

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti (Notoatmodjo 2002). Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *lotion* antioksidan ekstrak etanol buah tomat.

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang dianggap mewakili seluruh populasi dalam penelitian (Notoatmodjo 2002). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *lotion* antioksidan ekstrak etanol buah tomat dengan variasi konsentrasi ekstrak 15%, 20%, 25%

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

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

Variabel utama dalam penelitian ini sediaan *lotion* dari ekstrak tomat yang dibuat formulasi dengan variasi konsentrasi ekstrak yang berbeda dengan basis gliserin, triethanolamine, setil alkohol paraffin cair, asam stearat, nipagin dan nipasol. Melalui pengujian stabilitas *lotion*.

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

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

Variabel bebas pada adalah variabel yang dirancang untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung dengan perubahan-perubahan yang dilakukan. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak tomat dalam sediaan *lotion*.

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat dikendalikan yang dapat mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali yang dimaksud dalam penelitian ini pembuatan *lotion*, kondisi penelitian, dan kondisi laboratorium penelitian.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan dalam penelitian ini. Variabel tergantung yang dimaksud dalam penelitian ini stabilitas dan aktivitas antioksidan dari *lotion* ekstrak etanol buah tomat.

### 3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, buah tomat (*Solanum lycopersicon* L) adalah buah yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Buah tomat dipilih buah yang segar yaitu yang berwarna merah cerah, utuh dan tidak busuk

Kedua, bubur buah tomat (*Solanum lycopersicon* L) adalah buah yang segar dan tidak busuk, dibersihkan dari tangkai, daun, biji dan kulit arinya setelah itu dicuci dengan air mengalir dengan tujuan menghilangkan kotoran yang masih menempel. Dipotong kecil-kecil kemudian diblender hingga halus seperti bubur atau jus.

Ketiga, ekstrak buah tomat (*Solanum lycopersicon* L) adalah hasil maserasi dari bubur buah tomat dengan larutan penyari etanol 70% selama 2 hari, kemudian disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak kental

Keempat, variasi konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam masing-masing formula yakni 15%, 20% dan 25%

Kelima, uji mutu fisik dan stabilitas sediaan *lotion* adalah pengujian organoleptis, homogenitas, daya sebar, daya lekat, viskositas, pH, dan *cycling test*

Keenam, uji aktivitas antioksidan *lotion* adalah aktivitas antioksidan dari ekstrak buah tomat (*Solanum lycopersicon* L) dengan metode DPPH dan standar vitamin C

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan

**1.1. Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah buah tomat (*Solanum lycopersicon* L) yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

**1.2. Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah asam stearat, setil alkohol, paraffin cair, gliserin, nipagin, nipasol,

triethanolamin, aquadestilata, etanol 70%, metanol p.a, DPPH, Zn/Mg, Iodium, FeCl<sub>3</sub>, *methylen blue*, sudan III, vitamin C.

## **2. Alat**

Alat-alat penelitian yang diinginkan adalah neraca analitik, spektrofotometer UV-Vis, batang pengaduk, mortir, stamfer, alat maserasi, Erlenmeyer, Beaker glass, gelas ukur, pipet volume, pipet tetes, tabung reaksi, *stop watch*, lempeng kaca, viskometer, wadah *lotion*, cawan porselen, sudip, vial, kain flanel, mikroskop, alat uji daya lekat, alat uji daya sebar, alat uji pH, object glass, dan alat-alat lain yang menunjang penelitian.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Pengumpulan bahan**

Buah tomat segar diperoleh dari Desa Tengklik, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa tengah. Buah tomat dipilih adalah buah segar tidak busuk.

### **2. Determinasi tanaman**

Determinasi dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang diperiksa dalam penelitian ini sesuai dengan tanaman yang dimaksud untuk menghindari kesalahan pada pemilihan bahan tanaman tersebut.

Tahap pertama pada penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tentang buah tomat yang akan digunakan, yakni dilakukan dengan kepustakaan, determinasi ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

### **3. Pembuatan simplisia buah tomat**

Buah tomat utuh yang masih segar  $\pm$  4 kg dicuci dengan air mengalir, dibersihkan dari tangkai, daun, biji. Kemudian dicuci lagi dengan air mengalir. Kemudian daging buah tomat dipotong kecil-kecil dan diblender hingga halus hingga menjadi seperti jus atau bubur tomat.

### **4. Pembuatan ekstrak etanol buah tomat**

Pembuatan ekstrak buah tomat dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 1.500 gram bubur atau jus buah tomat dimaserasi dengan pelarut etanol 70%

dengan perbandingan 1 : 10, dimasukkan kedalam botol kaca gelap ditambah 15.000 mL (10 bagian) pelarut. Rendam selama 6 jam sambil sesekali diaduk, kemudian ditutup dan disimpan dalam ruangan yang terhindar dari cahaya matahari selama 18 jam, maserat disaring dengan kain flanel. Proses penyarian diulang dengan menggunakan ampas pada penyarian pertama dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah pelarut pada penyarian pertama (7500 mL). Maserat dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40° C hingga didapat ekstrak kental (Kemenkes RI 2013). Persen rendemen diperoleh dengan menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk buah tomat dan dikalikan 100%.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

## 5. Pemeriksaan organoleptis

Pemeriksaan organoleptis ekstrak buah tomat dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau dari ekstrak buah tomat.

## 6. Identifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak etanol buah tomat dengan metode warna.

**6.1 Identifikasi flavonoid.** Ditimbang 0,5 gram ekstrak buah tomat, di larutkan dengan 10 ml air panas dididihkan selama 5 menit. Larutan ekstrak disaring, filtrat digunakan sebagai larutan percobaan. Diambil larutan percobaan sebanyak 5 ml, ditambahkan serbuk Zink/Mg sebanyak ditambah 0,5 gram dan ditambahkan 1 ml HCl pekat. Ditambahkan Amyl alkohol sebanyak 2 ml, dikocok kuat, kemudian didiamkan hingga memisah. Hasil positif flavonoid apabila terbentuk warna merah/kuning/ jingga pada lapisan amyl alkohol (Sarker 2006).

**6.2 Identifikasi senyawa fenol.** Ditimbang 0,5 gram ekstrak buah tomat dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambah 10 mL aquadest panas kemudian disaring selagi panas. Filtrat yang diperoleh sebagai larutan sampel, kemudian dimasukkan 5 mL larutan sampel dalam tabung reaksi, dan ditambah beberapa tetes pereaksi FeCl<sub>3</sub> 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, biru merah, ungu, atau hitam pekat yang menunjukkan adanya kandungan fenolik (Harborne 1987).

**6.3 Identifikasi vitamin C.** Ditimbang 0,1 gram ekstrak etanol 70% buah tomat, ditambah 10 mL aquadest panas kemudian disaring selagi panas. Filtrat yang diperoleh sebagai larutan sampel dan ditetaskan sedikit demi sedikit pada larutan iodium. Reaksi positif warna iodium akan pudar apabila ditetesi larutan yang mengandung vitamin C (Mawarni 2018).

## 7. Identifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak etanol buah tomat dengan metode KLT

**7.1 Identifikasi flavonoid.** Identifikasi flavonoid pada ekstrak buah tomat secara KLT yaitu ekstrak ditotolkan pada lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> kemudian dielusi menggunakan N-butanol : asam stearat : air (4:1:5). Perbandingan yang digunakan yaitu quersetin, lempeng KLT yang sudah selesai dielusi kemudian dideteksi dengan menggunakan pereaksi semprot sitroborat. Hasil positif menunjukkan warna kuning atau orange pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Depkes RI 1995)

## 8. Rancangan formulasi lotion dari ekstrak etanol buah tomat

Formulasi *lotion* dibuat 3 variasi perbandingan konsentrasi ekstrak tomat yaitu: 15% , 20% dan 25% Rancangan formula *lotion* tomat dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Rancangan formula lotion ekstrak tomat**

Bahan	F I (%)	F II (%)	F III (%)	F IV (%)	F V (%)
Ekstrak buah tomat	-	-	15	20	25
Vitamin C	-	1	-	-	-
Asam stearat	2	2	2	2	2
Paraffin cair	3	3	3	3	3
Gliserin	10	10	10	10	10
Setil alkohol	3	3	3	3	3
Triethanolamin	2	2	2	2	2
Nipagin	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Nipasol	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Keterangan :

FI = kontrol negatif tanpa zat aktif

FII = kontrol positif dengan penambahan 1% vitamin C

FIII = variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% buah tomat 15%

FIV = variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% buah tomat 20%

FV = variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% buah tomat 25%

## 9. Pembuatan lotion ekstrak etanol buah tomat

Pembuatan formula ini bahan yang digunakan ditimbang, bahan-bahan dibagi menjadi dua bagian, yaitu fase minyak dan fase air. Bahan-bahan yang termasuk dalam fase minyak yaitu asam stearat, setil alkohol, nipasol, dan paraffin cair dimasukkan dalam cawan penguap dan dipanaskan diatas penangas air. Bahan-bahan yang termasuk fase air yaitu nipagin, triethanolamin, gliserin, dan aquadest dimasukkan ke cawan yang berbeda dan dipanaskan diatas penangas air pada suhu 70-75°C. Fase minyak ditambahkan pada fase air masukkan dalam mortir panas sambil diaduk sampai terbentuk massa yang kental. Proses pencampuran kedua sediaan yang berbeda tersebut dicampur sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai diperoleh basis *lotion* yang dingin pada suhu 40° – 45°C, Kemudian ditambah sedikit demi sedikit zat aktif (ekstrak buah tomat/ Vitamin C), diaduk sampai homogen dan terbentuk *lotion*. (Ginaris 2016).

## 10. Pengujian fisik lotion dari ekstrak tomat

**10.1 Uji organoleptis.** Uji organoleptis *lotion* meliputi uji warna, bau, dan konsistensi untuk mengetahui secara fisik keadaan *lotion*. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mendeskripsikan warna, bau, dan konsentrasi dari sediaan *lotion* yang sudah mecampur dengan basis, sediaan yang dihasilkan biasanya memiliki warna yang menarik bau yang menyenangkan dan kekentalan yang cukup agar nyaman dalam penggunaan (Voigt 1994).

**10.2 Uji homogenitas.** Uji homogenitas merupakan pengamatan visual. *Lotion* terlihat tidak merata bila terdapat bagian yang jernih dan bagian lain yang keruh, maka *lotion* tersebut dikategorikan tidak homogen. *Lotion* dikatakan homogen apabila seluruh permukaannya merata (Anonim 1979).

**10.3 Uji viskositas.** Uji viskositas atau kekentalan dilakukan dengan mengambil formula kemudian diukur menggunakan viscometer VT-04. *Lotion* dimasukkan ke dalam cup kemudian porttable *viscometer* dipasang, dicatat. Viskositas *lotion* diketahui dengan mengamati gerakan jarum penunjuk viskositas. Pengujian dilakukan setelah pembuatan *lotion* dan terakhir pada hari ke-21 setelah pembuatan untuk melihat pergeseran viskositas sebagai parameter stabilitas *lotion* selama penyimpanan (Voigt 1994).

**10.4 Uji daya sebar.** *Lotion* ditimbang sebanyak 500 mg, diletakkan ditengah kaca bundar dan ditutup dengan kaca penutup yang sudah ditimbang dan dibiarkan 1 menit. Diameter *lotion* yang menyebar (dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi) diukur kemudian ditambahkan 50 g, 100 g, 150 g, 200 g, 250 g sebagai beban tambahan, setiap penambahan beban didiamkan selama 1 menit setelah diameter *lotion* yang menyebar dicatat seperti yang sebelumnya. Pengujian dilakukan setelah *lotion* dibuat dan selama penyimpanan 21 hari (Voigt 1994).

**10.5 Uji daya lekat.** Uji daya lekat dilakukan dengan melekatkan *lotion* diatas gelas obyek kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit kemudian pasang obyek gelas pada alat tes setelah itu lepaskan beban seberat 80 g dan dicatat waktunya hingga kedua obyek tersebut terlepas, pengujian ini dilakukan setelah satu hari sediaan *lotion* dibuat dan selama penyimpanan 21 hari (Karina 2014).

**10.6 Uji tipe emulsi.** Penentuan emulsi dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu metode pengenceran dan metode pewarnaan.

**10.6.1. Metode pengenceran.** Memasukkan *lotion* ke dalam tabung reaksi kemudian diencerkan dengan air, jika *lotion* dapat diencerkan maka mempunyai tipe M.A (Anief 2000).

**10.6.2. Metode pewarnaan.** Dapat dilakukan dengan menggunakan metode warna. Sebanyak 1 tetes sediaan *lotion* ditempatkan di atas gelas obyek, ditambah 1 tetes larutan Sudan III, dicampur merata, amati di bawah mikroskop, jika terjadi warna merah homogen pada fase luar, maka tipe emulsi adalah air dalam minyak (A/M). Sebanyak 1 tetes sediaan *lotion* ditempatkan berbeda di atas gelas obyek, ditambah 1 tetes larutan metilen biru, dicampur merata, diamati di bawah mikroskop, jika terjadi warna biru homogen pada fase luar, maka tipe emulsi adalah minyak dalam air (M/A) (Lachman 2008).

**10.7 pH *lotion*.** Uji ini diawali dengan kalibrasi alat pH meter menggunakan larutan dapar pH 4 dan pH 7. Sebanyak 500 mg sediaan *lotion* dilarutkan dalam 9 mL aquadestilata. Kemudian dicelupkan pada pH meter dan

catat nilai pH pada pH meter. Analisis dilakukan satu hari setelah *lotion* dibuat dan haru ke- 21 (Trilestari 2002).

**10.8 Uji stabilitas *lotion* dengan metode *Cycling test*.** Uji stabilitas dilakukan dengan metode *cycling test*. Sampel *lotion* disimpan pada suhu 4 °C selama 24 jam, lalu dipindahkan ke dalam oven dengan suhu 40 °C selama 24 jam selama 12 hari (6 siklus). Pengamatan dilakukan pada hari ke-0, siklus ke-1 hingga ke-6. Kondisi fisik *lotion* dibandingkan selama percobaan dengan sediaan sebelumnya (Banker 1997).

## **11. Pengujian Aktivitas Antioksidan**

Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak tomat, sediaan *lotion* ekstrak tomat, kontrol positif vitamin C serta *lotion* vitamin C dengan DPPH yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum setelah waktu yang didapat dari *operating time*.

**11.1. Uji pendahuluan.** Dalam 3 buah tabung reaksi, masing-masing ditambahkan dengan larutan DPPH, larutan vitamin C 1 mg/mL, larutan ekstrak etanol buah tomat 5mg/mL, larutan *lotion* F1, F2, F3, F4 dan F5 5mg/mL sebanyak 1,0 mL kemudian ditambah dengan methanol p.a sebanyak 3 mL. Larutan tersebut kemudian divortex selama 30 detik dan didiamkan selama 30 menit. Setelah 30 menit, warna larutan diamati. Replikasi sebanyak 3 kali.

**11.2. Pembuatan larutan stok DPPH.** Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 15,8 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas pada labu takar 100,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM, yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol. labu takar dilapisi *aluminium foil* atau dihindarkan dari cahaya matahari. Pembuatan larutan DPPH harus dibuat baru dan secukupnya karena DPPH tidak stabil saat sudah menjadi larutan (Susiloningsih 2016).

