

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan mulai bulan Februari sampai Juli 2022 dan tempat yang digunakan untuk melakukan penelitian ini adalah di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Kimia STIKES Borneo Lestari Banjarbaru.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas laboratorium, ayakan, bejana maserasi, blender, desikator, *flow tester*, mortir, oven (*Thermo Fisher Scientific®*, *UK®*), pH meter (*Hanna®*, *Indonesia®*), *rotary evaporator* (*IKA RV10®*, *Germany®*), stamper, *stopwatch*, spektrofotometri UV-Vis (*Shimadzu®*), timbangan analitik (*Ohaus®*, *US®*), vial dan *waterbath* (*Memmert®*).

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia bunga rosella, simplisia bunga telang, etanol 70%, etanol p.a, aerosil, aspartam, asam sitrat, asam tartrat, *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH), kuersetin, laktosa, natrium bikarbonat, dan *polyvinylpyrrolidone* (PVP).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Determinasi Tanaman Bunga Rosella dan Bunga Telang

Sampel bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dan Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dideterminasi di Laboratorium Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru.

3.3.2 Pengumpulan dan Pengolahan Sampel Bunga Rosella dan Bunga Telang

Bunga yang mekar pada usia \pm 3 bulan sudah bisa dipanen dari Perkebunan Kelompok Wanita Tani Rosella Murni Kota Palangkaraya. Proses pengeringan bunga dilakukan dengan menjemur di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam agar dapat meminimalkan terjadinya kerusakan senyawa aktif. Bunga yang kering kemudian diserbukkan menggunakan blender kemudian diayak supaya mendapatkan serbuk dengan ukuran partikel yang homogen dan sesuai untuk maserasi (Styawan *et al.*, 2021).

3.3.3 Pembuatan Ekstrak Bunga Rosella dan Bunga Telang

Ekstraksi dilakukan masing-masing dengan metode maserasi atau perendaman, menggunakan etanol 70% sebagai cairan penyari. Sebanyak \pm 500 g serbuk bunga direndam dengan 3 L etanol 70% dan ditambahkan asam sitrat sebanyak 5% di dalam bejana maserasi yang tertutup rapat. Pada 6 jam pertama, diaduk sesekali, 18 jam kemudian didiamkan. Setelah 24 jam

dilakukan pergantian pelarut dan remaserasi dilakukan sebanyak dua kali. Hasil maserat disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu pemekatan terjaga sekitar 50-60°C. Selanjutnya dipekatkan diatas *waterbath* sampai bobot konstan (Depkes RI, 2017). Ekstrak kental ditambahkan aerosil dengan perbandingan 1:0,5 dan digerus hingga homogen. Sehingga diperoleh masing-masing ekstrak bunga rosella dan bunga telang dalam bentuk ekstrak kering (Saputra, 2012).

Adapun rumus perhitungan rendemen ekstrak kental sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental yang didapat}}{\text{Bobot simplisia yang di ekstraksi}} \times 100\%$$

3.3.4 Formula

Tabel 2. Formula granul *effervescent*

Bahan (mg)	FI	FII	FIII	FIV
Eks. Bunga Rosella	156,6	156,6	156,6	156,6
Eks. Bunga Telang	366,65	366,65	366,65	366,65
PVP	1000	1000	1000	1000
Asam sitrat	500	750	250	500
Asam tartrat	750	500	500	250
Na. Bikarbonat	1440	1460	860	880
Aspartam	300	300	300	300
Laktosa	486,8	466,8	1566,8	1546,8

Bobot granul yang diinginkan = 5 g

Keterangan : Ekstrak bunga rosella yang digunakan sebanyak 156,6 mg dan ekstrak bunga telang 366,65 mg. Hal ini berdasarkan perbandingan menggunakan asam askorbat, dimana 50 mg asam askorbat setara dengan IC_{50} asam askorbat sebesar 5,64 ppm yang dapat digunakan dalam perhitungan dosis ekstrak etanol 70% bunga rosella dan bunga telang untuk membuat sediaan granul *effervescent* (Seal dan Chaudhuri, 2015). Perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 3.

Formula dibuat dengan variasi konsentrasi asam sitrat dan asam tartrat FI (2:3) FII (3:2) FIII (1:2) FIV (2:1) serta natrium bikarbonat dengan kaidah stoikiometri. Formula ini memvariasikan konsentrasi asam sitrat dan asam tartrat berdasarkan penelitian Zuraidah *et all* (2018) menunjukkan bahwa hasil variasi konsentrasi asam sitrat dan asam tartrat berpengaruh terhadap sifat fisik granul *effervescent* dengan menghasilkan formula yang paling mendekati persyaratan dibandingkan dengan formula yang tidak memvariasikan asam sitrat dan asam tartrat (1:1).

