

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi penelitian adalah daun teh hijau dari Kemuning, Karanganyar, Jawa Tengah. Daun teh hijau dipilih sebagai contoh, memenuhi kriteria segar dan tidak rusak.

Sampel losion ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) 1,5%; 3%; Konsentrasi setil alkohol 6% tersedia untuk dipelajari.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Aktivitas antioksidan DPPH losion daun teh hijau adalah faktor utama pertama yang perlu dipertimbangkan.

Variabel kunci kedua adalah bagaimana perubahan konsentrasi ekstrak daun teh hijau mempengaruhi pengujian kualitas fisik dan stabilitas lotion.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Setelah variabel primer diidentifikasi, variabel tersebut diklasifikasikan menjadi tiga jenis variabel: independen, terkontrol, dan dependen. Penelitian pengaruh variabel terikat berpedoman pada variabel bebas. Variabel independen merupakan fokus penelitian, sedangkan variabel dependen mewakili permasalahan utama.

Variasi kandungan setil alkohol merupakan variabel independen penelitian.

Dalam penelitian ilmiah, variabel terkontrol adalah variabel yang dimanipulasi dalam keadaan yang ketat untuk memastikan bahwa temuan yang dihasilkan konsisten dan dapat direplikasi secara akurat. Formulasi lotion, uji antioksidan DPPH, keadaan penelitian, kondisi laboratorium, dan teknik penelitian merupakan contoh variabel terkontrol.

Dalam penelitian, variabel dependen menjadi fokus perhatian utama. Tingkat perlindungan antioksidan yang diberikan oleh lotion ekstrak teh hijau menjadi variabel dependen penelitian.

##### **3. Definisi operasional Variabel**

Pertama, daun teh hijau yang telah dikumpulkan dari Kemuning, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel dalam penelitian ini merupakan kumpulan dari beberapa daun segar yang telah dipilih.

Kedua, serbuk daun teh hijau merupakan daun teh hijau yang telah melalui proses pengambilan dan pencucian dengan air mengalir bertujuan untuk memisahkan kotoran dengan sampel. Kemudian, dilakukan proses pengeringan dengan bantuan cahaya matahari secara tidak langsung atau ditutup kain hitam polos, penyerbukan dan pengayakan dengan ukuran no 40.

Ketiga, ekstrak daun teh hijau merupakan hasil dari proses ekstraksi menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi lalu dipekatkan melalui *rotary evaporator*.

Keempat, basis formulasi lotion ekstrak daun teh hijau adalah *lexemul cs*, *Setil alcohol*, *IPM*, *EDTA*, *Penoxyetanol*, *Titanium*, *MPG*, *Aquades*.

Kelima, uji aktivitas antioksidan ekstrak daun teh hijau dengan menggunakan metode *DPPH*.

### **C. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

Alat yang digunakan timbangan analitik, batang pengaduk, gelas ukur 5, 100, 500mL, gelas beker 500 mL, pipet tetes, kertas saring, *rotary evaporator*, *ph meter*, *viscometer*, *termomether*, botol sediaan, *blender*, ayakan *mesh no 40*.

#### **2. Bahan**

Daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang bersumber dari Kemuning, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah menjadi bahan utama penelitian ini. *Laxemul CS*, *Setil alkohol*, *EDTA*, *penoksietanol*, *titanium dioksida*, *monopropilen glikol*, dan *aquades* juga disertakan.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi merupakan cara untuk mengetahui keaslian suatu tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi pada daun teh hijau dilakukan di *BPTOOT Tawangmangu*, Karanganyar.

#### **2. Pengambilan bahan penelitian**

Daun teh hijau diperoleh dari Kemuning, Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel yang diambil adalah daun yang segar lalu dilakukan proses pengeringan untuk tahap ekstraksi.

### **3. Pengeringan simplisia**

Daun teh hijau yang sudah dideterminasi kemudian dibersihkan dengan air yang mengalir dan ditiriskan. Proses pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven temperature 40°C hingga kering.

### **4. Pembuatan serbuk daun teh hijau**

Daun teh hijau yang sudah dikeringkan lalu disortasi terlebih dahulu agar tidak ada benda asing yang masuk. Proses pembuatan serbuk dilakukan dengan menggiling simplisia dengan blender untuk mempermudah proses ekstraksi. Setelah digiling, serbuk simplisia diayak dengan ayakan mesh nomor 40.

