

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium. Pengujian skrining metabolit sekunder menggunakan rancangan *posttest only design*, karena memberikan informasi yang bersifat deskriptif tanpa kelompok kontrol atau kelompok pembanding. Pengujian aktivitas antioksidan dan penetapan kadar flavonoid total menggunakan *posttest-only control design* karena terdapat beberapa kelompok perlakuan ditambah satu kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2012). Ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) sebelum diformulasikan akan dilakukan skrining fitokimia untuk mengidentifikasi metabolit sekunder yang memiliki fungsi antioksidan. Uji aktivitas antioksidan dilakukan sebelum dan sesudah ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) diformulasikan menjadi emulgel dengan metode DPPH (1,1-Difenil-2-pikrihidrazil). Sediaan emulgel setelah dilakukan uji evaluasi sifat fisik juga dilakukan penetapan kadar flavonoid total menggunakan metode $AlCl_3$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Determinasi biji pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro

- b. Pembuatan ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
- c. Penetapan kadar air serbuk simplisia biji pinang (*Areca catechu* L.) dan ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan di Laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
- d. Pengujian skrining fitokimia ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
- e. Pembuatan formulasi sediaan emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
- f. Pengujian evaluasi sifat fisik sediaan emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
- g. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dan emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
- h. Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dan emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian untuk ekstraksi biji pinang (*Areca catechu* L.), pengujian skrining fitokimia, pembuatan formulasi ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) menjadi sediaan emulgel, penetapan kadar flavonoid total serta pengujian aktivitas antioksidan pada bulan Mei hingga Juli 2023

C. Subjek Penelitian

1. Populasi dalam penelitian ini adalah biji pinang (*Areca catechu* L.) yang diperoleh dari Kota Liwa, Kabupaten Lampung Barat, Lampung.
2. Sampel dalam penelitian ini adalah serbuk simplisia biji pinang (*Areca catechu* L.) dan ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.).

D. Definisi Operasional

1. Variasi konsentrasi ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) adalah perbedaan konsentrasi ekstrak biji pinang yang digunakan pada tiap formula.
2. *Inhibition concentration* (IC₅₀) atau konsentrasi inhibisi adalah konsentrasi larutan sampel yang diperlukan untuk menghambat 50% dari radikal bebas DPPH (Izzati, 2014).
3. Senyawa metabolit sekunder, senyawa yang diperoleh melalui jalur metabolisme lainnya yang meskipun dibutuhkan dianggap tidak signifikan untuk pertumbuhan tanaman (Julianto, 2019).
4. Emulgel ekstrak biji pinang adalah sediaan dengan variasi konsentrasi ekstrak yaitu 0% (F0), 1% (F1), 2% (F2) dan 3% (F3).

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dalam formulasi emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) yaitu 0% (F0), 1% (F1), 2% (F2) dan 3% (F3).

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah senyawa metabolit sekunder yang berperan sebagai antioksidan pada ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.), kandungan metabolit sekunder flavonoid total ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.), kandungan metabolit sekunder flavonoid total emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.), potensi aktivitas antioksidan (IC₅₀) ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dan potensi aktivitas antioksidan (IC₅₀) emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.).

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah metode ekstraksi maserasi, suhu pengeringan dan lama pengadukan dalam pembuatan sediaan emulgel.

F. Pengumpulan Data

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pengayak 40 mesh, pisau, kain batis, toples kaca, spatula, batang pengaduk, kertas perkamen, kertas saring, cawan, pipet ukur, bulb, pipet tetes, beaker glass, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung, penjepit kayu, aluminium foil, objek glass, kaca

arloji, neraca analitik (Ohaus Pioneer PX 224/E), *waterbath*, *rotary evaporator* (RE-2000E), blender (Niko), *vortex* (DLAB MX-S), kuvet, spektrofotometer Uv-Vis (Shimazu), pH meter (Ohaus Starter 3100), viskometer (Brookfield DV2T) *spindle* no.64, jangka sorong (Mitutoyo), *moisture analyzer* (Ohaus Type MB 90), *ultra turrax* (IKA® T25), *stand mixer* (IKA® RW20), seperangkat alat uji daya sebar, seperangkat alat uji daya lekat dan wadah sediaan emulgel.

