

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan secara eksperimental. Biji pinang (*Areca catechu* L.) diekstraksi dengan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil ekstrak biji pinang diformulasikan menjadi emulgel dari dengan variasi konsentrasi ekstrak 1%, 2% dan 3% menggunakan formula emulgel menurut penelitian Erwiyani et al., (2022). Evaluasi stabilitas fisik emulgel yaitu uji organoleptik, homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat, uji sentrifugasi menggunakan uji *cycling test* selama 6 siklus, selanjutnya dilakukan uji efektivitas dari sediaan emulgel meliputi uji iritasi dan uji kelembaban kulit selama 14 hari.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Universitas Diponegoro.
- b. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Teknologi program studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei - Juni 2023

C. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) konsentrasi ekstrak 1%, 2% dan 3% yang diformulasikan menjadi sediaan emulgel menggunakan standar penelitian menurut Erwiyani et al., (2022).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) konsentrasi 1%, 2% dan 3% yang diformulasikan menjadi emulgel.

2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi akibat dari adanya variabel bebas pada uji stabilitas fisik meliputi uji organoleptis dan homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, sentrifugasi, dan uji efektivitas emulgel meliputi uji iritasi dan uji kelembaban pada kulit.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol adalah faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian yaitu suhu, tanaman yang diperoleh dari daerah yang sama, waktu, bahan dan kondisi laboratorium, cara pembuatan.

E. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain pisau, batang pengaduk, kain hitam, neraca analitik (Ohaus), kertas perkamen, kertas

saring, cawan, pipet tetes, *beaker glass* (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), penjepit kayu, spatula, *arloji glass*, kaca objek, cawan porselin (Pyrex), *waterbath* (DHH-88), *rotary evaporator* (Biobase), *blender* (Philips), viskometer (Brookfield DV2T), pH meter (Ohaus Starter 300), jangka sorong (Mitutoyo), uji daya lekat, seperangkat alat uji daya sebar, tabung sentrifuge (Pyrex), sentrifugator, *moisture analyzer* Sartorius Type MA 45, mortir dan stamper, *climetic chamber*, kulkas (Polytron), *homogenizer* (Ultraturax), plaster, kain kassa (Onemed), dan alat *Skin Moisture Analyzer*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain biji pinang (*Areca catechu* L.) yang diperoleh dari Kabupaten Lampung Barat, span 60 (Brataco, kualitas farmasetis), tween 60 (Brataco, kualitas farmasetis), karbomer 940 (Brataco, kualitas farmasetis), minyak zaitun (Brataco, kualitas farmasetis), trietanolamin (Brataco, kualitas farmasetis), propilen glikol (Brataco, kualitas farmasetis), aquades, metil paraben (Merck), propil paraben (Merck), etanol 96%, FeCl_3 , HCl 2N, NaCl, pereaksi Mayer, pereaksi Bauchardat, pereaksi Dragendroff.

3. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Universitas Diponegoro, Semarang. Tujuan dari determinasi tanaman yaitu untuk mengetahui kebenaran dari sampel biji pinang (*Areca catechu* L.) agar terhindar dari kesalahan pengumpulan

bahan utama penelitian dan mencegah kemungkinan tercampur dengan tanaman lain.

4. Prosedur Kerja

a. Pembuatan simplisia biji pinang (*Areca catechu* L.)

Siapkan biji pinang (*Areca catechu* L.) sebanyak 3 kg yang diperoleh dari Kabupaten Lampung Barat. Biji pinang (*Areca catechu* L.) dicuci dengan air mengalir hingga bersih kemudian pisahkan dari kulitnya. Biji pinang diperkecil ukurannya, kemudian keringkan dengan cara di bawah sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutup kain berwarna hitam agar kandungan yang tidak tahan panas pada biji pinang (*Areca catechu* L.) tidak rusak oleh sinar matahari. Biji pinang (*Areca catechu* L.) yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan cara di *blender*, lalu di ayak menggunakan mesh 40 dan dimasukkan ke dalam wadah.

b. Penentuan kadar air serbuk simplisia biji pinang (*Areca catechu* L.)

Serbuk simplisia biji pinang (*Areca catechu* L.) ditimbang sebanyak 2 gram dalam cawan aluminium pada *moisture analyzer* Sartorius type MA 45. Serbuk disebar pada semua sisi cawan aluminium. Alat *moisture analyzer* diatur pada suhu 105°C. Nilai yang tertera pada alat saat pengujian selesai menunjukkan nilai kadar airnya (Nurhidayati & Warmiati, 2021).

c. Pembuatan ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.)

