

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang dipakai pada penelitian ini adalah sediaan emulgel ekstrak daun sirih merah (*Piper ornatum*). Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sediaan emulgel ekstrak daun sirih merah (*Piper ornatum*) dengan variasi konsentrasi HPMC.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak daun sirih merah (*Piper ornatum*.) selaku antioksidan alami pada sediaan emulgel.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi HPMC sebagai *gelling agent* dalam formula sediaan emulgel ekstrak daun sirih merah.

Variabel terkendali pada penelitian kali ini ialah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas sehingga diperlukan untuk menetapkan kualifikasinya ataupun menetralkan supaya hasil yang diperoleh tak menyebar serta bisa diulang oleh peneliti lainnya dengan cara yang tepat. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah proses pembuatan ekstrak daun sirih merah, proses pembuatan emulgel. Penelitian dan peralatan yang digunakan, radikal DPPH.

Variabel tergantung pada penelitian ini ialah variabel yang ada akibat dari variabel utama. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah uji mutu fisik. Uji stabilitas dan uji aktifitas antioksidan sediaan emulgel ekstrak daun sirih merah (*Piper ornatum*).

3. Defenisi Operasional dan Variabel Utama

Pertama, daun sirih merah adalah tumbuhan merambat yang ditanam karena khasiat pengobatan dan juga keindahan daunnya. Nama ilmiah tumbuhan asal Sulawesi ini adalah *Piper ornatum*. Daun sirih merah mengandung flavonoid, senyawa pelenolad, dan minyak atsiri.

Kedua, ekstrak etanol daun sirih merah adalah hasil maserasi serbuk daun sirih merah dengan pelarut etanol 96% selama 24 jam kemudian disaring dan dipekatkan.

Ketiga, variasi HPMC adalah variasi sebagai *gelling agent* dengan konsentrasi 3%, 5% dan 7%.

Keempat, uji mutu fisik sediaan emulgel ekstrak etanol daun sirih merah adalah dengan melihat organoleptis, homogenitas, viskositas, daya sebar, pH, daya lekat, uji tipe emulsi dan stabilitas.

Kelima, aktivitas antioksidan sediaan emulgel adalah aktivitas antioksidan sediaan dengan metode DPPH dan menggunakan kuersetin.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, botol maserasi, beaker glass, gelas ukur, alat saring, corong, batang pengaduk, vacuum rotary evaporator (IKA® RV 10), labu destilasi, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), moisture balance, mortir dan stamper, erlenmeyer, labu tentukur, pipet volume, waterbath (Memert), sudip, lempeng kaca, object glass, stopwatch, oven, pH meter viscotester VT 04 (Rion co. Ltd) dan botol ukuran 100 mL.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun sirih merah, etanol 96%, asam askorbat, DPPH, aquades, HPMC tween 80, span 80, propilen glikol, parafin cair NaOH 2N, FeCl₃ 5% , etil asetat, asam asetat anhidrat , H₂SO₄ pekat, kuersetin.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu dengan memastikan kebenaran dari sampel daun sirih merah yang akan digunakan dalam penelitian. Identifikasi yang dilakukan berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman sirih merah.

2. Preparasi Tanaman

Preparasi sampel dilakukan dengan menyiapkan dan membersihkan sampel daun sirih merah dari kotoran yang menempel, memotong kecil-kecil, selanjutnya mengeringkan sampel daun sirih merah dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, kemudian sampel dihaluskan dengan menggunakan blender. Sampel daun sirih merah yang halus tersebut siap untuk diekstraksi.

3. Pembuatan serbuk daun sirih merah

Pengambilan daun sirih merah dilakukan pukul 07.00 pagi dan tidak setelah hujan, dipetik sejumlah sampel disimpan dalam wadah kantong plastik hitam, kemudian daun sirih merah ditimbang, dilakukan sortasi basah dengan memisahkan batang dan daun yang rusak, lakukan pencucian, setelah pencucian lakukan perajangan, selanjutnya pengeringan dilakukan selama rentang 6-10 hari dibawa sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam, lakukan sortasi kering. Tahap pembuatan simplisia dengan menghalus daun sirih merah dengan blender, kemudian hasil blender disimpan dalam wadah kaca sementara, simplisia serbuk daun sirih merah dengan mesh 60, simpan simplisia dalam wadah kaca yang kemudian ditutup dengan aluminium foil agar tidak terlindung dari cahaya dan udara.