3.3.5 Pembuatan Granul *Effervescent*

Granul *effervescent* dibuat dengan metode granulasi basah, metode ini menggunakan proses granulasi terpisah antara granul asam dan granul basa agar tidak terjadi reaksi dini.

a. Pembuatan granul asam

Campur setengah laktosa dan aspartam dalam formula kemudian ditambahkan kedalam campuran asam sitrat dan asam tartrat. Pada campuran tersebut ditambahkan ekstrak bunga rosella dan bunga telang yang sudah dicampur dengan PVP dalam etanol 70% sedikit demi sedikit sampai terbentuk massa granul yang baik, kemudian ayak dengan ayakan mesh No. 12. Granul yang didapat kemudian dikeringkan pada suhu 50°C selama ± 15 menit dalam oven.

b. Pembuatan granul basa

Campur setengah dari laktosa dan aspartam dalam formula didalam mortir hingga homogen. Ditambahkan natrium bikarbonat, kemudian ditetesi dengan larutan PVP sedikit demi sedikit sampai terbentuk massa granul yang baik, kemudian diayak dengan ayakan mesh No. 12 dan dikeringkan pada suhu 50°C selama ± 15 menit dalam oven.

c. Pencampuran granul komponen asam dan basa

Granul komponen asam dan komponen basa selanjutnya dicampur hingga homogen serta menjaga kelembabannya.

3.4 Evaluasi Granul

Evaluasi granul yang dilakukan menggunakan parameter pengamatan, sebagai berikut:

3.4.1 Uji Organoleptik

Uji organoleptik, meliputi bentuk, warna, bau dan rasa dari granul yang dihasilkan.

3.4.2 Indeks kompresibilitas

Granul *effervescent* sebanyak 50 gram dimasukkan ke dalam gelas ukur 100 ml dan dicatat volume sebelum dan sesudah dilakukan pengetapan sebanyak 500 kali (Syamsul & Supomo, 2014).

3.4.3 Uji Sudut Diam Granul

Granul sebanyak 50 gram dimasukkan dalam corong yang

sebelumnya bagian bawah corong sudah disumbat, alat yang digunakan dalam uji ini adalah *flow tester*. Setelah itu sumbatan dibuka, sehingga berbentuk tumpukan granul yang berbentuk kerucut (Widayanti *et al.*, 2012; Elfiyani *et al.*, 2014). Dihitung diameter dan tinggi kerucut yang terbentuk pada gundukan, kemudian dicari besar sudut diam (Atmajasari, 2014).

3.4.4 Uji Waktu Alir Granul

Granul sebanyak 50 gram dimasukkan ke dalam corong yang tertutup dan diratakan, alat yang digunakan dalam uji ini adalah *flow tester*. Kemudian penutup corong dibuka dan dicatat waktu yang diperlukan seluruh granul habis melewati corong (Widayanti *et al.*, 2012; Elfiyani *et al.*, 2014).

3.4.5 Uji Waktu Larut Granul

Uji waktu larut, dilakukan dengan cara dimasukkan 100 mL air ke dalam gelas beker 250 mL. Setelah itu dimasukkan satu bungkus granul *effervescent* 5 gram ke dalam air tersebut. Bila granul tersebut terdispersi dalam air dan menyelesaikan reaksinya (sampai tidak ada gas/buih) dalam waktu < 5 menit menunjukkan sediaan terdispersi sempurna (Siregar dan Wikarsa, 2010).

3.4.6 Pemeriksaan pH

Granul *effervescent* sebanyak 5 gram dilarutkan dalam 150 ml air

kemudian diukur pH dengan pH meter (Noerwahid, 2016). Pemeriksaan pH dilakukan untuk mengetahui derajat keasaman larutan granul *effervescent*. Jika larutan *effervescent* yang terbentuk terlalu asam maka dapat mengiritasi lambung sedangkan jika terlalu basa dapat menimbulkan rasa pahit dan tidak enak (Rahmawati *et al.*, 2016).

3.4.7 Uji Kadar Air

Uji kadar air merupakan salah satu parameter mutu yang penting bagi produk kering untuk menentukan daya tahan dan daya simpan produk. Sejumlah granul ditempatkan dalam piringan lalu dimasukkan ke dalam eksikator yang berisi silika gel selama 4 jam (Burhan *et al.*, 2012).

3.4.8 Uji *Acceptability*

Uji *acceptability* atau uji kesukaan merupakan pengujian yang panelisnya memberikan respon senang atau tidaknya terhadap bahan yang diuji. Parameter yang diuji meliputi tiga aspek penilaian yaitu penampilan, rasa dan aroma. Uji *acceptability* dilakukan terhadap 20 orang panelis yang dipilih secara acak untuk menilai ketiga formula. Sebelum mengisi kuesioner, panelis diberikan arahan cara mengisi kuesioner (Setiawan, 2012; Dewi *et al.*, 2014).

