

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan yaitu bulan Februari 2023 – Mei 2024. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi di Fakultas Ilmu Kesehatan Program Studi Farmasi Program Sarjana S-1 Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV mini-120), alat sonikasi, timbangan analitik (Ohaus), waterbath, erlenmeyer 250 mL (pyrex), beaker glass 250 mL (pyrex), gelas ukur 100 mL (pyrex), labu ukur 25 mL, labu ukur 100 mL, mortar dan stamper, cawan porselen (pyrex), corong kaca 50 mm (pyrex), kaca objek, sudip, sendok tanduk, spatula stainless, aluminium foil, wadah cream, kaca objek, pipet tetes, dan batang pengaduk (pyrex).

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*), asam stearat (CV Kimia Jaya Labora), setil alkohol (CV Nurul Jaya Medicalbisnis), tretanolamin (CV Kimia Jaya Labora), gliserin (CV Kimia Jaya Labora), metil paraben (CV Kimia Jaya Labora), propil paraben (CV Kimia Jaya Labora), aquades, metilen blue, metanol, etanol 70%, vitamin C, asam klorida

(HCl), reagen dragendroff, magnesium (Mg). asam sulfat (H_2SO_4) dan besi klorida ($FeCl_3$).

3.3 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini termasuk penelitian eksperimental yang bersifat analitik untuk mengetahui formulasi dan uji aktivitas antikosidan sediaan *eye cream* ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*). Dimana variabel pada penelitian ini yaitu:

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahan atau timbulnya variabel dependent (terikat). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*).

3.3.2 Variabel terkait

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karna adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil fisik sediaan dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*).

3.3.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga pengaruh variabel independent terhadap dependent tidak dipengaruhi faktor luar yang diteliti. Pada penelitian ini sebagai variabel kontrol adalah metode pembuatan ekstrak dan sediaan *eye cream*.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengumpulan Sampel

Daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) yang diteliti menggunakan daun hijau muda dan hijau tua pada tanaman tempuyung. Sampel basah daun tempuyung yang akan digunakan sebanyak 5 kg dengan hasil serbuk simplisia kering sebanyak 500 mg. Daun tempuyung diperoleh dari Wisata Kesehatan Jamu, Kecamatan Kalibakung, Kabupaten Tegal.

3.4.2 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Farmasi Bahan Alam Program Studi Farmasi Program Sarjana (S-1) di Universitas Bhmada Slawi, Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi. Agar menghindari terjadinya kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain (Khotimah, 2021).

3.4.3 Proses Pengeringan

Proses pengeringan daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) yang dilakukan pada penelitian ini dengan menggunakan pengeringan dengan menggunakan pemanas oven dengan suhu 40⁰C-50⁰C. Proses pengeringan dihentikan ketika daun menjadi layu dan berubah warna menjadi coklat serta daun rapuh saat digengam (Arja, 2019).

3.4.4 Pembuatan Serbuk Simplisia

Daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) yang sudah kering haluskan dengan cara diblender sehingga didapatkan serbuk simplisia dan yang dihitung rendemen yang didapatkan dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Berat Simplisia kering (g)}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

3.4.5 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak yang dilakukan pada penelitian ini dengan menggunakan metode sonikasi, metode sonikasi dipilih dapat memberikan kemampuan ekstraksi yang efisien pada suhu lebih rendah dari pada yang digunakan secara konvensional dan waktu ekstraksi yang lebih singkat (Paniwnyk *et al.*, 2009). Sampel daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*), yang telah dikeringkan dan dihaluskan ditimbang sebanyak 500gram. Diekstrasikan dengan metode sonikasi menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 1500mL selama 40menit (Qodriah *et al.*, 2021) dengan perbandingan 1:3, kemudian disaring. Setelah itu diuapkan pelarutnya menggunakan water bath pada suhu 60⁰C sehingga diperoleh ekstrak yang kental (Qodriah *et al.*, 2021). Ekstrak kental yang didapatkan dihitung menggunakan rumus rendemen ekstrak :

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat Ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Berat Serbuk Simplisia (g)}} \times 100\%$$

3.4.6 Standarisasi Ekstrak

a. Organoleptis

Organoleptis dilakukan untuk mengetahui suatu ekstrak rusak atau tidak setelah mengalami proses penyimpanan. Organoleptis dilakukan dengan mengamati bentuk, warna dan bau dari ekstrak (Adrianti, 2019).

b. Susut Pengeringan

Sebanyak 1gram ekstrak simplisia dimasukan ke dalam botol timbang yang sebelumnya telah dioven pada suhu 105°C hingga diperoleh bobot kristal, penimbangan dilakukan setelah cawan dan ekstak dimasukan ke dalam deskator hingga suhu kamar. Persyaratan kadar susut pengeringan pada simplian menurut standar Farmakope Herbal Indonesia Edisi 1 (2008) yaitu tidak boleh lebih dari 10% (Adrianti, 2019).

c. Kadar Air

Alat moisture analyzer diset pada suhu 105°C dan otomatis langsung memeriksa ketika alat ditutup. Sebanyak 5gram ekstrak dimasukan dan diratakan dalam mangkok alumumium foil, kemudian dimasukan kedalam alat. Panas halogen akan menyala dan melalui pemanasan ekstrak hingga bobot konstan, selama lampu halogen masih menyala maka berat ekstrak belum konstan setelah lampu mati berat ekstrak suatu konatsan dan delayer akan ditampilkan kadar air dari ekstrak. Persyaratan kadar air tidak lebih dari 10% (Adrianti, 2019).

3.4.7 Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) 0,5g ekstrak diambil dan ditambahkan 0,5ml H₂SO₄ 2N (asam sulfat) lapisan asam yang tidak berwarna diuji dengan menambahkan reagen dragendrof 3-4 tetes. Apabila terbentuk endapan berwarna oren, coklat atau putih menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung senyawa alkaloid (Ulfa,2016).

b. Flavonoid

Ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) 0,5g ekstrak diambil dan ditambahkan Mg 0,1g dan ditambahkan 2 tetes HCl pekat. Adanya flavanoid terbentuknya larutan berwarna merah pada lapisan etanol maka menunjukkan senyawa flavonoid (Ulfa,2016).

c. Titerpenoid/steroid

Ekstrak Etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) 0,5g ekstrak dimasukan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3ml etanol 70%, 2mL asam sulfat dan asam asetat anhidrat. Hasil positif larutan berwarna ungu ke biru atau hijau (Agustin *et al.*,2017).

d. Fenol

Ekstrak etanol tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) ditimbang sebanyak 0,5g ekstrak ditambah 2-3 tetes FeCl 1%. Adanya fenol ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman (Agustin *et al.*, 2017).

e. Saponin

Ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*). Ditimbang sebanyak 0,5g ekstrak kemudian ditambahkan aquadest hingga seluruh ekstrak terendam. Didihkan selama 2-3 menit kemudian didinginkan selanjutnya dikocok kuat-kuat. Hasil positif akan terbentuk buih yang stabil 1-3 cm (Agustin *et al.*,2017).

3.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak

a. Pembuatan Larutan DPPH 35 PPM

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 3,5mg kemudian dilarutkan dalam 100mL metanol P.a di dalam labu takar 100mL. Sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 35 ppm (Juwita, Muchtar & Putri, 2020).

b. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum

Dipipet 4 mL larutan DPPH ditambahkan 1 mL metanol P.a homogenkan dan diamati serapannya pada rentang 500-525nm dengan menggunakan blanko metanol (Aritong, 2019).

c. Penentuan Operating Time (OT)

Larutan DPPH 0,5mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 4mL. Kemudian ditambahkan 0,2mL larutan vitamin C dengan konsentrasi 100ppm. Setiap tabung reaksi ditutup dengan alumunium foil diinkubasi di tempat gelap dengan waktu yang berbeda yaitu 5menit, 15menit, 30menit, 45menit dan 60menit. Absorbansi sampel vitamin C diukur pada panjang gelombang maksimum dengan blanko metanol (Aritong, 2019).

d. Penentuan serapan blanko

Sebanyak 3,8mL larutan DPPH 0,05 dipipet dan ditambahkan 0,2mL metanol P.a setelah dibiarkan 12,5menit, ditempat pada keadaan dalam suhu kamar, serapan diukur pada spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 525nm.

e. Pembuatan Larutan Vitamin C

Larutan stok vitamin C 400 ppm dibuat dengan sebanyak 10 mg serbuk vitamin C ditimbang dan dilarutkan dalam 25mL metanol p.a. Kemudian dibuat seri kadar vitamin C dengan konsentrasi 2ppm, 4ppm, 6ppm, 8ppm, dan 10ppm, (Juwita, Muchatr & Putri, 2020).

f. Pembuatan Larutan Sampel

Sebanyak 2,5mg ekstrak etanol daun tempuyung ditimbang dan dilarutkan 25mL metanol sehingga didapatkan larutan stok sampel 100ppm. Dari larutan tersebut dilakukan pengenceran bertingkat untuk mendapatkan seri kadar larutan sampel ekstrak etanol daun tempuyung dengan konsentrasi 2ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm.

g. Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan sebanyak 0,2mL, masing-masing larutan uji dipipet dengan mikro ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 3,8mL larutan DPPH. Campuran larutan dihomogenkan dan dinkubasi selama 30 menit di tempat gelap dalam suhu ruang,

serapan diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang serapan maksimum DPPH 515,5nm. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*). Ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal bebas DPPH, dengan cara menghitung presentase inhibisi serapan DPPH (Juwita, Muchtr & Putri, 2020).

Rumus presentase inhibitor:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs. Kontrol} - \text{Abs. Sampel}}{\text{Abs. Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs. Kontrol = Serapan Radikal DPPH 0,05 pada panjang gelombang maksimum.

Abs.Sampel = Serapan Radikal DPPH 0,05 setelah ditambahkan larutan uji pada panjang gelombang serapan maksimum DPPH

Hasil persen inhibisi dilakukan pembuatan kurva antara persen inhibisi dengan konsentrasi ekstrak etanol tempuyung (*Sonchus arvensis L.*). Untuk membandingkan vitamin C. dari kurva tersebut akan diperoleh persamaan liner yaitu $Y = a + bx$ untuk menghitung besaran nilai IC_{50} .

3.4.10 Formulasi Sediaan

Tabel 3.1 Rancangan formulasi sediaan *eye cream* ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*)

No	Komposisi	Range (%)	Formulasi (%)				Kegunaan	Litelatur
			F0	F1	F2	F3		
1.	Ekstrak etanol daun tempuyung	-	-	5	10	12,5	Zat aktif	-
2.	Asam setearat	1-20%	10	10	10	10	Agent Pengemulsi	Handbook of pharmaceutical excipients hal 494
3.	Setil alkohol	2-5%	5	5	5	5	Emolien	Handbook of pharmaceutical excipients hal 155
4.	Tretanolamin	2-4%	2	2	2	2	Emulgator	Handbook of pharmaceutical excipients hal 663
5.	Gliserin	1- <30%	4	4	4	4	Humektan	Handbook of pharmaceutical excipients hal 283
6.	Metil paraben	0,02-0,3%	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengawet	Farmakope edisi IV hal 551
7.	Propil paraben	0,01-0,6%	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengawet	Handbook of pharmaceutical excipients hal 526
8.	Aqua dest	-	Ad 50	Ad 50	Ad 50	Ad 50	Solven	Farmakope edisi 3
9.	Esens tuti fruit	-	-	1	1	1	Pengaroma	

3.4.11 Pembuatan Sediaan *eye cream*

a. Cara pembuatan farmulasi kontrol

- 1) Masukkan asam strearat, setil alkohol, dan propil paraben ke dalam cawan (fase minyak) lebur fase minyak pada suhu 75°C
- 2) Panaskan aquadest, tambahkan trietanolamin, glisein dan metil paraben pada suhu 75°C (fase air), kemudian aduk homogen
- 3) Dimasukan fase air dalam mortir panas

- 4) Campurkan fase minyak ke dalam fase air sedikit demi sedikit dalam keadaan sama-sama panas. Aduk dengan menggunakan stamper sampai terbentuk masa krim (Puspitasari, 2017).
- b. Cara pembuatan formulasi I,II dan III
- 1) Masukkan asam stearat, setil alkohol dan propil paraben ke dalam cawan (fase minyak). Lebur fase minyak pada suhu 75°C (masa 1)
 - 2) Panaskan aquadest, tambahkan tretanolamin, gliserin dan metil paraben pada suhu 75°C (Fase air), kemudian aduk ad homogen (masa 2)
 - 3) Masukkan fase air ke dalam mortir panas
 - 4) Campurkan fase minyak ke dalam fase air sedikit demi sedikit dalam keadaan sama-sama panas sambil diaduk dengan stamper sampai terbentuk masa krim yang stabil (masa 3)
 - 5) Masukkan ekstrak kenal etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) ke dalam masa 3 pada suhu 45°C, tambahkan sedikit demi sedikit, gerus ad homogen (Lestari *et al.*, 2020).

3.4.12 Uji Sifat Fisik Sediaan

Sediaan *Eye cream* yang dibuat harus melewati uji sediaan fisik, hal ini bertujuan untuk mengetahui sifat fisik dari sediaan yang dibuat dan disesuaikan dengan persyaratan uji. Uji fisik sediaan meliputi:

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati secara langsung bentuk, warna dan bau dari sediaan *Eye cream* yang akan dibuat (Puspitasari & Yuita, 2017).

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk mengamati sediaan apakah adanya butiran kasar atau tidak yang terdapat pada sediaan *Eye cream* yang akan diformulasikan. Uji homogenitas dilakukan dengan mengoleskan sampel sediaan sebanyak 1 gram pada kaca objek dan diamati adanya butiran kasar atau tidak (Puspitasari & Yuita, 2017).

c. Uji stabilitas

Uji stabilitas dilakukan dengan metode *cycling test*. Krim disimpan pada suhu 4⁰C selama 24 jam dan kemudian dipindahkan ke dalam oven bersuhu 40⁰C selama 24 jam (satu siklus). Uji dilakukan sebanyak 3 siklus, kemudian diamati perubahan fisik yang terjadi (apakah ada pemisahan) (Arbie *et al.*, 2021).

d. Uji Tipe Krim

Uji tipe krim dilakukan dengan mengoleskan sediaan pada *objek glass*, kemudian ditambahkan 1 tetes metilen *blue* (Sugihartini *et al.*, n.d.). Uji tipe emulsi dilakukan untuk mengetahui sediaan *Eye cream* termasuk dalam tipe emulsi minyak

dalam air (M/A) atau air dalam minyak (A/M) (Sugihartini *et al.*, 2018).

e. Uji Daya Lekat

Uji daya lekat bertujuan untuk mengetahui kemampuan sediaan melekat ketika diaplikasikan ke kulit (Arbie *et al.*, 2021) Pengujian daya lekat dilakukan dengan meletakkan 0,5gram sediaan di atas *objek glass*, tutup menggunakan mika penutup dan tekan dengan beban 1kg selama 5menit. *Objek glass* dipasang pada alat uji daya lekat, dilepaskan beban seberat 100 gram, lalu dicatat waktu hingga kedua *objek glass* terlepas. Persyaratan uji daya lekat yang baik yaitu selama lebih dari 4 detik (Arbie *et al.*, 2021).

f. Uji Daya Sebar

Uji daya sebar dilakukan untuk mengetahui kemampuan sediaan menyebar pada permukaan kulit, uji daya sebar ditimbang 0,5 gram sediaan dengan posisi terbalik, didiamkan selama 1 menit dan diberi beban 50 gram, sampai 100 gram setiap menit. (Nugrahaeni *et al.*2019.). Persyaratan uji daya sebar yaitu dengan rentan daya sebar berkisar 5 cm-7 cm (Tungadi *et al.*, 2023).

g. Uji pH

Uji pH dilakukan untuk mengukur tingkat keasaman sediaan *eye cream* yang akan dibuat sebagai jaminan sediaan tidak akan menyebabkan iritasi pada kulit. Pengujian pH dilakukan dengan mencelupkan stik pH ke dalam sediaan *eye cream* , lalu diukur range pH yang tertera. Ditimbang 1 gram sediaan dan diencerkan

dengan 10 mL aquadest. Persyaratan pH yang baik untuk kulit yaitu berkisar antara 4,5-8,0 (Farmasetika *et al.*, 2017).

h. Uji viskositas

Uji viskositas bertujuan untuk mengetahui kekentalan sediaan krim yang diharapkan agar mudah dioleskan. Pengujian ini dilakukan menggunakan Brookfield dengan spindel dan kecepatan yang disesuaikan. Sediaan dimasukkan kedalam gelas beaker sampai mencapai volume 50 mL, kemudian spindel no 6 diturunkan hingga batas spindel tercelup dengan kecepatan 60 rpm. secara. Nilai viskositas yang memenuhi standar SNI yaitu berkisar antara 2000cp-50.000cp (Dewi *et al.*, 2014).

3.4.13 Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan *Eye cream*

a. Pembuatan Larutan DPPH

DPPH ditimbang sebanyak 3,5 mg kemudian dilarutkan dalam 100mL metanol P.a di dalam labu ukur 100mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 35 ppm (Muzdalifa & Jamal, 2019).

b. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksium

Dipipet 4 mL larutan DPPH ditambahkan 4mL metanol P.a homogenkan dan diamati serapanya pada rentang 500-525nm dengan menggunakan blanko metanol (Muzdalifa & Jamal, 2019).

c. Penentuan Operating Time (OT)

Larutan DPPH 0,5 dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 4mL, kemudian ditambahkan 0,2mL larutan vitamin C dengan konsentrasi 100ppm. Setiap tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil diinkubasi di tempat gelap dengan waktu yang berbeda yaitu 5menit, 15menit, 30menit, 45menit dan 60menit. Absorbansi sampel vitamin C diukur pada panjang gelombang maksimum dengan blanko metanol (Muzdalifa & Jamal, 2019).

d. Penentuan serapan blanko

Sebanyak 3,8mL larutan DPPH 0,01mM dipipet dan ditambahkan 0,2mL metanol P.a setelah dibiarkan 12,5menit, ditempat pada keadaan dalam suhu kamar, serapan diukur pada spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515nm (Muzdalifa & Jamal, 2019).

e. Pembuatan Larutan Vitamin C

Larutan stok vitamin C 100ppm dibuat dengan sebanyak 10mg serbuk vitamin C ditimbang dan dilarutkan dalam 25mL metanol. Kemudian dibuat seri kadar vitamin C dengan konsentrasi 2ppm, 4ppm, 6ppm, 8ppm, dan 10ppm (Muzdalifa & Jamal, 2019)

f. Pembuatan Larutan Sampel

Sebanyak 5 mg sediaa *eye cream* ekstrak etanol daun tempuyung ditimbang dan dilarutkan 10mL. Metanol sehingga didapatkan larutan stok sampel 500ppm. Dari larutan tersebut

dilakukan pengenceran bertingkat untuk mendapatkan seri kadar larutan sampel ekstrak etanol daun tempuyung dengan konsentrasi 10ppm, 20ppm, 30ppm, 40ppm dan 50 ppm (Muzdalifa & Jamal, 2019).

g. Uji aktivitas antioskidan sediaan *Eye cream*

Ditimbang sebanyak 5 mg krim, dimasukan ke dalam erlenmayer dilarutkan dalam etanol p.a hingga volumenya menjadi 10 mL, dipanaskan diatas penangas air hingga krim dan etanol menjadi homogen. Dilakukan sebanyak 3 kali ke dalam tabung reaksi, kemudian disentrifungsi dengan kecepatan 300rpm selama 10 menit. Disaring dan didiamkan pada tempat gelap selama 30menit. Dibaca absorbansinya menggunakan spektrofometer UV-VIS pada panjang gelombang 515,5nm. Dihitung % aktivitas antioskidan krim ekstrak etanol daun tempuyung (Muzdalifa & Jamal, 2019).

3.4.14 Analisi Data

Metode analisis data dalam penelitian ini menggunakan analisis *one way anova* dan uji tukey. Uji tukey merupakan salah uji statistik non parameter yang dapat digunakan untuk menguji apakah ada perbedaan yang signifikan antara kelompok variabel indepeden dengan variabel dependen *one way anova*.