Serbuk biji pinang (*Areca catechu* L.) diekstraksi menggunakan

metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Tahap pertama dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 500 gram simplisia biji pinang (*Areca catechu* L.), pelarut ditambahkan dengan perbandingan 1:10. Pelarut pertama sebanyak 3000 ml dan sisanya 2000 ml untuk remaserasi. Ekstraksi dilakukan selama 3x24 jam dengan pengadukan secara berkala dalam ruangan yang terlindung dari sinar matahari (Farida *et al.*, 2021).

Ekstrak etanol yang diperoleh dari maserat pertama disaring menggunakan kain flanel, setelah dilakukan penyaringan maserat pertama maka dilanjutkan dengan remaserasi. Remaserasi menggunakan sisa dari pelarut etanol 96% sebanyak 2000 ml, kemudian maserat dipindahkan dalam wadah tertutup dibiarkan ditempat sejuk dan terlindungi dari sinar matahari selama 2x24 jam dengan dilakukan pengadukan secara berkala. Maserat pertama dan maserat kedua dicampurkan, lalu diuapkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Hasil yang telah dievaporasi, diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental dan hitung rendemen ekstrak (Mardikasari *et al.*, 2017).

Perhitungan rendemen: Berat serbuk simplisia yang diekstrak A (gram) dan berat ekstrak yang didapat B (gram).

$$\text{Rendemen} = \frac{B}{A} \times 100\%$$

d. Penentuan kadar air ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.)

Ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) digerus sampai halus lalu

ditimbang sebanyak 2 gram dalam cawan aluminium pada *moisture analyzer* Sartorius type MA 45. Ekstrak diratakan pada semua sisi cawan aluminium. Alat *moisture analyzer* diatur pada suhu 105°C. Nilai yang tertera pada alat saat pengujian selesai menunjukkan nilai kadar airnya (Nurhidayati & Warmiati, 2021).

e. Skrining fitokimia

1) Uji flavonoid

Ekstrak biji pinang sebanyak 10 mg ditambah 5 ml etanol dan beberapa tetes reagen FeCl_3 . Jika terdapat perubahan warna menjadi biru, ungu, hijau, merah maupun hitam positif mengandung flavonoid. Apabila sampai 20 tetes FeCl_3 belum terjadi perubahan warna, maka flavonoid negative (Kumalasari & Andiarna, 2020).

2) Uji alkaloid

Ekstrak biji pinang sebanyak 10 mg ditambah 1ml HCl 9 ml air dipanaskan selama 2 menit, dinginkan lalu saring. Diambil 3 tetes filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer/ Dragendroff/Bauchardat. Positif alkaloid dengan adanya endapan putih/ putih kekuningan (Mayer), endapan merah jingga (Dragendroff), endapan coklat sampai kehitaman (Bauchardat) (Yuniarti & Khairina, 2022).

3) Uji saponin

Ekstrak biji pinang sebanyak 0,5 gram dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas dan dikocok kuat-

kuat hingga 10 detik. Uji positif adanya saponin ditandai dengan terbentuknya busa/ buih selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Erwiyani *et al.*, 2021).

4) Uji tanin

Ekstrak biji pinang sebanyak 0,5 gram direbus di dalam 20 ml akuades di dalam tabung reaksi. Saring dan tambahkan beberapa tetes air panas, NaCl dan FeCl₃ sampai berubah warna. Positif mengandung tannin ditandai dengan munculnya warna hijau kecoklatan atau warna biru hitam (Erwiyani *et al.*, 2021).

f. Pembuatan sediaan emulgel

Pembuatan emulgel didasarkan pada formulasi yang dilakukan oleh Erwiyani *et al.*, (2022).

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

Bahan	Konsentrasi %			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak biji pinang	0	1	2	3
Propilen glikol	10	10	10	10
Minyak zaitun	5	5	5	5
Tween 60	3,87	3,87	3,87	3,87
Karbomer 940	2	2	2	2
Span 60	1,13	1,13	1,13	1,13
Trietanolamin	1	1	1	1
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02
BHT	0,01	0,01	0,01	0,01
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

1) Pembuatan emulsi

Emulsi adalah sistem dua fase (fase minyak dan fase air) yang salah satu cairannya terdispersi dalam cairan pembawa yang membentuk butiran-butiran kecil dan distabilkan dengan zat emulgator.

Pembuatan emulsi pada penelitian ini, diawali dengan pembuatan fase minyak yang dibuat dengan cara meleburkan span 60 dan BHT ke dalam minyak zaitun, dengan cara dipanaskan di atas *waterbath* suhu 70°C. Fase air dibuat dengan mencampurkan ekstrak biji pinang, tween 60, metil paraben dan propil paraben yang sebelumnya dilarutkan dalam propilen glikol lalu ditambahkan aquades *ad* 100 ml dan dilakukan pengadukan hingga homogen, kemudian dipanaskan di atas *waterbath* suhu 70°C. (Jufri *et al.*, 2018).

2) Pembuatan basis gel

Gel dibuat dengan menyiapkan carbomer 940 yang didispersikan ke dalam akuades lalu aduk. Tambahkan trietanolamin ke dalam karbormer yang telah didispersikan aduk hingga basis gel terbentuk dan gel menjadi jernih (Jufri *et al.*, 2018).

3) Pembuatan emulgel

Pastikan masing-masing dari fase air dan fase minyak dalam kondisi masih panas, lalu masukkan sedikit demi sedikit fase minyak ke dalam fase air, kemudian dilakukan pengadukan hingga

menghasilkan emulsi yang homogen menggunakan alat homogenizer kecepatan 3000 rpm. Emulsi yang sudah terbentuk didispersikan ke dalam basis gel yang telah dibuat, lalu homogenkan hingga terbentuk emulgel (Jufri *et al.*, 2018).

g. Evaluasi uji sediaan

1) Uji stabilitas fisik

a) Uji organoleptik dan homogenitas

Uji organoleptik bertujuan untuk mengamati warna, bau, dan tekstur. Uji ini menggunakan indera manusia seperti indera penglihatan, penciuman dan peraba (Erwiyani *et al.*, 2022). Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan cara emulgel dioleskan pada kaca objek lalu diamati ada tidaknya butiran kasar secara visual (Azkiya *et al.*, 2017).

b) Uji pH

Uji pH dilakukan dengan 1,0 gram emulgel yang dilarutkan dalam aquades 10 mL, kemudian dilakukan pembacaan pH dengan pH meter yang telah dikalibrasi menggunakan larutan standar pH 4, 7 dan 10 (Suryani *et al.*, 2017).

c) Pengukuran viskositas

Sejumlah 50 gram emulgel diukur viskositasnya dengan viskometer *Brookfield* ukuran *spindle* No. 64 pada kecepatan putaran 100 rpm selama 1 menit (Erwiyani *et al.*, 2022).

d) Uji daya lekat

Sejumlah 0,5 gram emulgel diletakkan pada bagian tengah kedua objek gelas dengan beban 1 kg selama 5 menit. Kedua ujung objek dikaitkan pada alat. Daya lekat dihitung sebagai waktu yang diperlukan untuk kedua objek gelas terlepas (Erwiyani *et al.*, 2022).

e) Uji daya sebar

Sejumlah 0,5 gram emulgel ditempatkan di tengah kaca yang berbentuk bulat, kemudian ditutup kaca dan diberi beban 50 gram yang dinaikkan secara bertahap hingga 200 gram. Diameter daya sebar diukur setelah diberi beban yang dibiarkan selama 1 menit dengan mengamati diameter pada beberapa sisi (Zulkarya & Hastuti, 2018).

f) Uji sentrifugasi

Pengujian sentrifugasi dilakukan dengan memasukkan emulgel ke dalam tabung berskala lalu dilakukan putaran pada kecepatan 3800 rpm dengan ketinggian sediaan 10 cm selama 5 jam. Sediaan yang stabil setelah dilakukan uji sentrifugasi menunjukkan ekivalen terhadap efek gravitasi kurang lebih selama satu tahun (Jufri *et al.*, 2018).

2) *Cycling Test*

Pada metode *Cycling test* sampel emulgel disimpan pada suhu 4°C dalam waktu 24 jam, kemudian dipindahkan ke dalam

climetic chamber dengan suhu 40°C selama 24 jam (satu siklus). Uji dilakukan 6 siklus, lalu kondisi fisik emulgel setelah dilakukan 6 siklus *cycling test* dibandingkan dengan kondisi fisik emulgel sebelum *cycling test* (Zam Zam & Musdalifah, 2022).

3) Uji efektivitas sediaan emulgel

a) Uji iritasi

Sukarelawan yang dijadikan panel pada uji iritasi berjumlah 12 orang dengan kriteria wanita berbadan sehat, usia antara 20-30 tahun, tidak ada riwayat penyakit yang berhubungan dengan alergi dan bersedia menjadi responden. Uji iritasi dilakukan secara *in vivo* dengan 4 perlakuan yaitu control, F1 konsentrasi 1 %, F2 2% dan F3 3%, tiap perlakuannya menggunakan sebanyak 3 orang yang masing-masing menggunakan 1 sediaan emulgel. Uji iritasi dilakukan satu kali sehari selama 3 hari, Anggota tubuh yang digunakan adalah bagian lengan tangan dalam, karena pada lengan tangan bagian dalam merupakan salah satu bagian tubuh yang umum digunakan untuk pengujian produk kosmetik (Pratimasari *et al.*, 2015).

Pengujian dilakukan dengan uji tempel tertutup pada kulit manusia (*path test*). Caranya adalah emulgel diambil sebanyak 0,1 gram kemudian dioleskan pada lengan tangan bagian dalam dengan ukuran diameter 2 cm, lalu ditutup dengan kain kassa

dan plester, pengaplikasian emulgel dilakukan satu kali sehari selama tiga hari berturut-turut kemudian diamati reaksi yang terjadi. Pengamatan dilakukan pada 3 jam pertama dan dilanjutkan pengamatan pada jam ke 24, 48 dan 72 jam. Diamati gejala yang timbul seperti kemerahan, gatal-gatal pada kulit. Uji iritasi diukur dengan menggunakan indeks iritasi primer kulit (primary irritation index/PII). Jika dalam indeks iritasi primer kulit mendapatkan nilai 0 maka hal itu menunjukkan bahwa tidak ada oedema dan eritema (Pratimasari *et al.*, 2015).

Tabel 3. 2 Kategori Nilai Keadaan Kulit

Eritema		Oedema	
Jenis	Nilai	Jenis	Nilai
Tidak ada eritema	0	Tidak ada oedema	0
Eritema sangat kecil (nyaris tidak terlihat)	1	Edema sangat ringan (nyaris tidak terlihat)	1
Eritema yang terdefinisi dengan baik	2	Edema ringan (pemebesaran jelas)	2
Eritema sedang-berat	3	Edema sedang (ketebalan >1 mm)	3
Eritema parah	4	Edema parah (meningkat > 1 mm dan memanjang di luar area)	4

b) Uji kelembaban kulit

Sampel dioleskan merata di atas kulit punggung tangan kiri sehari sekali pada pagi hari, kemudian diukur menggunakan alat *Skin Moisture Analyzer* pada hari ke-0 (*pre tes*) dan pada hari ke 14 (*post tes*). Nilai efektivitas kemampuan pelembab dapat dilihat dari kenaikan persentase kelembaban yang dihitung

berdasarkan selisih nilai kelembaban yang dihasilkan pada alat *skin moisture analyzer* sebelum dan sesudah perlakuan dan dibandingkan dengan nilai kelembaban sebelum perlakuan pemberian sediaan (Ariyani & Suharsanti, 2018).

F. Analisis Data

Dalam penelitian ini dilakukan analisis deskriptif melalui uji stabilitas dipercepat atau *cycling test* dan uji efektivitas emulgel. Uji stabilitas meliputi uji organoleptik, homogenitas, viskositas, daya lekat, daya sebar, pH dan sentrifugasi sedangkan untuk uji efektivitas meliputi uji iritasi dan uji kemampuan sediaan emulgel dalam melembabkan kulit.

Data dianalisa dengan perangkat lunak SPSS. Untuk mengetahui normalitas data menggunakan uji Shapiro-wilk karena jumlah sampel kecil (<50). Data dikatakan terdistribusi normal jika $\text{sig} > 0,05$ dan data dikatakan tidak terdistribusi normal jika $\text{sig} < 0,05$. Uji homogenitas dengan nilai $\text{sig} > 0,05$ menunjukkan data varian homogen dan data dikatakan tidak homogen jika $\text{sig} < 0,05$ (Quraisy, 2022).

Pada uji stabilitas dan uji kemampuan pelembab emulgel, data dianalisis menggunakan uji paired T-test untuk mengetahui hasil sebelum dan sesudah dilakukan *cycling test* serta tes pengolesan emulgel pada kulit. Menurut Singgih, (2014) bahwa jika nilai signifikansi $< 0,05$ pada uji paired T-test menunjukkan hasil yang berbeda signifikan, sedangkan jika nilai signifikansi $> 0,05$ maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara sebelum dan setelah tes pengolesan emulgel.