

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan seluruh bagian yang menjadi target dari suatu penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel yang dibuat dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah dengan karakteristik daun binahong yang segar, berwarna hijau, tidak rusak dan tidak layu.

Sampel merupakan bagian dari populasi yang dipilih berdasarkan kriteria tertentu agar memenuhi syarat yang ditetapkan. Sampel dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel yang memiliki zat aktif ekstrak etanol daun binahong konsentrasi 1% berbasis HPMC sebagai *gelling agent* pada konsentrasi 1; 1,5; 2 dan 2,5%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang pertama adalah konsentrasi HPMC emulgel ekstrak etanol daun binahong dengan variasi konsentrasi.

Variabel utama yang kedua adalah mutu fisik sediaan emulgel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) dengan variasi konsentrasi HPMC sebagai *gelling agent*.

Variabel utama yang ketiga adalah aktivitas antioksidan sediaan emulgel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) dengan variasi konsentrasi HPMC sebagai *gelling agent* menggunakan metode DPPH.

Variabel utama yang keempat adalah nilai SPF sediaan emulgel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) dengan variasi konsentrasi HPMC sebagai *gelling agent* secara *in vitro* menggunakan metode Spektro UV-Vis.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama merupakan seluruh variabel yang diidentifikasi dalam penelitian. Identifikasi meliputi variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang diteliti untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini berupa konsentrasi HPMC dalam sediaan emulgel dengan variasi 1%, 1,5%, 2% dan 2,5%.

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Penelitian ini memiliki variabel tergantung berupa mutu fisik emulgel, aktivitas antioksidan, serta aktivitas tabir surya dari emulgel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*).

Variabel terkendali merupakan variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dikontrol agar hasil penelitian tetap valid dan dapat direplikasi. Variabel terkendali dalam penelitian ini meliputi kondisi peneliti, kondisi laboratorium, komposisi campuran bahan, serta metode yang digunakan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun binahong (*Anredera cordifolia*) adalah daun tanaman binahong yang berada di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, sediaan emulgel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) adalah hasil ekstraksi dari simplisia daun binahong (*Anredera cordifolia*) dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Ketiga, sediaan emulgel ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) adalah emulgel yang diformulasikan dengan variasi konsentrasi basis *gel* HPMC yaitu 1;1,5; 2; 2,5 dan 2,5% sebagai kontrol negatif K(-).

Keempat, uji mutu fisik sediaan emulgel adalah pengujian melalui pengamatan terhadap organoleptis, pH, homogenitas, viskositas, daya sebar, dan daya lekat.

Kelima, kontrol positif yang digunakan adalah kuersetin sebagai pembanding aktivitas antioksidan dan sediaan tabir surya yang telah beredar di pasaran dan umum digunakan oleh masyarakat sebagai pembanding nilai SPF.

Keenam, pengujian aktivitas tabir surya dilakukan dengan menentukan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

Ketujuh, pengujian aktivitas antioksidan sediaan emulgel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) dilakukan dengan metode DPPH.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, gelas ukur, tabung reaksi, labu takar, neraca analitik, bejana maserasi, blender, oven, erlenmeyer, corong kaca, alat-alat gelas, wadah emulgel, mortir,

stamper, sendok tanduk, batang pengaduk, sudip, cawan porselen, *Beaker glass*, *moisture balance*, *waterbath*, penangas air, *vacuum rotary evaporator*, pH meter, kaca arloji, pot emulgel, cawan porselen, penggaris, kertas saring, pipet tetes, kuvet, pinset, ayakan, *object glass*, kain flannel, anak timbang, mikropipet, *viscometer (Brookfield)*, alat uji daya lekat, alat uji daya sebar dan spektrofotometri UV-Vis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia*), HPMC, propilenglikol, parafin cair, span 80, tween 80, Butil hidroksitoluen (BHT), *phenoxyetanol*, etanol 96%, etanol *p.a.*, *aquadest*, DPPH (*1,1-Diphenil-2-pikrihidrazil*), serbuk Mg, HCl pekat, FeCl₃, pereaksi *Dragendorff*, pereaksi Mayer, pereaksi *Liebermann-Burchard*, H₂SO₄, sediaan tabir surya, kuersetin.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Langkah pertama dalam penelitian ini mencakup determinasi daun binahong (*Anredera cordifolia*) untuk memastikan keaslian dan ketepatan tanaman yang digunakan. Determinasi dilakukan dengan mengamati ciri morfologis yang ada pada tanaman binahong (*Anredera cordifolia*). Determinasi pada daun binahong (*Anredera cordifolia*) dilakukan di UPA Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Bahan daun binahong (*Anredera cordifolia*) diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun yang digunakan merupakan daun segar, tidak layu dan dalam kondisi baik tanpa kerusakan untuk menghasilkan ekstrak etanol yang optimal. Daun yang telah diperoleh dipisahkan dari batangnya.