### **5. Identifikasi serbuk daun teh hijau**

**5.1 Pemeriksaan organoleptik.** Identifikasi serbuk daun dilakukan secara organoleptis seperti bentuk, bau, warna dari serbuk daun sirsak (Rusli, 2019).

**5.2 Penetapan susut kering serbuk daun teh hijau.** Penetapan susut pengeringan dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi. Uji dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk daun teh hijau dimasukkan kedalam *moisture balance*, diatur dengan suhu 105°C, dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen (Haru, 2019).

### **6. Pembuatan ekstrak**

Ekstrak daun teh hijau dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1 bagian serbuk Simplisia kering dengan 10 bagian pelarut. Serbuk daun teh hijau dimasukkan ke dalam botol maserasi, kemudian ditambahkan 5000 ml pelarut etanol 70%. Serbuk direndam selama 6 jam pertama, diaduk sesekali, lalu didiamkan selama 18 jam. Maserasi kemudian dipisahkan dengan penyaringan. Prosedur ekstraksi kemudian diulangi dengan pelarut etanol 70% sebanyak setengah volume dari volume ekstraksi pertama. Selain itu, seluruh maserasi dikumpulkan kemudian diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen yang dicapai kemudian dihitung dengan menggunakan rumus berikut (FHI, 2017).

### **7. Identifikasi ekstrak daun teh hijau**

**7.1 Pemeriksaan organoleptik ekstrak daun teh hijau.** Pemeriksaan ekstrak daun teh hijau secara organoleptik berdasarkan bentuk, warna, dan bau dari ekstrak daun teh hijau.

**7.2 Penetapan kadar air ekstrak daun teh hijau.** Penentuan kadar air ekstrak daun teh hijau menggunakan alat Sterling-Bidwell. Prosedur ini dilakukan dengan perkiraan jumlah bahan yang mengandung 1-4 mL air, yang ditimbang, kemudian ditempatkan dalam labu destilasi dan ditambahkan 200 mL pelarut toluena jenuh air, dilanjutkan dengan alat Sterling-Bidwell. Labu dipanaskan dengan api kecil, setelah mendidih, apinya dinyalakan. Pemanasan dihentikan sampai tidak ada lagi air yang menetes di dalam tangki. Kadar air kemudian diukur menggunakan alat Sterling-Bidwell dengan mengamati volume pada skala alat. Sederhananya, kadar air maksimal adalah 10% (Kemenkes RI, 2010).

**7.3 Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun teh hijau.** Identifikasi senyawa kimia digunakan untuk mengetahui keaslian kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak daun teh hijau. Identifikasi kandungan senyawa kimia dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

**7.3.1 Uji flavonoid.** Sebanyak 1 gram serbuk ekstrak daun teh hijau dilarutkan dengan 5 ml metanol lalu dikocok. Dilakukan pemanasan dan kocok lagi untuk mengurangi pengendapan, selanjutnya disaring dan di masukan kedalam tabung reaksi. Tambah dengan 0,2 g MgSO dan 3 tetes HCL. Uji dikatakan berhasil jika timbul warna merah (Harborne, 1987).

**7.3.2 Uji tanin.** Sebanyak 1 gram ekstrak ditambahkan 10 ml air panas dan didihkan selama 15 menit dan saring. Ambil filtrat 5 ml dan ditambahkan FeCL 1%. Uji dikatakan berhasil jika terbentuk warna biru kehitaman (Robinson, 1995).

**7.3.3 Uji saponin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun teh hijau masukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 10 ml air panas kemudian dinginkan dan kocok kuat selama 10 detik setelah itu amati busa yang terbentuk stabil selama 10 menit dengan tinggi 1-10 cm, apabila ingin buih tidak hilang tambahkan 1 tetes HCl 2 N (Depkes RI, 1995).

