

## **BAB 3**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Juni 2024 di Laboratorium bahan alam Prodi Farmasi S-1 Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Bhamada Slawi.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **1. Alat**

Peralatan yang digunakan antara lain seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), oven (Getra), *rotary evaporator* (Biobase), timbangan analitik (Ohaus), *homogenizer*, desikator, kompor listrik (Maspion), viskometer (NDJ 8S), alat uji daya lekat, *water bath* (Biobase), *moisture analyzer balance*, *blender* (Cosmos), mortar, stamper, erlenmayer (*Pyrex*), gelas beker (*Pyrex*), cawan porselen, tabung reaksi (*Pyrex*), labu ukur (*Pyrex*), *object glass*, pH meter (Hanna), termometer ruang (Ohaus), toples kaca, rak tabung reaksi, pipet volume, pipet tetes, batang pengaduk, lempeng kaca, aluminium foil, kain flannel, kertas saring, pisau besar, sendok tanduk, spatula, sudip dan *handscoon*.

##### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi serbuk biji salak dan ekstrak daun jeruk purut, bahan-bahan lainnya dengan merk CV. Kimia Jaya Labora diantaranya etanol 96%, etanol 70%, metanol pro analisa, FeCl<sub>3</sub>, pereaksi *wagner*, pereaksi *mayer*, aquadest, serbuk DPPH, serbuk

vitamin C, larutan, NaOH, *Polivinil Alcohol* (PVA), Trietanolamin (TEA), HPMC, Gliserin (*CV. Kimia Jaya Abadi*), Nipagin dan Nipasol.

### **3.3 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium dengan variabel :

#### **1. Variabel bebas**

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab utamanya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini variasi konsentrasi serbuk biji salak dan ekstrak daun jeruk purut (Sugiyono, 2013).

#### **2. Variabel terikat**

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini hasil evaluasi aktivitas antioksidan masker gel *peel-off* (Sugiyono, 2013).

#### **3. Variabel terkontrol**

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga variabel bebas dan variabel terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar. Variabel terkontrol dalam penelitian ini metode DPPH dan formulasi masker gel *peel-off* (Sugiyono, 2013).

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1. Determinasi Tanaman**

Pemeriksaan atau determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi S-1, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Bhamada Slawi.

### **3.4.2. Persiapan Sampel**

Dalam penelitian ini menggunakan dua bahan sampel yaitu biji salak dan daun jeruk purut. Buah salak dengan memanfaatkan biji salak dengan warna coklat berbentuk agak lonjong dan keras diperoleh dari Desa Pakembaran, Kecamatan Warung Pring, Kabupaten Pemalang. Daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C.) yang masih segar dan berwarna hijau diperoleh dari Desa Pagejungan, Kecamatan Brebes, Kabupaten Brebes.

#### **3.4.2.1. Persiapan Sampel Serbuk Biji Salak**

Biji salak (*Salacca zalacca* Gaertn. Voss.) yang diperoleh dilakukan sortasi basah guna memisahkan biji salak dengan sisa-sisa buah salak atau kotoran. Biji salak yang sudah bersih ditiriskan ditimbang 5 kg dan dipotong menjadi 8 bagian. Dilakukan pengeringan dalam oven dengan suhu 60° C selama 48 jam, jadilah simplisia kering. Selanjutnya simplisia kering dihaluskan menggunakan *blender* dan diayak menggunakan ayakan nomor 30 mesh (Lutfiana, Dellima dan Rosita, 2021).

#### **3.4.2.2. Persiapan sampel daun jeruk purut**

Daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C.) ditimbang sebanyak 5 kg dicuci dengan air mengalir, dipotong dengan ukuran 0,25-0,6 cm lalu dilakukan perajangan. Sampel yang dirajang lalu dikeringkan dalam oven dengan suhu 60° C selama

24 jam. Simplisia kering dihaluskan menggunakan *blender* (Nurhayana, Stevani dan Ratna, 2022).

### 3.4.3. Ekstraksi Daun Jeruk Purut

Serbuk daun jeruk purut ditimbang 500 gram, masukan dalam toples kaca ditambah 3000 mL etanol 96%. Direndam selama 3 hari dan diaduk secara periodik. Ekstrak disaring dengan kain flannel, dimasukkan dalam *evaporator rotary* dan diuapkan diatas *waterbath* sampai alkohol menghilang, lalu timbang ekstrak yang diperoleh (Rohiyati, Juliantoni dan Hakim, 2020).

Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Rumus perhitungan % rendemen:

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat (gram)}}{\text{bobot sampel yang diekstrak (gram)}} \times 100 \%$$

(Febrilia, Wilmar dan Jeane, 2019)

### 3.4.4. Standarisasi Ekstrak

Standarisasi merupakan proses penentuan spesifikasi bahan berdasarkan parameter tertentu untuk mencapai tingkat kualitas standar berdasarkan 2 parameter yaitu parameter spesifik dan parameter non spesifik. Untuk menjamin mutu, aman, kualitas, dan khasiat dari simplisia tanaman obat, perlu dilakukan penetapan standar mutu spesifik dan non spesifik dengan tujuan simplisia dapat terstandar dan digunakan sebagai obat yang mengandung kadar senyawa aktif, konstan, dan memiliki kualitas yang baik (Ardi, Santi dan Lili, 2020).

Ada beberapa parameter standarisasi ekstrak spesifik dan non spesifik, diantaranya sebagai berikut :

1. Parameter spesifik

Organoleptik termasuk parameter spesifik yang meliputi penggunaan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk (padat, serbuk, kental, cair), warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000).

2. Parameter non spesifik

a. Kadar air

Ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukan dan diratakan dalam mangkok *aluminium foil* lalu dimasukan kedalam alat *moisture analyzer balance* yang telah diaktifkan pada suhu 105°C dan otomatis memeriksa ketika alat ditutup (Depkes RI, 2000).

Pemanas halogen akan menyala dan mulai memanaskan ekstrak hingga bobot konstan, selama lampu halogen masih menyala maka berat ekstrak belum konstan, setelah lampu mati berat ekstrak sudah konstan dan layar akan ditampilkan kadar air ekstrak. Syarat kadar air untuk simplisia pada umumnya yaitu tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 2000).

b. Susut pengeringan

Sebanyak timbang sebelumnya telah dioven dengan suhu 105°C selama 30 menit. Kemudian ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan menggunakan batang pengadu. Kemudian dimasukkan kedalam oven dan dibuka tutupnya, dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kemudian dimasukkan

dalam desikator hingga suhu kamar dan ditimbang. Persyaratan yang baik untuk susut pengeringan adalah kurang dari 10%, karena susut pengeringan juga mewakili kandungan air yang menguap (Halida, 2019).

perhitungan susut pengeringan :

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{berat sebelum pemanasan} - \text{berat akhir}}{\text{berat sebelum pemanasan}} \times 100 \%$$

(Depkes RI, 2000).

c. Pengujian bebas etanol

Ekstrak dilarutkan dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan asam asetat dan ditutup menggunakan kapas, selanjutnya dipanaskan sampai mendidih. Setelah itu diidentifikasi bau ester pada kapas, jika ekstrak tidak mengandung etanol maka tidak tercium bau ester khas dari etanol (Sandi dan Zulfiah, 2020).

### 3.4.5 Skrining Fitokimia

a. Uji flavonoid

Sebanyak 1mL sampel diambil masukan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 10%. Hasil positif akan ditandai berupa perubahan warna larutan menjadi coklat (Sonam, Singh dan Pooja, 2017).

b. Uji Tanin

Sampel 1mL, ditambahkan beberapa tetes FeCl<sub>3</sub> 1%. Diamati jika terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa tanin (Lumowa dan Bardin, 2018).

c. Uji Alkaloid

Dengan menggunakan pereaksi wagner 1 mL sampel ditambahkan beberapa tetes pereaksi *wagner*, reaksi positif apabila terbentuk endapan coklat dan negatif jika terjadi perubahan warna. Sedangkan dengan pereaksi *mayer*, reaksi positif ditandai terbentuknya endapan menggumpal yang berwarna putih atau kuning (Sonam, Singh dan Pooja, 2017).

d. Uji Fenol

Sampel 50 mg dilarutkan dalam 5 mL aquadest, ditambahkan sebanyak 2-3 tetes  $\text{FeCl}_3$ . Hasil positif ditandai adanya perubahan warna menjadi hijau hingga biru kehitaman (Boy et al., 2019).

e. Uji Saponin

Diambil sampel sebanyak 1 gram dan masukan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan aquadest hingga seluruh sampel terendam, didihkan selama 2-3 menit. Selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil (Melati et al., 2020).

