

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah krim ekstrak rambut jagung (*Zea mays* L.).

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sediaan krim antioksidan ekstrak rambut jagung (*Zea mays* L.) dengan variasi konsentrasi emulgator asam stearat 8%, 12%, 16% dan trietonolamin 2%, 3%, dan 4%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah krim ekstrak rambut jagung (*Zea mays* L.) melalui uji mutu fisik krim dengan berbagai parameter pengujian.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi lebih dulu dapat dikelompokkan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dari penelitian ini adalah variasi konsentrasi emulgator asam stearat dan trietonolamin dalam formulasi sediaan krim antioksidan ekstrak rambut jagung.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah cara pembuatan krim, kondisi penelitian, kondisi laboratorium penelitian.

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah merupakan variabel akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah mutu fisik, stabilitas, dan aktivitas antioksidan dari krim ekstrak rambut jagung yang dibuat.

3. Definisi operasional dan variable utama

Tahap pertama rambut jagung yang berasal dari tanaman jagung (*Zea mays* L.) yang diperoleh dari seorang petani Desa Tawangwangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak rambut jagung adalah hasil ekstraksi serbuk rambut jagung menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 80% yang kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Ketiga, krim rambut jagung adalah hasil pencampuran ekstrak rambut jagung dengan basis krim.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk rambut jagung (*Zea mays* L.). Bahan-bahan kimia yang digunakan asam stearat, trietanolamin, setil alkohol, parafin liquidum, propil paraben, metil paraben, gliserin, aquadest, etanol 80%, etanol p.a, vitamin E dan DPPH.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, timbangan, neraca analitik, *toothed disc mills*, ayakan nomor 40, botol maserasi, kain flannel, *rotary evaporator*, alat *moisture balance*, kertas saring, tabung reaksi, lempeng kromatografi silica gel GF₂₅₄ nm, chamber, pipa kapiler, spektrofotometer UV-VIS (Spectronic@20 Genesys™), kaca objek, vial, labu takar, pipet tetes, pipet tetes, pipet volum, gelas ukur, batang pengaduk, penangas air, cawan uap, mortir dan stamper, wadah krim, *viscotester* Rion VT-04, alat pengujian daya sebar, dan pH meter.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman dan identifikasi tanaman

Determinasi tanaman sebagai bahan penelitian perlu dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang diperiksa dalam penelitian ini sesuai dengan tanaman yang dimaksud sehingga menghindari kesalahan pemilihan bahan

tanaman. Determinasi dilakukan juga untuk mengetahui jenis dan kedudukan tanaman tersebut dalam sistem klasifikasi tanaman.

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman jagung berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman jagung terhadap pustaka yang dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengumpulan bahan

Sampel diperoleh dari seorang petani di Desa Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan yaitu rambut jagung dari Desa Tawangmangu.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Rambut jagung yang telah dicuci kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C, kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan menggunakan ayakan mesh nomor 40. Hasil ayakan ditimbang dengan timbangan elektik dan disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat.

4. Identifikasi serbuk rambut jagung

4.1 Organoleptis serbuk. Identifikasi serbuk rambut jagung secara organoleptis yaitu bentuk, warna, bau, dan rasa dari serbuk rambut jagung.

4.2 Penetapan kadar lembab. Penetapan kadar lembab serbuk rambut jagung dilakukan dengan menggunakan alat moisture balance, dengan cara menimbang serbuk rambut jagung ± 2 gram. Kemudian ditunggu sampai kadarnya konstan dan dilihat kadar lembabnya dalam satuan persen.

5. Pembuatan ekstrak rambut jagung

Serbuk rambut jagung ditimbang sebanyak 800 gram dimaserasi menggunakan 75 bagian cairan penyari yaitu sebanyak 6000 ml pelarut etanol 80% pada temperatur kamar selama 5 x 24 jam, kemudian disaring dengan kain flannel. Ampas yang telah disaring kemudian dicuci dengan pelarut etanol 80% sehingga didapat sari sebanyak 100 bagian. Hasil ekstraksi berupa filtrat dipisahkan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 45°C sampai bobot konstan dan dibuat ekstrak kental.