3. Pembuatan serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia*)

Serbuk diperoleh dari simplisia utuh atau potongan kecil yang telah dikeringkan kemudian diolah hingga mencapai tingkat kehalusan tertentu. Derajat kehalusan yang umum digunakan dalam pembuatan ekstrak merupakan serbuk halus, kecuali terdapat ketentuan lain.

3.1 Identifikasi serbuk daun binahong. Identifikasi serbuk dilakukan menggunakan panca indra dengan mengamati bau, warna, rasa serta bentuknya. Daun binahong (*Anredera cordifolia*) yang telah dipanen dilakukan sortasi basah dan pencucian dengan aliran air mengalir guna menghilangkan kotoran yang menempel. Daun binahong yang telah melalui proses pencucian diiris tipis kemudian dikeringkan.

Proses pengeringan dilakukan selama beberapa hari pada suhu kamar tanpa paparan sinar matahari langsung. Daun yang telah kering dihancurkan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan nomor 60 sampai diperoleh serbuk yang halus dan seragam. Serbuk hasil ayakan disimpan dalam wadah tertutup dan bebas kelembaban untuk digunakan dalam penelitian.

3.2 Uji susut pengeringan. Pengujian kadar air dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi menggunakan alat *moisture balance*. Alat dikalibrasi terlebih dahulu untuk memastikan tingkat akurasi. Serbuk sebanyak 2 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam plat alat. Hasil pengukuran dalam bentuk persentase akan muncul di layar alat *moisture balance* setelah terdengar bunyi ‘beep’.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*)

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 1 kilogram serbuk daun binahong ditimbang, dimasukkan ke dalam bejana gelap kemudian ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Perendaman berlangsung selama dua hari dengan penggojogan sesekali selama 6 jam pertama dan dilanjutkan dengan pendiaman selama 18 jam. Larutan disaring untuk memperoleh filtrat. Ampas hasil maserasi diekstraksi ulang menggunakan setengah volume pelarut pertama dan didiamkan selama satu hari sebelum disaring kembali. Seluruh filtrat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 45 rpm hingga terbentuk ekstrak kental. Rendemen ekstrak dihitung dengan menimbang hasil ekstrak kental dibagi serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia*) dan dikalikan dengan 100%.

4.1 Pemeriksaan organoleptik ekstrak daun binahong. Identifikasi ekstrak dilakukan dengan menggunakan panca indra. Pemeriksaan mencakup pengamatan terhadap warna, bau, bentuk dan rasa ekstrak (Suryanita *et al.*, 2019).

4.2 Penetapan kadar air ekstrak daun binahong. Penetapan kadar air menggunakan metode gravimetri. Sampel seberat kurang lebih 10 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam wadah bertara. Sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam. Setelah pengeringan, sampel ditimbang lalu dioven kembali selama 1 jam dan ditimbang ulang. Proses diulang hingga selisih dua

penimbangan berturut-turut tidak melebihi 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*)

5.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak kental ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dilarutkan dalam air kemudian dipanaskan selama 5 menit. Larutan disaring untuk memperoleh filtrat A. Sebanyak 5 mL filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 0,1 gram serbuk magnesium ditambahkan, diikuti dengan 1 mL HCl pekat dan 1 mL amil alkohol. Campuran dikocok hingga homogen kemudian didiamkan hingga terjadi pemisahan lapisan. Reaksi positif flavonoid ditunjukkan dengan munculnya warna merah, jingga atau kuning pada lapisan amil alkohol. Warna jingga hingga merah menunjukkan keberadaan flavon, merah hingga merah tua menunjukkan flavanol, sedangkan merah tua hingga magenta menunjukkan flavanon (Kemenkes RI, 2020).

5.2 Identifikasi tanin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak kental ditimbang kemudian dilarutkan dalam 10 mL *aquadest* dan dipanaskan selama 5 menit. Larutan disaring kemudian dimasukkan filtrat sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 0,1 gram FeCl_3 ditambahkan ke dalam larutan. Indikasi positif adanya tanin ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi biru kehitaman untuk tanin jenis galat atau hijau kehitaman untuk tanin jenis katekol (Yahya dan Nurrosyidah, 2020).

5.3 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 10 mg ekstrak kental daun binahong ditimbang dan dilarutkan dengan 10 mL kloroform. Larutan diaduk hingga homogen kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 0,5 mL H_2SO_4 1M dan dikocok kuat. Campuran dibiarkan beberapa saat hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan jernih yang berada di bagian atas diambil menggunakan pipet kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung A diberi 3-4 tetes pereaksi *Dragendorff*, sedangkan tabung B diberi pereaksi Mayer. Reaksi positif terhadap alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga pada tabung A dan endapan putih pada tabung B (Kemenkes RI, 2014).

5.4 Identifikasi saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak kental ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air panas. Campuran didiamkan hingga mencapai suhu ruang kemudian dikocok kuat. Indikasi positif adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa stabil setinggi 1 cm yang tetap

bertahan selama 1 jam atau munculnya busa serupa setelah penambahan 1 tetes HCl 2N (Kemenkes RI, 2014).

5.5 Identifikasi steroid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak kental ditimbang dan dilarutkan dengan 10 mL n-heksana selama 1 jam kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 mL diambil dan diuapkan dalam cawan penguap. Ditambahkan beberapa tetes pereaksi *Liebermann-Burchard* pada residu. Warna biru hingga hijau menandakan hasil positif untuk keberadaan steroid (Widiyati, 2006).

5.6 Uji KLT. Fase diam menggunakan silika *gel* 60 GF₂₅₄ pada pelat KLT berukuran 7 cm x 3 cm. Aktivasi dilakukan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100°C selama 10 menit. Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol kemudian ditotolkan pada fase diam. Identifikasi flavonoid menggunakan fase gerak terdiri yang atas campuran n-heksana : etil asetat : metanol : air (3:4,5:2:0,5). Adanya flavonoid ditunjukkan dengan bercak berwarna biru yang tampak di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm (Marliana *et al.*, 2005). Identifikasi tanin menggunakan fase gerak yang terdiri atas campuran metanol : air (6:4). Penampak noda menggunakan pereaksi FeCl₃ 5%. Reaksi positif terhadap tanin ditandai dengan terbentuknya bercak berwarna hitam (Banu dan Nagarajan, 2014). Identifikasi alkaloid menggunakan fase gerak etil asetat : metanol : air (6:4:2). Identifikasi steroid menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1). Identifikasi saponin menggunakan fase gerak n-butanol : air (1:1) dibandingkan dengan baku sapogenin (Sopianti dan Sary, 2018).

6. Formulasi emulgel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*)

Formula sediaan emulgel daun binahong (*Anredera cordifolia*) terdiri atas fase emulsi yang meliputi fase minyak dan air dan fase *gel*. Fase minyak dan air dipanaskan kemudian dicampurkan hingga membentuk emulsi. Fase *gel* menggunakan *gelling agent Hidroxypropyl methylcellulose* (HPMC) dengan perbedaan konsentrasi. Bahan aktif menggunakan ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*).

Formula yang direncanakan pada penelitian ini sesuai dalam tabel.

Tabel 4. Formula emulgel ekstrak etanol daun binahong

Bahan	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	K(+) %	K(-) (%)
Ekstrak etanol daun binahong	1	1	1	1	-	-
Kuersetin	-	-	-	-	0,01	-
HPMC	1,0	1,5	2	2,5	2,5	2,5
Parafin cair	10	10	10	10	10	10
Span 80	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tween 80	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>Phenoxyetanol</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
BHT	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Propilenglikol	10	10	10	10	10	10
<i>Aquadest</i>	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Keterangan :

- F1 : Formula dengan konsentrasi basis HPMC 1% dan konsentrasi ekstrak 1%
 F2 : Formula dengan konsentrasi basis HPMC 1,5% dan konsentrasi ekstrak 1%
 F3 : Formula dengan konsentrasi basis HPMC 2% dan konsentrasi ekstrak 1%
 F4 : Formula dengan konsentrasi basis HPMC 2,5% dan konsentrasi ekstrak 1%
 K(+) : Formula kuersetin dengan basis HPMC 2,5%
 K(-) : Formula dengan konsentrasi basis HPMC 2,5% tanpa ekstrak

7. Pembuatan emulgel

Pembuatan emulgel dilakukan melalui kombinasi sistem emulsi dan basis gel untuk memperoleh sediaan topikal yang stabil, mudah diaplikasikan, serta memiliki kemampuan pelepasan zat aktif yang baik. Basis gel dibuat menggunakan *Hydroxy Propyl Methyl Cellulose* (HPMC) karena bersifat nonionik, stabil pada rentang pH luas, dan kompatibel dengan berbagai bahan aktif. HPMC dikembangkan dalam air panas untuk mempercepat proses hidrasi dan pembentukan jaringan gel yang homogen (Rowe *et al.*, 2009).

Fase air yang terdiri dari propilenglikol, *phenoxyetanol*, dan tween 80 dipanaskan menggunakan *water bath* untuk menyamakan suhu dengan fase minyak. Propilenglikol berfungsi sebagai humektan sekaligus kosolven yang dapat meningkatkan kelarutan zat aktif dan kenyamanan penggunaan pada kulit (Barry, 2002). *Phenoxyetanol* digunakan sebagai pengawet karena efektif terhadap bakteri dan jamur pada sediaan topikal. Tween 80 berperan sebagai emulgator hidrofilik yang membantu menurunkan tegangan antarmuka sehingga meningkatkan kestabilan emulsi (Tadros, 2013).

Fase minyak yang terdiri dari parafin cair, span 80, dan BHT dipanaskan secara terpisah. Parafin cair berfungsi sebagai emolien yang dapat meningkatkan kelembapan kulit. Span 80 bertindak sebagai emulgator lipofilik yang mendukung pembentukan emulsi stabil ketika

dikombinasikan dengan tween 80. BHT digunakan sebagai antioksidan untuk mencegah oksidasi fase minyak selama penyimpanan. Pencampuran fase minyak ke dalam fase air dilakukan pada suhu yang relatif sama untuk mencegah pemisahan fase dan menghasilkan emulsi yang homogen. Emulsi yang terbentuk kemudian dimasukkan ke dalam basis gel HPMC secara bertahap sambil dihomogenisasi hingga terbentuk emulgel yang seragam. Penambahan ekstrak dilakukan pada tahap akhir untuk menghindari degradasi senyawa aktif akibat paparan panas dan gaya geser yang tinggi. Proses homogenisasi bertujuan untuk memastikan distribusi zat aktif yang merata dan meningkatkan stabilitas fisik sediaan (Sharma *et al.*, 2014).

8. Pengujian mutu fisik emulgel

8.1 Uji organoleptik. Pemeriksaan organoleptik dilakukan terhadap sediaan emulgel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) secara makroskopis menggunakan panca indra. Karakteristik fisik sediaan yang diamati berupa warna, bau, bentuk, tekstur dan konsistensi (Suryanita *et al.*, 2019).

8.2 Uji homogenitas. Sediaan emulgel dioleskan pada kaca objek untuk diamati homogenitasnya. Homogenitas dinyatakan tercapai apabila tidak ditemukan butiran kasar pada seluruh permukaan kaca objek (Suryanita *et al.*, 2019). Uji dilakukan replikasi tiga kali untuk setiap formula.

8.3 Uji viskositas. Penentuan viskositas emulgel dilakukan menggunakan *viscometer Brookfield* dengan spindel nomor 6. Sediaan ditempatkan dalam gelas beaker berkapasitas 100 mL, kemudian diatur pada kecepatan 50 rpm. Spindel diturunkan secara vertikal ke dalam sediaan dengan hati-hati agar tidak menyentuh bagian dasar *beaker glass* (Murdiana *et al.*, 2022). Uji dilakukan replikasi tiga kali untuk tiap formula.

8.4 Uji pH. pH meter dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH 4 dan 7. Nilai pH diukur menggunakan pH meter dengan cara mencelupkan elektroda ke dalam sediaan, lalu mencatat angka yang ditampilkan pada layar alat. Rentang pH yang sesuai untuk sediaan topikal adalah antara 4,5 hingga 6,5, menyesuaikan dengan pH fisiologis kulit (Halid dan Saleh, 2019). Uji dilakukan replikasi tiga kali untuk tiap formula.

8.5 Uji daya sebar. Sebanyak 0,5 gram sediaan diletakkan pada permukaan kaca bulat berskala. Kaca bulat lainnya diletakkan di

atas sediaan dan didiamkan selama 1 menit. Diameter sebar diukur dari berbagai sisi dan dihitung rata-ratanya. Beban tambahan sebesar 50, 100, 150, 200 dan 250 gram diberikan secara bertahap dengan waktu jeda 1 menit untuk masing-masing beban. Pengujian dilakukan tiga kali untuk tiap formula (Voigt, 1994).