### 3.4.5 Formulasi masker gel *peel-off* kombinasi serbuk biji salak dan ekstrak daun jeruk purut

Formulasi yang digunakan memiliki variasi konsentrasi dengan mengacu pada formulasi penelitian sebelumnya dengan dilakukan suatu pengembangan formulasi (Lutfiana, Dellima dan Rosita, 2021).

Tabel 4. Formulasi masker *gel peel-off*

Nama Bahan	Jumlah %						Fungsi	Range (%)
	F0	F1	F2	F3	F4	F5		
Serbuk biji salak	-	15	-	5	10	7,5	Zat aktif	-
Ekstrak daun jeruk purut	-	-	15	10	5	7,5	Zat aktif	-
PVA	10	10	10	10	10	10	Pembentuk film	
HPMC	1	1	1	1	1	1	Pengental	
Gliserin	12	12	12	12	12	12	Humektan	≤30
TEA	2	2	2	2	2	2	Alkalizing agent	2-4
Etanol 70%	2	2	2	2	2	2	Pelarut	-
Nipagin	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengawet	0,01-0,6
Nipasol	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	Pengawet	0,02-0,3
Aquadest ad	100	100	100	100	100	100	Pelarut	-

#### 3.4.5. Pembuatan masker *gel peel-off*

Serbuk biji salak dilarutkan dalam air mendidih secukupnya, saring dengan menggunakan kertas saring dan ambil filtratnya. *Polivinil Alcohol* (PVA) ditambahkan air 30 mL kemudian dididihkan hingga membentuk cairan kental yang jernih. HPMC ditaburkan dalam air panas secukupnya dan didiamkan hingga mengembang, diaduk hingga membentuk cairan kental. Nipagin dan nipasol dilarutkan kedalam gliserin-etanol yang telah dicampurkan sebelumnya. PVA dan HPMC dicampurkan, serta campuran gliserin hingga membentuk massa gel. Filtrat serbuk biji salak dan ekstrak daun jeruk purut dicampurkan kedalam basis gel sedikit demi sedikit hingga terdispersi merata. Hasil



sediaan masker gel *peel-off* dimasukan kedalam wadah tertutup rapat dan langkah selanjutnya akan dilakukan uji evaluasi sediaan dengan tujuan agar dapat mengetahui kesesuaian hasil sediaan dengan parameter fisik yang sudah ditetapkan serta uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (Lutfiana, Dellima dan Rosita, 2021).

### **3.4.6. Uji aktivitas antioksidan metode DPPH sampel serbuk biji salak dan ekstrak daun jeruk purut serta formulasi masker gel *peel-off***

#### **3.4.9.1 Pembuatan larutan stok DPPH 50 ppm**

Diambil serbuk DPPH dan ditimbang sebanyak 5 mg, kemudian akan dilarutkan dengan larutan metanol pro analisa pada labu ukur 100 mL (Douw dan Wardani, 2023).

#### **3.4.9.2 Pembuatan larutan stok vitamin C 1000 ppm**

Ditimbang vitamin C sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan dengan menggunakan metanol pro analisa pada labu ukur 100 mL (Douw dan Wardani, 2023).

#### **3.4.9.3 Pembuatan larutan stok sampel**

Sampel ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam 10 mL metanol pro analisa, lalu aduk sampai homogen (Douw dan Wardani, 2023).

#### **3.4.9.4 Pengukuran serapan blangko**

Larutan stok DPPH diambil sebanyak 3 mL, lalu dilakukan pengukuran panjang gelombang dengan

menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 400-800 nm (Douw dan Wardani, 2023).

#### **3.4.9.5 Penentuan *operating time***

Sebanyak 1,0 mL vitamin C ditambah 3,0 mL larutan blanko DPPH 0,1 mM. Kemudian akan dihomogenkan selama 1 menit menggunakan *vortex*, lalu dilakukan pengukuran absorbansi tiap 5 menit pada panjang gelombang 516 nm selama 60 menit (Nisa et al., 2017).