6. Identifikasi ekstrak rambut jagung

6.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan mengamati meliputi warna, bau, dan bentuk ekstrak.

6.2 Pemeriksaan bebas etanol ekstrak. Uji bebas etanol ekstrak dilakukan dengan cara esterifikasi etanol dimana ekstrak ditambahkan asam asetat dan asam sukfat pekat kemudian dipanaskan, bila tidak ada bau ester berarti pada ekstrak sudah tidak terdapat etanol.

6.3 Identifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak rambut jagung. Identifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak rambut jagung dilakukan dengan uji tabung untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak kental rambut jagung.

6.3.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 3 mL sampel diuapkan, dicuci dengan heksana sampai jernih. Residu dilarutkan dalam 20 mL etanol kemudian disaring. Filtrat dibagi 3 bagian A, B, dan C. Filtrat A sebagai blangko, filtrat B ditambah 0,5 mL HCL pekat kemudian dipanaskan pada penangas air, jika terjadi perubahan warna merah tua sampai ungu menunjukkan hasil yang positif (metode Bate Smith-Metchalf). Filtrat C ditambahkan 0,5 mL HCL dengan logam Mg kemudian diamati perubahan warna yang terjadi (metode Wilstater). Warna merah sampai jingga diberikan oleh senyawa flavon, warna merah tua diberikan oleh flavonol atau flavonon, warna hijau sampai biru diberikan oleh aglikon atau glikosida (Harborne 1987).

6.3.2 Identifikasi saponin. Identifikasi saponin menggunakan uji penyabunan. 5 ml larutan sampel dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian digojok selama 5 menit. Hasil positif apabila terbentuk busa yang stabil.

6.3.3 Tanin. Sebanyak 1 gram sampel dipanaskan dalam 100 ml air suling dan dididihkan selama 15 menit kemudian disaring, dan diperoleh filtrate A. Sebanyak 15 ml filtrate A dibagi kedalam tiga tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan besi (III) klorida. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan larutan menjadi biru kehitaman (tanin galat) atau hijau kehitaman (tanin katekol) (Sunarni *et al* 2018).

7. Rancangan formulasi krim dari ekstrak rambut jagung

Tabel 1. Rancangan formula krim antioksidan ekstrak rambut jagung.

Bahan	Konsentrasi bahan (%)				
	I	II	III	IV	V
Ekstrak	5	5	5	-	-
Vitamin E	-	-	-	-	5
Asam stearate	8	12	16	16	16
Trietanolamin	2	3	4	4	4
Setil alcohol	2	2	2	2	2
Parafin liquidum	2	2	2	2	2
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Gliserin	10	10	10	10	10
Aquadest ad	100	100	100	100	100

Keterangan :

Formula I : Asam stearat 8% (8 gram) dan trietanolamin 2% (2 gram)

Formulasi II : Asam stearat 12% (12 gram) dan trietanolamin 3% (3 gram)

Formulasi III : Asam stearat 16% (16 gram) dan trietanolamin 4% (4 gram)

Formulasi IV (-) : Kontrol negatif tanpa zat aktif, Asam stearat 16% (16 gram) dan trietanolamin 4% (4 gram)

Formulasi V (+) : Kontrol positif dengan penambahan vitamin E, Asam stearat 16% (16 gram) dan trietanolamin 4% (4 gram)

8. Pembuatan sediaan krim ekstrak rambut jagung

Pembuatan sediaan krim antioksidan ekstrak rambut jagung dibuat dengan pemisahan dua fase antara fase minyak dan fase air. Fase minyak dibuat dengan melebur asam stearat, setil alkohol, propil paraben dan parafin liquidum pada suhu 50°C. pada wadah lain, membuat fase air dengan cara melarutkan metil paraben dan trietanolamin dalam aquadest dan dipanaskan hingga suhu 50°C. Ekstrak rambut jagung di masukkan dalam mortir hangat dan dilarutkan dengan gliserin, kemudian ditambahkan fase air sedikit demi sedikit lalu digerus sampai homogen. Kemudian krim dimasukkan kedalam wadah (Hasniar *et al* 2015).