3.5 Analisis Data Granul

3.5.1 Indeks Kompresibilitas

Granul dapat dikatakan baik jika nilai indeks kompresibilitasnya

kurang dari 20% (Akbar dan Alik, 2019). Data yang diperoleh dimasukkan ke dalam rumus:

$$\text{Indeks kompresibilitas} = \frac{\text{Volume sebelum} - \text{Volume sesudah}}{\text{Volume sebelum}} \times 100\%$$

Tabel 3. Indeks Kompresibilitas dan Kategorinya

Indeks Kompresibilitas (%)	Kategori
<10	Istimewa
11 – 15	Baik
16 – 20	Cukup baik
21 – 25	Agak baik
26 – 31	Buruk
32 – 37	Sangat buruk
>38	Sangat buruk sekali

3.5.2 Uji Sudut Diam

Sudut diam granul (Atmajasari, 2014) ditentukan dengan rumus:

$$\text{Sudut diam (a)} = \frac{h}{r}$$

Keterangan :

- a = sudut diam
- h = tinggi timbunan granul
- r = jari-jari timbunan granul

Tabel 4. Nilai Sudut Diam dan Sifat Alirannya

Sudut Diam (derajat)	Sifat Aliran
<25	Istimewa
25 – 30	Baik
30 – 40	Cukup
>40	Sangat buruk

3.5.3 Uji Waktu Alir Granul

Persyaratan waktu alir ditetapkan sebagai berikut (Atmajasari, 2014):

Tabel 5. Waktu Alir dan Sifat Alirannya

Laju Alir (g/detik)	Sifat Aliran
10	Bebas mengalir
4 – 10	Mudah mengalir
1,6 – 4	Kohesif
<1,6	Sangat kohesif

3.5.4 Uji Kadar Air

Uji ini untuk mengetahui kadar air yang terdapat dalam sediaan granul *effervescent* dengan syarat <10%.

Kadar air dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Burhan *et al.*,2012):

$$\text{Kadar Air} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat sampel sebelum dimasukkan

B = Berat sampel setelah dimasukkan

3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

Menimbang sebanyak 7,9 mg DPPH dan melarutkan dengan etanol p.a dalam labu ukur sampai 50 ml hingga homogen. Kemudian tutup dengan aluminium foil dan menyimpan pada tempat gelap (Noerwahid, 2016).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH 0,4 mM

Memasukkan larutan DPPH (0,4 mM) yang telah dibuat sebanyak 1 ml kedalam vial gelap. Kemudian mencampurkan dengan etanol p.a sebanyak 4 ml dan ditutup dengan aluminium foil dan menginkubasi selama 30 menit. Kemudian memasukkan kedalam kuvet dan mengukur

nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm, sehingga diperoleh panjang gelombang optimumnya DPPH (Hamzah *et al.*, 2014; Mayara *et al.*, 2016; Zulfa, 2020).

c. Penentuan OT (*Operating Time*)

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mencampurkan larutan DPPH (0,4 mM) sebanyak 1 ml dengan larutan pembanding kuersetin sebanyak 4 ml. Kemudian mengukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum yang didapat dan mengamati serapannya setiap 5 menit selama 60 menit. Menit yang menghasilkan absorbansi perendaman radikal bebas DPPH paling stabil merupakan *operating timenya* (Mulangsri *et al.*, 2017).

d. Pembuatan Larutan Blanko DPPH 0,4 mM

Masukkan sebanyak 1 ml larutan DPPH (0,4 mM) kedalam vial gelap lalu mencampurkan dengan 4 ml etanol p.a menggunakan vortex. Kemudian menutup menggunakan aluminium foil agar tidak tembus cahaya karena DPPH sensitif terhadap cahaya. Lalu menginkubasi pada ruang gelap selama *operating time* yang didapat dan mengukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum yang telah didapat (Hamzah *et al.*, 2014; Mayara *et al.*, 2016; Zulfa, 2020).

e. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Pembuatan larutan pembanding kuersetin dilakukan dengan

menimbang 25 mg kuersetin kemudian masukkan kedalam labu ukur 25 ml dan menambahkan etanol p.a sampai tanda batas, sehingga memperoleh konsentrasi kuersetin sebesar 1000 ppm. Kemudian mengencerkannya dengan memipet 2,5 ml larutan induk kuersetin kemudian menambahkan etanol p.a hingga tanda batas 25 ml pada labu ukur sehingga diperoleh larutan kuersetin 100 ppm. Dari hasil pengenceran tersebut, kemudian membuat larutan seri konsentrasi dengan cara mengambil 250, 500, 750, 1000 dan 1250 μ l dan melarutkan masing-masing dalam labu ukur 25 ml dengan pelarut etanol p.a untuk mendapatkan beberapa variasi konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm (Saputri *et al.*, 2019; Zulfa, 2020).

f. Pengujian Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Kuersetin

Pengujian ini dilakukan dengan mengukur masing-masing larutan kuersetin sebanyak 4 ml kemudian menambahkan 1 ml larutan DPPH (0,4 mM) ke dalam masing-masing vial gojog hingga homogen. Menginkubasi larutan tersebut pada *operating time* yang didapatkan pada tempat yang gelap. Kemudian mengukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan sebelumnya (Ipandi *et al.*, 2016; Khairiah *et al.*, 2018).

g. Pembuatan Larutan Uji Kombinasi Ekstrak Etanol 70% Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)

Larutan induk 1000 ppm dibuat dengan 100 mg ekstrak kental