

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan penelitian yaitu metode quasi eksperimental untuk mengetahui perbedaan nilai antioksidan dengan tiga variasi kelompok sabun hidrogel ekstrak daun rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Dilakukan parameter uji dalam penelitian ini yang terdiri dari uji skrining fitokimia, uji kualitas sediaan yang terdiri dari (organoleptik, homogenitas, pH, dan viskositas), uji rasio *swelling*, uji fraksi gel, uji stabilitas, dan uji antioksidan dengan metode DPPH.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu Ekstrak daun rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (BALITTRO), aquadest (Sari Kimia), etanol p.a (Kimia Herbal), vitamin C (Planet Kimia), DPPH (CV. Aloin Labora), reagen dragendorff, reagen mayer, reagen libermann-burchard, larutan FeCl_3 1%, serbuk Mg, HCl, serta bahan-bahan pembuatan Sabun Hidrogel seperti, kalium klorida, karagenan (Planet Kimia), gliserin (Planet Kimia), PVP K-30 (Planet Kimia), PEG-400 (Planet Kimia), natrium alginat (Chemical Retail), agar (Chemical Retail), aquadest, sodium lauryl sarcosinate (Raja Kimia), asam miristat (Kimia Jaya Abadi), Asam Stearat (Planet Kimia), Sodium PCA (Planet Kimia), KOH 48% (Raja Kimia), PEG-120 *Methyl Glucose Diolate* (Kimia Jaya Abadi), sukrosa, DMDM hydantoin (Planet Kimia).

3.2.2 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu neraca analitik (Adam Scientific), gelas ukur (Pyrex), tabung reaksi (Iwaki), gelas kimia (Pyrex), labu ukur (Pyrex), pipet tetes, batang pengaduk, spatula, kertas perkamen, cawan porselen (Pyrex), vial, magnetic stirrer, corong

(Pyrex), cetakan hidrogel, spektrofotometer UV-Vis (VWR UV-1600PC), kuvet (Quartz), viscometer brookfield (NDJ-8S), pH meter digital (YY-1030), thermometer (GEA), oven (Biobase), lemari pendingin (Philips), obyek glass,

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

3.3.1 Tempat Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Riset dan Instrumental, Laboratorium Teknologi Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian mulai dilakukan dari bulan Maret 2025-bulan Mei 2025.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variable bebas pada penelitian ini yaitu tiga variasi kelompok berdasarkan perbedaan konsentrasi basis gel dan konsentrasi ekstrak yaitu, F1(NA 1,2%;Agar 1,8%), F2(NA 1,8%;Agar 2,7%), F3(NA 2,4%;Agar 3,6%), dan ekstrak daun rosemary (F1 1%, F2 2%, F3 4%).

2. Variabel Terikat

Variabel yang dipengaruhi atau hasil dari keberadaan variabel bebas, dalam penelitian ini yaitu uji skrining fitokimia, uji kualitas sabun hidrogel meliputi (organoleptik, pH, viskositas dan homogenitas), uji rasio *swelling*, uji fraksi gel, uji stabilitas sabun hidrogel serta uji antioksidan ekstrak rosemary dan sediaan sabun hidrogel berdasarkan uji antioksidan DPPH.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini merupakan hasil tabel definisi operasional variabel yang terdapat dalam penelitian.

Tabel 3.1 Definisi operasional variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas					
1.	Formula sabun hidrogel ekstrak daun rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	Formulasi sabun hidrogel ekstrak daun rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) dengan tiga variasi konsentrasi natrium alginat, agar, dan ekstrak daun rosemary	Pengujian meliputi: Uji kualitas sediaan (organoleptik, homogenitas pH, dan viskositas), Uji rasio <i>swelling</i> , Uji fraksi gel, Uji stabilitas, dan Uji aktivitas antioksidan	Nominal	F1 (NA 1,2%; Agar 1,8%; Ekstrak 1%), F2 (NA 1,8%; Agar 2,7%; Ekstrak 2%), F3 (NA 2,4%; Agar 3,6%; Ekstrak 4%)
Variabel Terikat					
2.	Skrining fitokimia alkaloid	Skrining firokimia adalah uji menggunakan pereaksi dengan indikator positif ditandai terdapat endapan putih (mayer) dan endapan merah jingga (dragendorff)	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
3.	Skrining fitokimia terpenoid dan steroid	Skrining firokimia adalah uji menggunakan pereaksi libermann-burchard dengan indikator positif ditunjukkan terbentuk cincin kecoklatan (terpenoid) dan cincin hijau kebiruan (steroid)	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
4.	Skrining fitokimia polifenol dan tanin	Skrining firokimia adalah uji menggunakan pereaksi FeCl ₃ 1% dengan indikator positif ditandai larutan	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif

		hijau kehitaman (tanin) dan hijau biru kehitaman (polifenol)			
5.	Skrining fitokimia saponin	Skrining fitokimia adalah uji menggunakan pereaksi HCl 2N dengan indikator positif ditandai buih stabil 1-10 cm	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
6.	Skrining fitokimia flavonoid	Skrining fitokimia adalah uji menggunakan pereaksi Mg dan HCl dengan indikator positif ditunjukkan larutan jingga	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
7.	Organoleptik (warna, aroma, bentuk) sediaan sabun hidrogel ekstrak daun rosemary	Pengujian fisik dengan menggunakan indra penglihatan dan penciuman dalam pengujian sabun hidrogel	Panca indra	Ordinal	1. Warna 2. Aroma 3. Bentuk
8.	pH sediaan sabun hidrogel ekstrak daun rosemary	Uji nilai pH sediaan sabun hidrogel disesuaikan pH standar	pH meter	Rasio	Angka dalam pH meter
9.	Viskositas sediaan sabun hidrogel ekstrak daun rosemary	Pengujian kekentalan pada sediaan	Viskometer brookfield	Rasio	Angka dalam viskometer (cPs)
10.	Homogenitas sediaan sabun hidrogel ekstrak daun rosemary	Pengujian dengan meletakan sabun hidrogel diatas kaca objek lalu ditutup dengan kaca objek lain untuk diamati homogenitasnya	Kaca objek	Ordinal	1. Homogen 2. Tidak Homogen
11.	Rasio <i>swelling</i> sediaan sabun hidrogel ekstrak daun rosemary	Pengujian daya serap cairan dengan cara timbang sabun hidrogel sabun (Wd) lalu ditetesi dengan	Timbangan analitik	Rasio	%

		aquades sebanyak 8 mL dan ditimbang pada 5 menit pertama, 15 menit, 25 menit, 35 menit, 45 menit, 55 menit, dan 60 menit sebagai (W_s)			
12.	Fraksi gel sediaan sabun hidrogel ekstrak daun rosemary	Pengujian untuk persentase ikatan silang polimer dengan cara ditimbang sediaan sebagai berat awal (W_0), kemudian direndam dalam 20 ml aquadest selama 24 jam, lalu dioven pada suhu 50°C selama 4 jam dan beratnya ditimbang sebagai bobot akhir (W_1).	Timbangan analitik	Rasio	%
13.	Uji stabilitas sediaan sabun hidrogel ekstrak daun rosemary	Dilakukan uji stabilitas dipercepat selama 3 siklus. Dengan menyimpan sediaan dalam keadaan beku suhu (4°C) dan keadaan panas suhu (40°C)	Indra penglihatan dan penciuman, kaca objek, viskometer, pH Meter	Ordinal	1.Terjadi perubahan 2.Tidak terjadi perubahan
14.	Uji aktivitas antioksidan ekstrak dan sediaan sabun hidrogel ekstrak daun rosemary	Dilakukan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak daun rosemary dan sediaan sabun hidrogel dengan menggunakan metode DPPH untuk mengukur nilai absorbansi	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio	$\mu\text{g/mL}$

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman adalah proses mengidentifikasi atau menentukan tanaman secara spesifik dengan membandingkan ciri-ciri tanaman tersebut menggunakan tanaman yang sudah diketahui atau kunci determinasi, yang bertujuan untuk memastikan keakuratan tanaman tersebut dalam penelitian agar tidak terjadi kesalahan pengumpulan sampel atau bahan (Yulian dan Ismail, 2023). Determinasi tanaman rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) dilakukan di Laboratorium Biosistematika dan Molekuler Departemen Biologi di Herbarium Jatinangor, FMIPA UNPAD.

3.5.2 Ekstrak Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)

Dalam penelitian ini menggunakan ekstrak daun rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO) yang terletak di Cipanas - Bogor, Jawa Barat. Ekstrak kental yang diperoleh melalui metode maserasi, dibuat dari 1000 gram simplisia kering yang dimaserasi dengan etanol 96% selama tiga hari dalam wadah tertutup, sesekali diaduk lalu disaring. Seluruh filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada 40°C hingga menjadi ekstrak kental (Esati *et al.*, 2022).