2. Bahan Penelitian

Bahan utama penelitian adalah bahan simplisia yaitu biji pinang (*Areca catechu* L.) dari Desa Lumbok Kabupaten Lampung Barat. Bahan kimia yang digunakan yaitu karbomer 940 (Brataco, kualitas farmasetis), minyak zaitun (Brataco, kualitas farmasetis), span 60 (Brataco, kualitas farmasetis), tween 60 (Brataco, kualitas farmasetis), propilen glikol (Brataco, kualitas farmasetis), butylated hydroxytoluene (BHT), metil paraben (Merck), propil paraben (Merck), trietanolamin (Brataco, kualitas farmasetis), etanol teknis 96%, HCl pekat, serbuk magnesium (Mg), kloroform, asetat anhidrat, asam sulfat pekat (H₂SO₄), FeCl₃ 1%, NaCl 10%, aquadest, gelatin, pereaksi meyer, pereaksi dragendroff, HCl 2N, serbuk kuersetin (Sigma), AlCl₃ 10%, asam asetat glasial 5% dan serbuk DPPH (Sigma Aldrich).

3. Prosedur Penelitian

- a. Determinasi Biji Pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan sebelum pelaksanaan penelitian dengan tujuan untuk memastikan bahwa tanaman

yang akan diteliti benar dan mencegah kesalahan dalam penggunaan bahan penelitian. Determinasi biji pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

b. Penyiapan Simplisia Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Biji Pinang (*Areca catechu* L.) diperoleh dari Kota Liwa, Kabupaten Lampung Barat, Lampung. Biji pinang (*Areca catechu* L.) yang telah dikumpulkan selanjutnya dilakukan sortasi untuk menghilangkan kotoran dan bahan-bahan asing, sehingga jumlah pengotor yang dibawa ke dalam bahan uji berkurang. Setelah dibersihkan dengan air mengalir, biji pinang dianginkan hingga air tidak tersisa. Potong biji pinang menjadi potongan kecil, keringkan dan lakukan sortasi kering lalu haluskan dengan blender. Setelah diblender, serbuk halus diayak dengan pengayak ukuran 40 mesh dan kemudian diekstraksi (Hardiani, 2019).

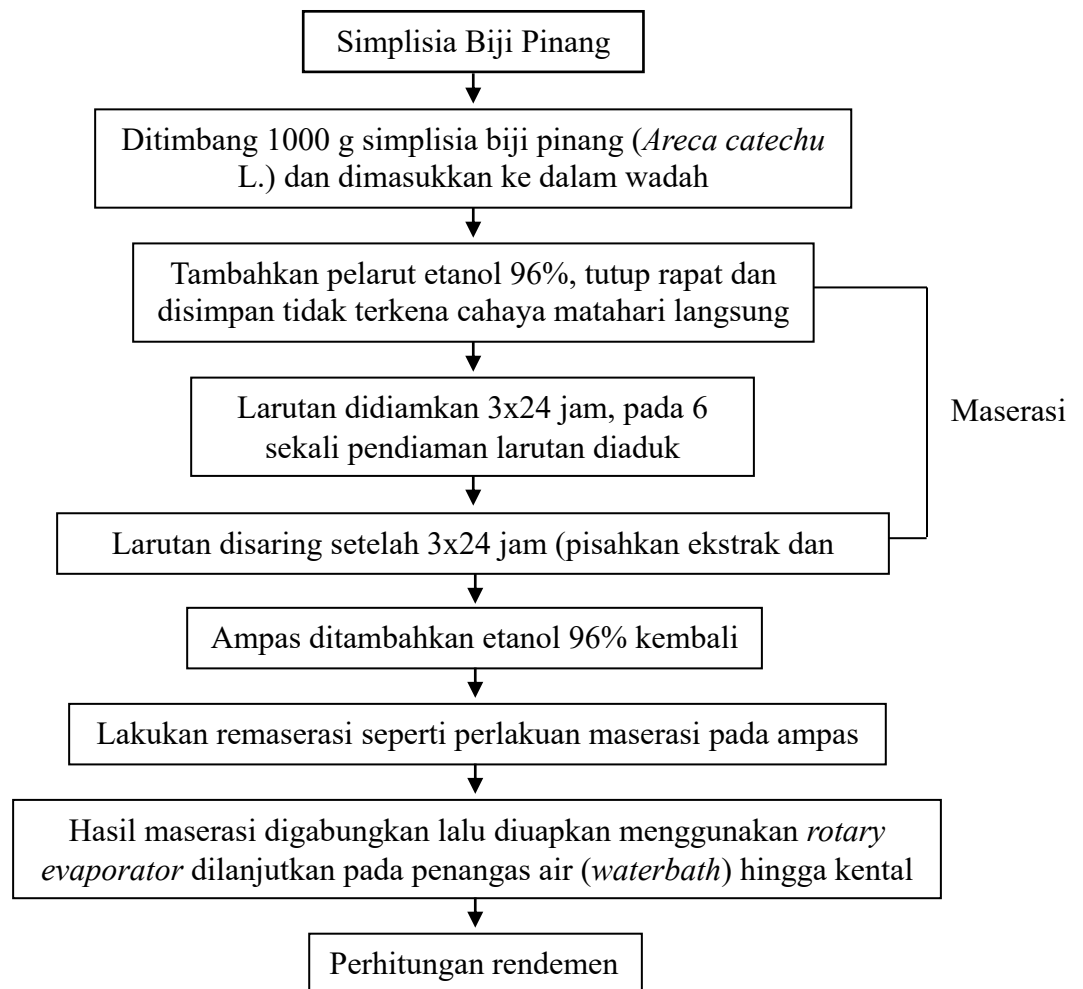
c. Kadar Air Serbuk Simplisia Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Serbuk simplisia biji pinang (*Areca catechu* L.) ditimbang 2 gram dalam cawan aluminium *moisture analyzer* Ohaus Type MB 90. Serbuk disebar pada semua bagian sisi cawan aluminium. Alat *moisture analyzer* diatur pada suhu 105°C. Nilai yang tertera pada alat saat pengujian selesai menunjukkan nilai kadar air (Nurhidayati & Warmiati, 2021).

d. Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dibuat dengan metode ekstraksi maserasi. Maserasi dipilih karena menggunakan alat sederhana dalam pengerjaannya (Silvia *et al.*, 2016). Senyawa yang bersifat termolabil juga dapat dilindungi dari kerusakan melalui metode maserasi (Mukhtarini, 2014).

Maserasi dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 1000 gr serbuk simplisia kering biji pinang kemudian dimasukkan ke dalam wadah dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 5 liter (Erwiyani *et al.*, 2021), disimpan di tempat yang tidak terkena sinar matahari langsung dengan wadah ditutup rapat. Diamkan selama 3x24 jam, dan dilakukan pengadukan setiap 6 jam. Setelah 3x24 jam, ekstrak kemudian disaring dan dipisahkan ekstrak dan ampasnya. Ampas diambil kembali dan ditambahkan cairan penyari yang sama yaitu etanol 96% dengan jumlah yang sama dan dibiarkan 2x24 jam. Hasil penyaringan digabungkan kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*; dilanjutkan dengan pemanasan dengan penangas air (*waterbath*) hingga menghasilkan ekstrak kental biji pinang lalu ditimbang untuk menghitung rendemen dan kadar airnya. Jumlah pelarut etanol yang digunakan dalam 1 kg serbuk simplisia adalah 10.000 mL (Hardiani, 2019).