**11.3 Pembuatan larutan stok ekstrak tomat.** Ekstrak ditimbang sebanyak 20 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas pada labu takar 100,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 200 ppm. Larutan

ekstrak buah tomat konsentrasi 200 ppm dibuat 5 seri pengenceran yaitu 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm.

**11.4 Pembuatan larutan stok *lotion* ekstrak.** Sediaan *lotion* ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan dalam metanol p.a sampai tanda batas pada labu takar 100,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan *lotion* konsentrasi 1000 ppm dibuat seri pengencerannya, yaitu 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm.

**11.5 Pembuatan larutan stok *lotion* vitamin C.** Sediaan *lotion* vitamin C ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan dalam metanol p.a sampai tanda batas pada labu takar 100,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan *lotion* konsentrasi 1000 ppm dibuat seri pengencerannya, yaitu 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm.

**11.6 Pembuatan larutan stok vitamin C.** Vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg, dimasukkan dalam labu takar 100,0 mL dan ditambah metanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm, selanjutnya disebut sebagai larutan induk. Larutan vitamin C konsentrasi 100 ppm dibuat seri pengencerannya, yaitu 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm dan 3,125 ppm.

**11.7 Penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda$  maksimum).** Larutan stok DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 1,0 mL dan dimasukkan dalam labu takar 5,0 mL, lalu tambahkan metanol p.a sebanyak 4,0 mL lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450-550 nm. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang di mana larutan sampel memiliki serapan yang maksimum.

**11.8 Penentuan operating time (OT).** Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1,0 mL dimasukkan ke dalam labu takar 5,0 ml, lalu tambahkan metanol p.a sebanyak 4,0 mL. Penentuan operating time dilakukan pada  $\lambda$  maksimal DPPH yang telah diperoleh sebelumnya. Dengan interval waktu dari menit ke 0 sampai diperoleh absorbansi yang stabil dan tidak terlihat adanya penurunan absorbansi (Windono *et al.* 2004).

**11.9 Uji aktivitas antioksidan.** Larutan stok (ekstrak buah tomat, *lotion* ekstrak buah tomat, standar vitamin C, *lotion* vitamin C) yang telah dibuat 5 seri

pengenceran masing-masing diambil 1,0 mL, kemudian ditambahkan dengan 1,0 mL larutan DPPH mM. Campuran diinkubasi selama operating time yang diperoleh sebelumnya kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum. Absorbansi blangko yang diperoleh dengan mengukur absorbansi campuran 1,0 ml larutan DPPH 0,4 mM dan 4,0 ml metanol p.a pada panjang gelombang maksimum DPPH.

**11.10 Penentuan IC<sub>50</sub>.** Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan melalui perhitungan *Inhibitory Concentration* (IC<sub>50</sub>). IC<sub>50</sub> adalah konsentrasi yang memberikan % aktivitas antiradikal sebesar 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier antar kadar terhadap % penangkapan radikal. Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

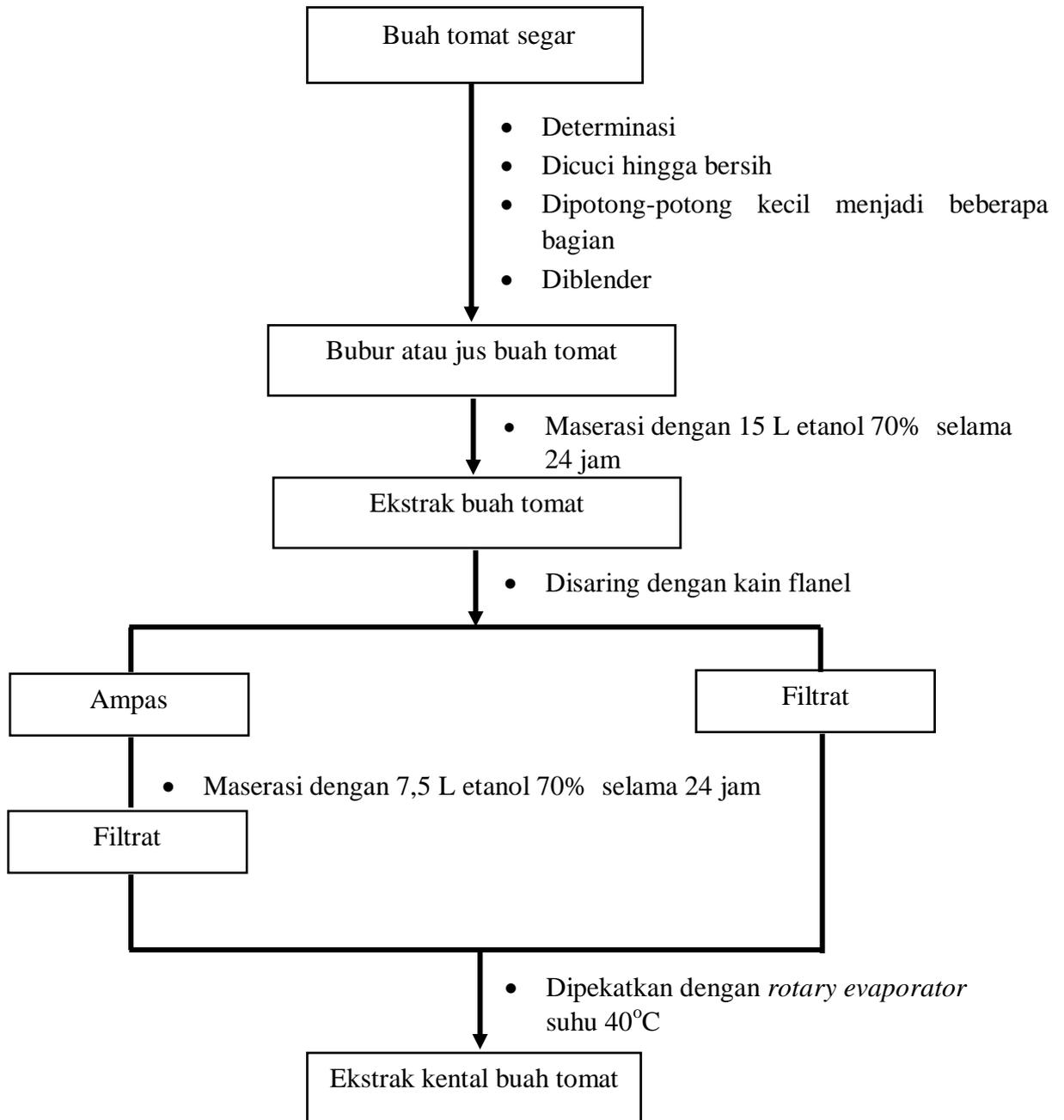
Keterangan :

Absorbansi blangko : Absorbansi pada DPPH tanpa sampel

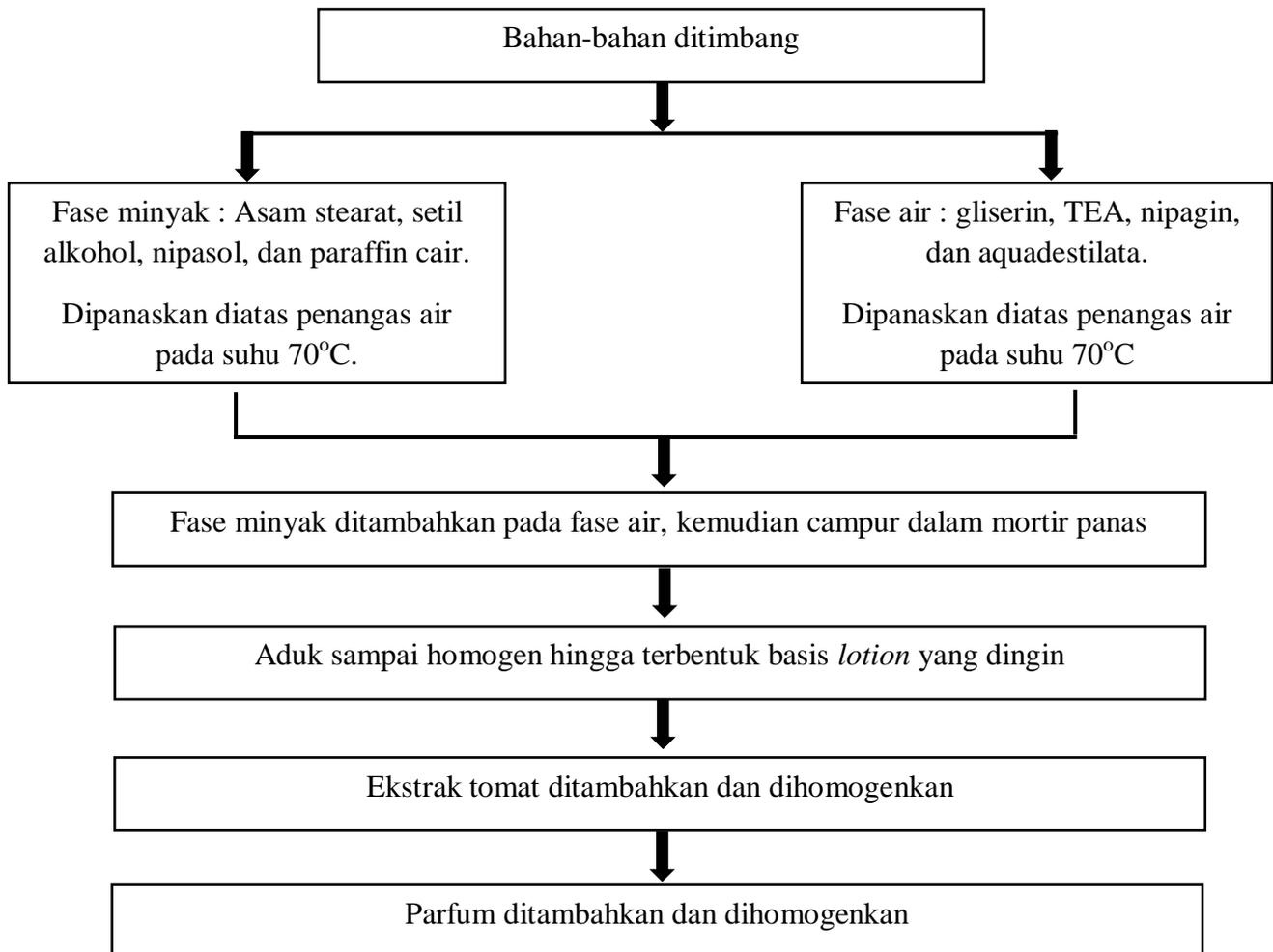
Absorbansi sampel : Absorbansi pada DPPH setelah ditambah sampel.

