat uji *flow tester*, kemudian penutup bawah corong dibuka dan waktu jatuhnya granul diukur dengan stopwatch. Sifat aliran granul dianggap baik jika waktu aliran  $\leq 10$  detik atau laju aliran 10 g/detik.(Pratama et al., 2024; Murtini & Elisa, 2018).

## 3. Uji Kerapatan Nyata, Kerapatan Mampat, Kompresibilitas

Dimasukan granul ke dalam gelas ukur 250 mL kemudian dicatat ketinggian awalnya, setelah itu diketukan gelas ukur perlahan sekitar 250 kali dan dicatat volumenya. Setelah itu didapat bobot granul setelah mampat dan dihitung kerapatan nyata dan mampat dengan rumus: (Pratama et al., 2022).

$$\text{Kerapatan nyata} = \frac{\text{Bobot Granul (g)}}{\text{Volume Granul (mL)}} \times 100\%$$

$$\text{Kerapatan mampat} = \frac{\text{Bobot Granul (g)}}{\text{Volume Mampat(mL)}} \times 100\%$$

Setelah didapat kerapatan nyata dan kerapatan mampat dihitung persentase indeks kompresibilitas dengan rumus :

$$\text{Indeks Kompresibilitas} = \frac{\text{Kerapatan mampat} - \text{Kerapatan nyata}}{\text{Volume Mampat(mL)}} \times 100\%$$

## 4. Uji waktu larut

Uji waktu larut dilakukan dengan menimbang 20 gram granul, kemudian dilarutkan ke dalam 200 mL air dingin sambil diaduk secara terus-menerus. Waktu yang dibutuhkan untuk molarut diukur menggunakan stopwatch. Granul dinyatakan memenuhi syarat apabila larut sepenuhnya dalam waktu kurang dari 5 menit (Husni et al., 2020).

## 5. Uji Sudut Diam

Sudut diam ditentukan dengan mengukur tinggi gundukan dan jari-jari tumpukan granul yang terbentuk. Nilai sudut diam  $\leq 30^\circ$  menunjukkan sifat alir yang sangat baik (Andriani et al., 2023).

## 6. Uji pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menempatkan elektroda pH meter ke dalam 10 gram granul yang sudah dilarutkan dalam 150 ml air sampai pH stabil kemudian catat nilai pH yang didapatkan. Syarat pH larutan adalah berada dalam rentang netral antara pH 6-7 (Solikhati *et al.*, 2022).

## 7. Uji *Loss on Drying* (LoD)

Pengukuran kadar air dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Cara kerja alat *moisture balance* adalah membaca kadar air secara otomatis, dengan cara menempatkan sampel sekitar  $\pm$  2 gram ke dalam cawan aluminium, kemudian menutupnya dan menunggu hingga angka pada % LoD muncul di layar alat, dengan ketentuan 2-4% (Pratama *et al.*, 2022).

## 8. Uji Hedonik

Uji hedonik atau kesukaan dilakukan dengan menyajikan sampel granul instan daun kirinyuh yang telah diseduh kepada 20 responden dalam suhu normal. Tujuannya adalah untuk menilai preferensi responden terhadap sampel granul instan tersebut. Setiap responden diminta mengisi form penilaian yang mencakup parameter warna, aroma, dan rasa. Setiap sampel dibuat dengan melarutkan 10 g granul ekstrak daun kirinyuh dalam 250 ml air. Penilaian dilakukan dengan menggunakan skala dari 1 hingga 5, di mana (1) berarti sangat tidak suka, (2) tidak suka, (3) cukup, (4) suka, dan (5) sangat suka (Lestari *et al.*, 2018).

### 3.10 Pengujian Aktioksidan

Berikut tahapan dalam pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Pratama *et al.*, 2023)

#### 3.10.1 Metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazy*)

##### 1. Pembuatan Larutan DPPH

DPPH Ditimbang 5 mg kemudian dilarutkan menggunakan metanol p.a dalam labu ukur 50 mL, kocok hingga homogen sampai diperoleh

konsentrasi larutan DPPH 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Kemudian simpan larutan DPPH dalam wadah gelap yang ditutup dengan aluminium foil.

## 2. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko Dibuat dengan cara dipipet Sebanyak 1 mL metanol p.a dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan larutan DDPH sebanyak 1 mL. Kemudian ditambahkan 2 mL metanol p.a dan dikocok hingga homogen. selanjutnya larutan blanko diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Absorbansi larutan blanko diukur pada panjang gelombang maksimum 516 nm..

## 3. Optimasi Panjang Gelombang DPPH

Larutan DPPH dengan konsentrasi 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disimpan dalam wadah yang terlindung dari cahaya dengan cara ditutup dengan aluminium foil. Larutan DPPH harus dibuat baru untuk setiap pengujian. Kemudian larutan ini ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400–800 nm. Sementara panjang gelombang maksimum DPPH yang digunakan berada pada kisaran 515–520 nm.

## 4. Pembuatan Larutan Sampel

Ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg , kemudian dilarutkan dalam 20 mL metanol p.a hingga diperoleh konsentrasi 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . selanjutnya dibuat larutan seri konsentrasi 20,40, 60, 80,100 dan 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## 5. Penentuan Larutan Pembanding Vitamin C

Vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan methanol p.a sebanyak 20 mL menggunakan labu ukur pada konsentrasi 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Kemudian disiapkan larutan dengan kisaran konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 dan 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## 6. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Larutan pembanding ataupun larutan sampel dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan sebanyak 2 mL methanol p.a dan larutan DPPH sebanyak 1 mL kemudian larutan diaduk hingga homogen. larutan diinkubasi selama 30 menit lalu diukur serapannya

menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm.

## 7. Penentuan Inhibisi dan Nilai IC50

Persen inhibisi dihitung dengan persamaan :

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

Nilai IC<sub>50</sub> secara persamaan regresi linear dari  $y=bx+a$ .

Keterangan: x: Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) y: % inhibisi

### 3.11 Analisis Data

Analisis Data untuk evaluasi fisik sediaan dianalisis menggunakan One Way ANOVA untuk membandingkan hasil antar formula. Sementara itu, untuk data uji hedonik dan uji antioksidan disajikan secara deskriptif.