4. Penetapan susut pengeringan

Serbuk ditimbang sebanyak 1 g sampai 2 g dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam botol timbang, dengan menggoyangkan botol hingga merupakan lapisan setebal kurang 5 mm sampai 10 mm, kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering. Dibuka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C hingga botol tetap. Sebelum pengeringan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar. Kemudian keringkan kembali pada suhu penetapan hingga bobot tetap (Depkes RI, 2000).

5. Penetapan kadar air serbuk daun sirih merah

Sebanyak 10 gram serbuk daun sirih merah dimasukkan ke labu alas bulat dan ditambahkan toluena sebanyak 100 ml yang sudah dijenuhkan terlebih dahulu, pastikan sampai semua bahan terendam. Pasang alat destilasi bidwell sterling dan dipanaskan menggunakan api yang kecil. Pemanasan akan dihentikan ketika tidak ada lagi air yang menetes pada tabung Receiver. Membaca volume air yang telah terdestilasi pada skala pada tabung Receiver (Ditjen POM, 2017).

6. Pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah

Sediaan ekstrak etanol dibuat dengan cara maserasi, yaitu dengan merendam simplisia sebanyak 500 g dalam 5000 ml pelarut etanol 96% selama 24 jam sambil sekali-sekali diaduk. Setelah 24 jam, ekstrak disaring melalui kain batis dan ampasnya diperas. Ampas ditambah cairan pelarut secukupnya, diaduk kemudian disaring

sehingga diperoleh ekstrak. Setelah itu cairan ekstrak diuapkan dengan alat penguap (Rotary evaporator) sampai berbentuk cairan kental, kemudian dilanjutkan dengan menggunakan penangas air dengan suhu antara 400C-500C sampai diperoleh ekstrak kental dan hasilnya ditimbang (DepKes, 2000). Rendeman ekstrak total dihitung dengan membandingkan berat awal simplisia dan berat ekstrak yang dihasilkan.

7. Penetapan kadar air ekstrak

Ditimbang 10 gram ekstrak etanol daun sirih merah, dimasukkan dalam wadah yang sudah ditera (W1). Kemudian dimasukkan dalam oven dan dikeringkan selama 5 jam pada suhu 105°C kemudian ditimbang. Pengeringan dilanjutkan selang waktu 1 jam dan ditimbang kembali (W2) hingga didapatkan dari kedua penimbang selisih bobot tidak lebih dari 0,25 % (Ditjen POM, 2017).

8. Skrining fitokimia

8.1. Uji flavonoid. Ekstrak ditimbang sebanyak 1 gram, dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah serbuk magnesium dan HCl pekat, lalu dipanaskan kurang lebih 15 menit diatas penangas air. Jika hasilnya berwarna merah atau kuning berarti positif flavonoid (Zaky *et al.*, 2021).

8.2. Uji saponin. Ditimbang 0,5 g ekstrak, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air panas kemudian dikocok selama 10 menit sampai terbentuk busa, lalu tetesi dengan HCl 2N, jika hasilnya berbusa atau tidak hilang ketika ditambahkan HCl 2N maka bisa dikatakan positif sponin (Adhayanti *et al*, 2018).

8.3. Uji tannin. Ekstrak dan fraksi yang sudah menjadi larutan uji diambil sebanyak 1 ml kemudian reaksi dengan larutan FeCl₃. Senyawa tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan (Adhayanti, 2018).

8.4. Uji terpenoid dan steroid. Ekstrak ditimbang 2 gram, dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian dikocok dengan sedikit ditambahkan eter. Lapisan eter diambil lalu ditetaskan pada plat tetes, biarkan sampai mengering. Setelah kering tambahkan dua tetes asam asetat anhidrat dan satu tetes asam sulfat pekat. Jika hasilnya berwarna orange, merah atau kuning berarti mengandung terpenoid. Tetapi, jika hasilnya terbentuk warna hijau berarti mengandung steroid (Zaky *et al.*, 2021).

9. Uji KLT identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol daun sirih merah

Cara kerja metode KLT adalah sampel ditotolkan pada lempeng fase diam GF254 yang sudah di beri garis tanda batas, degan fase gerak yang sesuai (yang sudah dijenuhkan) dalam chamber, baku pembanding disesuaikan dengan masing-masing senyawa yang ingin diidentifikasi serta bantuan penambahan reagen deteksi tertentu. Setelah di fase diam terelusi sempurna oleh fase gerak, keringkan lempeng dengan cara diangin-anginkan. Amati di bawah sinau UV 254 nm dan 366 nm, beri tanda pada bercak yang terlihat di lempeng (dilingkari menggunakan pensil), kemudian dihitung nilai Rf masing-masing bercak. Senyawa dikatakan positif (+) jika memiliki nilai Rf yang sesuai dengan baku pembanding atau timbul warna yang sama dengan baku setelah di beri reagen deteksi.

10. Rancangan formula

Tabel 2. Rancangan formula emulgel ekstrak etanol daun sirih merah (Fitri Puspitasri et al., 2023).

Bahan	Formula (%b/b)		
	F1	F2	F3
Ekstrak daun kelor (Zat aktif)	0,0086	0,0086	0,0086
HPMC (<i>Gelling agent</i>)	3	5	7
Propilen glikol (<i>Humektan, penetration enhancer</i>)	10	10	10
Metilparaben (<i>Pengawet</i>)	0,25	0,25	0,25
Parafin cair (<i>Emolien, pelarut fase minyak</i>)	10	10	10
Span 80 (<i>Emulsifier</i>)	1,4	1,4	1,4
Tween 80 (<i>Emulsifier</i>)	3,6	3,6	3,6
Aquades (<i>Pelarut</i>)	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Tabel 3. Rancangan formula emulgel ekstrak etanol daun sirih merah

Bahan	Konsentrasi (%)					Kegunaan
	F1	F2	F3	F4	F5	
Ekstrak daun sirih	-	-	0,75	0,75	0,75	Zat aktif
Kuersetin	-	0,75	-	-	-	Pembanding
HPMC 8060 M	3	3	3	5	7	<i>Gelling agent</i>
propilenglikol	10	10	10	10	10	<i>Humektan</i>
Metil Paraben	0,2	0,25	0,25	0,25	0,25	pengawet
Parafin Cair	10	10	10	10	10	Pelarut
Span 80	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	Emulgator
Tween 80	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	Emugator
Aquadest	100	100	100	100	100	Zat tambahan

11. Cara pembuatan emulgel

Emulsi dibuat dengan memanaskan fase minyak dan fase air secara terpisah. Fase minyak dibuat dengan penambahan sebagian parafin cair kemudian ditambahkan dengan span 80 lalu dipanaskan diatas *waterbath* diaduk *ad* homogen. Fase air dibuat dengan nipagin kemudian ditambah dengan propilen glikol, tween 80 dan aquadest lalu dipanaskan diatas *waterbath* diaduk *ad* homogen. Fase air dimasukkan ke dalam fase minyak sambil tetap dipanaskan diatas *waterbath* dan diaduk hingga terbentuk basis emulsi, kemudian diangkat dari *waterbath* dan didiamkan hingga mencapai suhu runang. Pembuatan basis gel dengan cara *gelling agent* HPMC didispersikan menggunakan mortir dengan pelarut aquadest hingga tidak ada butiran yang menggumpal. Ekstrak diencerkan dengan sisa parafin sambil dipanaskan diatas *waterbath*. Basis emulsi dimasukkan ke dalam basis gel campur *ad* rata dan homogen, kemudian ditambah ekstrak yang sudah diencerkan aduk *ad* rata dan homogen hingga menjadi sediaan emulgel.

12. Evaluasi mutu fisik sediaan emugel

12.1 Uji organoleptik. Uji organoleptis dilakukan untuk melihat sediaan secara fisik dengan cara melakukan pengamatan warna, bau, dan tekstur dari sediaan yang dibuat (Effendi *et al.*, 2019).

12.2 Uji homogenitas. Dilakukan untuk melihat apakah sediaan yang telah dibuat homogen atau tidak. Sediaan emulgel dioleskan pada kaca objek dan diamati ada atau tidaknya partikel kasar yang terdapat pada kaca. Jika tidak ada partikel kasar maka sediaan tersebut menunjukkan homogen jika ada sediaan tersebut tidak homogen, homogen atau tidak homogen menunjukkan tidak terdapat partikel kasar atau gumpalan bahan (Effendi *et al.*, 2019).

12.3 Uji pH. Uji pH dilakukan menggunakan alat pH meter. Alat tersebut dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan pH 4, 7, dan 10. Setelah itu timbang sediaan dan dimasukkan ke dalam beaker glass dan diencerkan dengan aquadest sebanyak ± 10 mL. Celupkan elektroda ke dalam beaker glass dan catat hasilnya. pH yang baik untuk kulit adalah 4,5 – 6,5 (Tranggono, RI;Latifah, 2014).

12.4 Uji viskositas. Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield Rotor, pengujian dilakukan dengan nomer spindel yang sesuai. Angka dial reading dikalikan

dengan faktor koreksi yang dilihat pada tabel yang ada di brosur alat untuk mendapatkan nilai viskositas (Mayangkara, 2011).

12.5 Uji daya sebar. Sebanyak 0,5 gram sediaan emulgel diletakkan di bagian tengah kaca transparan yang dilapisi kertas grafik dibawahnya, kemudian ditutup dengan kaca transparan lain diatasnya, diberi beban (50 g, 100 g, 150 g, 200 g, dan 250 g) dan didiamkan selama 1 menit, lalu diukur diameter daerah penyebaran emulgel terlepas (Sovyana Zulkarnain, 2013).

12.6 Uji daya lekat. Sampel 0,25 gram diletakkan diantara 2 gelas obyek, kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Setelah itu beban diangkat dari gelas obyek, kemudian gelas obyek dipasang pada alat test. Alat uji diberi beban 80 gram dan kemudian dicatat waktu pelepasan emulgel dari gelas obyek (Miranti, 2009).

12.7 Uji Tipe Emulsi. Emulgel diletakkan pada objek glass, lalu tambahkan 1 tetes metilen biru, aduk dengan batang pengaduk. Bila emulgel homogen maka mempunyai tipe (M/A). apabila terdapat bintik-bintik biru maka krim mempunyai tipe (A/M) (Duha I dan Chan A, 2016).

12.8 Uji Daya Hantar Listrik. Uji daya hantar listrik adalah untuk mengetahui daya hantar listrik air, sifat larutan elektrolitk lemah dan kuat atau non elektrolitk. Siapakan alat penguji elektrolit lalu celupkan batang elektroda kedalam sediaan lalu amati jarum listrik.

13. Uji stabilitas sediaan emulgel

Pengujian menggunakan metode *cycling test* dimana pengamatan organoleptis, homogenitas, pH, dan viskositas. Sediaan kemudian disimpan pada suhu awal 4°C selama 24 jam kemudian dipindah ke oven dengan suhu 40°C (Budiman et al., 2020).

14. Pengujian aktivitas ekstrak antioksidan dengan DPPH

14.1 Penyiapan larutan stok DPPH 0,4 mM. Serbuk DPPH dengan berat 15,8 mg ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL. serbuk di larutkan ke dalam etanol p.a hingga mencapai tanda batas pada labu tentukur dan diperoleh larutan DPPH (Wulandhari, 2022).