3.5.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan acuan dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Priyatno dan Suryandari, 2022) sebagai berikut:

1. Uji Alkaloid

Larutan uji sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, buat dalam 2 buah tabung reaksi. Tabung pertama ditetesi pereaksi dragendorff, indikator positif alkaloid menunjukkan terbentuk endapan jingga. Tabung kedua ditetesi 5 tetes pereaksi mayer, indikator positif ditunjukkan dengan terdapat endapan putih.

2. Uji Steroid dan Terpenoid

Larutan uji sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan larutan kloroform. Beri beberapa tetes pereaksi libermann-burchard, jika larutan uji menunjukkan terbentuknya cincin berwarna kecoklatan maka positif terpenoid tetapi jika terbentuk cincin berwarna hijau kebiruan maka positif steroid.

3. Uji Polifenol dan Tanin

Larutan uji sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan aquadest panas saat sudah suhu kamar ditambahkan NaCl 10%. Kemudian tambahkan beberapa tetes FeCl_3 bila terjadi perubahan larutan menjadi hijau biru kehitaman menandai positif polifenol tetapi jika larutan berwarna hijau kehitaman maka positif tanin.

4. Uji Saponin

Larutan uji sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan aquadest 10 ml panas lalu dinginkan. Setelah itu kocok kuat selama 10 detik lalu tetesi HCl 2N, indikator positif terbentuknya buih stabil 1-10 cm selama 10 menit.

5. Uji Flavonoid

Larutan uji sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan etanol lalu dipanaskan. Setelah itu tambahkan serbuk Mg 0,1 g dan HCl pekat 1 ml, indikator positif perubahan warna larutan menjadi jingga.

3.5.4 Formulasi Sabun Hidrogel Ekstrak Daun Rosemary

Berikut formulasi sabun hidrogel pada penelitian ini mengacu pada penelitian sebelumnya dari hibah pendanaan Program Kreativitas Mahasiswa yang diselenggarakan oleh Direktorat Pembelajaran dan Kemahasiswaan (Belmawa), yang berada di bawah naungan Ditjen Diktiristek pada tahun 2023 dengan judul Inovasi Sabun Hidrogel Tanpa Bilas Sebagai Pembersih Badan di Lingkungan Krisis Air Bersih - PKM KI serta pada penelitian (Esati *et al.*, 2022).

Tabel 3.2 Formulasi Sediaan Sabun Hidrogel Ekstrak Daun Rosemary

Bahan	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	Fungsi
Basis Gel				
Kalium Klorida	0,1	0,1	0,1	Gelling agent, pengental
Karagenan	1	1	1	Pengental
Gliserin	5	5	5	Humektan
PVP K-30	1	1	1	Gelling agent
PEG-400	1,5	1,5	1,5	Humektan
Natrium Alginat	1,2	1,8	2,4	Emolien, meningkatkan viskositas
Agar	1,8	2,7	3,6	Gelling agent
Aqua destillata	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Pelarut
Basis Sabun				
Ekstrak Rosemary	1	2	4	Zat aktif
Sodium Lauryl Sarcosinate	4	4	4	Menarik kotoran
Asam Miristat	2	2	2	Pelembab
Asam Stearat	3	3	3	Surfaktan, penstabil busa
Sodium PCA	3	3	3	Pelembab
KOH 48%	2	2	2	Saponifikasi
PEG-120 <i>Methyl Glucose Diolate</i>	3	3	3	Pendingin
Aqua destillata	11,8	11,8	11,8	Pelarut
Sukrosa	10	10	10	Humektan
DMDM Hydantoin	0,5	0,5	0,5	Pengawet
Aqua destillata	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Pelarut

Formulasi sabun hidrogel dibuat dengan menggabungkan basis gel dan basis sabun. Basis gel dibuat dengan mencampurkan kalium klorida, karagenan, gliserin, PVP K-30, natrium alginat, agar, dan aqua destillata hingga homogen dengan magnetic stirrer pada suhu 80°C kemudian dilakukan *cross-linking* menggunakan autoklaf 121°C selama 15 menit, variasi formula terdapat pada perbedaan konsentrasi natrium alginat, agar, dan ekstrak daun rosemary yang digunakan. Basis sabun terdiri dari sodium lauryl sarcosinate, asam miristat, asam stearat, sodium PCA, KOH 48%, PEG-120 *Methyl Glucose Diolate*, larutan sukrosa, ekstrak daun rosemary, DMDM Hydantoin, dan aquadest dibuat pada gelas kimia dicampur hingga homogen dengan magnetic stirrer pada suhu 80°C. Kedua basis dicampur hingga homogen, lalu dimasukkan ke dalam cetakan hingga sabun hidrogel memadat. Sabun hidrogel mengalami proses *freeze-drying* untuk menghilangkan kadar air pada sabun hidrogel.

