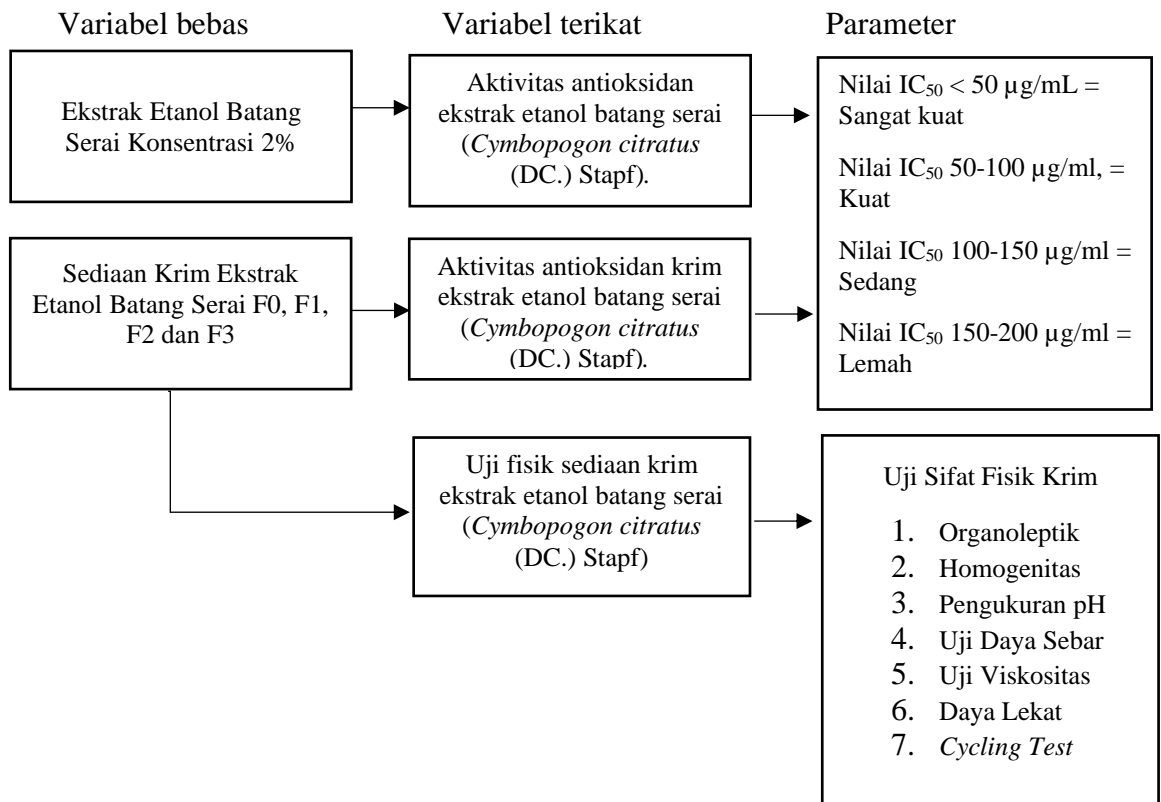


BAB III METODE PENELITIAN

1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan metode penyajian deskriptif kuantitatif uji aktivitas antioksidan ekstrak dan krim ekstrak etanol batang serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) menggunakan metode *1,1 -diphenyl-2- picylhydrazyl* (DPPH) dengan pembanding vitamin C. Formulasi sediaan krim ekstrak etanol batang serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) dan evaluasi fisik sediaan krim mencakup uji daya sebar, uji viskositas, uji *cycling*, uji pH, uji daya lekat, uji homogenitas dan uji organoleptis. Hasil data disajikan dalam bentuk table serta gambar dan dilakukan analisis data menggunakan uji *One Way ANOVA*.

2. Variabel Penelitian



Gambar 3.1 Variabel Penelitian

3. Waktu dan Tempat Kegiatan

Penelitian ini dilakukan pada Oktober 2021-Desember 2022. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Lingkungan Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto, Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Laboratorium Farmakognosi, Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Teknologi Farmasi STIKes Ibnu Sina Ajibarang.

4. Alat dan Bahan

a. Alat

Mortir dan stamper, sudip, pipet volume (*HERMA*), Pipet tetes, Mikropipet (*Accumax Pro*), batang pengaduk, thermometer (RoHS), corong kaca kecil (*HERMA*), beaker glass 50ml (*Pyrex*), erlemeyer 200ml (*HERMA*), oven, penangas air (*Faithfull*), cawan porselen, penjepit kayu, *object glass* (*Sail Brand*), tabung reaksi (*Pyrex*), viskometer oswald, gelas ukur 100ml (*HERMA*), labu ukur 5ml, labu ukur 10ml (*HERMA*), labu ukur 25ml (*HERMA*), *spektrofotometri UV-Vis* (*D-LAB*), piknometer (*Pyrex*), kuvet, neraca analitik (*Matrix*), ayakan mesh 40 (*QC Passed*), pH universal, *stopwatch*.

b. Bahan

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah batang serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), Vitamin C, Etanol 96%, Etanol 70%, Asam stearat, Propilenglikol, Setil Alkohol, Gliserin, TEA, Metil Paraben dan Aquadest

5. Langkah Kerja

a. Determinasi Tanaman

Langkah pertama penelitian ini adalah mendeterminasi batang serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) yang bertujuan untuk memverifikasi keakuratan sampel batang serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) yang dilakukan dengan mencocokkan ciri morfologi batang serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) yang dibuktikan keakuratannya di Laboratorium Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto.

b. Pengambilan dan Pembuatan Serbuk Batang Serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf)

Batang serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) menjadi sampel pada penelitian ini yang didapat dari desa Karangreja, Kutasari, Purbalingga, Jawa Tengah. Sampel yang telah dipanen disortir basah kemudian dicuci. Sampel kemudian dipotong kecil-kecil dengan ketebalan kurang dari satu sentimeter. Setelah itu, bahan dikeringkan selama 48 jam dalam oven dengan suhu 40 derajat Celcius. Sampel yang sudah kering diayak menggunakan saringan 40 mesh setelah dihancurkan dalam blender (Shadri dkk., 2018).

c. Pembuatan Ekstrak Etanol Batang Serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf)

Batang serai dipisahkan dari kotoran lain seperti daun, akar, tanah, dan sebagainya setelah dipanen dan disortir untuk memilih batang yang kondisinya baik. Hasil sortasi diambil sebanyak 2 kg, dicuci, dipotong-potong setebal kurang dari 1 cm dan dikeringkan dalam oven selama dua hari pada suhu 40°C. Batang serai diblender menjadi serbuk kemudian diayak dengan ayakan 40 mesh untuk mendapatkan serbuk batang serai dengan ukuran partikel yang seragam (Shadri dkk., 2018).

Ekstrak batang serai diperoleh dengan cara maserasi pelarut dengan etanol 70%. Toples diisi secara berurutan dengan 250 gram bubuk serai dan 1750 mililiter pelarut etanol 70%. Tutup toples yang terbungkus aluminium foil dan badan toples yang terbungkus kertas cokelat dimaksudkan agar tidak terkena sinar matahari langsung. Proses perendaman berlangsung selama tiga hari dan diperlukan pengadukan tiga kali sehari selama lima belas menit. Setelah tiga hari maserate 1 disaring, kemudian 750 mililiter pelarut etanol 70% ditambahkan ke residu filter untuk remaserasi (perendaman ulang) dan dibiarkan selama satu hari dengan tiga kali pengadukan. Maserat 2 kemudian diperoleh setelah disaring kembali. Ekstrak etanol dihasilkan dengan memekatkan kedua hasil penyaringan (maserat 1 dan 2) dalam penangas air pada temperatur 70°C setelah didiamkan semalaman (Puspitasari dkk., 2018).

d. Rancangan Formula

Tabel 3.1 Formula krim M/A dibuat dengan memodifikasi formula krim dari (Puspitasari dkk, 2018)