## E. Analisis Data

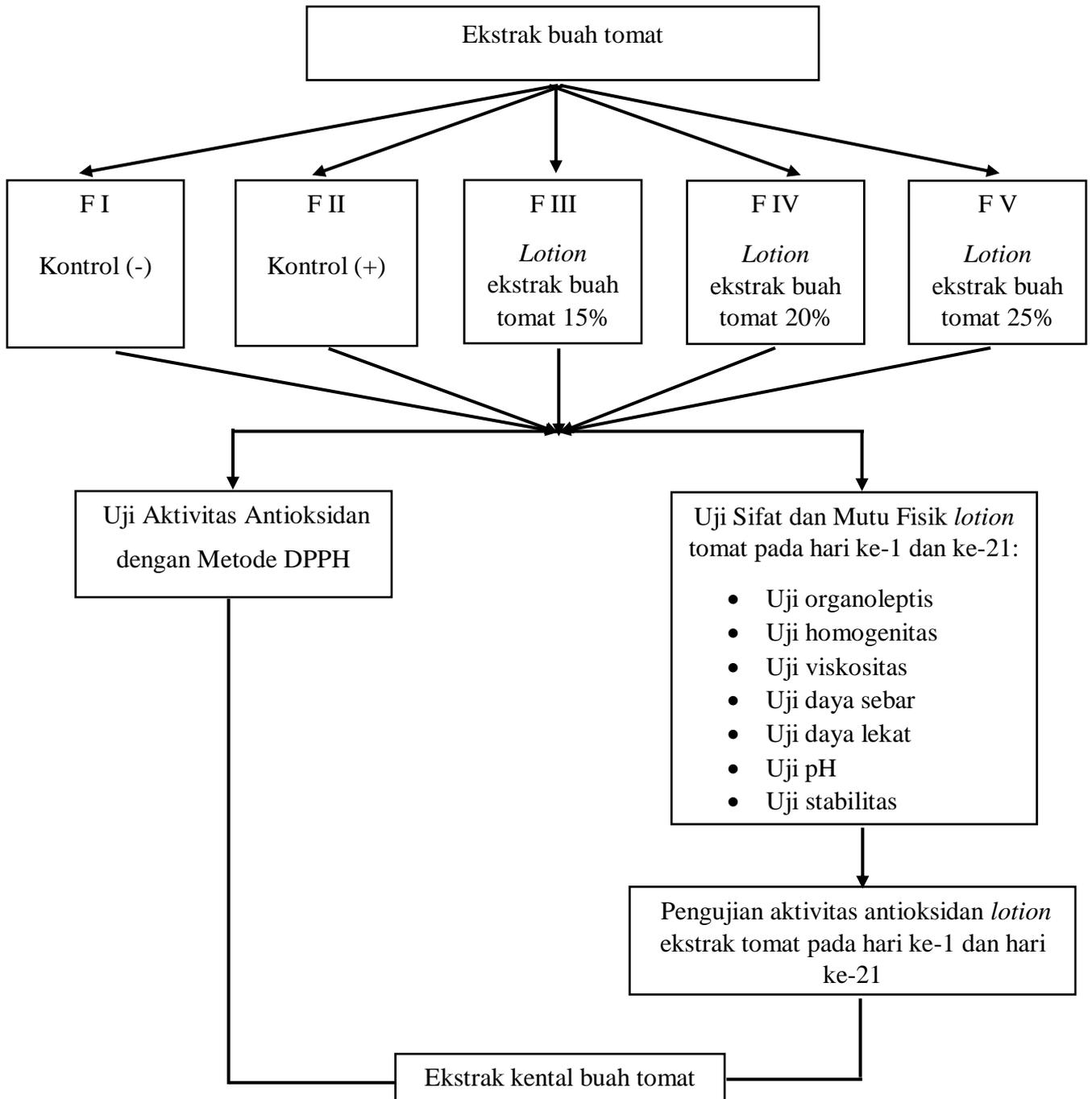
*Lotion* dari masing-masing formula yang didapat kemudian diuji sifat fisik dan mutunya meliputi keadaan, pH, viskositas, daya sebar, dan daya lekat. Analisis hasil pengujian berbagai parameter dilakukan dengan pendekatan statistik yaitu menggunakan program SPSS. Data uji yang diperoleh dianalisis menggunakan *Kolmogorov-Smirnov*, jika data tersebut termasuk ke dalam distribusi normal maka dilanjutkan dengan uji ANOVA dua jalan dengan kepercayaan 95%. Data uji yang terdistribusi tidak normal, dianalisis menggunakan analisis *Kruskal-Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* (Susiloningsih 2016).



Gambar 11. Skema pembuatan ekstrak buah tomat



Gambar 12. Skema pembuatan *lotion* ekstrak tomat



Gambar 13. Skema pengujian mutu fisik dan aktivitas antioksidan *lotion* ekstrak etanol buah tomat