14.2 Pembuatan larutan stok kuersetin. Pembuatan larutan kuersetin baku 100 ppm dengan cara menimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan etanol 96% hingga 100 mL dibuat pengenceran larutan kuersetin dari larutan stock yaitu 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm.

Setiap larutan dipipet sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah ditutupi dengan aluminium foil dan ditambahkan 4 mL larutan DPPH 40 ppm. Larutan di inkubasi selama ± 30 menit, selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Salim *et al.*, 2019).

14.3 Pembuatan larutan stok ekstrak etanol daun sirih merah. Ekstrak daun sirih merah ditimbang 100 mg dilarutkan dengan etanol *p.a* kemudian dimasukkan dalam labu tentukur 100 ml sampai tanda batas. Konsentrasi yang diperoleh 1000 ppm. Kemudian, dilakukan pengenceran dari 1000 ppm ke 100 ppm, dilakukan pengenceran kembali dari 100 ppm ke 50 ppm. Selanjutnya, larutan dipipet sebanyak 1 mL; 2 mL; 4 mL. 6 mL; 8 mL dimasukkan dalam labu tentukur 10 mL ditambah etanol *p.a* sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi berturut-turut dibuat 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm.

14.4 Pembuatan larutan stok sediaan emulgel daun sirih merah. Ekstrak daun sirih merah ditimbang 13 gram dilarutkan dengan etanol *p.a* kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 ml sampai tanda batas. Konsentrasi yang diperoleh 13.000 ppm. Kemudian, dilakukan pengenceran dari 1000 ppm ke 100 ppm, Selanjutnya, larutan dipipet sebanyak 1 mL; 2 mL; 3 mL. 4 mL, 5 mL dimasukkan dalam labu ukur 10 mL ditambah etanol *p.a* sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi berturut-turut dibuat 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm

14.5 Pembuatan larutan stok kontrol negatif basis emulgel. Sebanyak 10 mL sediaan dilarutkan dengan etanol *p.a* dalam labu ukur 100 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian, larutan dipipet sebanyak 1 mL; 2 mL; 3 mL; 4 mL dan 5 mL dimasukkan dalam labu tukur 10 mL ditambah etanol *p.a* sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi berturut-turut 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm.

14.6 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH. Masukkan larutan DPPH 0,4mM sebanyak 1 ml lalu dimasukkan dalam labu takar 10 ml kemudian tambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas larutan diukur dengan panjang gelombang 500-600 nm. panjang gelombang maksimum DPPH ditetapkan berdasarkan Panjang

gelombang yang memberikan nilai absorbansi paling besar (Fitriani, 2017)

14.7 Penetapan *operating time* dilakukan dengan cara 1 mL larutan DPPH 0,4 mM ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas pada labu ukur 10 mL. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dengan interval waktu 1 menit waktu 0-30 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

14.8 Uji aktivitas antioksidan. Diambil masing-masing sebanyak 1 mL larutan stok ekstrak etanol daun sirih merah dan larutan stok serum daun sirih merah, larutan stok kontrol positif serum kuersetin, serta larutan kontrol negatif basis serum yang sudah dibuat 5 seri pengenceran, dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL kemudian ditambahkan etanol *p.a* tanda batas. Selanjutnya pindahkan ke dalam vial dan digojog. Campuran diinkubasi selama *operating time* yang telah diperoleh dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH. Absorbansi yang sudah didapat kemudian digunakan untuk mengukur aktivitas penangkapan radikal bebas dari berbagai seri konsentrasi lainnya.

E. Analisis Data

Analisis hasil pengujian dari berbagai parameter antara lain viskositas, daya lekat, daya sebar, pH, dan uji aktivitas antioksidan akan dianalisis dengan pendekatan statistic menggunakan aplikasi SPSS (Statistical Package for the Social Science). Data hasil pengujian dianalisa menggunakan KolmogorvSmirnov untuk mengetahui terdistribusi normal atau tidak, jika tidak terdistribusi dengan normal akan dianalisa menggunakan uji ANOVA, dan jika data tidak homogen akan dilakukan analisa menggunakan uji Kruskal-Wallis.

