

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah kesemuanya dari kumpulan subjek yang memiliki beberapa karakteristik umum. Dalam penelitian ini populasinya adalah krim ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.).

Penelitian ini sampel yang digunakan adalah krim ekstrak daun kelor dengan variasi konsentrasi emulgator asam stearat dan TEA dengan perbandingan konsentrasi 2:14, 2:16, 3:18, dan 4:20.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang tersusun atas variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

Pertama, daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang dibuat sediaan krim.

Kedua, sediaan krim ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) dengan perbandingan variasi konsentrasi emulgator asam stearat dan TEA.

Ketiga, aktivitas *anti aging* dari ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) dengan metode spektrofotometri UV-VIS.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama merupakan variabel yang dapat dikelompokkan menjadi berbagai jenis variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas merupakan variabel utama yang variabelnya diubah-ubah untuk melihat pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi emulgator asam stearat dan TEA dalam formulasi krim *anti aging* ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.).

Variabel tergantung merupakan variabel yang faktornya diamati dan diukur untuk menentukan pengaruh yang diakibatkan oleh variabel bebas. Penelitian ini variabel tergantungnya adalah stabilitas mutu fisik sediaan dan aktivitas *anti aging* krim ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.).

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dapat mempengaruhi variabel terikat. Dalam penelitian ini variabel terkontrolnya adalah pembuatan krim.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kelor (*Moringa oleifera* L.) adalah daun kelor yang masih segar dan berwarna hijau yang diperoleh dari daerah Meger, Klaten, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun kelor (*Moringa oleifera* L.) adalah serbuk dari daun kelor yang sudah dibersihkan, dicuci bersih dan dikeringkan sampai kering, lalu digiling dengan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan nomor 60 (Fathurachman, 2014).

Ketiga, ekstrak daun kelor adalah ekstrak yang diperoleh dari bagian daun kelor yang diekstraksi dengan cara dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Selanjutnya disaring dan hasil maserasi diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental (Kemenkes, 2017).

Keempat, krim ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) adalah formulasi krim yang dibuat dengan variasi emulgator asam stearat dan TEA dengan ada tidaknya perbedaan stabilitas fisik sediaan krim ekstrak daun kelor dalam masing-masing formula.

Kelima, uji mutu fisik krim merupakan pengujian terhadap sediaan krim yang akan menentukan sediaan yang terbaik dari suatu formula krim yang meliputi organoleptis, homogenitas, viskositas, daya lekat, daya sebar, *pH*, dan stabilitas sediaan dengan metode *cyling test*.

Keenam, uji aktivitas *anti aging* adalah pengujian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang diformulasikan dalam sediaan krim dengan menggunakan metode penghambat tirosinase yang dinyatakan dalam persen.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik (Ohaus), oven, labu ukur (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), Beaker glass (Pyrex), *rotary evaporator*, *moisture balance* (Ohaus), viskometer (*Brookfield*), *pH* meter (Eutech), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-2900), mortir, stamper, pipet tetes, batang pengaduk, sendok tanduk, cawan porselin dan alat-alat lain yang menunjang penelitian ini.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun kelor (*Moringa oleifera* L.), etanol 70% (Bratachem), asam stearat (Bratachem), vaselin album (Bratachem), propilen glikol (Bratachem), aquadest (Bratachem), cera alba (Bratachem), TEA (Bratachem), nipagin (Bratachem), nipasol (Bratachem), NaOH (Merck), kalium fosfat monobasa (Merck), DMSO (Merck), L-DOPA (Mepofram), tirosin (Sigmaaldirch), HCL (Bratachem), serbuk Mg (Merck), dan asam askorbat (Sigmaaldirch).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman merupakan kegiatan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian sesuai dengan tanaman yang dimaksud sehingga menghindari kesalahan pemilihan bahan tanaman serta untuk mengetahui jenis dan kedudukan tanaman tersebut dalam sistem klasifikasi tanaman.

Tahap awal dalam penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman daun kelor dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman daun kelor terhadap pustaka yang dilakukan di B2P2TOOT Tawamangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan bahan

Sampel yang digunakan adalah daun kelor yang segar dengan warna masih hijau yang diperoleh dari daerah Klaten, Ceper, Jawa Tengah pada September 2022.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Daun kelor yang telah dicuci kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari langsung, selanjutnya untuk mendapatkan daun kelor dalam bentuk serbuk daun kelor yang telah kering digiling dengan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan nomor 60 (Fathurachman, 2014).

4. Identifikasi serbuk daun kelor

4.1. Organoleptis serbuk. Serbuk daun kelor diidentifikasi secara organoleptis dengan melihat bentuk, warna, bau, dan rasa (Santoso *et al.*, 2020).

4.2. Penetapan susut pengeringan serbuk. Penetapan susut pengeringan serbuk daun kelor dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* suhu 105°C, dengan cara serbuk daun kelor ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian dimasukkan ke dalam *moisture*

balance. Nilai susut pengeringan muncul dalam satuan persen (Depkes RI, 2000).

5. Pembuatan ekstrak daun kelor

Daun kelor diekstraksi dengan cara dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Daun kelor yang dicampur dengan pelarut direndam selama 6 jam sambil sesekali diaduk, kemudian rendam selama 18 jam. Selanjutnya disaring menggunakan flannel. Sisa endapan serbuk diremaserasi menggunakan setengah pelarut awal dan disaring sehingga menghasilkan maserat. Hasil maserat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental (Kemenkes, 2017).

6. Identifikasi ekstrak daun kelor

6.1. Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan mengamati meliputi warna, bau, dan bentuk ekstrak (Agoes, 2012).

6.2. Identifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak daun kelor

6.2.1 Pembuatan larutan uji. Pembuatan larutan uji untuk identifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak dilakukan dengan cara melarutkan 500 mg ekstrak dengan aquadest 50 mL. Larutan selanjutnya disaring menggunakan kertas saring (Dewi *et al.*, 2014).

6.2.2 Identifikasi flavonoid. Uji flavonoid dilakukan dengan cara larutan ekstrak daun kelor diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan dengan serbuk magnesium secukupnya dan ditetesi sebanyak 4 tetes amil alkohol. Positif flavonoid apabila terbentuk warna kemerahan, kuning, atau jingga (Harborne, 1987).

6.2.3 Identifikasi saponin. Sebanyak 5 mL ekstrak daun kelor dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian dikocok selama 5 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil setelah didiamkan selama 10 menit setelah penambahan 1 tetes HCl 2 N (Harborne, 1987).

6.2.4 Identifikasi tanin. Sebanyak 1 mL ekstrak daun kelor ditambahkan dengan 5 tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam (Harborne, 1987).

6.2.5 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 2 mL ekstrak daun kelor ditambahkan 10 mL kloroform dan 3 tetes amoniak. Fraksi kloroform yang diperoleh kemudian dipisahkan dan diasamkan dengan 2 mL H₂SO₄ pekat untuk memperjelas pemisahan. Bagian fase atas yang

terbentuk diambil lalu diletakkan pada 3 tabung dan masing-masing tabung ditambahkan pereaksi Meyer, Dragendorf, dan Wagner. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih untuk pereaksi Mayer, endapan merah untuk pereaksi Dragendorf, dan endapan coklat untuk pereaksi Wagner (Harborne, 1987).

7. Rancangan formulasi krim dari ekstrak daun kelor

Formulasi krim dibuat dengan tiga variasi perbandingan antara asam stearat dengan TEA. Rancangan formula krim ekstrak daun kelor dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Rancangan formula krim ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.)