Gambar 3.1 Skema Ekstraksi Biji Pinang

Ekstrak etanol yang telah diuapkan sampai kental dilakukan perhitungan rendemen. Rendemen berat simplisia dihitung dengan rumus berikut (Agoes, 2007 dalam Putranti, 2013).

$$\text{Rendemen berat kering} = \frac{\text{jumlah berat kering}}{\text{jumlah berat basah}} \times 100\%$$

e. Kadar Air Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Penetapan kadar air dilakukan dengan alat *moisture analyzer* Ohaus Type MB 90 Ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) ditimbang

sebanyak 2 gram dalam cawan aluminium *moisture analyzer*. Ekstrak disebar pada semua bagian sisi cawan aluminium. Alat *moisture analyzer* diatur pada suhu 105°C. Nilai yang tertera pada alat saat pengujian selesai menunjukkan nilai kadar air (Nurhidayati & Warmiati, 2021).

Persyaratan kadar air ekstrak biji pinang pada Farmakope Herbal Indonesia tidak boleh melebihi 10% (Kementrian Kesehatan RI, 2017) Kadar air menunjukkan kualitas ekstrak dan mempengaruhi stabilitas ekstrak sebab air menjadi media pertumbuhan mikroorganisme sehingga bisa merusak ekstrak (Tobi *et al.*, 2022).

4. Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

1) Pereaksi *Wilstater*

Ekstrak etanol 96% biji pinang (*Areca catechu* L.) diambil sebanyak 1 ml, ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,5 gram dan 3 tetes HCl pekat. Senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning sampai merah (Ikalinus *et al.*, 2015).

2) Pereaksi FeCl₃

Ekstrak etanol biji pinang diambil sebanyak 10 mg ditambah 5 ml etanol dan beberapa tetes FeCl₃ hingga terjadi perubahan warna. Kandungan flavonoid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi biru, ungu, hijau, merah maupun hitam. Apabila sampai 20 tetes FeCl₃ belum terjadi perubahan warna, maka flavonoid negatif (M. L. F. Kumalasari & Andiarna, 2020).

b. Uji Steroid/Triterpenoid

1) Pereaksi Liebermann Burchad/ Kloroform

Ekstrak etanol 96% biji pinang (*Areca catechu* L.) diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 2 mL kloroform kemudian dikocok. Larutan ditambahkan pereaksi Liebermann burchad yaitu asetat anhidrat dan asam sulfat pekat masing-masing 2 tetes (Ambari, Ocardini S, *et al.*, 2021). Warna yang berubah menjadi biru atau ungu menunjukkan adanya kelompok steroid, dan warna yang berubah menjadi merah menunjukkan adanya kelompok triterpenoid (Rairasti, 2014).

2) Uji Salkowski

Sejumlah sampel diambil dan dimasukkan pada tabung reaksi. Sampel dilarutkan dalam CHCl_3 / kloroform kemudian ditambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat ditambahkan ke larutan kloroform dan diamati perubahan warna. Warna merah di lapisan bawah untuk steroid dan warna kuning keemasan untuk triterpenoid (Agustina, 2017).

c. Uji Alkaloid

1) Pereaksi Meyer

Ekstrak etanol 96% biji pinang (*Areca catechu* L.) diambil 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes pereaksi meyer. Alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kekuningan (Yuniarti & Khairina, 2022).

2) Pereaksi Dragendroff

Ekstrak etanol 96% biji pinang (*Areca catechu* L.) diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes pereaksi dragendroff. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna orange kemerahan (Yuniarti & Khairina, 2022).

d. Uji Tannin

1) Pereaksi FeCl₃

Ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 10 mL aquades lalu dididihkan. Filtrat kemudian didinginkan lalu ditambahkan 5 mL FeCl₃ 1% (b/v). Adanya senyawa tannin ditandai dengan terbentuknya warna kehitaman atau kehijauan (Humaryanto *et al.*, 2023; Tobi *et al.*, 2022).

2) Pereaksi gelatin

Ekstrak etanol 96% biji pinang (*Areca catechu* L.) diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan sedikit larutan gelatin dan 5 mL NaCl 10%. Adanya senyawa tannin ditandai dengan terbentuknya endapan kekuningan (Ikalinus *et al.*, 2015).

e. Uji Saponin

1) Metode pengocokan

Ekstrak etanol 96% biji pinang (*Areca catechu* L.) dipipet sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 10 mL air panas. Dinginkan lalu kocok dengan kuat selama 10 detik sehingga terbentuk

buih. Buih yang terbentuk selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 cm-10 cm menunjukkan adanya senyawa saponin (Ambari, Ocardini S, *et al.*, 2021).

2) Metode penambahan HCl 2N

Buih yang terbentuk pada metode pengocokan ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N, jika buih tidak hilang dinyatakan positif mengandung samponin (Ambari, Ocardini S, *et al.*, 2021).

5. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Penetapan kadar flavonoid total ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dianalisa dengan metode kolorimetri (AlCl_3) menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang optimum. Hasil flavonoid total dinyatakan dalam ekuivalen kuersetin (EQ) (Yuspita *et al.*, 2021).

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Quersetin diambil sebanyak 100 mg, dilarutkan dengan 100 mL etanol. Larutan ini sebagai larutan 1000 ppm. Larutan diencerkan menjadi konsentrasi 100 ppm. Dipipet sebanyak 1 mL larutan kuersetin 100 ppm lalu ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur pada rentang panjang gelombang 400-800 nm (Yuspita *et al.*, 2021).

b. Penentuan *Operating Time*

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan diukur

absorbansinya pada panjang gelombang yang sudah diperoleh dari menit 0-30 dengan interval waktu 1 menit. *Operating time* ditunjukkan pada waktu dengan absorbansi yang stabil serta tidak terjadi penurunan absorbansi (Asmorowati & Lindawati, 2019).

c. Pembuatan Kurva Standar *quersetin*

Kuersetin ditimbang 100 mg kemudian dilarutkan dengan etanol sebanyak 100 mL (1000 ppm). Larutan dibuat konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm. Larutan standar masing-masing dipipet 1 mL, ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Inkubasi larutan selama waktu *operating time* lalu absorbansi diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang optimum. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan nilai serapan sebagai koordinat (Y) dan konsentrasi larutan standar (X) (Yuspita *et al.*, 2021).

d. Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) diambil 10 mg dilarutkan pada 5 mL etanol. Tambahkan etanol hingga diperoleh larutan sebanyak 10 mL (1000 ppm). Larutan dipipet 1 mL, tambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% serta 8 mL asam asetat 5%. Larutan diinkubasi selama waktu *operating time* lalu absorbansi diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang optimum (Asmorowati & Lindawati, 2019; Yuspita *et al.*, 2021). Kadar flavonoid total dihitung dengan rumus berikut (Yuspita *et al.*, 2021).

$$F = \frac{c \times V \times f \times 10^{-6}}{m} \times 100 \%$$

Keterangan:

F = Jumlah flavonoid dengan metode AlCl₃

c = Kesetaraan *quersetin* (mg/mL)

V = Volume total ekstrak (mL)

f = faktor pengenceran

m = berat sampel (gram)

6. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

a. Pembuatan larutan stok DPPH 0,1 mM

Serbuk DPPH (BM = 394,32) ditimbang 0,0019 gram, dilarutkan dengan 15 mL etanol pro analisa. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL lalu volumenya ditambahkan dengan etanol pro analisa sampai tanda batas labu ukur dan ditutup dengan aluminium foil. Larutan ini digunakan sebagai larutan DPPH 0,1 mM (Ambari, Fitri, *et al.*, 2021).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ max)

Larutan DPPH 0,1 mM dipipet sebanyak 2,0 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan larutan etanol pro analisa 2 mL dan di vortex hingga larutan homogen. Mulut tabung reaksi ditutup menggunakan aluminium foil dan diinkubasi selama 30. Tuang sejumlah 3 mL ke dalam kuvet. Diukur dengan rentang panjang gelombang 400-800 nm pada spektrofotometer UV-Vis (Ambari, Fitri, *et al.*, 2021).

c. Penentuan *operating time* (OT)

Larutan dalam pengukuran *operating time* adalah 1 mL larutan DPPH 0,1 mM dan 2 mL kuersetin 2 ppm, serapannya dibaca pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan sebelumnya

dengan interval waktu 1 menit dalam durasi 0-30 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Rizki et al., 2022). *Operating time* ditunjukkan pada waktu dengan absorbansi stabil dan tidak terjadi penurunan absorbansi (Rastuti & Purwati, 2012).

d. Pembuatan larutan blanko

DPPH 0,1 mM dipipet 2 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan etanol pro analisa sebanyak 2 mL, vortex sampai homogen. Inkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap kemudian diukur panjang gelombang yang optimal (Ambari, Fitri, et al., 2021).

e. Pembuatan larutan pembanding (Kuersetin)

1) Pembuatan larutan induk konsentrasi 100 ppm

Larutan pembanding yang digunakan adalah kuersetin. Kuersetin ditimbang 2,5 mg dilarutkan dengan etanol pro analisa. Larutan dimasukkan pada labu ukur 25 mL, cukupkan sampai tanda batas. Larutan ini sebagai larutan 100 ppm (Ambari, Fitri, et al., 2021).

2) Pembuatan larutan uji seri konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm

Larutan induk kuersetin sebagai pembanding dibuat seri konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dalam 10 mL. Larutan induk 100 ppm diencerkan, dipipet masing-masing 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan dicukupkan dengan etanol pro analisa sampai tanda batas labu ukur (Ambari, Fitri, et al., 2021).

f. Pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Larutan seri kuersetin dipipet sebanyak 2 mL, dimasukkan pada tabung reaksi. Tambahkan larutan DPPH 0,1 mM 2 mL, vortex hingga homogen. Inkubasi larutan selama 30 menit pada ruangan yang gelap kemudian diukur serapan pada panjang gelombang yang optimal (Ambari, Fitri, *et al.*, 2021).

g. Pembuatan larutan uji ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.)

Ekstrak biji pinang ditimbang 1 mg, dilarutkan dengan 10 mL etanol pro analisis (100 ppm). Larutan ini digunakan sebagai larutan induk. Larutan tersebut dibuat dalam beberapa seri konsentrasi yaitu 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 dan 40 ppm. Konsentrasi tersebut dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan larutan DPPH 0,1 mM dengan rasio 1:1. Tunggu selama 30 menit. Serapan diukur menggunakan spektrofototer UV-Vis dengan panjang gelombang yang optimal. Setelah dilakukan uji aktivitas antioksidan pada ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.), dilakukan perhitungan % inhibisi, menggunakan rumus (Philip, 2004):

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{absorbansi kontrol DPPH} - \text{absorbansi sampel emulgel})}{\text{absorbansi kontrol DPPH}} \times 100\%$$

7. Pembuatan Sediaan Emulgel Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

a. Formulasi Sediaan Emulgel Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Formula emulgel ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) menggunakan formula milik Erwiyani *et al.* (2022). Pada formula tersebut, penulis menggunakan ekstrak daging buah labu kuning. Pada penelitian kali ini, peneliti mengganti bagian ekstrak etanol daging buah labu kuning menjadi ekstrak etanol biji pinang dan menambah konsentrasi menjadi empat, yaitu basis (F0), formula 1 (F1), formula 2 (F2) dan formula 3 (F3). Formula emulgel ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) dapat dilihat pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Formula Emulgel Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Nama Bahan	Jumlah Bahan (%)			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak etanol biji pinang	0,00	1,00	2,00	3,00
Karbomer 940	2,00	2,00	2,00	2,00
Minyak zaitun	5,00	5,00	5,00	5,00
Span 60	1,13	1,13	1,13	1,13
Tween 60	3,87	3,87	3,87	3,87
Propilen glikol	10,00	10,00	10,00	10,00
BHT	0,01	0,01	0,01	0,01
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02
Trietanolamin (TEA)	3,00	3,00	3,00	3,00
Aquades	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

