

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah jumlah dari keseluruhan objek yang diteliti. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) yang diambil B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan obat Tradisional) Tawangmangu. Sampel adalah sebagian dari populasi yang akan diteliti dan dianggap bisa mewakili keseluruhan dari populasi. Daun bayam merah dapat diambil dari tanaman yang masih bagus dan tidak rusak, kemudian akan diformulasikan menjadi sediaan krim dengan berbagai variasi konsentrasi ekstrak.

B. Variasi Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah konsentrasi basis tween 80 dan span 80 dalam formula krim antioksidan bayam merah.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan sediaan krim antioksidan ekstrak bayam merah.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel kendali. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) dalam formulais sediaan krim antioksidan.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah proses pembuatan krim, kondisi laboratorium beserta peralatan yang digunakan, radikal bebas DPPH, kondisi peneliti dalam penelitian.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam suatu penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah stabilitas fisik sediaan krim (tipe krim, pH krim, organoleptis, viskositas, daya lekat, daya sebar, homogenitas, *freeze and thaw*), aktivitas antioksidan dari krim antioksidan ekstrak bayam merah (*Amaranthus tricolor* L).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun bayam merah yang digunakan adalah daun yang masih muda dari B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan obat Tradisional) Tawangmangu. Dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel dalam daun, lalu keringkan dalam oven 45⁰C selama 2-3 hari, kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan mesh no.40.

Kedua, ekstrak bayam merah adalah hasil dari proses maserasi antara serbuk daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) dengan pelarut etanol 70%.

Ketiga, sediaan krim antioksidan ekstrak bayam merah adalah sediaan krim yang telah diformulasikan dengan variabel konsentrasi ekstrakbayam merah (*Amaranthus tricolor* L) yang ada atau tidaknya perbedaan stabilitas fisik pada masing-masing formula krim antioksidan.

Keempat, stabilitas fisik krim adalah sifat-sifat dari krim antioksidan ekstrak bayam merah yang akan diuji meliputi keadaan organoleptis, pH, homogenitas, tipe krim, viskositas, daya sebar, dan daya lekat krim.

Kelima, aktivitas antioksidan adalah efek yang ditimbulkan dari krim antioksidan ekstrak bayam merah yang ditunjukkan pada nilai IC₅₀.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bayam merah yang masih segar tidak terlalu tua, *cety alkohol*, paraffin cair, asam stearat, stearil alkohol, lanolin anhidrat, propilenglikol, tween 80, span 80, oleum rosae, aquadest, DPPH (*1-1 difenil-2-2pikrolhidrazil*) dan etanol 70%, methanol for analisis.

2. Alat

Alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah oven, ayakan mesh 40, blender, mortir, stamper, spektrometer UV-Vis, rotary evaporator, chamber, kertas saring, vacuum pump, penangas air, cawan uap, labu ukur, gelas kimia, pipet ukur, erlenmeyer, batang pengaduk, cawan petri, cawan porselin, neraca analitik, autoklaf, viskometer, tabung reaksi, seperangkat uji daya sebar, seperangkat alat uji daya lekat, sendok tanduk, kuvet, moisture balance, objek glass dan pH stik.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman pada tahap ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) dengan cara mencocokkan ciri dan morfologi tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi untuk menghindari kesalahan dari tanaman yang digunakan untuk penelitian.

2. Pembuatan serbuk

Daun bayam merah segar sebanyak 13kg disortasi, dicuci dengan menggunakan air mengalir bertujuan untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel pada daun, setelah itu dikeringkan dalam oven dengan suhu 45⁰C selama 2-3 hari. Simplisia yang telah kering diserbuk dengan blender kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40 sampai serbuk terayak habis.

3. Pemeriksaan sifat fisik serbuk

4.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis meliputi pemeriksaan bentuk, warna, bau dan rasa dari serbuk daun bayam merah.

4.2 Penetapan susut pengeringan serbuk. Pemeriksaan kadar lembab serbuk daun bayam merah menggunakan *moisture balance*. Prosedur pemeriksaan dilakukan dengan cara menimbang 2 gram serbuk daun bayam merah, kemudian dimasukkan ke dalam alat *moisture balance* pada suhu 105⁰C. Nilai kadar lembab muncul pada alat dalam satuan persen.

4.3 Penetapan susut pengeringan ekstrak. Pemeriksaan kadar lembab ekstrak daun bayam merah menggunakan *moisture balance*. Prosedur pemeriksaan dilakukan dengan cara menimbang 2 gram ekstrak daun bayam

merah, kemudian dimasukkan ke dalam alat *moisture balance* pada suhu 105°C. Nilai kadar lembab muncul pada alat dalam satuan persen

4. Pembuatan ekstrak daun bayam merah

Sebanyak 500 gram serbuk dimaserasi dengan penyari etanol 70% sebanyak 3750 ml di dalam botol kaca gelap. Kemudian didiamkan selama 5 hari. Gojog setiap 8 jam sekali. Hasil maserasi disaring dengan kain flannel steril. Botol dibilas dengan etanol 70% sebanyak 1250 ml untuk mencuci ekstrak yang terdapat dalam botol. Lakukan pemisahan ampas dengan filtrat. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary vaccum evaporator* pada suhu 50° C hingga diperoleh ekstrak kental (Dirjen POM 2008).

5. Pemeriksaan fisik ekstrak daun bayam merah

5.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan meliputi bentuk, warna, bau dan rasa.

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun bayam merah

6.1 Penyiapan sampel. Sebanyak 1 gram ekstrak daun bayam merah ditambah 100mL air, dididihkan selama 15 menit lalu disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh sebagai larutan sampel.

6.2 Pemeriksaan alkaloid. Dimasukan ke dalam tabung reaksi 5ml larutan sampel, ditambahkan HCl 2%. Membagikan larutan menjadi 3 sama banyak, dalam tabung reaksi I untuk pembanding, ditambahkan pada tabung reaksi II 2-4 tetes reagen Dragendorf adanya alkaloid di tunjukan dengan kekeruhan atau endapan coklat, ditambahkan tabung reaksi III 2-4 tetes reagen Mayer, adanya alkaloid ditunjukan dengan adanya endapan putih kekuningan (DepKes 1977)

6.3 Pemeriksaan flavonoid. Dimasukkan sebanyak 5ml larutan sampel ke dalam tabung reaksi ditambahkan 0,1 gr logam Mg dan larutan HCl 2N. Dipanaskan kedua campuran ini selama 5-10 menit, setelah dingin lalu disaring, kedalam filtrat ditambahkan amil alkohol dan dikocok kuat-kuat, warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alcohol menunjukkan adanya flavonoid (Robinson 1995)

6.4 Pemeriksaan saponin. Dimasukkan sepuluh tetes larutan sampel ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil postif bila terbentuk buih selama tidak kurang 10 menit setinggi 1-10 cm, buih tidak hilang jika ditambahkan asam klorida.

7. Formulasi krim antioksidan ekstrak daun bayam merah

Tabel 1. Rancangan Formula Sediaan Krim Antioksidan Ekstrak Daun Bayam Merah dengan tiga konsentrasi Ekstrak Bayam Merah (Indrawaty Claudhy, 2016)

Bahan	F1 (gram)	F2 (gram)	F3 (gram)	F4 (gram)	F5 (gram)
Ekstrak daun bayam merah	1	1,25	1,5	-	-
Vitamin E	-	-	-	0,01	-
Asam stearat	2	2	2	2	2
Setil alkohol	3	3	3	3	3
Stearil alkohol	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Lanolin anhidrat	2	2	2	2	2
Tween 80	4,626	4,626	4,626	4,626	4,626
Span 80	0,374	0,374	0,374	0,374	0,374
Propilen glikol	10	10	10	10	10
Aquadest ad	50	50	50	50	50

8. Pembuatan krim antioksidan ekstrak daun bayam merah

Pembuatan krim antioksidan ekstrak daun bayam merah dimulai dengan dileburkan masing-masing fase secara terpisah pada suhu 70⁰C di atas waterbath. Fase minyak dibuat dengan melebur lanolin anhidrat, setil alkohol, asam stearat, steril alkohol dan span 80. Fase air dibuat dengan dilarutkan tween 80 dalam air yang telah dipanaskan hingga 70⁰C, kemudian ditambah propilen glikol. Krim dibuat dengan dicampurkan fase minyak ke dalam fase air ke dalam mortir hangat kemudian diaduk sampai terbentuk basi krim. dimasukkan ekstrak kental daun bayam merah ke dalam mortir lalu ditambahkan basis krim sedikit demi sedikit dan diaduk sampai homogen. Ditambahkan minyak mawar aduk homogen. Krim yang dihasilkan dikemas dalam wadah yang terlindung dari cahaya dan disimpan di tempat gelap selama 21 hari.

9. Pengujian stabilitas fisik krim antioksidan ekstrak daun bayam merah

9.1 Uji homogenitas krim. Uji homogenitas krim dilakukan dengan cara melihat keseragaman warnah dalam basis yang sudah dicampur dengan visual. Jika warna krim merata maka diasumsikan krim tersebut homogen. Cara lain untuk menguji homogenitas adalah dengan mengoleskan 0,1 gram sediaan krim

pada objek gelas. Jika tidak ada butiran kasar maka krim dinyatakan homogen. Pengujian homogenitas ini diulang sebanyak tiga kali tiap formulanya. Pengujian pertama dilakukan di hari pertama krim dibuat, dan di ujikan kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al*, 2013).

9.2 Uji organoleptis krim. Pemeriksaan organoleptis meliputi pemeriksaan konsistensi, warna dan bau dari sediaan krim ekstrak daun bayam merah untuk mengetahui kondisi fisik dari krim. Sediaan yang dihasilkan sebaiknya memiliki warna yang menarik, bau yang menyenangkan serta kekentalan yang cukup supaya menimbulkan kenyamanan saat digunakan. Pengujian pertama dilakukan di hari pertama krim dibuat, dan diuji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al*, 2013)

9.3 Uji viskositas. Uji viskositas krim dilakukan dengan menggunakan alat *viscometer Cup and Bob*. Bagian cup diisi dengan masa krim yang akan diuji viskositasnya, kemudian alat dinyalakan. Viskositas krim dapat diketahui setelah jarum skala pada viskometer stabil. Pengujian viskositas ini diulang sebanyak tiga kali tiap formulanya. Uji dilakukan pada hari pertama krim dibuat kemudian diuji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al* 2013).

9.4 Uji daya sebar krim. Uji daya sebar krim dilakukan dengan menggunakan alat *extensometer*. Pengujian diawali dengan menimbang 0,5 gram krim yang akan diuji kemudian letakan dibagian tengah alat. Kaca penutup ditimbang terlebih dahulu kemudian diletakan di atas krim dan dibiarkan 1 menit. Diameter krim yang menyebar (panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi) diukur lalu ditambahkan beban tambahan sebesar 50 gram, 100 gram, 150 gram dan 200 gram. Setiap penambahan beban didiamkan selama 1 menit dan dilakukan pengujian diameter krim yang menyebar seperti sebelumnya. Pengujian daya sebar krim diulangi sebanyak tiga kali tiap formulanya. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan untuk tiap formula pada hari pertama lalu pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al* 2013).

9.5 Uji daya lekat krim. Uji daya lekat krim dilakukan dengan dioleskan 0,25 gram krim di atas objek gelas yang kemudian ditutup dengan objek gelas lain. Kedua objek gelas ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit, kemudian

dipasang pada alat uji. Beban seberat 80 gram dilepaskan dari alat tersebut dan dicatat waktu pelepasan kedua objek glass yang melekat. Pengujian daya lekat diulang sebanyak tiga kali tiap formulanya. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan untuk tiap formula pada hari pertama lalu pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al* 2013).

9.6 Uji tipe krim. Terdapat dua metode pengujian tipe krim yaitu dengan metode pewarnaan dan pengenceran. Metode pengenceran dilakukan dengan cara krim yang akan diuji dimasukkan ke dalam vial, kemudian diencerkan dengan air. Jika krim dapat diencerkan maka tipe krim adalah M/A. Metode pewarnaan dilakukan dengan cara memasukkan krim ke dalam vial kemudian ditetaskan dengan beberapa test larutan *methylen blue*. Jika warna biru segera terdispersi homogen keseluruhan bagian kiri, maka tipe krim adalah M/A. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan untuk tiap formula pada hari pertama lalu pada ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al* 2013).

9.7 Uji pH krim. Pengukuran pH dilakukan dengan cara mencelupkan pH stik ke dalam sediaan krim dari ekstrak daun bayam merah. Pengukuran pH krim diulang sebanyak tiga kali tiap formulanya. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan untuk tiap formula pada hari pertama lalu pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al* 2013).

9.8 Uji freeze and thaw. Pengujian stabilitas ini dilakukan dengan cara sediaan krim pada masing-masing krim formula ditimbang sebanyak 15 gram. Pengujian *freeze and thaw* dilakukan dengan penyimpanan pada suhu 4⁰C pada 48 jam berikutnya. kemudian dilanjutkan dengan menyimpan sediaan di dalam oven (suhu 40⁰ C) pada waktu yang sama. Kemudian diamati keterpisahan fasenya. Pengujian dilakukan sebanyak 2 siklus kemudian dilakukan pengamatan terhadap stabilitas krim meliputi memisah atau tidaknya krim tersebut (Hamsinah *et al*, 2016).

10. Pengujian aktivitas antioksidan krim ekstrak daun bayam merah

10.1 Pembuatan larutan stok DPPH 0,4mM. Serbuk DPPH ditimbang dengan seksama sebanyak 15,8 mg dan dilarutkan dengan metanol sampai tanda

batas labu takar 100,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM. Konsentrasi 0,4 Mm dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol.

10.2 Pembuatan larutan stok ekstrak daun bayam merah. Ekstrak kental ditimbang dengan seksama sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan metanol pro analisa sampai tanda batas labu takar 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi 50 ppm. Larutan ekstrak kental konsentrasi 50 ppm kemudian dibuat 5 seri pengenceran 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm.

10.3 Pembuatan larutan stok krim ekstrak daun bayam merah. Ditimbang 100 mg sediaan krim kemudian dilarutkan dengan metanaol pro analisa sampai tanda batas labu takar 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan gel konsentrasi 1000 ppm dibuat seri pengenceran yakni 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm.

10.4 Pembuatan larutan stok vitamin E. Vitamin E ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas labu takar 100,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 20 ppm. Larutan vitamin E kosentrasi 2 ppm kemudian dibuat 5 seri pengenceran 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 5 ppm, dan 8 ppm.

10.5 Pembuatan larutan stok krim vitamin E. Krim vitamin E ditimbang 0,1 gram kemudian dilarutkan dengan metanol sampai batas labu takar 100,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan krim vitamin E konsentrasi 1000 ppm dibuat 5 seri pengenceran 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500 ppm.

10.6 Penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan stok DPPH 0,4 Mm diambil sebanyak 1 ml disukkan ke dalam labu takar 5,0 ml kemudian di tambah larutan uji sampai tanda batas. Campuran dikocok sampai homogen, diinkubasi pada *operating time* dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450-530nm. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang dimana larutan sampel memiliki absorbansi yang maksimum (Molyneux, 2003).

10.7 Penentuan *operating time* (OT). Larutan stok DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 1 ml dimasukkan dalam labu takar 5,0 ml kemudian menambahkan larutan uji sampai tanda batas. Penentuan *operating time* dilakukan

pada panjang gelombang maksimum DPPH yang telah diperoleh sebelumnya. Interval waktu penentuan *operating time* yaitu dari menit ke-0 sampai didapat absorbansi yang stabil, dan tidak terlihat adanya penurunan absorbansi.

10.8 Uji aktivitas penangkapan radikal bebas. Larutan stok yang telah dibuat 5 seri pengenceran masing-masing diambil 4 ml, kemudian ditambahkan 5 ml larutan DPPH 1 mM, volume dicukupkan sampai 25,0ml. Campuran diinkubasi sebelum *operating time* yang diperoleh sebelumnya dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH (Sharon *et al*, 2013).

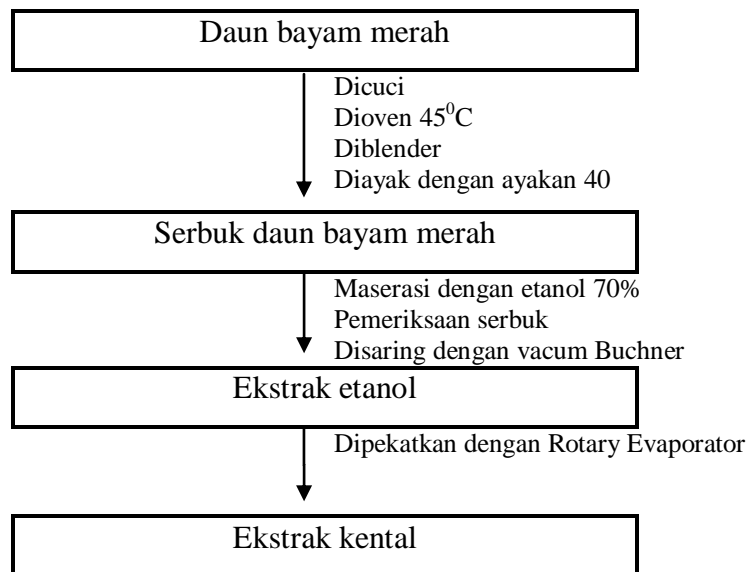
E. Analisis Hasil

Data penelitian yang didapat berupa organoleptis, homogenitas, viskositas, pemeriksaan pH, daya lekat, daya sebar, tipe krim. Data hasil penelitian tersebut dianalisis dengan menggunakan *One Sample Kolmogorov Smirnov* dan *One Way Anova* dengan program SPSS.

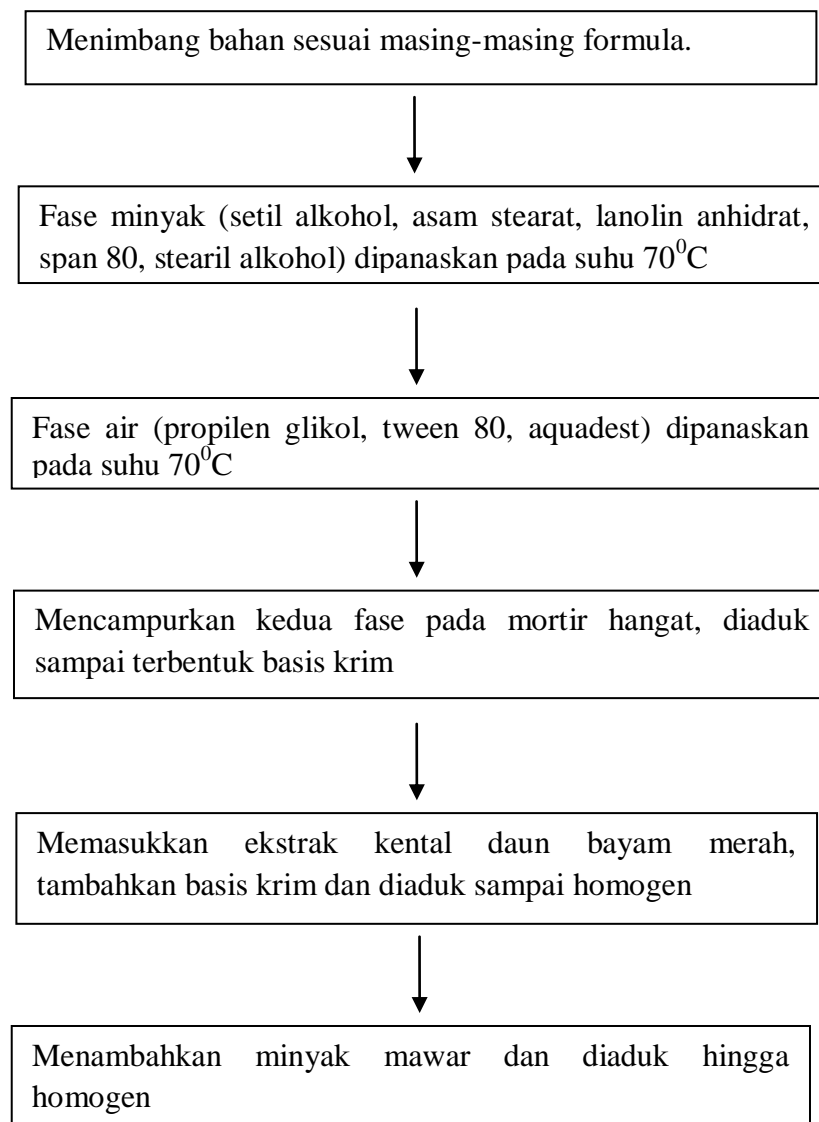
Data aktivitas antioksidan radikal DPPH (%) ekstrak daun maupun krim ekstrak daun bayam merah dihitung dengan metode probit dari persamaan regresi linear dan ditentukan IC_{50} -nya. Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

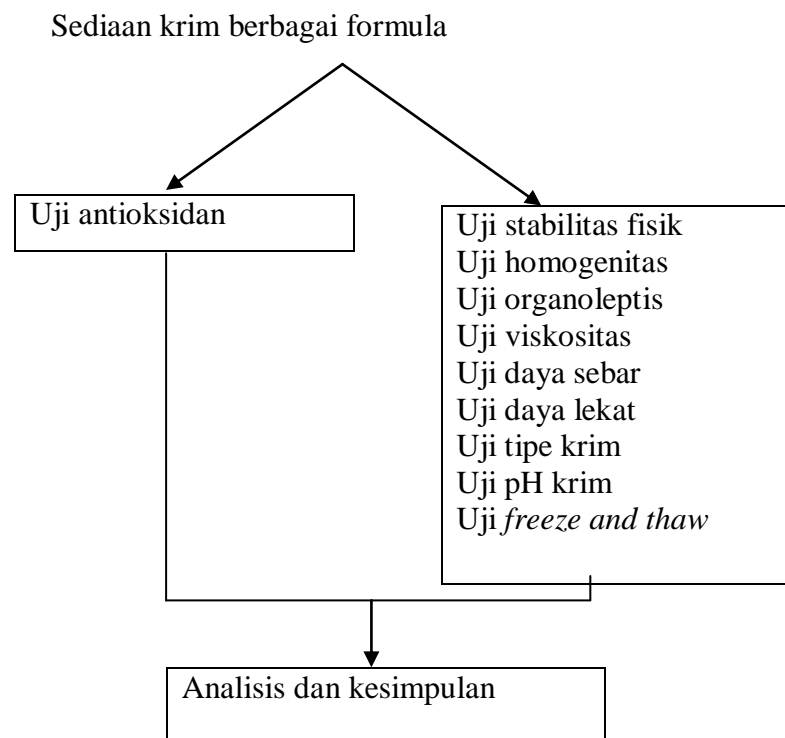
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 4. Pembuatan serbuk dan ekstrak daun bayam merah



Gambar 5. Pembuatan sediaan krim ekstrak daun bayam merah.



Gambar 6. Pengujian stabilitas fisik dan aktivitas antioksidan