#### **3.4.9.6 Pengukuran pada aktivitas pengikat DPPH dengan serbuk vitamin C**

Larutan masing-masing akan dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 2; 4; 6; 8; dan 10 ppm dari larutan stok vitamin C, lalu dicukupkan masing-masing sampai volume 10 mL labu ukur dengan metanol pro analisa. Dari larutan tersebut diambil 1 mL larutan dan ditambahkan 2 mL larutan stok DPPH. Larutan akan diinkubasi selama 30 menit dan diukur serapan sampel dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal 516 nm (Douw dan Wardani, 2023).

#### **3.4.9.7 Pengukuran aktivitas pengikat DPPH dengan sampel**

Larutan masing-masing akan dibuat dengan 5 seri konsentrasi yaitu 5; 10; 25; 50; dan 100 ppm pada larutan stok sampel, ditambahkan masing-masing sampai volume 10 mL labu ukur menggunakan metanol pro analisa. Dari larutan

tersebut diambil 1 mL larutan dan ditambah sebanyak 2 mL larutan stok DPPH. Larutan diinkubasi selama 30 menit dan diukur serapan sampel dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm (Douw dan Wardani, 2023).

#### **3.4.7. Uji evaluasi sediaan masker *gel peel-off***

Uji evaluasi sediaan masker *gel peel-off* dilakukan pengamatan dalam suhu ruang  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  selama 7 hari meliputi organoleptik, homogenitas, daya sebar, pH sediaan, waktu mengering, viskositas, daya lekat dan stabilitas.

##### **a. Uji organoleptis**

Pada uji ini dilakukan bertujuan untuk mengamati suatu sediaan yang sudah dibuat dengan cara sediaan diamati secara visual, meliputi bentuk, aroma dan warna selama penyimpanan (Septiani, Wathoni dan Mita, 2011).

##### **b. Uji homogenitas**

Uji homogenitas dilakukan dengan melakukan pengamatan hasil sediaan yang dioleskan pada plat kaca uji (Megawati, Rani dan Elsy, 2020). Pengujian homogenitas dilakukan untuk mengetahui campuran yang sudah baik dalam sediaan masker *gel peel-off*, homogenitas yang baik apabila tidak terlihatnya butiran atau partikel yang masih terdapat dalam sediaan. Apabila dalam sediaan masih terlihat adanya partikel asing, sediaan dapat digerus kembali sampai

didapatkan sediaan yang bening pada kaca uji (Hidayati, Styawan dan Muslimah, 2020).

c. Uji daya sebar

Uji daya sebar dilakukan dengan cara ditimbang 1 gram masker, lalu diletakan diatas lempeng kaca dengan diameter 15 cm. Lempeng kaca untuk bagian atas diletakan diatas masker gel *peel-off* dan tambahkan beban 50 gram biarkan selama 5 menit. Kemudian ditambahkan kembali beban seberat 100 gram, dibiarkan 5 menit. Selanjutnya ditambahkan beban kembali dengan berat maksimum 150 gram selama 5 menit dan diukur diameter sebar nya (Megawati, Rani dan Elsy, 2020).

Pada uji ini bertujuan untuk mengetahui kesempurnaan daya sebar pada sediaan masker gel *peel-off*, semakin besarnya daya sebar yang dihasilkan maka semakin baik kualitas pada sediaan. masker gel *peel-off* dikatakan memiliki daya sebar yang baik yaitu pada rentan 5-7 cm (Hidayati, Styawan dan Muslimah, 2020).

d. Uji pH

Ditimbang sediaan masker gel *peel-off* sebanyak 1 gram diencerkan dengan 10 mL aquadest. Sediaan masker gel diletakan dala wadah, kemudian diukur pH nya dengan menggunakan stik pH meter. Pengukuran dilakukan setiap minggu selama 4 minggu penyimpanan (Megawati, Rani dan Elsy, 2020).