b. Pembuatan Sediaan Emulgel Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Pembuatan emulgel pada formula dibuat sebanyak 100 gram setiap satu replikasi pembuatan. Pembuatan sediaan emulgel menggunakan jurnal acuan Erwiyani *et al.* (2022), yaitu membuat emulsi primer minyak dalam air (m/a) dan gel. Emulsi primer minyak dalam air (m/a)

terdiri dari fase minyak dan fase air. Fase minyak dibuat dengan cara melarutkan span 60 dan BHT ke dalam minyak zaitun. Fase air dibuat dengan mencampurkan ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*), tween 60, metil paraben dan propil paraben ke dalam propilen glikol. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam aquadest dan diaduk hingga homogen. Fase minyak dan fase air yang telah dibuat dipanaskan di atas *waterbath* dengan suhu 70°C. Fase minyak dicampurkan sedikit demi sedikit ke dalam fase air dan dilakukan pengadukan dengan *ultra turrax* kecepatan 2500 rpm hingga suhu menjadi suhu ruang dan menghasilkan emulsi yang homogen.

Gel dibuat dengan mendispersikan karbomer 940 dalam aquades selama 24 jam. Larutan yang telah didispersikan kemudian ditambahkan trietanolamin (TEA) untuk meningkatkan pH gel lalu aduk dengan *ultra turrax* kecepatan 250 rpm hingga homogen. Tahap terakhir pembuatan emulgel yaitu mendispersikan emulsi minyak dalam air (m/a) ke dalam gel hingga terbentuk emulgel menggunakan *stand mixer* kecepatan 3000 rpm (Erwiyani *et al.*, 2022).

8. Evaluasi Sifat Fisik Sediaan Emulgel Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu L.*)

Karakteristik fisik sediaan emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*) meliputi evaluasi dengan parameter organoleptis, uji pH, viskositas, daya lekat dan daya sebar yang dilakukan dengan waktu 21 hari (3 minggu). Sediaan disimpan pada suhu ruang (suhu kamar) dengan pengamatan

organoleptis, uji pH, viskositas, daya lekat dan daya sebar yang dilakukan setiap minggu (Erwiyani *et al.*, 2022).

a. Pengamatan organoleptis

Pengamatan organoleptis dilakukan dengan mengamati meliputi warna, bau dan tekstur dari sediaan emulgel ekstrak biji pinang (Erwiyani *et al.*, 2022).

b. Uji PH

Emulgel dilarutkan dengan aquadest dengan konsentrasi 10%, yaitu 1 gram dalam 10 mL aquadest (Shanti, 2019). pH diukur dengan pH meter yang telah dikalibrasi menggunakan larutan standar. Pengukuran dilakukan tiga kali untuk setiap perlakuan, dan nilai kemudian ditunjukkan sebagai pH rata-rata (Baibhav *et al.*, 2012 dalam Erwiyani *et al.*, 2022).

c. Pengukuran Viskositas

Pengukuran viskositas sediaan emulgel ekstrak biji pinang dilakukan dengan cara mengambil 50 gram emulgel ekstrak biji pinang kemudian diukur viskositas dengan viskometer Brookfield *spindle* no.64 dengan kecepatan putaran 100 rpm dengan waktu 1 menit. Angka yang tertera pada jarum merah skala menunjukkan nilai viskositas (Erwiyani *et al.*, 2022).

d. Uji Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 0,5 gram sediaan emulgel ekstrak biji pinang kemudian diletakkan pada

bagian tengah kedua objek gelas dengan beban 1 kg dalam waktu 1 menit. Kedua ujung objek kemudian dikaitkan pada alat. Waktu yang diperlukan untuk kedua objek gelas terlepas menunjukkan nilai daya lekat (Erwiyani *et al.*, 2022).

e. Uji Daya Sebar

Uji daya sebar dilakukan dengan cara mengambil sejumlah 0,5 gram dan ditempatkan di tengah kaca berbentuk bulat, kaca ditutup lalu diberi beban 50 gram kemudian ditingkatkan secara bertahap sampai 200 gram biarkan satu menit. Diameter pada beberapa sisi menunjukkan nilai diameter daya sebar (Erwiyani *et al.*, 2022).

9. Penentuan Kadar Flavonoid Total Emulgel Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Emulgel ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) diambil sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan pada secukupnya etanol dan ditambah sampai diperoleh larutan sebanyak 10 mL (1000 ppm). Larutan dipipet 1 mL dan ditambahkan dengan 1 mL AlCl₃ 10% serta 8 mL asam asetat 5%. Larutan diinkubasi selama waktu *operating time* dan absorbansi diukur pada panjang gelombang yang optimum (Yuspita *et al.*, 2021). Kadar Flavonoid total dihitung menggunakan rumus berikut (Yuspita *et al.*, 2021).

$$F = \frac{c \times V \times f \times 10^{-6}}{m} \times 100 \%$$

Keterangan:

F = Jumlah flavonoid dengan metode AlCl₃

c= Kesetaraan *quersetin* (mg/mL)

V = Volume total ekstrak (mL)

f = faktor pengenceran

m = berat sampel (gram)

10. Uji Aktivitas Antioksidan Emulgel Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

a. Pembuatan larutan induk konsentrasi 100 ppm

Larutan yang dibuat diambil dari emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.). Emulgel ekstrak biji pinang ditimbang sebanyak 1 mg lalu dilarutkan dengan etanol pro analisa. Masukkan larutan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dicukupkan sampai tanda batas labu ukur (Ambari, Fitri, *et al.*, 2021).

b. Pembuatan larutan uji seri konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm

Larutan induk emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dibuat dalam seri konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dalam 5 mL. Dari larutan induk 100 ppm, dipipet masing-masing 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL lalu dicukupkan dengan etanol pro analisa sampai tanda batas labu ukur (Ambari, Fitri, *et al.*, 2021).

c. Pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Uji emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) diambil sebanyak 2 mL dari larutan seri dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 mL dan di vortex hingga homogen. Inkubasi larutan selama 30 menit dalam ruangan yang gelap dan kemudian diukur serapan pada panjang gelombang yang optimal (Ambari, Fitri, *et al.*, 2021). Setelah dilakukan uji aktivitas antioksidan

pada emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) maka dilakukan perhitungan % inhibisi, dengan rumus (Philip, 2004):

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{absorbansi kontrol DPPH} - \text{absorbansi sampel emulgel})}{\text{absorbansi kontrol DPPH}} \times 100\%$$

G. Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari skrining fitokimia disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisis secara deskriptif (Putranti, 2013). Uji stabilitas fisik emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) disajikan dalam bentuk tabel, kurva dan dianalisa secara statistik dengan uji *one way ANOVA* SPSS.

Aktivitas antioksidan dapat dilihat dari perhitungan IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% dari radikal bebas DPPH (Izzati, 2014). IC_{50} dapat dihitung dengan persamaan regresi linier, sumbu x adalah konsentrasi sampel dan sumbu y adalah % inhibisi. IC_{50} dapat dihitung menggunakan persamaan $y = a + bx$ (Izzati, 2014).

$$y = a + bx$$

$$50 = a + bx$$

$$(x) IC_{50} = \frac{(50 - a)}{b}$$

Keterangan:

y = % inhibisi

a = intercept (perpotongan garis di bawah sumbu y)

b = slope (kemiringan)

x = konsentrasi

Data uji aktivitas antioksidan ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dan data uji aktivitas antioksidan emulgel ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.)

dianalisis secara kuantitatif. Nilai IC_{50} dianalisis dengan beberapa kategori, yaitu sangat kuat (<50), kuat (50-100), sedang (100-150), lemah (150-200) dan sangat lemah (>200) (Mariyah, 2020). Semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu zat, semakin rendah nilai IC_{50} zat tersebut (Izzati, 2014). Hasil penetapan kadar flavonoid total serta aktivitas antioksidan ekstrak etanol biji pinang dan emulgel ekstrak etanol biji pinang dianalisa secara statistik dengan uji *one way ANOVA* SPSS dan disajikan dalam bentuk tabel maupun bentuk lainnya.