9. Pengujian stabilitas fisik krim antioksidan ekstrak rambut jagung

Pengujian stabilitas fisik krim dilakukan terhadap sediaan krim yang baru dibuat dan yang telah disimpan selama 21 hari. Setiap hari pengujian dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali tiap formulanya.

9.1 Pengujian organoleptis. Pengujian organoleptis yang perlu diamati yaitu bentuk krim (konsistensinya), warna dan bau krim. Warna krim yang lebih baik yaitu yang berwarna menarik dan memiliki harum yang menyenangkan (Dewi *et al* 2014).

9.2 Pengujian homogenitas krim. Pengujian homogenitas krim dilakukan dengan cara krim diletakkan diantara 2 kaca objek kemudian diperhatikan ada atau tidaknya partikel kasar dalam sediaan krim, bila terdapat partikel kasar berarti sediaan krim belum homogen (Dewi *et al* 2014).

9.3 Pengujian tipe krim. Pengujian tipe krim dapat dilakukan dengan metode pengenceran dan metode pewarnaan. Metode pengenceran, krim diberi sedikit air dan diaduk, jika diperoleh krim yang homogen berarti tipe krim minyak dalam air tapi jika diperoleh sediaan krim yang tidak homogeny berarti tipe krim air dalam minyak. Metode pewarnaan, dengan cara krim dimasukkan dalam vial kemudian ditetesi dengan larutan metilen blue bila warna biru terdispersi keseluruhan emulsi berarti tipe krim minyak dalam air dan bila diamati dengan mikroskop fase dispersinya tidak berwarna sedangkan fase kontinyu berwarna biru (Pakki *et al* 2009).

9.4 Pengujian viskositas. Uji viskositas krim dilakukan dengan alat *viscotester* Rion VT-04. Rotor ditempatkan tepat ditengah-tengah sediaan yang berisi masa krim, alatnya kemudian dinyalakan. Viskositas krim dapat diketahui setelah jarum skala dari rotor viskotester stabil. Pengujian ini diulangi sebanyak tiga kali tiap formula (Sharon *et al* 2013).

9.5 Pengujian daya lekat. Pengujian daya lekat sediaan krim dilakukan dengan mengoleskan sediaan krim secukupnya diatas objek glass kemudian objek glass yang lain diletakkan diatas krim tersebut dan ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Kaca objek dipasang pada alat uji, lepaskan beban seberat 80 gram dan dicatat waktu yang diperlukan hingga kedua kaca objek terlepas (Shovyana & Zulkarnain 2013).

9.6 Pengujian daya sebar. Pengujian daya sebar dilakukan dengan menimbang 0,5 gram krim diletakkan diatas kaca transparan berskala, diatasnya diletakkan kaca yang lainnya dan dibiarkan selama 1 menit kemudian diameter penyebaran krim diukur, selanjutnya ditambahkan beban tambahan 50 gram, 100 gram, 150 gram dan 200 gram, didiamkan selama 1 menit lalu diukur diameter yang konstan. Daya sebar krim yang baik yaitu bila diperoleh diameter yang semakin lebar (Setyowati *et al* 2013).

9.7 Pengujian pH. Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter. pH meter dikalibrasi dengan larutan dapar standar netral (pH 7,01) dan larutan dapar pH asam (pH 4,01) sampai menunjukkan angka pH tersebut. Kemudian elektroda dicuci dengan air suling dan dikeringkan dengan tissue. Ditimbang 1 g sediaan krim dan dilarutkan dalam 10 ml air suling. Kemudian elektroda dicelupkan dalam larutan tersebut. Dibiarkan alat menunjukkan angka pH sampai konstan. Angka yang ditunjukkan pH meter merupakan pH sediaan. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali untuk masing-masing formula (Setyowati *et al* 2013).