Bahan	Konsentrasi bahan (%)					
	Satuan	I	II	III	K (-)	K (+)
Ekstrak daun kelor	%	3	3	3	3	Krim komersial
Cera alba	%	2	2	2	2	
Vaselin album	%	8	8	8	8	
Propilen glikol	%	8	8	8	8	
TEA	%	2	2	3	4	
Asam stearat	%	14	16	18	20	
Nipagin	%	0,1	0,1	0,1	0,1	
Nipasol	%	0,02	0,02	0,02	0,02	
Aquadest (ad)	mL	50	50	50	50	

Keterangan :

Formula 1 : TEA dan asam stearat 2:14

Formula 2 : TEA dan asam stearat 2:16

Formula 3 : TEA dan asam stearat 3:18

Formula 4 : TEA dan asam stearat 4:20

K (-) : Kontrol negatif tanpa diberi zat aktif

K (+) : Kontrol positif menggunakan produk krim *anti aging* yang ada di pasaran

8. Pembuatan krim ekstrak daun kelor

Pembuatan krim dilakukan dengan cara antara fase minyak dipisahkan dengan fase air. Fase minyak dibuat dengan cara vaselin album, cera alba, asam stearat, dan nipasol diletakkan pada cawan porselin dan dilebur di atas penangas air. Fase air dibuat dengan cara trietanolamin, propilen glikol dan nipagin dilarutkan dalam aquadest di atas penangas air. Fase air dicampur dengan fase minyak, lalu aduk, ditambah ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang telah dilarutkan dengan aquades hangat, selanjutnya diaduk hingga homogen dan dingin (Santoso *et al.*, 2020).

9. Pengujian sifat fisik krim ekstrak daun kelor

9.1. Uji organoleptis. Uji organoleptis krim dilakukan dengan melihat bentuk, warna, bau, dan rasa dari sediaan krim untuk menilai sifat fisik sediaan krim (Agoes, 2012).

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

9.3. Pengujian viskositas. Uji viskositas krim dilakukan dengan cara meletakkan sediaan ke dalam beaker glass lalu pasang spindel ke alat viskometer. Spindel harus bisa terendam sediaan uji. Viskometer yang digunakan adalah viskometer *Brookfield* dengan spindle no. 7 menggunakan kecepatan 50 rpm (Tahir *et al.*, 2017)

9.4. Uji daya lekat. Uji daya lekat dilakukan dengan cara 0,5 g krim diletakkan pada satu sisi kaca obyek dengan sisi di bawahnya yang telah dipasangkan tali yang mengikat beban. Kemudian ditempelkan kaca objek yang lain selama 1 menit, selanjutnya diletakkan beban dengan berat 100 g selama 5 menit. Beban yang digunakan 50 g, kemudian ditarik tuas alatnya dan diamati waktu yang dibutuhkan beban tersebut untuk memisahkan kedua kaca tersebut (Agoes, 2012). Daya lekat dikatakan baik jika daya lekat yang dihasilkan tidak kurang dari 4 detik, semakin lama krim melekat pada kulit maka efek yang ditimbulkan juga semakin besar (Wasiatmadja, 1997).

9.5. Uji daya sebar. Uji daya sebar dilakukan dengan cara krim sebanyak 0,5 g diletakkan di atas kaca arloji, kemudian diberi beban dengan kaca arloji yang sama selama 60 detik, lalu diberi masing-masing beban berturut-turut seberat 50 g, 100 g, 150 g, dan 200 g dan dibiarkan selama 60 detik. Daya sebar krim dihitung dengan cara diukur jumlah dari titik pusat ketepi kanan dan kiri (Agoes, 2012). Sediaan krim yang nyaman digunakan memiliki daya sebar 5-7 cm (Wasiatmadja, 1997).

9.6. Uji pH. Uji pH dilakukan dengan pH meter dengan cara melarutkan 1 g krim dengan 100 mL aquadest. Nilai pH krim harus sesuai dengan pH kulit manusia yaitu 4,5- 6,5 sehingga aman untuk digunakan (Tranggono dan Latifah, 2007).

9.7. Cycling test. Uji stabilitas dengan metode *cycling test* ini dilakukan dengan cara sediaan disimpan pada suhu dingin $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, setelah itu ditempatkan pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (1 siklus). Percobaan ini diulang sebanyak 6 siklus lalu dilakukan pengamatan organoleptis dan evaluasi meliputi memisah atau tidaknya krim tersebut (Pambudi, 2013).

10. Uji aktivitas *anti aging*

10.1. Pembuatan larutan dapar fosfat pH 6,5 50 mM. Untuk menyiapkan 200 mL, 50 mL kalium fosfat monobasa 0,2 M dicampurkan dengan 12,60 mL natrium hidroksida 0,2 N, dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas 200 mL. Nilai pH diatur hingga 6,5 dengan menggunakan pH meter (Kemenkes RI, 2020).

10.2. Pembuatan larutan substrat L-DOPA 20 mM. Sebanyak 39,4 mg serbuk L-DOPA ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, selanjutnya dilarutkan menggunakan dapar fosfat sampai tanda batas. Larutan LDOPA disimpan dan dihindarkan dari cahaya (Apriliani, 2018).

10.3. Pembuatan larutan enzim tirosinase. Ditimbang seksama tirosin sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,5 dalam labu ukur sampai 10,0 mL. Larutan diletakan pada wadah yang berisi es agar suhu enzim tetap stabil pada suhudingin saat pengerjaan (Apriliani, 2018).

10.4. Pembuatan larutan stok krim ekstrak daun kelor 1000 ppm. Sampel krim sebanyak 1 g diekstraksi dengan 10 mL DMSO 10%, kemudian disentrifugasi untuk memisahkan filtrat dengan basis krim. Filtrat ditampung untuk diuji aktivitasnya dan diencerkan sesuai dengan konsentrasi masing-masing 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm (Al Amin *et al.*, 2018).

10.5. Pembuatan larutan stok asam askorbat 500 ppm sebagai pembanding. Serbuk asam askorbat ditimbang sejumlah 5 mg dan dilarutkan dalam 100 mL dapar fosfat pH 6,5. Kemudian larutan asam askorbat dibuat seri pengenceran sama dengan konsentrasi sampel yaitu 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm (Batubara *et al.*, 2010).

10.6. Pengukuran panjang gelombang maksimum. Untuk menentukan panjang gelombang maksimum, 2,7 mL larutan dapar fosfat pH 6,5 dan 0,8 mL larutan L-DOPA dipipet ke dalam tabung reaksi. Inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan enzim tirosinase ke dalam tabung reaksi tersebut. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 450-500 nm (Arung *et al.*, 2006).

10.7. Pengukuran *operating time*. Larutan dapar fosfat pH 6,5 sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam vial, ditambahkan sebanyak 0,1

mL enzim tirosinase lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat L-DOPA, kemudian dihomogenkan. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit dan serapannya diukur pada panjang gelombang 485 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Abidin *et al.*, 2019).

10.8. Pengujian aktivitas *anti aging*. Pengujian dilakukan pada sediaan krim ekstrak daun kelor, kontrol negatif, dan kontrol positif dengan metode pengujian penghambat tirosin yang diukur dengan spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 485 nm. Disiapkan larutan L-DOPA, dapar fosfat pH 6.5, larutan tirosinase, larutan sampel dan 4 tabung reaksi (Arung *et al.*, 2006).

Tabung A (kontrol) diisi 80 µL dapar fosfat, 40 µL L-DOPA dan 40 µL larutan enzim tirosinase, tabung B (blanko kontrol) diisi 80 µL dapar fosfat dan 40 µL L-DOPA, tabung C (sampel) diisi 40 µL larutan sampel, 80 µL dapar fosfat, 40 µL L-DOPA dan 40 µL larutan enzim tirosinase, dan tabung D (blanko sampel) diisi 80 µL dapar fosfat, 40 µL L-DOPA dan 40 µL larutan sampel (Fatmawati *et al.*, 2020).

Bahan-bahan tersebut dicampurkan pada tabung yang sesuai kemudian diinkubasi pada suhu kamar (27-30°C) selama waktu yang diperoleh dari *operating time* yaitu antara 34-37 menit, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 485nm. Aktivitas *anti aging* ditentukan dengan menghitung pembentukan penghambatan tirosinase dengan rumus (Arung *et al.*, 2006):

$$\% \text{ inhibisi tirosin} = \frac{A-B}{A} 100\%$$

Keterangan:

A = Absorbansi larutan tanpa sampel (kontrol - blanko kontrol)

B = Absorbansi larutan dengan penambahan sampel (sampel – blanko sampel)

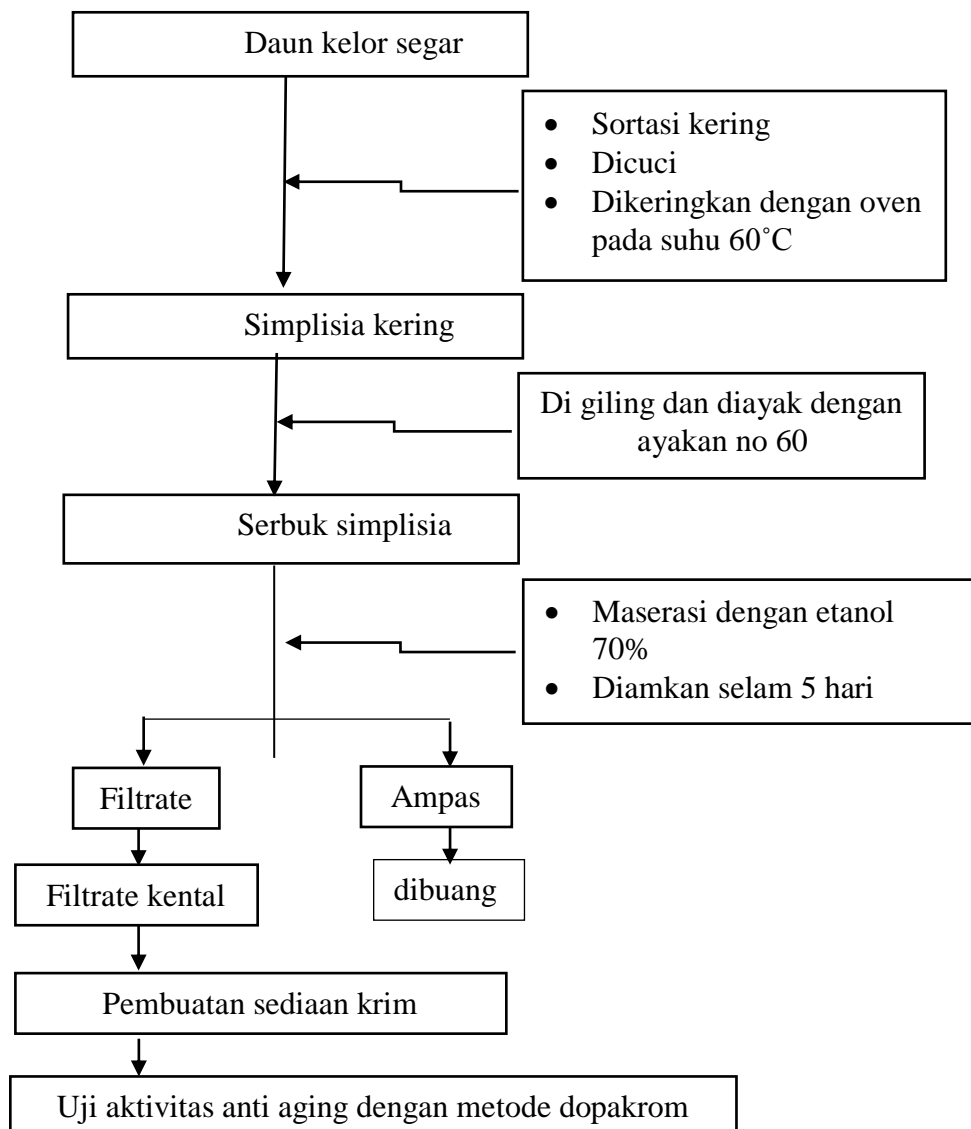
E. Analisis data

Ketiga formula krim diuji mutu fisiknya, meliputi organoleptis, homogenitas, viskositas, daya lekat, daya sebar, dan menentukan tipe krim. Hasil uji aktivitas *anti aging* krim ekstrak daun kelor dilakukan uji statistik menggunakan metode ANOVA satu arah dengan kepercayaan 95%, dan dengan uji Duncam untuk mengetahui formulasi manakah yang paling baik menggunakan SPSS. Penentuan

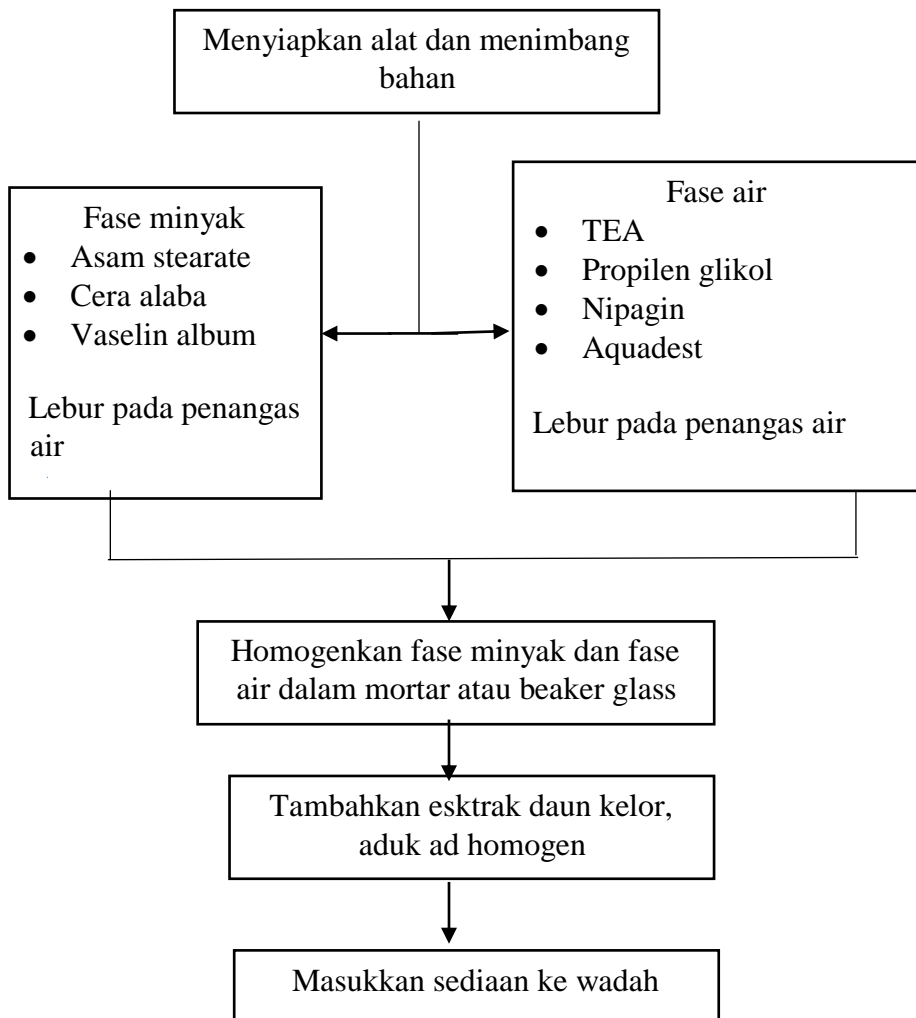
aktivitas *anti aging* dilakukan menggunakan metode pengujian penghambat tirosin dengan menghitung persentase inhibisi tirosin dan dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} dihitung dari kurva regresi linear antara konsentrasi (ppm) sebagai sumbu x dan % inhibisi tirosin sebagai sumbu Y. Berikut rumus inhibisi tirosin (Arung *et al.*, 2006) :

$$\% \text{ inhibisi tirosin} = \frac{A-B}{A} 100 \%$$

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 3. Skema Pembuatan Ekstrak Daun Kelor



Gambar 4. Skema Pembuatan Krim Ekstrak Daun Kelor