3.5.5 Uji Kualitas Sediaan Sabun Hidrogel Ekstrak Daun Rosemary

Pengujian kualitas sediaan sabun hidrogel ekstrak daun rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) terdiri dari beberapa parameter uji, diantaranya sebagai berikut:

1. Uji Organoleptik

Pengamatan organoleptik dilakukan meliputi warna, aroma, dan bentuk sediaan kemudian hasilnya dicatat (Harliatika dan Noval, 2021).

2. Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas hidrogel melalui secara visual, sediaan diletakkan di atas kaca objek kemudian ditutup dengan kaca objek lain lalu diamati keberadaan agregat (partikel) pada sediaan hidrogel (Harliatika dan Noval, 2021).

3. Uji pH

Dilakukan dengan alat pH meter yang sudah dikalibrasi dengan larutan standar, elektroda pH meter diletakan pada sediaan yang ada di dalam gelas kimia tunggu beberapa saat hingga pH stabil lakukan tiga replikasi (Wahidah *et al.*, 2024).

4. Uji Viskositas

Pengujian dilakukan dengan alat viskometer spindle nomor 4 dengan kecepatan 60 rpm (*revolutions per minute*), sediaan dalam gelas kimia dimasukkan ke dalam viskometer kemudian dicatat hasil dan dilakukan tiga kali replikasi (Harliatika dan Noval, 2021).

3.5.6 Uji Stabilitas Sediaan Sabun Hidrogel Ekstrak Daun Rosemary

Sediaan dilakukan uji stabilitas dipercepat atau *cycling test* (*freeze-thaw test*) selama 3 siklus dengan perubahan suhu ekstrem. Tiap siklus berlangsung 2 hari: sediaan akan disimpan pada lemari pendingin dengan suhu dingin (4°C) selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke oven dengan suhu panas (40°C) selama 24 jam berikutnya. Kemudian setiap satu siklus, dilakukan uji pemeriksaan fisik, meliputi: organoleptik (warna, bau, bentuk), homogenitas, viskositas, dan pH

(Juliana *et al.*, 2024).

3.5.7 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Rosemary dan Sediaan Sabun Hidrogel

Dilakukan uji antioksidan dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) pada penelitian ini. Pengujian ini meliputi beberapa tahapan diantaranya yaitu pembuatan larutan DPPH, persiapan larutan uji ekstrak daun rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), pembuatan larutan standar vitamin C, penentuan panjang gelombang maksimum DPPH, pembuatan larutan uji sabun hidrogel ekstrak daun rosemary, serta uji aktivitas antioksidan larutan uji ekstrak dan sediaan.

1. Pembuatan larutan DPPH

Dibuat larutan DPPH dengan konsentrasi 50 ppm, dengan cara ditimbang 2,5 mg serbuk DPPH setelahnya ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas labu ukur 50 ml (Siregar *et al.*, 2020).

2. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH sebanyak 4 mililiter dimasukkan ke dalam kuvet, lalu ukur panjang gelombang maksimum DPPH dengan digunakan alat spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 200-800 nm (Siregar *et al.*, 2020).

3. Persiapan larutan uji ekstrak ekstrak daun rosemary dan sediaan sabun hidrogel

Dilakukan pembuatan larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm, dengan cara 50 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu ukur. Kemudian dibuat larutan seri sampel dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm lalu dipipet 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, dan 400 μ L ke dalam labu ukur 5 ml tambahkan etanol p.a sampai tanda batas (Prasetyo *et al.*, 2020).

4. Pembuatan larutan vitamin C

Dilakukan pembuatan larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm, dengan cara 50 mg serbuk vitamin C ditimbang dan dilarutkan

dengan etanol p.a dalam labu ukur. Kemudian dibuat larutan seri sampel dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm lalu dipipet 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, dan 50 μ L ke dalam labu ukur 5 ml tambahkan etanol p.a sampai tanda batas (Prasetyo *et al*, 2020).

5. Pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer uv-vis

Sebanyak 2 ml larutan uji dimasukkan ke dalam botol vial, ditambahkan larutan DPPH 2 ml. Kemudian homogenkan dan diinkubasi dalam ruang gelap, lalu diukur serapannya pada panjang gelombang pada menit ke dua puluh enam dan maksimal pada menit ke tiga puluh (Syahri, Perdana, & Norhaslinda, 2023).