9.8 Pengujian stabilitas krim dengan metode uji pemisahan fase dengan metode *freeze and thaw*. Pengujian stabilitas ini dilakukan dengan cara sediaan krim pada masing-masing formula ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan kedalam 5 vial yang tertutup rapat. Pengujian *freeze and thaw* dilakukan dengan penyimpanan pada suhu 4°C pada 48 jam pertama dan suhu 40°C pada 48 jam berikutnya. Pengujian dilakukan sebanyak 3 siklus kemudian dilakukan pengamatan terhadap stabilitas krim meliputi memisah atau tidaknya krim tersebut (Dewi *et al* 2014).

10. Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak kental rambut jagung dan sediaan krim ekstrak rambut jagung dengan DPPH yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum setelah waktu yang didapat dari *operating time*.

10.1 Pembuatan larutan stok DPPH. Ditimbang dengan seksama serbuk DPPH 15,8 mg kemudian dilarutkan dengan etanol (p.a) sampai tanda batas labu takar 100 mL, sehingga didapatkan konsentrasi 0,4 mM, yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol. Labu takar ditutup *aluminium foil* atau dihindarkan dari cahaya matahari.

10.2 Pembuatan larutan stok ekstrak rambut jagung. Ditimbang seksama 20 mg ekstrak rambut jagung kemudian dilarutkan dengan etanol (p.a) sampai tanda batas pada labu takar 100 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 200

ppm. Larutan ekstrak rambut jagung konsentrasi 200 ppm dibuat seri pengenceran 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 60 ppm.

10.3 Pembuatan larutan stok krim ekstrak rambut jagung. Ditimbang seksama 25 mg sediaan krim rambut jagung, kemudian dilarutkan dengan etanol (p.a) sampai tanda batas pada labu takar 25 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan krim rambut jagung konsentrasi 1000 ppm dibuat seri pengenceran 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm.

10.4 Pembuatan larutan stok krim kontrol. Ditimbang seksama 25 mg sediaan krim kontrol positif yang berisi vitamin e, kemudian dilarutkan dengan etanol (p.a) sampai tanda batas pada labu takar 25 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan krim rambut jagung konsentrasi 1000 ppm dibuat seri pengenceran 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm.

10.5 Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maksimum) DPPH. Larutan stok DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 3 mL ditambahkan etanol (p.a) 1,5 mL diamati absorbansinya pada panjang gelombang 500 – 530 nm sebagai blanko digunakan etanol (p.a). Panjang gelombang maksimum yakni panjang gelombang yang mempunyai nilai absorbansi paling tinggi.

10.6 Penentuan *operating time* (OT). Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 3 mL ditambahkan 1,5 mL larutan uji dengan konsentrasi tertentu. Penentuan *operating time* dilakukan pada panjang gelombang maksimum DPPH yang telah diperoleh sebelumnya. Interval waktu *operating time* yaitu dibaca mulai menit ke-0 sampai menit ke-30. *Operating time* yaitu didapat dari absorbansi yang stabil saat pembacaan menggunakan spektrofotometer pada menit tertentu (Arista 2013).

10.7 Uji aktivitas antioksidan. Larutan stok (ekstrak rambut jagung, krim kontrol negatif, krim ekstrak rambut jagung dan standar vitamin E)) yang telah dibuat 5 seri pengenceran masing-masing diambil sebanyak 1 mL dan dicampur dengan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dengan perbandingan 1:1 di dalam labu takar dan dikocok. Campuran diinkubasi selama *operating time* yang telah diperoleh dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH. Absorbansi yang telah diperoleh selanjutnya digunakan untuk mengukur aktivitas

penangkapan radikal bebas dari berbagai seri konsentrasi lainnya (Daud *et al* 2011).

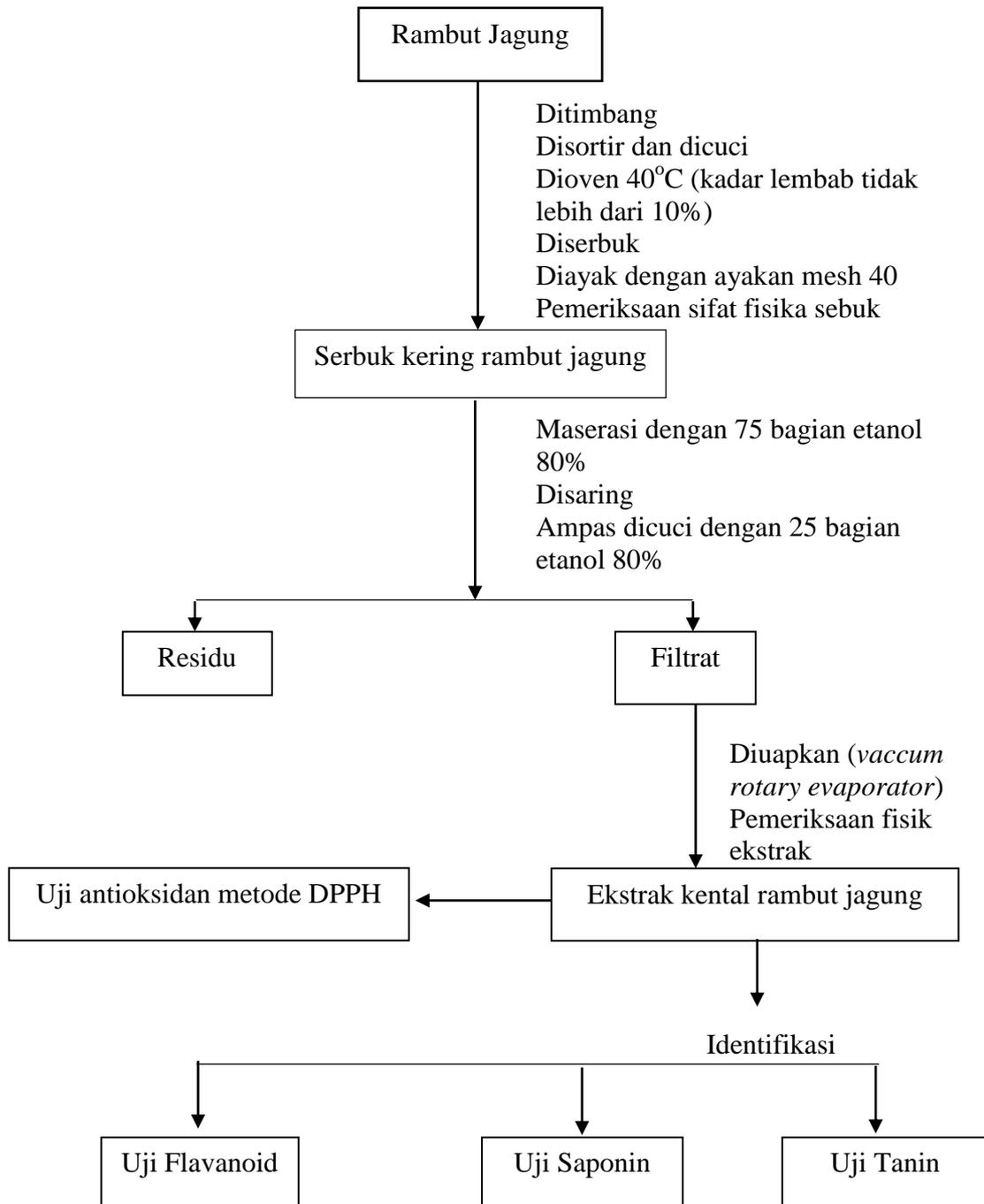
E. Analisis Hasil

Analisis hasil pengujian berbagai parameter berupa viskositas, daya lekat, daya sebar, pH, dan uji aktivitas antioksidan akan dianalisis dengan membandingkan hasil dengan bebrapa literature dan dengan pendekatan statistic menggunakan menggunakan program SPSS. Data hasil pengujian dianalisa dengan menggunakan Kolmogorov-Smirnov, bila terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan analisis *One Way Anova* pada taraf kepercayaan 95 % kemudian dilanjutkan dengan uji Post hoc pada setiap percobaan apabila ada perbedaan yang signifikan antara hari ke 1 dan hari ke 24 dilakukan uji one sampel t-test.