Penentuan asbsorbansi dari formula I (kontrol negatif), II (kontrol positif), III, IV, V menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis serta digunakan sebagai pengukuran aktivitas antioksidan radikal bebas dan dinyatakan sebagai nilai IC₅₀. Presentase pengurangan radikal bebas DPPH pada sampel dapat dihitung dengan menggunakan persamaan:

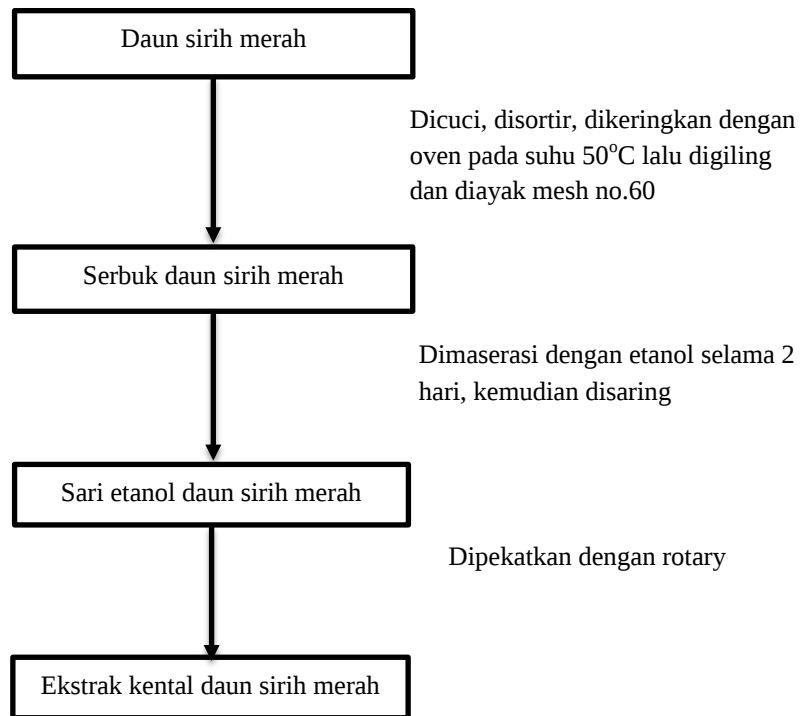
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dapat dihitung menggunakan persamaan regresi linier dimana konsetrasi sampel digunakan sebagai variable indpenden

(sumbu X) dan presentasi inhibisi sebagai variabel dependen (sumbu Y).

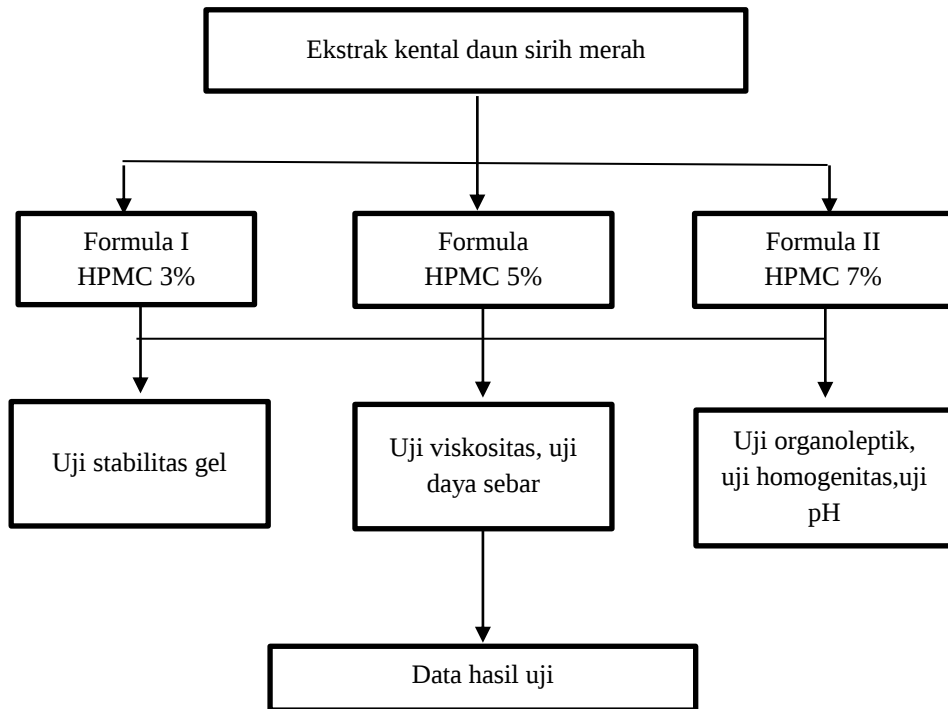
F. Skema Jalannya Penelitian

1. Skema pembuatan ekstrak daun sirih merah



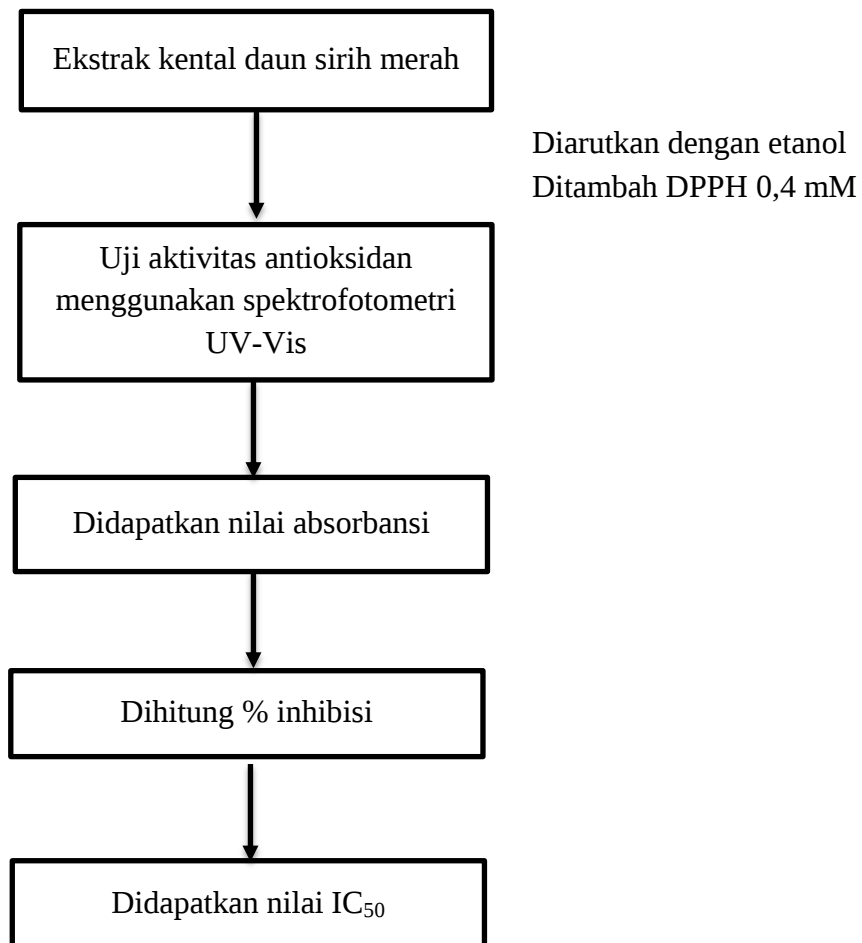
Gambar 8. Skema Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah

2. Pembuatan sediaan emulgel daun sirih merah



Gambar 9. Pembuatan Sediaan Emulgel Daun Sirih Merah.

3. Skema uji antioksidan



Gambar 10. Skema Uji Aktivitas Antioksidan