**7.3.4 Uji alkaloid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak tambahkan 1 ml asam klorida 2 N, 9 ml air suling lalu panaskan diatas penangas air selama 2 menit, dinginkan sampel lalu saring. Filtrat yang diperoleh akan diuji alkaloid. Siapkan 3 tabung reaksi dan 0,5 gram filtrat dimasukkan ke masing-masing tabung reaksi kemudian ketiga tabung ditambahkan pereaksi. Tabung 1 ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer,

tabung 2 ditambahkan pereaksi Bouchardat, dan tabung 3 ditambahkan Dragendroff. Uji dikatakan berhasil apabila timbul endapan atau ada kekeruhan paling sedikit dua dari tiga percobaan (Depkes RI, 1995).

**7.3.5 Uji steroid.** Sebanyak 1 gram sampel dilakukan uji maserasi selama 2 jam dengan 20 ml *n*-heksan lalu disarng. Filtrate diuapkan dalam cawan penguap. Tambahkan sampel dengan pereaksi Liebermann-Burchad beberapa tetes. Uji dikatakan berhasil apabila timbul warna biru atau biru hijau (Harborne, 1987).

## 8. Formulasi lotion

Sediaan lotion diformulasikan menggunakan bahan aktif yaitu ekstrak daun teh hijau.

**Tabel 2. Formulasi lotion ekstrak daun teh hijau**

| <i>Bahan</i>     | <i>Satuan</i> | <i>F1</i> | <i>F2</i> | <i>F3</i> | <i>F4</i> | <i>F5</i> | <i>F6</i> |
|------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Ekstrak daun teh | %             | -         | -         | -         | 1         | 1         | 1         |
| hijau            | %             | 7         | 7         | 7         | 7         | 7         | 7         |
| Lexemul cs 20    | %             | 1,5       | 3         | 6         | 1,5       | 3         | 6         |
| Setil alkohol    |               |           |           |           |           |           |           |
| IPM              | %             | 2         | 2         | 2         | 2         | 2         | 2         |
| EDTA             | %             | 0,2       | 0,2       | 0,2       | 0,2       | 0,2       | 0,2       |
| Phenoxyetanol    | %             | 0,25      | 0,25      | 0,25      | 0,25      | 0,25      | 0,25      |
| Titanium         | %             | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       |
| MPG              | %             | 4         | 4         | 4         | 4         | 4         | 4         |
| Aquades ad       | %             | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       |

## 9. Pembuatan lotion

Lotion Ekstrak Daun Teh Hijau dibuat sesuai dengan formula yang ditunjukkan pada Tabel I. Pembuatan losion dimulai dengan pembuatan fase air dan lemak. Lexemul cs, Cetyl Alcohol, IPM adalah fase minyak yang dicampur kemudian dipanaskan dalam mug porselen kedap udara dengan pengadukan konstan. MPG, EDTA, Aquades, yaitu fase air, dicampur dan dipanaskan. Campuran 1 (minyak) dan 2 (air) dicampur dengan titanium sambil terus diaduk sampai suhunya menjadi krim. Tambahkan ekstrak daun teh hijau dan penoxyethanol ke dalam adonan, aduk hingga rata.

## 10. Pembuatan kontrol

**10.1 Kontrol negatif.** Kontrol negatif yang digunakan adalah kontrol basis dari formula yang tidak mengandung ekstrak daun teh hijau.

**10.2 Kontrol positif.** Kontrol positif yang digunakan adalah lotion daun teh hijau dengan merk *Hand & Body Citra Fresh Radiance*.

## 11. Evaluasi sediaan lotion

Evaluasi fisik sediaan lotion yang dilakukan meliputi uji organoleptik dan homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji daya sebar, Uji Daya Lekat, Uji akseptabilitas lotion, dan *Cycling Test*.

**11.1 Uji organoleptik.** Uji organoleptik dilakukan dengan cara melihat secara visual warna, bentuk, dan aroma dari sabun (Swastika *et al*, 2013). Pengamatan sediaan meliputi aroma, warna dan tekstur dari masing-masing formula sediaan lotion ekstrak daun teh hijau yang diamati sebanyak 3 kali selama 1 bulan. Sediaan diuji menggunakan dua buah kaca objek, dimana sampel diletakkan pada salah satu kaca objek dan diletakkan secara merata. Sediaan yang baik harus homogen dan bebas dari partikel yang masih menggumpal.

**11.2 Uji pH.** Menurut Wasitaatmadja (2007), nilai pH yang sangat tinggi atau sangat rendah dapat menambah daya pada absorpsi kulit sehingga memungkinkan kulit teriritasi. Rentang toleransi pH lotion berkisar antara 4,0 - 7,5 (Aswal, 2013) Timbang sampel sebanyak 10 gram kemudian sampel dilarutkan menggunakan 50 ml aquades dalam beaker glass, sampel kemudian ditambah dengan aquadest ad 100 ml lalu diaduk hingga homogen. Larutan dari sampel kemudian dilakukan pengukuran pH nya menggunakan pH meter yang sudah distandarisasi dan catat hasilnya (Sudarmadji, 1984). Nilai pH yang ditentukan oleh SNI 4399-1996 untuk sediaan tabir surya yaitu berkisar 4,5-8,0.

**11.3 Uji homogenitas.** Uji homogenitas merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui sediaan dalam keadaan homogen atau tidak. Sediaan yang homogen dapat menghasilkan kualitas yang baik karena bahan obat dapat terdispersi merata dalam bahan dasar, sehingga dalam setiap bagian sediaan mengandung obat yang jumlahnya sama. Jika bahan obat tidak terdispersi merata dalam sediaan maka tidak akan tercapai efek terapi yang diinginkan (Ulaen dkk., 2012). Lotion diambil tiap formula secukupnya kemudian dioleskan pada plat kaca, diraba, dan digosokkan, massa lotion harus menunjukkan susunan homogen yaitu tidak terasa adanya bahan padat pada kaca (Lestari, 2002). Memenuhi standar SNI 4399-1996 dalam sediaan tabir surya jika sediaan homogen.

**11.4 Uji Viskositas.** Uji viskositas dilakukan dengan memasukkan 100 ml sampel *lotion* ke dalam wadah kemudian dipasang spindle yang sesuai. Spindle wajib terendam di dalam sediaan uji.

Viskometer dinyalakan serta ditentukan kecepatan berputarnya rotor yakni kecepatan 60 rpm. Amatilah jarum penanda pada viskometer yang menunjukkan angka pada skala viskositas kemudian catatlah serta kalikan dengan aspek 100 (Zuklarnanin, 2013). Rentang nilai viskositas lotion berdasarkan SNI 4399-1996 untuk sediaan tabir surya yaitu 2.000 – 50.000 cP.

**11.5 Uji Daya Sebar.** Tujuan uji daya sebar untuk mengetahui kemampuan penyebaran lotion pada kulit telah memenuhi persyaratan untuk daya sebar lotion. Daya sebar yang baik dapat mempermudah saat diaplikasikan pada kulit. Faktor yang mempengaruhi diameter daya sebar suatu sediaan adalah jumlah ekstrak yang digunakan setiap masing-masing formula. Hal ini berdasarkan pada semakin rendah konsistensi sediaan lotion dengan waktu lekat yang lebih rendah maka dapat membuat lotion semakin mudah menyebar (Ansel dkk.,1989). Nilai uji daya sebar menurut SNI No. 06-2588 yaitu sebesar 5-7 cm.

**11.6 Uji Daya Lekat.** Uji daya lekat memiliki ikatan berbanding lurus dengan uji viskositas, dimana semakin tinggi nilai viskositas maka semakin tinggi daya lekatnya (Pebrianti,2021) Range dari uji daya lekat yaitu minimal 1 detik (Yusuf et al., 2017).

**11.7 Uji akseptabilitas lotion.** Uji akseptabilitas dilakukan selama 1 hari pada 10 orang panelis yang dilakukan untuk mengetahui formula mana yang paling disukai oleh panelis sebagai lotion ekstrak daun teh hijau. Parameter aroma pada F1 memiliki nilai akseptabilitas yang paling rendah, yaitu sebesar 79%.

**11.8 Cycling Test.** Uji ini dilakukan untuk mengetahui stabilitas pada sediaan. Dilakukan dengan cara sediaan disipan dalam suhu 4°C dan 40 °C. Setelah itu dilakukan pengamatan sebelum dan sesudah pengujian (Septiani, dkk. 2011).

## **12. Pembuatan larutan stok**

**12.1 Pembuatan larutan stok.** Pembuatan larutan stok DPPH. Dilakukan dengan menyiapkan 11,3 mg, kemudian dilarutkan menggunakan metanol sampai tanda pada labu takar 100ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4mM , yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol. Dalam Pembuatan labu takar dilapisi aluminium foil.

**12.2 Pembuatan larutan stok ekstrak daun teh.** Ekstrak kental daun teh ditimbang sebanyak 10mg dilarutkan dalam metanol sampai tanda batas labu takar 100ml maka diperoleh konsentrasi

500ppm. Larutan ekstrak kental daun teh konsentrasi 500ppm dibuat dalam 5 seri pengenceran yaitu 1ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, dan 5ppm.

#### **12.3 Pembuatan larutan stok lotion ekstrak daun teh.**

Menimbang sebanyak 50mg lotion, dilarutkan dengan etanol pa sampai pada tanda batas labu takar 100ml, sehingga diperoleh 500ppm. Larutan lotion dengan konsentrasi 500ppm dibuat 5 seri pengenceran 1ppm, 1ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm.

**12.4 Pembuatan larutan stok rutin.** Menimbang sebanyak 50mg lotion, dilarutkan dengan etanol pa sampai pada tanda batas labu takar 100ml, sehingga diperoleh 500ppm. Larutan lotion dengan konsentrasi 500ppm dibuat 5 seri pengenceran 1ppm, 1ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm.

**12.5 Pembuatan larutan stok lotion rutin.** Menimbang sebanyak 50mg lotion, dilarutkan dengan etanol pa sampai pada tanda batas labu takar 100ml, sehingga diperoleh 500ppm. Larutan lotion dengan konsentrasi 500ppm dibuat 5 seri pengenceran 1ppm, 1ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm.

### **13. Penentuan panjang gelombang maksimum**

Sebanyak 1ml larutan stok DPPH 0,3nM dimasukkan dalam labu takar 5ml ditambah larutan uji (ekstrak daun teh, lotion ekstrak daun teh, standart rutin, lotion rutin) sampai tanda batas. Campuran tersebut dihomogenkan, lalu diinkubasi pada operating time dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450-500nm.

### **14. Penentuan operating time**

Sebanyak 1ml larutan stok DPPH 0,3nM dimasukkan dalam labu takar 5ml ditambah larutan uji (ekstrak daun teh, lotion ekstrak daun teh, standart rutin, lotion rutin) sampai tanda batas. Penentuan operating time dilakukan pada panjang gelombang maksimal DPPH yang diperoleh sebelumnya. Interval waktu dari penentuan operating time yaitu dari menit ke 0 sampai didapat absorbansi yang stabil.

### **15. Uji aktivitas penangkapan radikal bebas**

Larutan stok yang telah dibuat menjadi 5 seri pengenceran diambil 4ml lalu ditambah 1ml larutan DPPH 0,3nM. Campuran diinkubasi selama operating time dan dibaca absorbansinya.

## **E. Analisis Data**

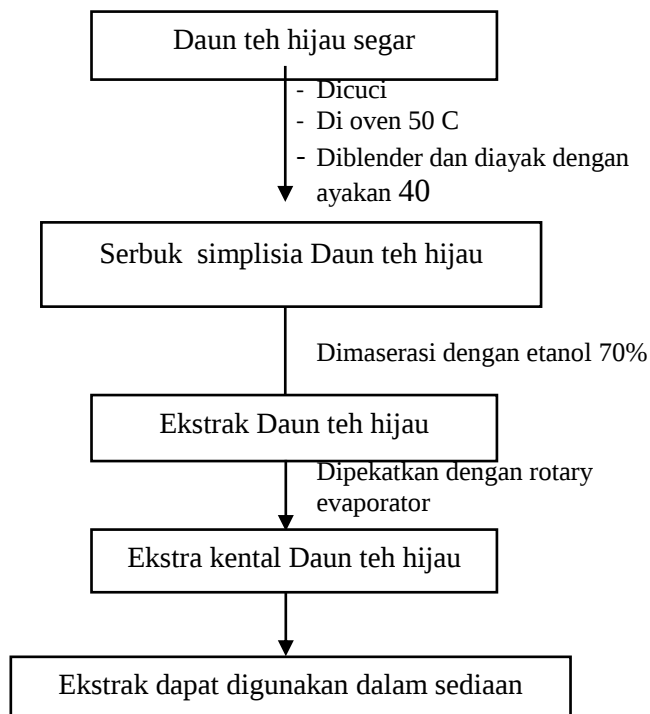
Analisis hasil dari pengujian mutu fisik sediaan lotion dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Package for the Social*

*Sciences*). Analisis menggunakan *Shapiro-Wilk*, data dapat dikatakan berdistribusi normal jika diperoleh nilai  $p > 0,05$  lalu dapat dilanjutkan dengan *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila terdapat perbedaan data yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji Tukey HSD. Uji Tukey HSD (*Honestly Significant Different*) bertujuan mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki pengaruh berbeda signifikan. Uji ini merupakan perbaikan dari LSD, hal ini dikarenakan uji Tukey HSD membandingkan mean tanpa perencanaan terlebih dahulu (Kusriningrum, 2010). Data aktivitas DPPH ekstrak maupun lotion dihitung dengan persamaan regresi linier dan ditentukan IC 50nya. Dihitung dengan rumus:

$$\text{Penangkapan (\%)} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100 \%$$

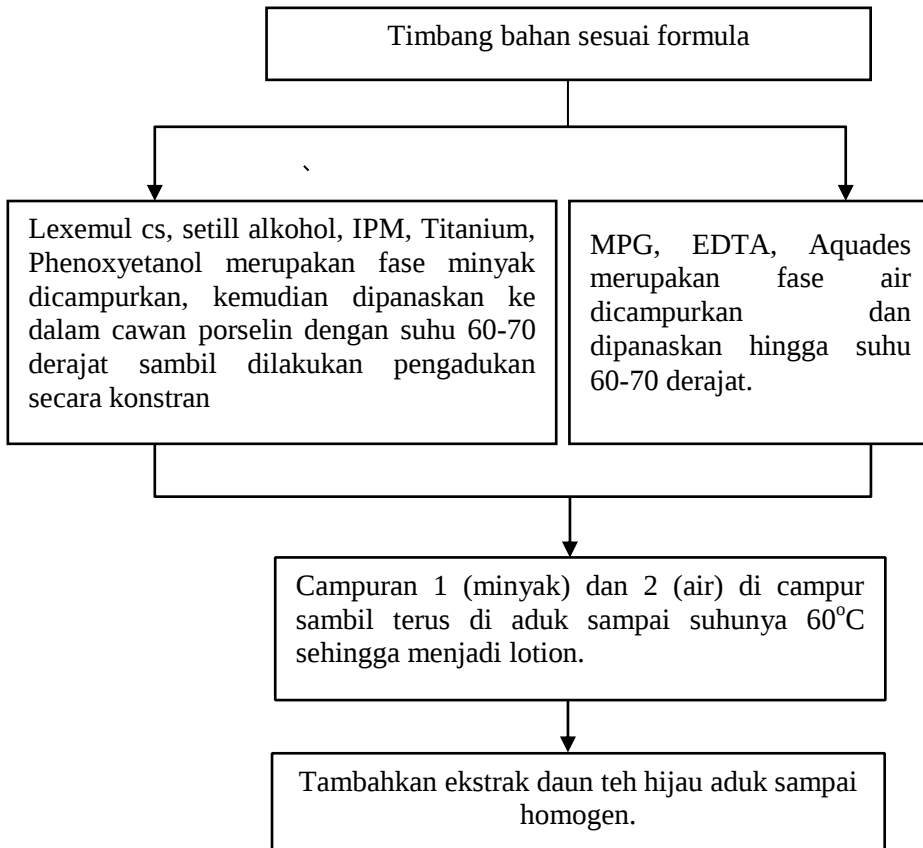
## F. Skema Penelitian

### 1. Skema Pembuatan dan pengujian ekstraksi daun teh hijau



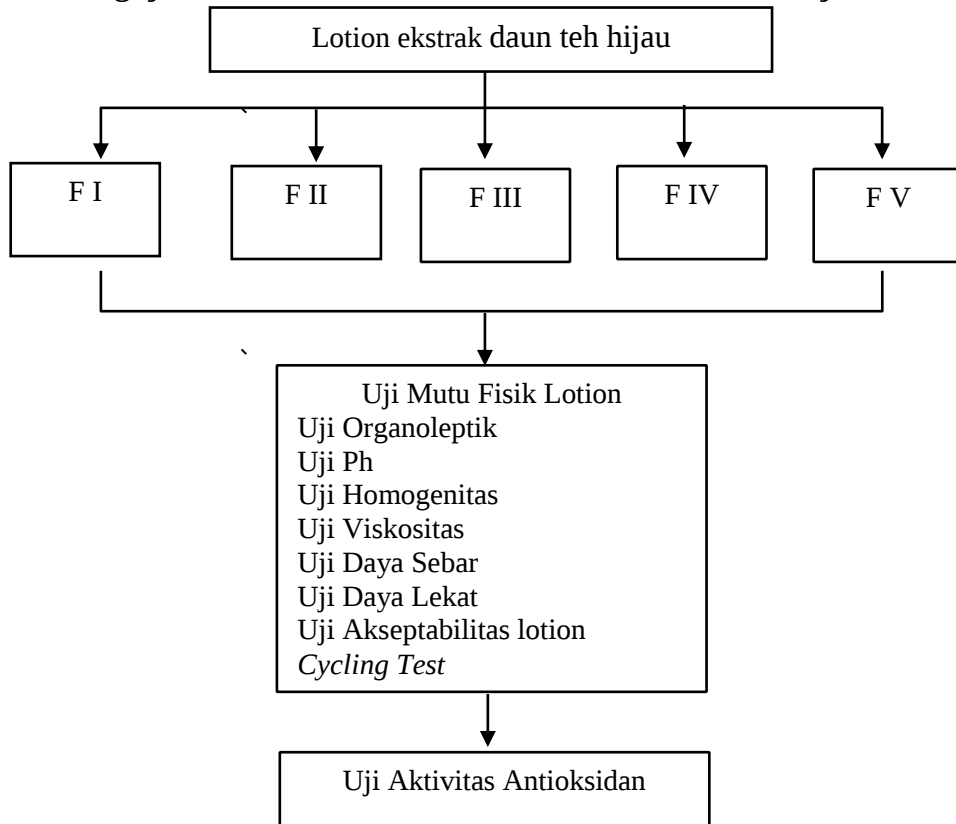
**Gambar 5. Skema pembuatan dan pengujian ekstraksi daun teh hijau**

## 2. Pembuatan sediaan lotion ekstrak Daun teh hijau



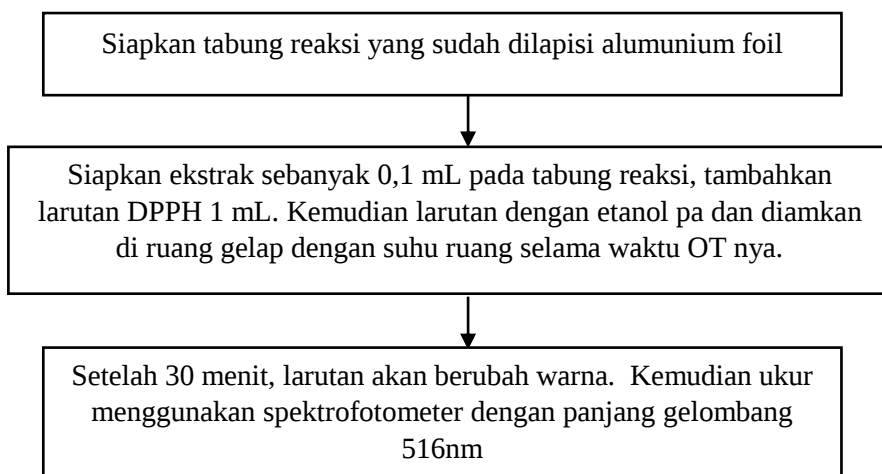
**Gambar 6. Pembuatan sediaan lotion ekstrak daun teh hijau**

### 3. Pengujian mutu fisik sediaan lotion ekstrak daun teh hijau



**Gambar 7. Pengujian mutu fisik sediaan lotion ekstrak lotion ekstrak daun teh hijau**

### 4. Pengujian altivitas antioksidan dengan metode DPPH



**Gambar 8. Skema Pengujian Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH**