

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah krim antioksidan kunyit putih.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah krim antioksidan ekstrak kunyit putih dengan variasi kombinasi emulgator Tween 80 dan Span 80.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah krim antioksidan kunyit putih yang diformulasikan dengan variasi konsentrasi emulgator dan akan dilakukan pengujian krim dengan berbagai parameter pengujian.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi kombinasi emulgator yang ditambahkan dalam formulasi krim antioksidan kunyit putih.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kestabilan fisik sediaan krim dan aktivitas antioksidan kunyit putih.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah metode pengeringan simplisia, metode penyerbukan, metode ekstraksi, proses pembuatan krim, suhu penyimpanan, metode analisis DPPH, komponen basis krim yang digunakan, serta bahan dan alat instrumen analisis.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, rimpang kunyit putih adalah bagian dari tanaman kunyit putih yang berbentuk seperti tanaman dengan batang bawah tanah., yang diambil di Desa Pojok Kecamatan Mojogedang Kab. Karanganyar.

Kedua, serbuk rimpang kunyit putih adalah serbuk yang dibuat dengan mencuci rimpang kunyit putih kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender sampai diperoleh serbuk rimpang kunyit putih lalu sampel ditimbang dan diayak dengan ayakan mesh 40 hingga diperoleh serbuk yang halus.

Ketiga, ekstrak rimpang kunyit putih adalah ekstrak kental yang diperoleh dari proses maserasi serbuk kunyit putih selama 3x24 jam dengan menggunakan pelarut etanol 96% lalu dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu tidak lebih dari 60⁰C sehingga diperoleh ekstrak pekat.

Keempat, krim antioksidan ekstrak kunyit putih adalah krim yang mengandung ekstrak kental rimpang kunyit putih dengan konsentrasi ekstrak yang sama dengan menggunakan kombinasi emulgator Tween 80 dan Span 80.

Kelima, mutu fisik krim antioksidan kunyit putih yang akan diujikan meliputi organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, viskositas dan cycling test.

Keenam, aktivitas antioksidan adalah kemampuan dari ekstrak kunyit putih atau krim dari ekstrak kunyit putih.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah serbuk rimpang kunyit putih, etanol 96%, serbuk Mg, HCl, Larutan Mayer, larutan Bouchardat, adepslanae setil alkohol, tween 80 dan Span 80, metil paraben, propil paraben, gliserin, aquadest, vitamin C dan DPPH.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : pisau, kain hitam, timbangan analitik, blender, oven, ayakan mesh no.40, moisture balance, satu set alat maserasi, corong, evaporator rotary, Spektrofotometri Uv-Vis, kuvet, cawan porselin, beaker glas, mikropipet, tabung reaksi, labu takar, wadah krim, steamper & mortir, waterbath, pipet tetes, batang pengaduk, kertas saring, kain flannel, kaca arloji, pH meter, anak timbangan, cawan patri, stopwatch, kulkas, kaca preparat, dan penggaris.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi dan identifikasi dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kunyit putih yang akan digunakan dalam penelitian ini. Determinasi dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman kunyit putih terhadap kepustakaan yang telah dibuktikan

dilaboratorium Morfologi dan Sistematika Tumbuhan, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel yaitu rimpang kunyit putih dalam penelitian ini diambil dari Desa Pojok Mojogedang Kab. Karanganyar.

3. Pembuatan ekstrak

Serbuk rimpang kunyit putih seberat 500 gram dimaserasi dengan 1.500 ml etanol 96% selama 3 x 24 jam. Hasil yang diperoleh kemudian disaring menggunakan kain flanel dengan bantuan corong kemudian disaring lagi dengan kertas saring. Penyaringan dilakukan untuk memisahkan sisa saringan dari filtratnya. Setelah dimaserasi, filtrat yang diperoleh diuapkan pada suhu 60°C menggunakan evaporator. Hasil evaporasi yang diperoleh adalah ekstrak kunyit putih kental yang digunakan sebagai bahan aktif yang ditambahkan pada krim (Bae, 2015).

4. Identifikasi kandungan kimia ekstrak kunyit putih

4.1. Penyiapan sampel. Sebanyak 1 gram ekstrak kunyit putih ditambah 100 ml air, dididihkan selama 15 menit kemudian disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh sebagai larutan sampel.

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

4.3. Pemeriksaan alkaloid. Dimasukan ke dalam tabung reaksi 5 ml 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 ditunjukkan dengan kekeruhan atau endapan coklat, ditambahkan tabung reaksi III 2-4 tetes reagen Mayer, adanya alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan putih kekuningan (Depkes 1977)

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

4.5. Pemeriksaan triterpenoid. Dimasukkan kedalam tabung reaksi 5 ml larutan sampel, ditambah dengan 0,5 ml asam asetat anhidrat.

Campuran selanjutnya ditambah dengan 1-2 ml H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung reaksi. Apabila hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut maka ekstrak tersebut menunjukkan adanya triterpenoid.

4.6. Pemeriksaan Tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan menimbang 0,5 g ekstrak kunyit putih, dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan menggunakan aquadest panas sebanyak 4 ml lalu ditambah 3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Reaksi positif tanin ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tua (Arifin *et al.*, 2006).

5. Pembuatan Krim

Tabel 1. Rancangan Formula Sediaan Krim Ekstrak Kunyit Putih.

Bahan	Fungsi	F I (%)	F II (%)	FIII (%)	FIV
Ekstrak Kunyit Putih	Zat aktif	2	2	2	-
Tween 80	Emulgator	4,4	5,8	7,2	5,8
Span 80	Emulgator	5,6	4,2	2,8	4,2
Metil Paraben	Pengawet	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil Paraben	Pengawet	0,02	0,02	0,02	0,02
Gliserin	Humektan	20	20	20	20
Adeps Lanae	Basis krim	3	3	3	3
Setil Alkohol	Pengental	5	5	5	5
Aquadest	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Keterangan:

- F I : Formula krim ekstrak kunyit putih dengan Tween 80 4,4% dan Span 80 5,6%
 F II : Formula krim ekstrak kunyit putih dengan Tween 80 5,8% dan Span 80 4,2%
 F III : Formula krim ekstrak kunyit putih dengan Tween 80 7,2% dan Span 80 2,8%
 F IV : Kontrol negatif tanpa ekstrak kunyit putih dengan Tween 80 5,8% dan Span 80 4,2%

Menyiapkan alat dan bahan. Pembuatan emulsi terdapat dua fase, yaitu fase minyak dan fase air (Swastika, 2013). Fase minyak terdiri dari setil alkohol, adeps lanae, propil paraben, span 80. Fase air terdiri dari metil paraben, tween 80, aquadest, gliserin. Kedua fase tersebut dileburkan secara terpisah. Dileburkan fase minyak terlebih dahulu diatas penangas air pada suhu 60-70°C diaduk hingga homogen. Kemudian, dileburkan fase air dalam wadah yang berbeda diatas penangas air pada suhu 60-70°C, diaduk hingga homogen. Fase minyak dan fase air dicampurkan dalam keadaan hangat sedikit demi sedikit dan diaduk terus-menerus sampai terbentuk masa basis krim hingga homogen. Ekstrak kunyit putih kemudian ditambahkan dan dihomogenkan. Setelah terbentuk krim, krim dimasukkan didalam wadah dan dilakukan evaluasi sediaan krim.

6. Evaluasi sediaan krim

6.1. Uji Organoleptis. Uji organoleptis meliputi bentuk, warna, bau dan rasa. Uji ini dilakukan untuk mendeskripsikan warna, bentuk, bau dan rasa dari sediaan krim yang sudah bercampur dengan beberapa bahan dasar (Handayani *et al.*, 2012).

6.2. Uji Homogenitas. Sejumlah tertentu sediaan dioleskan pada objek glass, sediaan dikatakan homogen apabila tidak terlihat adanya butiran kasar diatas objek glass.

6.3. Uji pH. Pengukuran pH emulgel mengguakan pH meter yang telah dikalibrasi. Uji dilaksanakan dengan cara menyelupkan alat (elektroda) pada sediaan krim yang diuji, diamati beberapa detik sampai angka pada layar stabil dan dicatat nilai pH yang muncul pada layar. Rentang pH yang dapat diterima kulit berkisar 4,0-7,5 (Aswal, 2013).

6.4. Uji daya sebar. Uji daya sebar dilakukan dengan meletakkan sebanyak 1 g sediaan krim pada posisi tengah-tengah kaca bulat, ditutup dengan kaca bulat lainnya. Langkah ini dipertahankan selama 1 menit dan diukur diameter sebar krim. Kemudian diberikan beban secara bertahap yaitu 50 gram, 100 gram, dan 150 gram. Setiap penambahan beban diberikan waktu 1menit kemudian dilakukan pengukuran diameternya, pengukuran direplikasi sebanyak 3 kali pada setiap formula. Nilai uji daya sebar yang baik berkisar 5-7 cm (Febriani *et al.*, 2020).

6.5. Uji Daya Lekat. Uji ini dilakukan dengan alat tes daya lekat. Pengujian diawali dengan meletakkan 1 gram sediaan di atas kaca objek lalu ditutup dengan kaca objek lainnya. Beban seberat 1 kg diletakkan diatas kaca objek selama 5 menit, kemudian beban diangkat dan tuas ditarik. Dilakukan pencatatan waktu pelepasan kedua objek glass dengan menggunakan stopwatch. Waktu dihitung ketika tuas tepat ditarik dan dihentikan ketika kaca objek terlepas (Puspitasari dan Setyowati, 2018). Pengujian daya lekat dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali pada setiap formula.

6.6. Uji tipe krim. Diambil sedikit sediaan krim dan diletakkan di kaca arloji. Kemudian, dilarutkan sediaan krim dengan pelarut air. Diamati krim apakah krim dapat terdispersi atau akan pecah. Jika stabil dan terdispersi maka krim tipe M/A , jika krim akan pecah dimana air dan minyak tidak akan tercampur sama sekali maka menunjukkan krim tipe M/A (Voight, 1995). Penentuan uji tipe krim dapat dilakukan dengan metode pewarnaan. Metode Pewarnaan. Sebanyak 1 tetes sediaan krim

ditempatkan pada gelas obyek, ditambah 1 tetes larutan sudan III, dicampur merata, kemudian diamati menggunakan mikroskop, jika terjadi perubahan warna merah homogen pada fase luar, maka tipe krim adalah air dalam minyak (A/M). Sebanyak 1 tetes sediaan krim ditempatkan ditempat berbeda diatas gelas obyek, ditambah 1 tetes larutan metilen biru, dicampur secara merata, kemudian diamati dibawah mikroskop. Jika terjadi warna biru homogen pada fase luar, maka tipe krim adalah minyak dalam air (M/A) (Lachman, 2008).

6.7. Uji Viskositas. Uji viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer. Pertama siapakan sediaan emulgel, pasangviskotester pada klemnya dengan arah horizontal atau tegak lurus dengan arah klem. Kemudian rotor dipasang pada viskotester dengan menguncinya berlawanan arah jarum jam. Viskotester dihidupkan dan rotor akan mulai berputar, biarkan beberapa saat hingga jarum penunjuk viskositas menunjukkan angka stabil.

6.8. Uji *cycling test*. Metode *cycling test* dilakukan dengan tujuan melihat kestabilan sediaan dengan pengaruh variasi suhu selama waktu penyimpanan tertentu. Sediaan emulgel disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam lalu dipindahkan ke dalam oven bersuhu 40°C selama 24 jam. Waktu selama penyimpanan 2 suhu tersebut dianggap 1 siklus. Percobaan diulangi sebanyak 3 siklus. Dilakukan evaluasi sediaan meliputi pH dan viskositas pada awal dan akhir masa siklus, serta diamati terjadinya pemisahan fase atau tidak (Yani, 2016).

7. Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak kunyit putih dan sediaan krim ekstrak kunyit putih dengan DPPH yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum setelah waktu yang didapat dari operating time.

7.1. Uji Pendahuluan. Dalam 3 buah tabung reaksi, masing-masing ditambahkan dengan larutan DPPH, larutan ekstrak kunyit putih 5mg/ml, larutan formula krim 5mg/ml sebanyak 1 mg/ml kemudian ditambah dengan etanol p.a sebanyak 3 ml. Larutan tersebut kemudian divortex selama 30 detik dan didiamkan selama 30 menit, warna larutan diamati.

7.2. Pembuatan larutan stok DPPH 0,4 mM. Serbuk DPPH ditimbang dengan seksama sejumlah 15,8 mg dan dilarutkan dengan etanol 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. 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).

7.3. Pembuatan larutan stok ekstrak kunyit putih. Ekstrak kental ditimbang dengan seksama sebanyak 20 mg dan dilarutkan dengan metanol pro analisa sampai tanda batas labu takar 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi 200 ppm. Larutan ekstrak kental konsentrasi 200 ppm kemudian dibuat seri pengenceran 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm, dan 7 ppm.

7.4. Pembuatan larutan stok krim ekstrak kunyit putih. Krim kunyit putih ditimbang 20 mg sediaan krim kemudian dilarutkan dengan metanol pro analisa sampai tanda batas labu takar 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi 200 ppm. Larutan krim kunyit putih konsentrasi 200 ppm dibuat seri pengenceran yakni 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm.

7.5. Pembuatan larutan stok Vitamin C. Ditimbang seksama 10 mg sediaan krim kontrol positif yang berisi vitamin C, kemudian dilarutkan dengan etanol (p.a) sampai batas pada labu takar 100 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Larutan krim kunyit putih konsentrasi 100 ppm dibuat seri pengenceran 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm dan 6 ppm.

7.6. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH. Larutan stok DPPH 0,4 Mm diambil sebanyak 1 ml disukkan ke dalam labu takar 5 ml kemudian di tambah larutan uji sampai tanda batas. Campuran dikocok sampai homogen, diinkubasi pada operating time dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-530nm. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang dimana larutan sampel memiliki absorbansi yang maksimum (Molyneux, 2003).

7.7. Penentuan *operating time* (OT). Larutan stok DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 1 ml dimasukkan dalam labu takar 5 ml kemudian menambahkan 1 ml larutan uji, tambahkan etanol p.a 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 menit ke-60. Operating time yaitu didapat dari absorbansi yang stabil saat pembacaan menggunakan spektrofotometer pada menit tertentu (Arista, 2013).

7.8. Uji aktivitas antioksidan. Larutan stok (ekstrak kunyit putih, krim krim ekstrak kunyit putih dan standar vitamin C) 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).

7.9. Penentuan IC₅₀. Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan melalui perhitungan *Inhibitory Concentration* (IC₅₀). IC₅₀ 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:

$$\text{Peredaman (\%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Keterangan:

A₀ = Absorbansi blanko

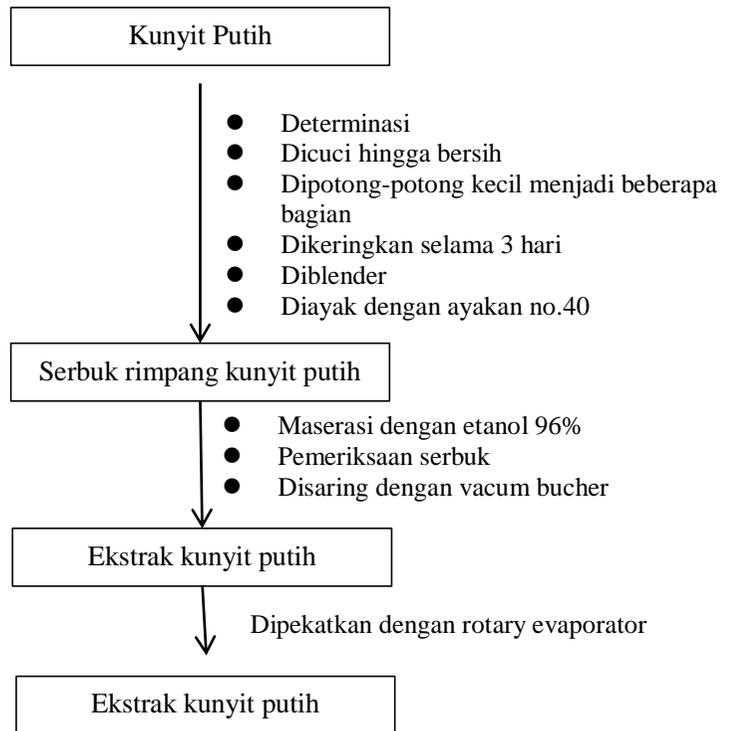
A₁ = Absorbansi sampel

Setelah didapatkan persen (%) aktivitas antioksidan selanjutnya masing - masing ekstrak dihitung nilai IC₅₀ dengan memperoleh persamaan regresi.

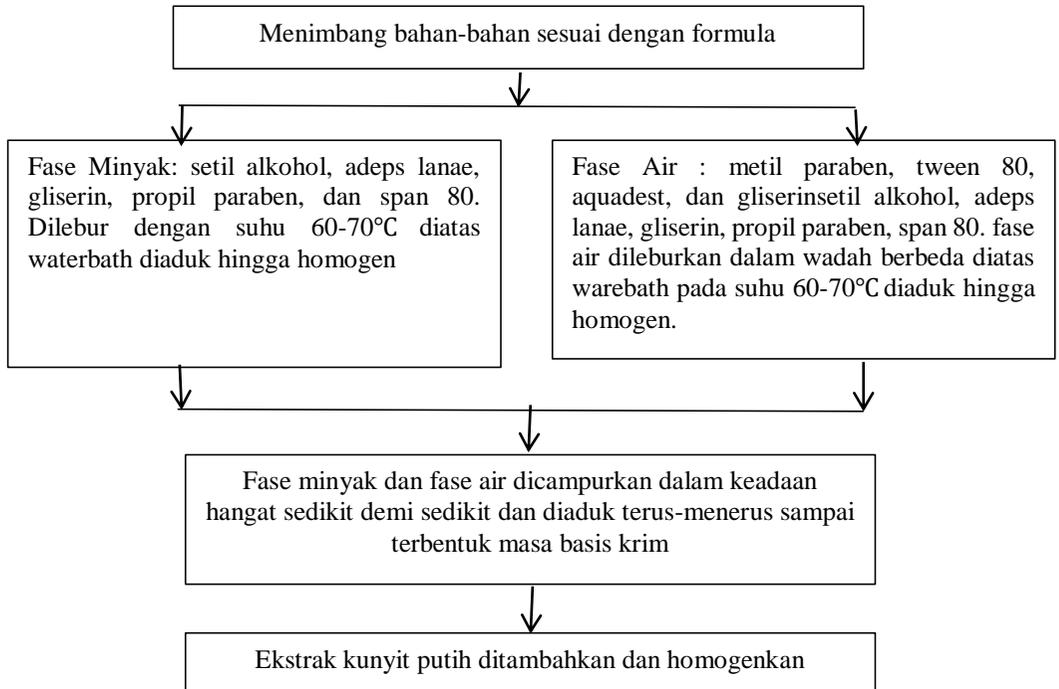
E. Analisa Hasil

Analisa data dilakukan dengan mengidentifikasi data uji mutu fisik yang meliputi uji organoleptis, uji homogenitas, uji tipe krim dan uji iritasi dicatat dan dianalisis secara deskriptif. Data uji sifat fisik yang meliputi uji pH dan uji daya sebar dicatat dan dianalisis statistik dengan menggunakan uji normalitas *Kolmonogorov-Smirnov*. Jika terdistribusi normal maka hasilnya dianalisis menggunakan perangkat lunak *One Way ANOVA* dua jalan dengan kepercayaan 95%. Data uji yang terdistribusi tidak normal, dianalisis menggunakan analisis Kruskal-Wallis kemudian dilanjutkan dengan uji MannWhitney (Susiloningsih 2016). Penentuan formulasi terbaik didapatkan dari hasil uji sifat fisik dan stabilitas yang sesuai dengan kriteria. Data aktivitas antioksidan radikal DPPH (%) ekstrak kunyit putih dihitung dari probit dari persamaan regresi linear dan ditentukan IC₅₀.

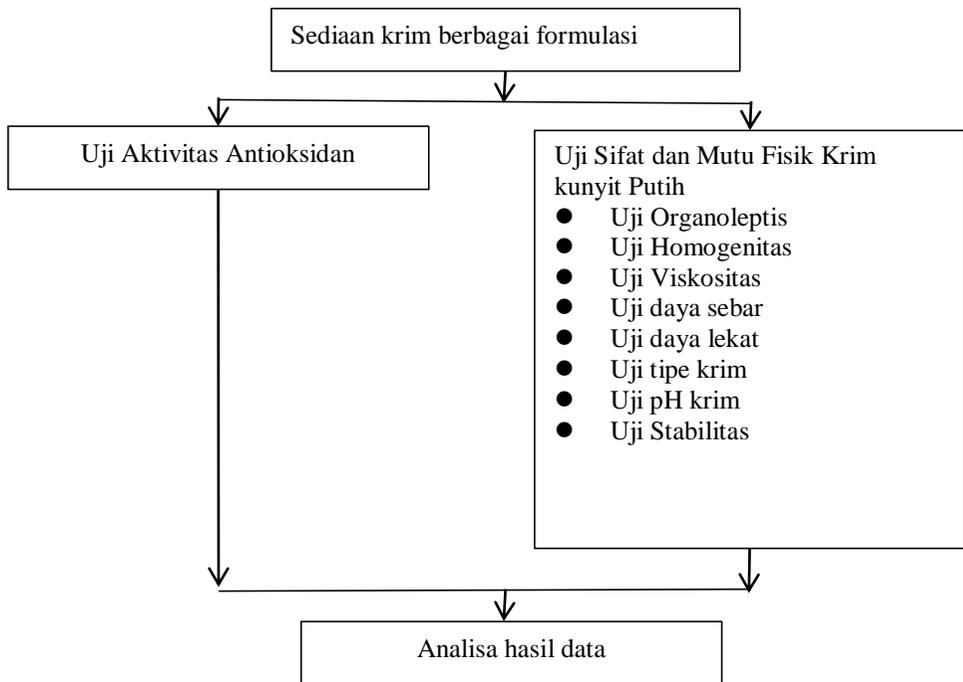
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 10.Pembuatan serbuk dan Ekstrak Kunyit Putih



Gambar 11. Pembuatan krim ekstrak kunyit putih



Gambar 12. Skema Pengujian Mutu Fisik dan Aktivitas antioksidan krim kunyit putih