6. Penentuan persen inhibisi

Penentuan % inhibisi atau aktivitas penangkal radikal dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Yahya & Nurrosyidah, 2020), sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Blanko} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Blanko}} \times 100\%$$

Keterangan:

Absorbansi Blanko : nilai absorbansi larutan blanko

Absorbansi Sampel : nilai absorbansi larutan uji atau larutan pembanding

7. Penentuan nilai IC₅₀

Penentuan nilai IC₅₀ ditentukan dari hasil persen peredaman yang diperoleh yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Ditentukan dengan rumus (Yahya & Nurrosyidah, 2020), sebagai berikut:

$$\text{IC}_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

Keterangan:

a = nilai x pada kurva linear

b = nilai y pada kurva linear

3.5.8 Uji Rasio *Swelling* Sediaan Sabun Hidrogel Ekstrak Daun Rosemary

Dilakukan pengujian hidrogel yang telah ditimbang (W_d) ditetesi dengan aquadest sebanyak 8 ml kemudian ditimbang berat sediaan pada 5 menit pertama, 15 menit, 25 menit, 35 menit, 45 menit, 55 menit, dan 60 menit sebagai (W_s) (Rahayuningdyah *et al.*, 2020). Perhitungan rasio *swelling* dilakukan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ rasio swelling} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100\%$$

3.5.9 Uji Fraksi Gel Sediaan Sabun Hidrogel Ekstrak Daun Rosemary

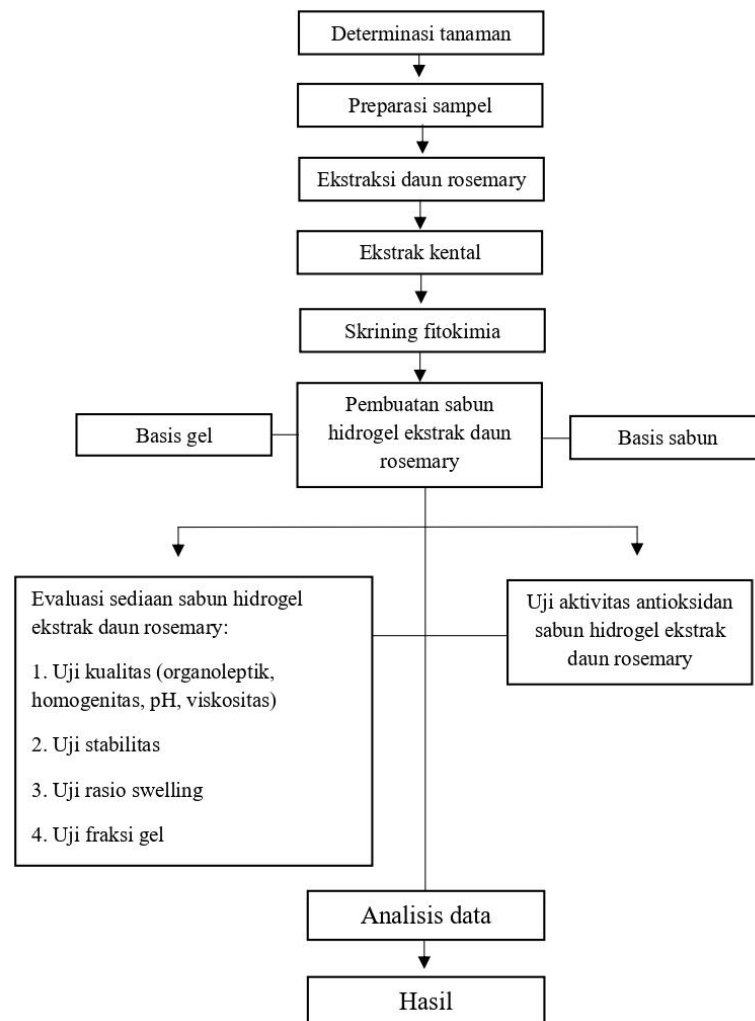
Dilakukan pengujian hidrogel dengan ditimbang sediaan sebagai berat awal (W_0), kemudian direndam dalam 20 ml aquadestillata selama 24 jam, lalu dioven pada suhu 50°C kurang lebih selama 4 jam dan beratnya ditimbang sebagai bobot akhir (W_1). Perhitungan fraksi gel dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ fraksi gel} = \frac{W_1}{W_0} \times 100\%$$

3.6 Analisis Data

Analisis data statistik pada pengujian aktivitas antioksidan sediaan sabun hidrogel dianalisis dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) uji one-way ANOVA, apabila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji Tukey HSD (*Honest Significant Difference*) pada tingkat kepercayaan 95%. Data yang sudah diolah, kemudian diinterpretasikan dalam bentuk tabel dan grafik.

3.7 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian