

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Maret 2024 di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.5.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu gelas ukur (*Pyrex*), gelas beaker (*Pyrex*), thermostat *waterbath* HH-6 (*DSS*), *rotary evaporator* (*biobased*), batang pengaduk (*pyrex*), tabung reaksi (*Pyrex*), kaca arloji, *object glass*, kuvet, spektrofotometer UV-Vis (UV-1280), cawan porselin, mortir dan stemper, sudip, sendok tanduk, viscometer *brookfield*, stik pH, alat uji daya lekat, *moisture analyzer balance*, timbangan analitik (*Ohaus*), anak timbang, kompor, blender (*Miyako*), dan wadah maserasi.

3.5.2. Bahan

Ekstrak daun temu blenyeh, asam stearat, setil alkohol, trietanolamin, metil paraben, butilhidroksitoluen (BHT), akuades, oleum rosae, silika gel, etanol 96%, HCL 2N, HCL pekat, FeCl₃, serbuk Mg, pereaksi mayer, N-heksan, H₂SO₄.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan menjadi tiga tahapan yaitu tahap persiapan, tahap penelitian dan tahap akhir dengan variabel sebagai berikut:

3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi zat aktif ekstrak temu blenyeh pada sediaan *hand cream*.

3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah sediaan *hand cream* sebagai antioksidan.

3.3.3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah tempat pengambilan sampel tanaman temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengambilan Bahan

Sampel yang digunakan yaitu temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) yang diperoleh dari Wisata Kesehatan Jamu (WKJ) Kalibakung Kabupaten Tegal.

3.4.2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium bahan alam Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.4.3. Pembuatan Serbuk Daun Temu Blenyeh

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun temu blenyeh sebanyak 6 kg yang dilakukan pencucian dengan menggunakan air mengalir terlebih dahulu untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada daun temu blenyeh. Kemudian dilakukan perajangan daun temu blenyeh yang sudah melalui sortasi basah, kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 55°C, pengeringan ini dilakukan supaya daun yang digunakan tidak mudah rusak sehingga lebih tahan lama dengan cara mengurangi kadar air. Serbuk temu blenyeh dibuat dengan cara menghaluskan daun temu blenyeh yang sudah kering menggunakan blender sampai daun benar-benar halus (Zonia, 2023).

3.4.4. Pembuatan Ekstrak

Metode yang digunakan dalam pembuatan ekstrak temu blenyeh yaitu maserasi. Serbuk daun temu blenyeh yang digunakan yaitu 500 g dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan pelarut 1:10 dalam wadah tertutup rapat. Maserasi dilakukan sebanyak 3x24 jam dengan sesekali diaduk. Kemudian hasil maserasi disaring dengan menggunakan kain flannel dan kertas saring, kemudian dilakukan remaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:5, hasil filtrat yang didapat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dan diuapkan kembali dengan menggunakan waterbath untuk mendapatkan ekstrak yang sangat kental (Pramiastuti dan Murti, 2022).

3.4.5. Uji Rendemen Ekstrak

Ekstrak kental yang telah diperoleh kemudian ditimbang dalam cawan porselin dan dihitung rendemen ekstrak dengan menggunakan rumus (Ardianto dan Safitri, 2021).

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

3.4.6. Uji Parameter Ekstrak

a. Penetapan organoleptik ekstrak

Pemeriksaan organoleptik ekstrak meliputi bentuk, bau, rasa dan warna (Depkes, 2000).

b. Penetapan susut pengeringan

Ekstrak sebanyak 1 g ditempatkan dalam wadah krus porselen tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan dengan suhu 105°C selama 30 menit dan sudah ditara. Sebelum ditimbang ekstrak diratakan dalam krus porselen dengan cara digoyang-goyangkan hingga membentuk lapisan setebal kurang lebih 5–10 mm. Kemudian dimasukkan ke dalam oven, dibuka tutupnya dan dikeringkan serta disimpan dalam suhu kamar sampai bobot tetap. Syarat susut pengeringan yaitu < 10% (Zubaidatul Muqowwiyah et al., 2021)

c. Penetapan kadar air

Ekstrak ditimbang kurang lebih 0,5 g diletakkan kedalam cawan aluminium. Kemudian ekstrak temu blenyeh dimasukkan kedalam alat *mouisture analyzer* dan atur suhu alat menjadi 105°C, selanjutnya tutup alat dan tunggu proses hingga selesai dengan ditandai bunyi beep

(Nurhidayati, 2021). Syarat mutu kadar air pada ekstrak kental yaitu antara 5-30%, ekstrak cair >30% dan ekstrak kering <10% (Halim Umar, 2017).

d. Penetapan kadar abu

Ekstrak sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara. Kemudian pijarkan secara perlahan-lahan dengan menggunakan tanur hingga arang habis. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga mencapai bobot yang tetap. Dihitung kadar abu total dengan menggunakan rumus persamaan (5) (Utami et al., 2017 dan Yana, Gummay & Marpaung, 2022).

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{\text{massa abu(g)}}{\text{massa ekstrak(g)}} \times 100\%$$

3.4.7. Skrining Fitokimia

1. Uji Alkaloid

Ekstrak ditimbang 0,5 gram dimasukkan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 ml HCl 2N, lalu ditambahkan 2-3 tetes dengan pereaksi mayer dipanaskan kurang lebih 2 menit. Hasil positif dan adanya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid (Fikayuniar et al., 2021).

2. Uji Flavonoid

Ditimbang ekstrak 200 mg, diekstrak dengan 5 mL etanol dan dipanaskan selama lima menit didalam tabung reaksi, ditambah beberapa tetes HCl pekat, kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk Mg, kemudian dikocok kuat. Hasil dikatakan positif jika ekstrak ditunjukkan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Sambode et al., 2022).

3. Uji Tanin

Ditimbang 1 gram ekstrak, kemudian ditambahkan 10 mL air suling, setelah itu dididihkan 3 menit, dinginkan dan saring, pada larutan diambil sebanyak 2 mL ditambahkan sampai 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Pada uji ini ditandai hasil positif jika pada ekstrak terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Depkes, 1995).

4. Uji Saponin

Ditimbang ekstrak 0,5 gram dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL akuades panas, dinginkan, dikocok selama 10 detik, setelah itu akan terbentuk buih atau busa tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Setelah itu tambahkan 1 tetes larutan HCl 2 N, pada uji ini hasil dikatakan positif jika pada ekstrak terdapat busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes, 1995).

5. Uji triterpenoid dan steroid

Ekstrak ditimbang 0,5 gram, kemudian dilarutkan dalam 1 mL n-Hexana kemudian ditambah 2-3 tetes H₂SO₄. Jika hasil positif terbentuk warna ungu menunjukkan adanya triterpenoid dan terbentuknya warna biru atau hijau menunjukkan adanya steroid (Fikayuniar et al., 2021).

3.5 Rancangan Formulasi Hand Cream

Rancangan pembuatan *hand cream* ekstrak daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) dibuat dengan bobot 30 gram, formulasi *hand cream* yang akan dibuat dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Formulasi *Hand Cream* (Husna & Djendakita Purba, 2012)

Bahan	Formulasi (%)				Fungsi	Range (Handbook rowe edisi 6) (%)
	F0	F1	F2	F3		
Ekstrak temu blenyeh	0	10	12	14	Zat aktif	-
Asam stearate	12	12	12	12	Emulgator	1-20
Setil alcohol	0,5	0,5	0,5	0,5	Pengental	1-10
Trietanolamin	1	1	1	1	Pengemulsi	1-5
Butilhidroksitoluen	0,1	0,1	0,1	0,1	Antioksidan	-
Metil paraben	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet	0,02-0,3
Akuades	86,3	76,3	74,3	72,3	Pelarut	-
Oleum rosae (tetes)	qs	qs	qs	qs	Pengaroma	-

Keterangan:

F1: *Hand cream* dengan konsentrasi ekstrak daun temu blenyeh 0%

F2: *Hand cream* dengan konsentrasi ekstrak daun temu blenyeh 10%

F3: *Hand cream* dengan konsentrasi ekstrak daun temu blenyeh 12%

F4: *Hand cream* dengan konsentrasi ekstrak daun temu blenyeh 14%

3.5.1. Pembuatan Sediaan *Hand Cream*

Menyiapkan alat dan bahan untuk pembuatan *hand cream*.

Menimbang semua bahan yang digunakan untuk pembuatan sediaan *hand cream*. Langkah pertama yaitu mengambil asam stearat dan setil alcohol kemudian dilebur (massa I). Metil paraben dan trietanolamin dilarutkan dalam akuades (massa II). Kemudian, massa I dicampurkan dengan massa II hingga diperoleh dasar krim. Ekstrak daun temu blenyeh yang telah bercampur dengan butilhidroksitoluen dicampurkan dengan dasar krim. Terakhir, ditambahkan oleum rosae.

3.5.2. Evaluasi Sediaan *Hand Cream*

1) Uji Organoleptis

Uji ini dilakukan pengamatan untuk menilai keadaan sediaan secara subyektif meliputi tekstur, warna dan aroma dan dilakukan secara kualitatif (Iswandana dan Sihombing, 2017).

2) Uji Homogenitas

Sediaan *hand cream* sebanyak 0,1 gram diletakkan diantara 2 kaca objek lalu dilakukan pengamatan adanya partikel kasar atau tidak homegen dibawah cahaya (Dewi et al., 2014).

3) Uji Ph

Uji ini dilakukan dengan memakai pH meter digital pada suhu ruang dengan cara melarutkan 0,5 gram *hand cream* dengan 5 ml aquadest lalu diukur dengan stik pH meter. Rentang pH kulit berkisar 4,0 - 7,5 (Nurfita et al., 2021).

4) Uji Daya Sebar

Untuk uji daya sebar digunakan sepasang kaca dan anak timbang 50 hingga 200 gram. Krim di timbang 0,5 gram diletakan ditengah lempeng kaca, kemudian letakan anak timbang diatas lempeng kaca dan dibiarkan hingga satu menit. Diameter daya sebar yang baik adalah 5-7 cm (Manna & Thalib, 2023).

5) Uji Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan meletakkan sampel *hand cream* sebanyak 0,5 gram diatas kaca objek kemudian diberi beban 1 Kg selama 5 menit, lalu dipasang beban dengan berat 80 gram lalu dicatat waktu sampai kedua kaca objek tersebut terlepas. Nilai uji daya lekat yang baik yaitu 2-300 detik (Engelina NG, 2013).

6) Uji Viskositas

Sebanyak 25 g *hand cream* dimasukan kedalam wadah, lalu dipasang spindel no 4 dengan kecepatan 12 rpm. Amati jarum penunjuk

dari viskometer yang mengarah ke angka pada skala viskositas untuk spindel yang dipakai, ketika jarum menunjukkan ke arah yang stabil (setelah 1 menit), maka nilai tersebut adalah viskositas sediaan *hand cream* yang diuji (Nurfita et al., 2021).

3.6 Uji Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan dilakukan pengujian dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Pembuatan larutan DPPH 100 ppm

Ditimbang 10 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu terukur 100 ml, ditambahkan etanol 96% ad 100 ml, dikocok hingga homogen. (Erna Cahyaningsih et.al, 2019).

2. Larutan blanko

Diambil etanol 96% sebanyak 10 mL, lalu diambil 3 mL masukkan ke dalam kuvet, selanjutnya kuvet dimasukan pada alat Spektrofotometri.

3. Penentuan panjang gelombang maksimum

Dari larutan baku induk DPPH 100 ppm dipipet sebanyak 2 ml dimasukkan kedalam labu terukur 5 ml dan ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas, dikocok hingga homogen (Erna Cahyaningsih et.al, 2019).

4. *Operating Time*

Dipipet 1 mL larutan induk baku DPPH yang telah dibuat, dimasukan ke dalam labu ukur bervolume 5 mL. Dichelupkan sampai garis tanda dengan metanol dan dihomogenkan, Diukur pada waktu stabil sampai dimenit ke 30 menit dengan spektrofotometer visible pada panjang

gelombang maksimum dengan interval waktu 2 menit. Perlakuan tersebut dilakukan untuk mendapatkan nilai operating time (Lindawati & Ningsih, 2020 & Maulina, 2014).

5. Pembuatan larutan induk Vitamin C (1000 ppm)

Vitamin C dilarutkan dalam etanol untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm dengan menimbang 10 mg vitamin C kemudian dilarutkan dengan 10 ml etanol 96%.

6. Uji aktivitas antioksidan larutan seri Vitamin C

Dari larutan stok dilakukan pengenceran dengan cara diambil larutan 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, dan 0,05 ml. Kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 5 ml sehingga diperoleh dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Diambil 3 ml pada tiap konsentrasi dan tambahkan 3 ml larutan DPPH induk, diukur absorbansi pada tiap konsentrasi dengan panjang gelombang maksimum menggunakan alat Spektrofotometer Uv-Vis (Andriani dan Murtisiwi, 2020).

7. Pembuatan larutan induk ekstrak daun temu blenyeh (100 ppm)

Ditimbang ekstrak 10 mg dilarutkan pada labu ukur 100 ml dan tambahkan etanol 96% sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan induk 100 ppm (Andriani dan Murtisiwi, 2020).

8. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun temu blenyeh

Dari larutan stok dilakukan pengenceran dengan cara diambil larutan 1, 2, 3, 4, dan 5 ml. Kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 10 ml sehingga diperoleh dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Diambil 3 ml pada tiap konsentrasi dan tambahkan 3 ml larutan DPPH

induk, diukur absorbansi pada tiap konsentrasi dengan panjang gelombang maksimum menggunakan alat Spektrofotometer Uv-Vis (Andriani dan Murtisiwi, 2020).

9. Pembuatan larutan induk sediaan *hand cream*

Ditimbang ekstrak 100 mg dilarutkan pada labu ukur 100 ml dan tambahkan etanol 96% sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan induk 1000 ppm.

10. Uji aktivitas antioksidan sediaan *hand cream*

Dari larutan stok dilakukan pengenceran dengan cara diambil larutan 0,5 , 1, 1,5, 2, dan 2,5 ml. Kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 10 ml sehingga diperoleh dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm. Diambil 3 ml pada tiap konsentrasi dan tambahkan 3 ml larutan DPPH induk, diukur absorbansi pada tiap konsentrasi dengan panjang gelombang maksimum menggunakan alat Spektrofotometer Uv-Vis (Andriani dan Murtisiwi, 2020).

11. Perhitungan % inhibisi dan IC₅₀

Untuk menentukan aktivitas antioksidan pada sampel ditemukan oleh besaran penurunan serapan radikal DPPH dan kemudian dihitung melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH.

Rumus Inhibisi :

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban kontrol}} \times 100\%$$

Dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier, nilai konsentrasi sebagai sumbu x dan persentase inhibisi sebagai sumbu y. Dari

persamaan $y = a + bx$ dapat dihitung nilai % inhibisi dan nilai IC_{50} (Elmitra et al., 2022).

3.7 Analisis Data

Data hasil uji antioksidan formulasi sediaan *hand cream* ekstrak daun temu blenyeh yang diperoleh analisa varian (*One way ANOVA*) untuk membandingkan data antara formula sediaan *hand cream* yang didapatkan terhadap konsentrasi ekstrak yang digunakan. Hasil berbeda secara nyata apabila didapatkan secara statistik ($P < 0,05$). analisa data menggunakan SPSS 25, tujuannya untuk mengetahui perbedaan hasil dari masing-masing konsentrasi zat aktif. Kemudian data antioksidan pada radikal DPPH (% penghambatan) ekstrak dan sediaan dianalisis dan dihitung nilai IC_{50} . Semakin kecil nilai IC_{50} berarti aktivitas antioksidan semakin kuat. Pada penelitian ini nilai IC_{50} dianalisis dan dihitung persamaan regresi linear.