Pengujian pH masker gel *peel-off* dilakukan untuk mengetahui kadar pH yang memiliki keamanan yang baik. Sediaan dengan kadar pH yang baik yaitu sesuai dengan pH kulit yang berkisar 4,5-8,0. (Hidayati, Styawan dan Muslimah, 2020).

e. Uji waktu kering

Ditimbang sebanyak 1 gram sediaan masker gel *peel-off* lalu dioleskan pada kulit punggung tangan. Diamati proses mengeringnya masker gel dengan ditandai hingga membentuk lapisan film, dapat dihitung waktu mengeringnya masker gel menggunakan *stopwatch*. Pada uji waktu kering sediaan yang baik yaitu 15-30 menit (Megawati, Rani dan Elsy, 2020).

f. Uji viskositas

Uji viskositas dilakukan dengan cara meletakkan sediaan masker gel *peel-off* pada wadah, kemudian nyalakan alat viskometer *Brookfield* diputar selama 1 menit dengan kecepatan 12 rpm menggunakan spindel nomor 4 dan tunggu hingga angka pada viskometer stabil (Rihlatun, 2022).

Viskositas sangat berpengaruh pada daya sebar suatu sediaan topikal, sediaan dengan viskositas yang baik dapat menaikkan konsentrasi gel dan senyawa aktif yang terdispersi akan tertahan. Persyaratan viskositas yang baik pada sediaan topikal yaitu 4.000-40.000 cps (Hidayati, Styawan dan Muslimah, 2020).

g. Uji daya lekat

Sediaan masker gel *peel-off* ditimbang sebanyak 0,25 gram, lalu diletakan pada gelas obyek dengan beban 1 kg selama 5 menit. Gelas obyek dipasang beban seberat 80 gram dan kemudian catat waktu pelepasan maskerdari gelas obyek (Megawati, Rani dan Elsy, 2020).

Pengujian daya lekat bertujuan untuk mengukur kemampuan sediaan dalam melakukan aksinya saat dioleskan pada kulit selama proses mengering. Persyaratan sediaan masker gel *peel-off* dikatakan memiliki daya lekat yang baik yaitu tidak kurang dari 4 detik (Hidayati, Styawan dan Muslimah, 2020).

h. Uji iritasi

Pada pengujian ini dilakukan untuk mengetahui efek iritasi dari masker gel *peel-off* setelah digunakan pada kulit, sehingga dapat diketahui tingkat keamanan sediaan tersebut. Uji iritasi dilakukan dengan menggunakan formulasi kontrol negatif dan formulasi terbaik pada penelitian ini, objek penelitian pada uji ini menggunakan seekor kelinci dengan cara mencukur bulu bagian punggung dengan diameter sekitar 5x5 cm, kemudian oles tipis sediaan masker gel *peel-off* pada kulit kelinci lalu tutup dengan plaster. Biarkan selama 4 jam dan diamati pada 1, 24, 48 dan 72 jam. Hasil uji iritasi ditandai apabila sediaan dapat mengiritasi kulit, maka akan muncul warna kemerahan atau luka kecil pada kulit

kelinci yang sudah dioleskan sediaan masker gel *peel-off* (Zulfa, Rani dan Dwi, 2022).

i. *Cycling test*

*Cycling test* dilakukan dengan menyimpan sediaan 24 jam pada suhu 4 °C dan kemudian pada suhu 40°C. Lama penyimpanan pada kedua suhu dianggap sebagai satu siklus dan pengujian dilakukan sebanyak 6 siklus selama 12 hari (Pradiningsih dan Mahida, 2019).

j. Uji hedonik

Uji hedonik memiliki tujuan untuk mengetahui tingkat kesukaan panelis dengan melakukan penilaian sediaan masker gel *peel-off* dengan parameter aroma, warna, dan tekstur sediaan. Uji ini dilakukan pada 20 panelis dengan *range* umur 18-30 tahun karena pada range umur tersebut memiliki regenerasi sel kulit yang baik dimana mereka akan menilai parameter kesukaan dengan memberikan penilaian berupa angka 1 sampai 5 yang menunjukkan : 1 (sangat tidak suka), 2 (tidak suka), 3 (agak suka), 4 (suka), 5 (sangat suka) (Fathi, Dwi dan Nugraha Maulana, 2022).

### 3.4 Analisis Data

Pada analisis data akan dianalisis dengan program SPSS pendekatan secara teoritis dan statistik dengan uji *Two Way* ANOVA. Apabila hasil tidak dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis* (Lutfiana, Dellima dan Rosita, 2021).