Bahan	Konsentrasi			
	F0(g)	F1(g)	F2(g)	F3(g)
Ekstrak etanol batang serai	-	0,1	0,2	0,3
Asam stearat	3	3	3	3
Setil alkohol	0,9	0,9	0,9	0,9
Gliserin	3	3	3	3
TEA	0,6	0,6	0,6	0,6
Metil Paraben	0,06	0,06	0,06	0,06
Propil Paraben	0,015	0,015	0,015	0,015
Aquadest	ad 30	ad 30	ad 30	ad 30

Tabel 3.2 Kontrol positif krim vitamin C

Bahan	Konsentrasi			
	F0(g)	F1(g)	F2(g)	F3(g)
Serbuk vitamin C	-	0,1	0,2	0,3
Asam stearat	3	3	3	3
Setil alkohol	0,9	0,9	0,9	0,9
Gliserin	3	3	3	3
TEA	0,6	0,6	0,6	0,6
Metil Paraben	0,06	0,06	0,06	0,06
Propil Paraben	0,015	0,015	0,015	0,015
Aquadest	ad 30	ad 30	ad 30	ad 30

e. Pembuatan Krim Ekstrak Batang Serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf)

Sediaan krim dibuat dalam 4 formulasi ekstrak batang serai dengan konsentrasi F0; F1; F2; dan F3. Kemudian masing-masing bahan diambil dan ditimbang lalu dipisahkan. Setil alkohol, asam stearat, dan propil paraben yang merupakan fase minyak, dicairkan hingga cair dalam cawan porselen di atas penangas air (dipertahankan pada suhu 70-75°C) untuk membuat krim. TEA, metil paraben, ½ gliserin dan air suling (fase air) dicampur dalam cawan porselen kemudian dipanaskan di atas penangas air sampai meleleh (dipertahankan pada suhu 70-75°C). Untuk melarutkan ekstrak,

menggunakan sisa $\frac{1}{2}$ gliserin. Untuk menghasilkan massa krim, kedua fase tersebut dimasukkan secara bergantian ke dalam mortar dan dihomogenkan. Ekstrak etanol batang serai kemudian ditambahkan, dihomogenkan, dan lalu dievaluasi fisik dari sediaan krimnya (Puspitasari dkk., 2018).

f. Evaluasi Fisik Sediaan Krim

Evaluasi fisik yang dilakukan dalam pemeriksaan mutu sediaan krim antara lain: uji organoleptik, uji homogenitas, uji daya lekat, uji daya sebar, uji pH, uji viskositas dan uji *cycling* (Retnowati, 2021).

1) Uji Homogenitas

Oleskan krim secukupnya pada sepotong kaca atau benda transparan lain yang sesuai, sediaan krim dalam jumlah tertentu harus memiliki komposisi yang seragam dan tidak ada butiran kasar yang terlihat (Sinaga dkk., 2020)

2) Uji Organoleptik

Bau, warna, dan tekstur adalah beberapa uji organoleptik. Setiap formula direplikasi tiga kali untuk uji evaluasi fisik krim (Puspitasari dkk., 2018)

3) Uji pH

Gunakan kertas indikator pH untuk menguji pH dari sediaan krim. Encerkan 1 gram krim dengan 10 mililiter air suling untuk membuat larutan. Nilai pH selanjutnya dapat ditentukan dengan mencelupkan kertas indikator pH dan amati perubahan warna dari kertas indikator pH lalu cocokkan menggunakan standar pH universal untuk mengetahui nilai dari pH sediaan (Azkiya dkk., 2017). Menurut Utama (2017), pH kulit harus diperhatikan dalam membuat kosmetik yaitu dengan pH 4,5-6,5.

4) Uji Daya Lekat

Dua gelas objek, stopwatch, krim, dan timbangan gram merupakan alat dan bahan yang digunakan dalam uji lekat (Puspitasari dkk., 2018). Pada tahap pertama adalah mengoleskan krim secukupnya pada objek kaca kemudian menutupinya dengan objek kaca lain. Kaca objek ditekan dengan anak timbang seberat 0,5 kg selama lima menit, setelah 5 menit pemberat diangkat lalu kedua objek kaca terlepas dan catat waktu

pelepasannya. Kemampuan krim untuk melekat pada kulit dalam jangka waktu yang lebih lama meningkatkan kemungkinan bahan dasar akan melepaskan lebih banyak bahan aktif sehingga dapat meresap lebih dalam ke dalam kulit (Puspitasari dkk., 2018).

5) Uji Daya Sebar

Kaca transparan ditempatkan di atas kertas grafik untuk uji daya sebar. Untuk menentukan diameter daerah tersebut, 0,5 gram krim diletakkan di atas kaca lalu ditutup dengan kaca transparan lainnya dan dibiarkan selama kurang lebih 5 detik (Mandiraatmadja dkk., 2015). Setelah itu dilakukan dengan meletakkan beban 50, 100, 200, dan 500 g di atas kaca transparan dan mengamati diameter area tersebut. Sediaan yang baik adalah krim dapat dioleskan dengan mudah dan merata (Mandiraatmadja dkk., 2015).

6) Uji Viskositas

Viskometer Ostwald digunakan untuk mengukur viskositas sediaan Puspitasari dkk., 2020). Sejumlah sampel yang telah diencerkan dari 1% (b/v) dimasukkan ke dalam tabung. Dengan menggunakan tekanan atau isapan, meniskus cairan di dalam tabung kapiler diarahkan ke garis atas. Buka tabung kapiler dan juga tabung pengisi agar cairan dapat mengalir dengan bebas ke dalam wadah di bawah tekanan atmosfer. Waktu yang diperlukan zat cair untuk mengalir dari batas atas ke batas bawah dalam pipa kapiler dicatat (Puspitasari dkk., 2020). Berikut rumus yang digunakan untuk menentukan nilai viskositas (Ermawati dan Wahdaniah, 2021):

$$\text{Viskositas} = \frac{\rho_{\text{sampel}} + t_{\text{sampel}}}{\rho_{\text{air}} + t_{\text{air}}} \times \eta_{\text{air}}$$

Keterangan:

η_{air} = viskositas air (0,890)

ρ = bobot jenis (g/ml)

t = waktu yang diperlukan untuk mengalir

Rumus menghitung bobot jenis (Putra, 2013) :

$$\rho = \frac{\text{massa piknometer} - \text{massa piknometer kosong}}{\text{volume piknometer}}$$

Keterangan :
 ρ = bobot jenis

7) Uji *Cycling*

Sediaan krim disimpan pada suhu 40°C selama 24 jam dan suhu 4°C selama 24 jam. Pengujian dilakukan selama enam siklus dan amati perubahan fisik krimnya pada awal dan akhir siklus yang meliputi uji organoleptik, homogenitas, pH, dan daya sebar dan daya lekat (Lumentut dkk., 2020).

g. Pengujian Aktivitas Antioksidan Sampel Ekstrak dan Krim

1) Pembuatan larutan blanko DPPH

Dalam labu ukur 25 ml, diambil 2,5 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dengan etanol 96% hingga sampai garis tanda (Retnowati, 2021). Sebanyak 2,5 mL larutan DPPH 100 ppm dipipet ke dalam labu ukur 25 mL, kemudian ditambahkan etanol 96% hingga garis batas. Setelah itu larutan dikocok secara merata dan dibiarkan selama tiga puluh menit. Semua pekerjaan dalam pembuatan larutan blanko DPPH dilakukan di ruangan yang terbebas dari sinar matahari (Retnowati, 2021).

2) Pembuatan larutan pembanding vitamin C

Tujuan penggunaan vitamin C sebagai pembanding sebab vitamin C berfungsi sebagai antioksidan dengan menangkap radikal bebas dan mencegah reaksi berantai (Retnowati, 2021). Dalam labu ukur 10 ml, dimasukkan 200 mg serbuk vitamin C yang sudah ditimbang dan ditambahkan dengan pelarut etanol 96% sampai garis tanda. Setelah itu, larutan pembanding sebanyak 1, 2, dan 3 mililiter dipipet ke dalam labu ukur 5 mililiter, ditambahkan larutan DPPH sebanyak 2,5 mililiter dan cukupkan sampai garis tanda menggunakan etanol 96% (Retnowati, 2021).

3) Pengujian larutan ekstrak etanol batang serai

Pertama dibuat larutan induk pada labu takar 10 ml dengan melarutkan 200 mg ekstrak yang telah ditimbang dan dilarutkan dengan

etanol 96% sampai garis batas. Larutan induk kemudian dipipet ke dalam labu ukur 5 ml masing-masing 1, 2, dan 3 ml ditambah dengan 2,5 ml larutan DPPH dan etanol 96% sampai garis batas (Retnowati, 2021).

4) Pembuatan larutan uji krim

Langkah pertama larutkan 5 mg krim yang sebelumnya ditimbang dengan etanol 96% pada labu ukur 10ml dan dicukupkan hingga tanda batas (Retnowati, 2021). Larutan sampel didiamkan selama lima menit sampai larutan benar-benar larut. Pipet 2 mililiter larutan sampel larutan krim ke dalam tabung reaksi yang berisi 1 mililiter larutan DPPH kemudian tutup tabung dengan aluminium foil. Kemudian dilarutkan dengan alat vortex dan diamkan selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 520 nm dan menghitung persentase inhibisinya (Retnowati, 2021).

5) *Operating time* larutan DPPH

Operating time ditentukan dengan cara menghomogenkan 50 µl larutan vitamin C dengan 4,0 ml larutan DPPH 0,1 mm lalu distirer selama satu menit. Ukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 dilihat absorbansinya pada λ maksimum yang diperoleh (Ulfah dkk, 2014).

6) Pengukuran serapan

Pengukuran absorbansi dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan blanko yang telah disiapkan kemudian ditambahkan ke dalam kuvet. Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 520 nm digunakan untuk pengukuran ini (Retnowati, 2021).

7) Perhitungan persen inhibisi IC_{50}

Analisis aktivitas antioksidan penangkalan radikal bebas DPPH ekstrak etanol batang serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) dikaji dan setiap sampel dihitung nilai IC_{50} dengan analisa probit (Retnowati, 2021). Setelah itu, membandingkan kategori tingkat kekuatan antioksidan dengan hasil analisis probit yang diperoleh. Prosedur penentuan nilai IC_{50} ekstrak etanol batang serai adalah sebagai berikut: Penentuan nilai antioksidan ekstrak serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) sebagai antioksidan,

setelah 30 menit diukur absorbansinya dua kali pada panjang gelombang 520 nm. Absorbansi digunakan untuk menghitung persentase nilai antioksidan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Daya antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Apabila persen inhibisi dari setiap konsentrasi sudah didapat, maka selanjutnya antara konsentrasi sampel dan persen inhibisi masing-masing konsentrasi diplot pada sumbu x dan y menggunakan persamaan regresi linier $y = ax + b$ (Harun, 2014). Nilai IC_{50} untuk masing-masing konsentrasi selanjutnya ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi tersebut. Kekuatan antioksidan kemudian ditentukan dengan menggunakan nilai IC_{50} dari perhitungan sebelumnya (Harun, 2014).

h. Analisis data

1) Analisis SPSS uji anova satu arah (*one way anova*)

Uji *one way* ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95% digunakan untuk melanjutkan analisis statistik setelah diperoleh hasil dengan menggunakan program SPSS 26. Uji *one way* ANOVA menghasilkan taraf signifikansi $0,000 < 0,05$ yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan (Elmitra dkk., 2019). Setelah itu dilanjutkan dengan uji *post hoc* Duncan dengan maksud untuk menentukan konsentrasi yang menghasilkan antioksidan paling efektif (Elmitra dkk., 2019). Analisis statistik menggunakan uji *one way* ANOVA jika kedua syarat uji ANOVA tidak terpenuhi yakni data homogen dan terdistribusi normal maka digunakan uji *Kruskal Wallis* dan apabila ditemukan adanya perbedaan maka perlu dilanjutkan menggunakan uji *Mann Whitney* (Genatrika dkk., 2016).