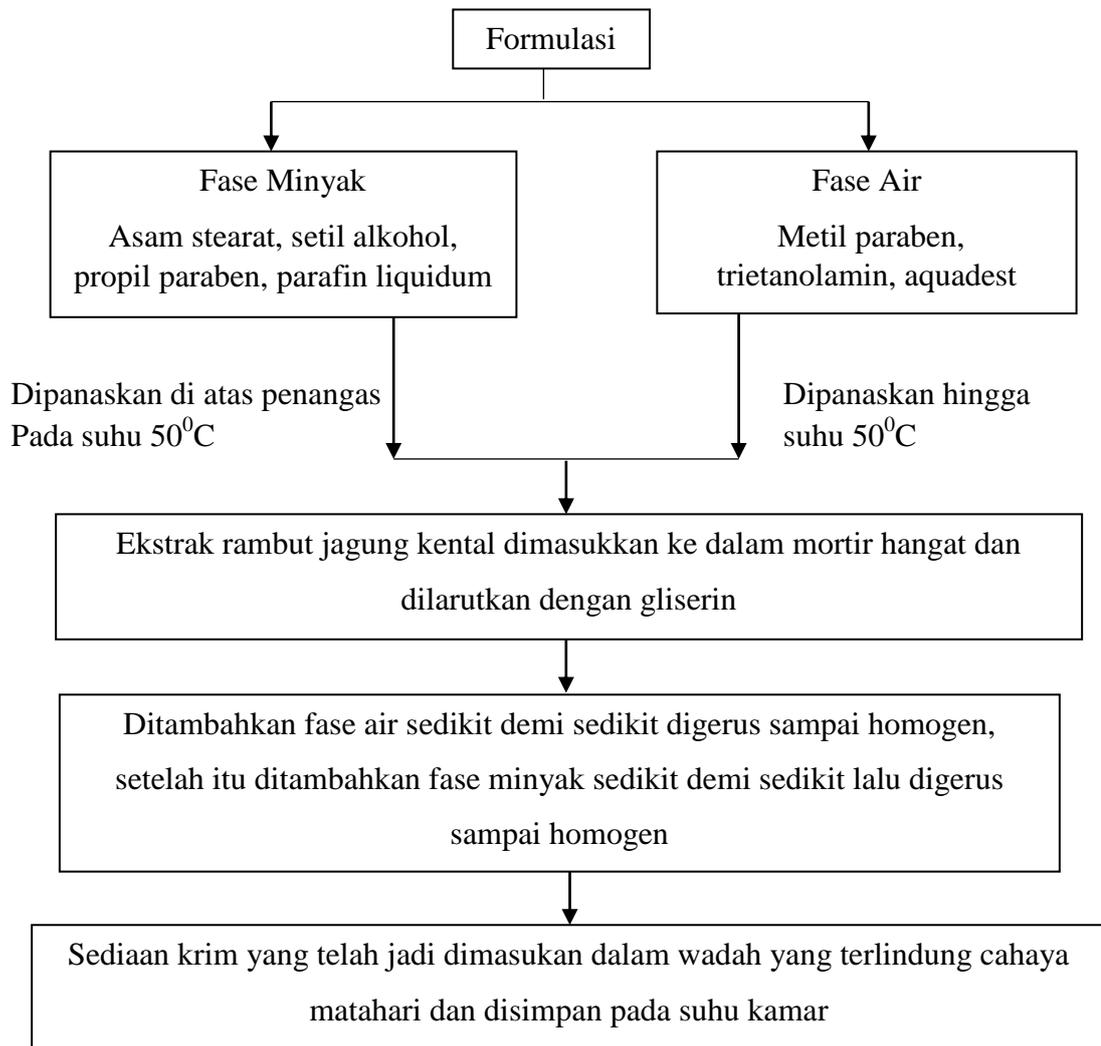
Aktivitas penangkapan radikal DPPH (%) ekstrak rambut jagung maupun krim ekstrak rambut jagung dapat dihitung dengan menggunakan rumus prosen peredaman. IC50 dihitung menggunakan persamaan regresi linier yang telah diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Rumus prosentase peredaman sebagai berikut :

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

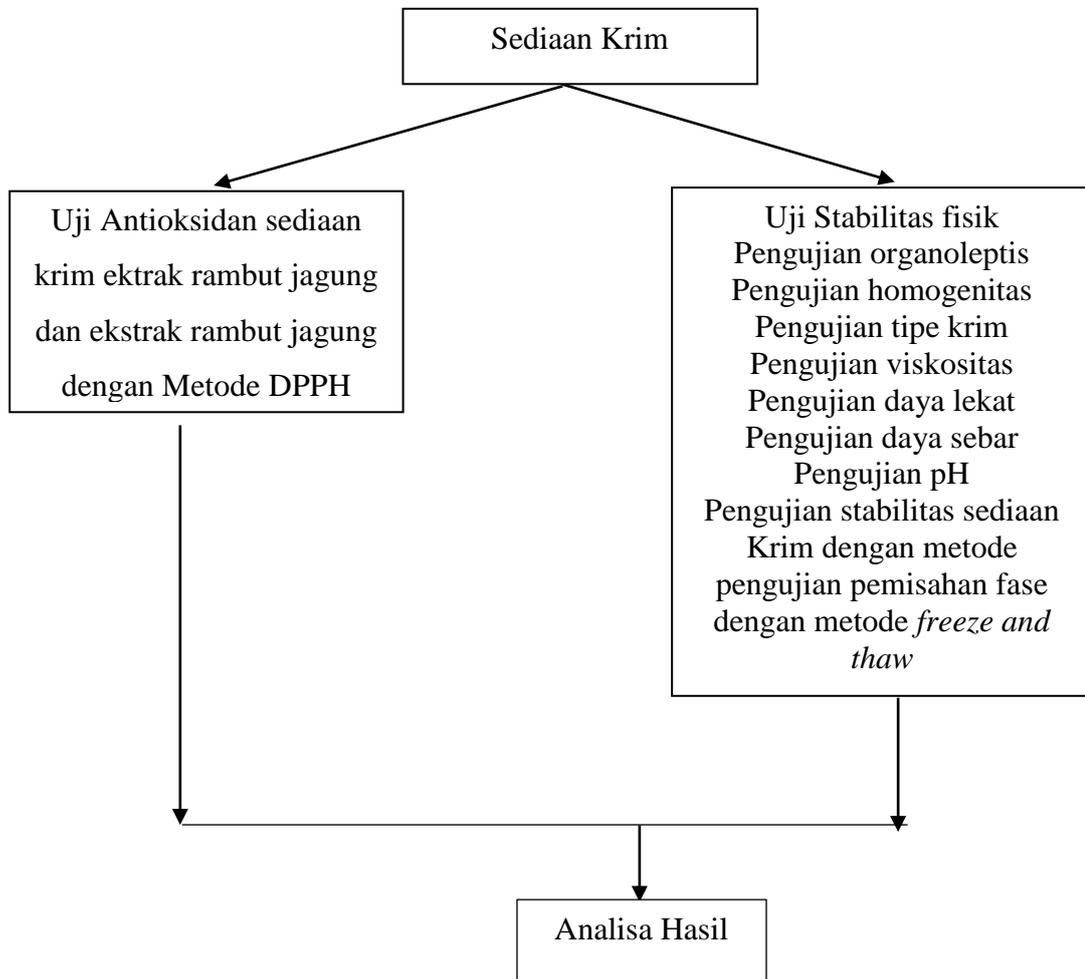
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 2. Skema Pembuatan Serbuk dan Ekstrak Kental Rambut Jagung



Gambar 3. Skema pembuatan sediaan krim ekstrak rambut jagung.



Gambar 4. Skema pengujian Stabilitas fisik dan aktivitas antioksidan