8.6 Uji daya lekat. Sebanyak 0,5 gram sediaan emulgel dioleskan pada kaca objek dan ditutup dengan kaca objek lainnya. Kedua kaca kemudian diberikan tekanan menggunakan beban 1 kg selama 5 menit. Alat uji dipasang dan ditambahkan beban seberat 80 gram. Waktu yang diperlukan hingga kaca terpisah dicatat sebagai hasil pengujian daya lekat. Kriteria daya lekat yang baik ditunjukkan oleh waktu menempel minimal selama 4 detik (Nurlely *et al.*, 2021). Pengujian dilakukan tiga kali untuk tiap formula.

9. Pengujian aktivitas antioksidan emulgel ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*)

9.1 Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM. Larutan stok DPPH 0,4 mM (berat molekul 394,32 g/mol) disiapkan dengan cara menimbang DPPH sebanyak 15,8 mg. Serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan etanol *p.a.* hingga mencapai tanda batas. Larutan dihomogenkan dan disimpan dalam tempat gelap yang terlindung dari cahaya (Sosalia *et al.*, 2021).

9.2 Pembuatan larutan induk kuersetin 100 ppm. Kuersetin sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 mL etanol *p.a.* Larutan dikocok hingga tercampur secara merata (Wulandari *et al.*, 2015).

9.3 Pembuatan larutan seri kuersetin. Larutan induk kuersetin digunakan untuk membuat seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Masing-masing konsentrasi dibuat dengan memipet larutan induk, kemudian diencerkan hingga tanda batas menggunakan etanol *p.a.* (Wulandari *et al.*, 2015).

9.4 Pembuatan larutan uji ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*). Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL etanol *p.a.*, kemudian dihomogenkan. Larutan disaring menggunakan kertas saring. Larutan jernih yang diperoleh diencerkan untuk membuat larutan seri dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Volume masing-masing dipipet sebanyak 1, 2, 3, 4, dan 5 mL ke dalam labu ukur 10 mL ditambahkan dengan etanol *p.a.* hingga mencapai tanda batas (Wulandari *et al.*, 2015).

9.5 Penentuan *operating time*. Sebanyak 1 mL larutan seri kuersetin pada konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm diambil dan dicampurkan dengan 1 mL larutan stok DPPH 0,4 mM. Campuran dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian diencerkan dengan etanol *p.a.* hingga batas tanda. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex dan diamati setiap 5 menit selama 60 menit pada panjang gelombang teoritis 516 nm. Nilai *operating time* ditetapkan berdasarkan waktu saat absorbansi tertinggi dan paling stabil tercapai (Sosalia *et al.*, 2021).

9.6 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH. Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian diencerkan dengan etanol *p.a.* hingga tanda batas. Larutan dihomogenkan, lalu dilakukan pengukuran absorbansi maksimum pada rentang panjang gelombang 400–800 nm selama waktu *operating time* yang telah diperoleh dari pengujian sebelumnya (Hidayati *et al.*, 2017).

9.7 Pengukuran absorbansi larutan kontrol DPPH. Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, lalu volumenya ditambahkan etanol *p.a.* hingga mencapai tanda batas. Larutan dihomogenkan dan didiamkan selama *operating time*. Seluruh proses dilakukan dalam wadah tertutup dan terlindung dari paparan cahaya. Absorbansi larutan kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum (Wulandari *et al.*, 2015).

9.8 Pengukuran absorbansi larutan pembanding kuersetin. Sebanyak 1 mL dari masing-masing larutan pembanding dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan diencerkan dengan etanol *p.a.* hingga tanda batas. Larutan dihomogenkan dan didiamkan selama *operating time*. Proses pengujian dilakukan dalam wadah tertutup yang terhindar dari cahaya. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum, dan setiap pengukuran direplikasi sebanyak tiga kali (Wulandari *et al.*, 2015).

9.9 Pengukuran absorbansi ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*). Sebanyak 1 mL dari masing-masing larutan uji dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL. Campuran ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan diencerkan menggunakan etanol *p.a.* hingga tanda batas. Campuran yang telah dihomogenkan didiamkan selama *operating time*.

Pengujian dilakukan dalam wadah tertutup yang tidak terpapar cahaya. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan etanol *p.a.* dan ekstrak sebagai blangko. Setiap pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali (Wulandari *et al.*, 2015).

9.10 Penentuan aktivitas antioksidan emulgel ekstrak etanol binahong. Masing-masing larutan uji sebanyak 1 mL dicampurkan dengan 1 mL larutan stok DPPH 0,4 mM, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan etanol *p.a.* hingga batas volume. Larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama waktu *operating time* pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Sosalia *et al.*, 2021).

9.11 Penentuan persen inhibisi. Persentase inhibisi terhadap radikal bebas DPPH dihitung berdasarkan data absorbansi yang diperoleh. Perhitungan dilakukan menggunakan rumus berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs DPPH}} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

Keterangan :

Abs DPPH = Absorbansi DPPH

Abs Sampel = Absorbansi Sampel

Inhibisi = Aktivitas Antioksidan

9.12 Penentuan Nilai IC₅₀. Persentase inhibisi yang telah dihitung kemudian dimasukkan ke dalam persamaan garis lurus linear dengan bentuk persamaan $Y = a + bx$. Nilai IC₅₀ ditentukan dengan menggunakan rumus berikut :

$$x = \frac{50 - a}{b} \dots \dots \dots (4)$$

Keterangan:

Y= Persentase inhibisi

a = *Intercept*

b = *Slope*

x = Nilai IC₅₀ dengan satuan µg/mL (ppm)

Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti aktivitas antiradikalnya semakin tinggi.

10. Pengujian *Sun Protection Factor* (SPF) emulgel ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*)

Penentuan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) bertujuan mengevaluasi efektivitas perlindungan sediaan emulgel terhadap radiasi sinar *ultraviolet* secara *in vitro* menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Pengujian dilakukan terhadap emulgel ekstrak daun binahong

(*Anredera cordifolia*) dengan konsentrasi HPMC 2,5% (kontrol negatif), 1%, 1,5%, 2% dan 2,5%. Sediaan kontrol yang diketahui memiliki aktivitas tabir surya juga disertakan dalam pengujian.

10.1 Penentuan nilai SPF pada kontrol positif. Kontrol positif sebanyak 25 mg dilarutkan dalam 25 mL etanol *p.a* dengan pengadukan hingga homogen. Campuran ini kemudian diultrasonikasi selama 5 menit dan disaring. Hasil saringan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan volumenya dicukupkan dengan etanol *p.a*. Sebanyak 1 mL larutan ini diambil dan diencerkan menjadi 10 mL menggunakan etanol *p.a*. Larutan yang didapatkan diukur menggunakan spektrofotometri UV dengan etanol *p.a* sebagai blangko. Nilai absorbansi diukur setiap 5 nm pada panjang gelombang 290-320 nm (Widitasari *et al.*, 2023).

10.2 Preparasi ekstrak etanol daun binahong. Ekstrak etanol daun binahong yang akan diketahui nilai SPF dengan konsentrasi 1%. Ditimbang sesuai jumlah konsentrasi dan ditambahkan dengan etanol *p.a*. Campuran ini kemudian diultrasonikasi selama 5 menit dan disaring. Hasil saringan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan volumenya dicukupkan dengan etanol *p.a*. Sebanyak 1 mL larutan ini diambil dan diencerkan menjadi 10 mL menggunakan etanol *p.a* sampai tanda batas (Widitasari *et al.*, 2023).

10.3 Preparasi emulgel ekstrak etanol daun binahong. Emulgel sebanyak 25 mg dilarutkan dalam 25 mL etanol *p.a* dengan pengadukan hingga homogen. Campuran ini kemudian diultrasonikasi selama 5 menit dan disaring. Hasil saringan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan volumenya dicukupkan dengan etanol *p.a*. Sebanyak 1 mL larutan ini diambil dan diencerkan menjadi 10 mL menggunakan etanol *p.a* (Widitasari *et al.*, 2023).

10.4 Pengukuran nilai *Sun Protection Factor* (SPF). Larutan yang didapatkan diukur menggunakan spektrofotometri UV dengan etanol *p.a* sebagai blangko. Nilai absorbansi diukur setiap 5 nm. Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing konsentrasi (Amin *et al.*, 2024) .

10.5 Perhitungan nilai *Sun Protection Factor* (SPF). Data spektrum serapan yang diperoleh dari spektrofotometri UV pada panjang gelombang 290-320 nm dijadikan dasar perhitungan SPF. Nilai absorbansi dicatat kemudian dihitung nilai SPF dengan menggunakan persamaan Mansur :

$$\text{SPF} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda) \dots \dots \dots (5)$$

Keterangan:

CF : *Correction factor* = 10

EE : *Erythemat effect spectrum*

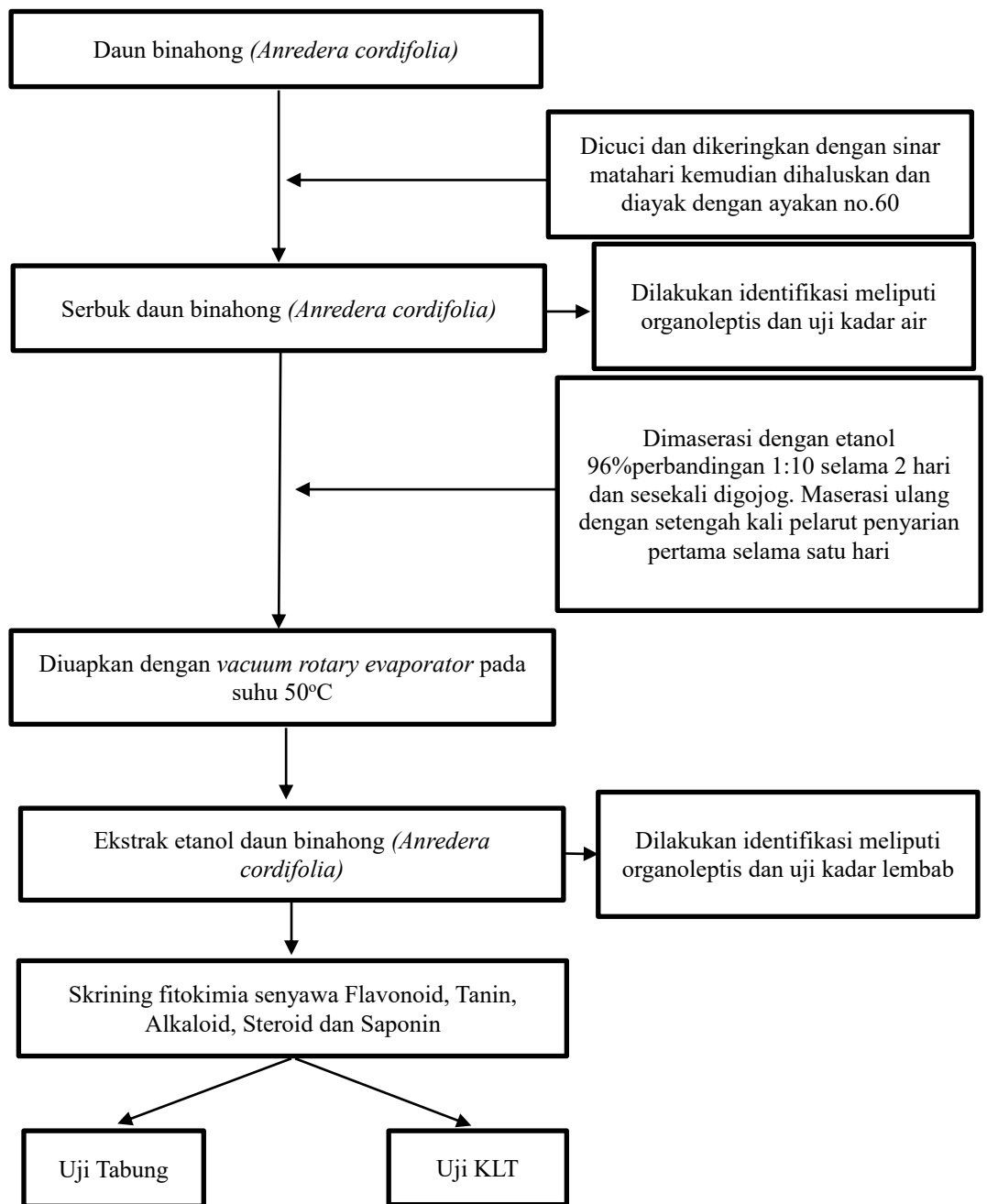
I : Intensitas spektrum matahari pada panjang gelombang

Abs : Absorbansi produk tabir surya

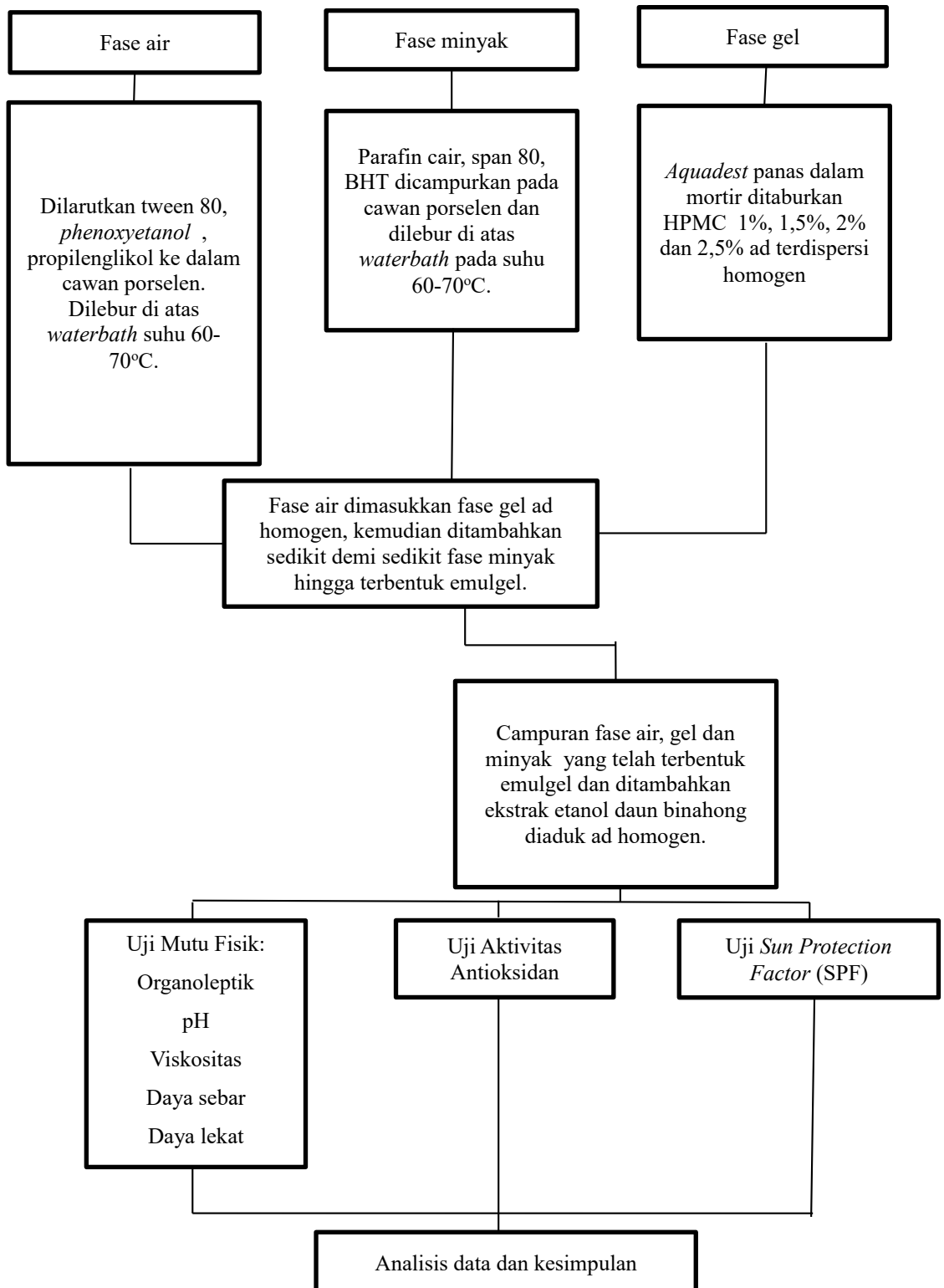
E. Analisis Hasil

Data mutu fisik sediaan emulgel ekstrak daun binahong yang meliputi viskositas, daya sebar, dan daya lekat terlebih dahulu diuji normalitasnya. Data yang berdistribusi normal dianalisis menggunakan uji *One Way Anova*. Homogenitas varians diuji menggunakan uji *Levene*. Data yang memenuhi asumsi homogenitas ($p > 0,05$) dianalisis lebih lanjut menggunakan uji *Tukey* pada tingkat kepercayaan 95%. Data yang berdistribusi normal tetapi tidak homogen ($p < 0,05$) dianalisis menggunakan uji *Anova Welch* dan dilanjutkan dengan uji *Games–Howell*. Mutu fisik sediaan pada hari ke-1 (H-1) dan hari ke-21 (H-21) dianalisis menggunakan uji *Paired T-test*. Data aktivitas tabir surya yang diperoleh dari pengukuran absorbansi terhadap radikal bebas DPPH serta penentuan nilai SPF dianalisis menggunakan pendekatan statistik yang sama sesuai dengan hasil uji homogenitas, kemudian dilanjutkan dengan uji *Tukey* atau *Games–Howell* pada tingkat kepercayaan 95%.

F. Skema Penelitian



Gambar 9. Skema pembuatan dan pengujian ekstrak etanol daun binahong



Gambar 10. Skema pembuatan emulgel ekstrak etanol daun binahong