

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-Maret 2025 di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Prodi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Timbangan analitik, *water bath*, viskometer, *hot plate*, juga alat kaca sebagai berikut; cawan porselin, mortar, stemper, beaker glass, labu ukur, erlemeyer, pipet tetes, kain flanel, batang pengaduk, sudip, mesh no. 60, gelas ukur, kaca objek, dan indikator pH universal.

3.2.2 Bahan

Rimpang temu blenyeh, etanol 96%, *asam tioglikolat*, *cetyl alcohol*, lilin lebah, paraffin cair, minyak jeruk, serbuk magnesium, HCl pekat, HCl 2%, HCl 2N, reagen dragendorff, reagen mayer, FeCl₃ 1%, dan kelinci *New Zealand* albino jantan.

3.3. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan penelitian *eksperimental*. Rancangan penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan dan tahap akhir.

3.3.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini yang menjadi variabel bebas yaitu ekstrak rimpang temu blenyeh.

3.3.2 Variabel Terikat

Pada penelitian ini yang menjadi variabel terikat yaitu hasil uji fisik dan uji evaluasi terhadap kelenci albino jantan.

3.3.3 Variabel Terkendali

Pada penelitian ini yang menjadivariabel terkendali yaitu tempat pengambilan sampel, pembuatan simplisia, ekstrak, dan pembuatan sediaan.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Proses determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam di Fakultas Ilmu Kesehatan Program Studi Farmasi Program Sarjana S-1 Universitas Bhamada Slawi. Determinasi dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian (Ekasari & Yudoyono, 2013).

3.4.2 Pembuatan Serbuk Simplisia

Pembuatan serbuk simplisia yang pertama dilakukan adalah mengumpulkan bahan baku rimpang temu blenyeh yang sudah tua yang di dapatkan dari wisata Kesehatan jamu (WKJ) di desa Kalibakung, Kabupaten Tegal. Rimpang temu blenyeh diambil 10kg lalu disortasi basah, kemudian dicuci bersih dengan air bersih yang mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada rimpang, selanjutnya di rajang tipis dan di tiriskan pada wadah lalu

dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C hingga kadar air kurang dari 10 %, kemudian rimpang temu blenyeh di haluskan dengan cara di blander setelah itu di ekstraksi (Harrizul et al., 2014).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Rimpang Temu Blenyeh

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi, dilakukan 500 gram serbuk simplisia rimpang temu blenyeh dengan perbandingan 1:10 kemudian direndam dengan etanol 96% selama 3 hari sesekali diaduk, dilakukan pengamatan setiap harinya untuk mengetahui hasil penguapan pelarut yang terjadi, kemudian disaring menggunakan kain flannel lalu hasil penyaringan yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* yang berfungsi untuk mengubah sebagian atau keseluruhan sebuah pelarut dari bentuk cair menjadi uap, serta cepat mendapatkan ekstrak yang lebih kental setelah itu diuapkan kembali menggunakan *waterbath* sehingga akan diperoleh ekstrak kental (Pratiwi et al., 2024)

3.4.4 Uji Standarisasi Ekstrak

a. Uji Susut Pengeringan

Ekstrak ditimbang sebanyak 1g, dimasukkan kedalam kurs porselin dengan dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C untuk menghilangkan kadar air , kemudian sampel disimpan pada desikator sekitar 10 menit dan ditimbang. Kemudian memasukkan kurs porselin berisi ekstrak dalam oven panaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Susut pengeringan dengan

standart menurut Depkes, yaitu <10% (Najib et al., 2017).

penyusutan presentase menggunakan rumus berikut:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{bobot ekstrak kering (g)}}{\text{botot ekstrak basah (g)}} \times 100\%$$

b. Kadar Air

Ekstrak ditimbang 0,5 g diletakkan kedalam kurs porselin yang telah di panaskan dalam oven pada pada suhu 105°C selama 30 menit tujuannya untuk menghilangkan kadar airnya. Lalu menimbang kurs porselin yang telah dipanaskan, menimbang ekstrak dan dimasukkan kedalam oven 105°C selama 15 menit, kemudian sampel disimpan pada desikator sekitar 10menit dan ditimbang. Perlakuan diulangi sampai mendapatkan berat yang konstan. Uji kadar air ekstrak kering dengan standart menurut Depkes yaitu $\leq 10\%$ (Najib et al., 2017). Rumus untuk menentukan kadar air adalah:

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

Keterangan:

A= Bobot sampel sebelum dipanaskan

B= Bobot sampel setelah dipanaskan

c. Kadar Abu Total

1 g ekstrak ditimbang dan ditempatkan dalam wadah silikat yang sebelumnya telah dibakar dan ditimbang. Ekstrak kemudian dibakar secara perlahan di dalam tanur hingga arang

habis. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang sampai berat tertentu (Marpaung & Septiyani, 2020). Kadar abu harus memiliki nilai yang kecil, karena parameter ini mengindikasikan adanya cemaran logam berat yang tahan terhadap suhu tinggi (Maryam et al., 2020). Syarat kadar abu total yaitu tidak lebih dari 7,6% (Kemenkes, 2017). Kadar abu total, dinyatakan dalam % (b/b), kemudian dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

3.4.5 Skrining Fitokimia

a. Flavanoid

Ekstrak di timbang 0,5 g ditambahkan dengan air panas 1-2 mL air panas dan sedikit serbuk Mg. Kemudian ditambahkan 4-5 tetes HCl pekat. Jika menunjukkan warna merah, kuning, atau jingga maka ekstrak positif mengandung flavonoid (Rahayu et al., 2015).

b. Alkaloid

Ekstrak ditimbang 0,5 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 1 ml HCl 2N dan 9 mL aquadest, larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2- 3 tetes reagen Dragendorff, tabung II ditambahkan 2- 3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning- kuning, menunjukkan adanya

alkaloid (Alzanando et al., 2022).

c. Tanin

Ekstrak ditimbang 1 g, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua, maka ekstrak tersebut mengandung tanin (Nu'man, 2023).

d. Saponin

Ditimbang ekstrak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan 2 tetes HCl 2N dan dibiarkan selama 10 menit, bila busa yang terbentuk bisa tetap stabil maka ekstrak tersebut mengandung saponin (Suleman et al., 2022).

3.5 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Temu Blenyeh

3.5.1 Pembuatan Larutan Induk DPPH dan Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Ditimbang DPPH (*2,2-difenil-1-picrylhidrazil*) sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam etanol 96% dengan menggunakan labu ukur 100 mL, lalu ditempatkan dalam botol kaca berwarna gelap dan dihomogenkan (Fadhilah et al., 2023). Larutan DPPH dengan konsentrasi 40 ppm diukur absorbansinya dengan pelarut etanol 96% menggunakan spektrometri UV-Vis panjang gelombang 400-800nm (Alifni et al., 2017).

3.5.2 Penentuan Operating Time

Larutan DPPH 100 ppm sebanyak 4 mL dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum setiap 5 menit selama 60 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Alkhariza et al., 2024).

3.5.3 Pembuatan Larutan Pembanding Vitamin C 100 ppm

Serbuk vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan etanol 96% sampai tanda batas, Pengujian dilakukan dengan cara membuat pengenceran 5 seri konsentrasi larutan pembanding vitamin C, 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm. Dari larutan stok masing-masing dipipet 2,5, 5, 7,5, 10 dan 12,5 mL masing-masing ditambahkan dengan etanol dalam labu ukur 5 mL sampai tanda batas, kemudian disetiap konsentrasi diambil 1 mL dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Selanjutnya campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit. Kemudian masing-masing larutan tersebut diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm sebanyak 3 replikasi (Apitalau et al., 2021).

3.5.4 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rimpang Temu Blenyeh

Ditimbang ekstrak sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 10 mL. Kemudian dibuat larutan stok dengan konsentrasi 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm dengan ditambahkan etanol 70% pada masing – masing konsentrasi sampai

tanda batas (5 mL), pada masing – masing konsentrasi dipipet 2 mL, divortex selama 5 detik dan didiamkan selama 30 menit, kemudian diuji pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm (Sibua et al., 2022).

3.5.5 Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Perontok Bulu

Sediaan perontok bulu ditimbang sebanyak 10 mg masukan dalam labu ukur dilarutkan dengan 10 mL etanol 96%, sehingga diperoleh konsentrasi induk sebesar 1000 ppm. Setelah itu dibuat larutan seri 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm. Pada larutan seri ditambahkan 4 mL larutan DPPH 35 ppm. Larutan dihomogenkan dibiarkan 30 menit di tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Rosalia et al., 2022).

3.5.6 Perhitungan % Inhibisi dan IC50

Untuk menentukan aktivitas antioksidan pada sampel ditemukan oleh besaran penurunan serapan radikal DPPH dan kemudian dihitung melalui perhitungan presentase 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} (Rosalia et al., 2022).

3.6 Formulasi Sediaan

Tabel 3.1. Formulasi Perontok Bulu

Bahan	Formulasi (%)				Range	Fungsi
	F0	F1	F2	F3		
Asam Tioglikolat	9	9	9	9	<8 (Badan POM, 2015)	Zat aktif
Ekstrak temu blenyeh	0	10	15	20	10-30 (Anggita & Nurhayati, 2024)	Antioksidan
<i>Cetyl alcohol</i>	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5-6 (Rowe et al., 2023)	Pengemulsi
Propilenglikol	20	20	20	20	5-20 (Rowe et al., 2023)	Pelarut
Cera alba	20	20	20	20	5-20 (Rowe et al., 2023)	Pengemulsi
Parafin cair	10	10	10	10	5-10 (Rowe, et. al, 2009)	Pelumas
Minyak mawar	5 tetes	5 tetes	5 tetes	5 tetes	-	Pewangi
Aquades	Ad 100 mL	Ad 100 mL	Ad 100 mL	Ad 100 mL	-	

Keterangan : Tiap Formulasi Dibuat Sebanyak 100 gram

3.6.1 Pembuatan Sediaan

Panaskan parafin cair, cera alba, dan setil alkohol dalam gelas kimia borosilikat pada suhu 75° C dan pertahankan suhu pemanasan tersebut (fase minyak). Kemudian tambahkan propilenglikol dan ekstrak temu blenyeh dalam jumlah yang terukur dan aduk dengan kuat hingga membentuk krim yang halus. Kemudian tambahkan bahan aktif asam *tioglikolat* ke dalam krim dan aduk terus-menerus hingga tercampur rata dengan krim. Kemudian tambahkan sedikit minyak mawar sebagai pewangi. Aduk dengan benar hingga terbentuk krim yang tepat (Nurfita et al., 2021).

3.6.2 Uji Evaluasi Sediaan

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis yaitu uji yang dilakukan dengan indra manusia seperti bau, rasa, warna, dan rasa (Khalisa et al., 2021).

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas yaitu uji yang dilakukan untuk mengetahui apakah varian populasi sama atau tidak (Sianturi, 2022). Krim harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran halus (Manna & Thalib, 2023).

c. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menggunakan stik pH meter. Pengukuran dilakukan tiga kali untuk masing-masing sediaan, pH sediaan luar yang baik adalah antara 4,5 sampai 8 yang sebanding dengan pH kulit (Manna & Thalib, 2023).

d. 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).

e. Uji Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan cara 0,5 krim diletakan diatas kaca objek kemudian ditutup dengan menggunakan kaca objek lain dan diletakan beban seberat 500 gram selama 5 menit. Selanjutnya dijepit kaca objek pada alat lalu beban seberat 100 gram dilepaskan hingga akan menarik kaca objek bagian bawah. Kemudian catat waktu yang dibutuhkan kedua kaca objek terpisah. Persyaratan yang baik pada krim yaitu lebih dari 4 detik (Pratiwi et al., 2024).

f. Uji Perontok Bulu dan Iritasi

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci New Zealand albino Jantan (*Oryctolagus cuniculus*),

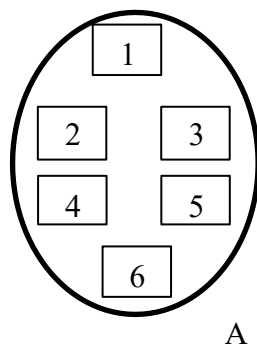
pemilihan kelinci albino dikarenakan memiliki kulit yang sensitif dibandingkan kelinci jenis lainnya dan berdasarkan bulu kelinci yang lebih halus dibandingkan kelinci jenis lain (Wijaya & Nisyak, 2020). Tujuan dari percobaan ini merupakan untuk mengetahui apakah sediaan krim perontok bulu dapat merontokkan bulu dan menyebabkan iritasi pada kulit atau tidak. Pengamatan ini dilakukan menggunakan hewan uji kelinci dengan basis krim sebagai kontrol negatif F0, F1, F2, dan F3 dilakukan pengamatan perontokan bulu kelinci selama 5 sampai 10 menit (Reichert et al., 2023).

Pada pengujian iritasi menggunakan kontrol positif (*veet*), kontrol negatif (F0), F1, F2, dan F3. Pengamatan dengan metode *draise* dan diamati adanya eritema dan edema yang terjadi pada 24 jam dan 72 jam, kemudian diberi range iritasi mulai 0 sampai 4 tergantung tingkat keparahan iritasi yang terlihat. Eritema adalah kemerahan pada kulit yang dihasilkan oleh kongesti pembuluh kapiler, sedangkan edema merupakan akumulasi abnormal cairan dibawah kulit atau dalam satu atau lebih rongga tubuh. Pengamatan tidak perlu dilakukan pada 48 jam dikarenakan pada 24 jam saja sentuhan pertama zat uji akan merangsang pada kulit dan pada 48 jam dan 72 jam itu mengamati pemulihan dari hari pertama 24 jam (Sukirawati, 2013).

Respon yang didapat digunakan untuk mendapatkan nilai *Primary Irritation Index* (PII) yang dibandingkan dengan tabel skor iritasi dengan rumus sebagai berikut :

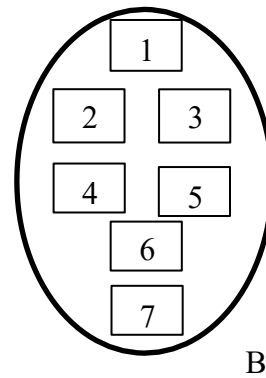
$$P II = \frac{\text{jumlah skor eritema} + \text{Jumlah skor endema}}{\text{jumlah hewan}}$$

Selanjutnya dilakukan dengan 4 kelompok perlakuan sebagai berikut :



Keterangan A:

- a. Kepala kelinci
- b. Daerah pemaparan kontrol negatif (F0)
- c. Daerah pemaparan F1
- d. Daerah pemaparan F2
- e. Daerah pemaparan F3
- f. Ekor kelinci



Keterangan B:

1. Kepala kelinci
2. Daerah pemaparan kontrol positif (*veet*)
3. Daerah pemaparan F0
4. Daerah pemaparan F1
5. Daerah pemaparan F2
6. Daerah pemaparan F3
7. Ekor kelinci

3.7 Analisa Data

Data hasil evaluasi sediaan dilakukan analisis untuk membandingkan antar formula. Dilakukan pengujian terhadap homogenitas dan normalitas data kemudian hasil pengujian dapat dilakukan untuk menentukan analisis menggunakan parametrik (uji ANOVA) atau non parametri (Uji Kruskal Wallis) dengan taraf kepercayaan 95% (Yulastuti et al., 2024).