

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen untuk mengevaluasi pengaruh variasi konsentrasi kombinasi emulgator trietanolamin dan asam stearat ekstrak daun asam jawa yang berpengaruh dengan sifat fisik dari krim serta aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi (S-1) yang berada di Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Mei hingga Juni tahun 2025.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel independen : variasi konsentrasi kombinasi emulgator trietanolamin dan asam stearat.
2. Variabel dependen : sifat fisik krim yang terdiri daya lekat, daya sebar, pH, viskositas, dan nilai dari IC_{50} .
3. Variabel terkontrol : temperatur pengeringan, waktu ekstraksi, temperatur peleburan, kecepatan pengadukan krim, dan waktu pengadukan krim.

D. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak daun asam jawa merupakan cairan dengan viskositas tinggi yang diperoleh melalui proses maserasi, yaitu perendaman serbuk simplisia dalam etanol 96% untuk mengekstraksi senyawa aktif, kemudian dilanjutkan dengan evaporasi.
2. Krim ekstrak daun asam jawa adalah sediaan berbentuk semipadat yang dibuat melalui campuran fase minyak dan fase air dengan variasi kombinasi emulgator.
3. IC_{50} merupakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat radikal bebas DPPH sebesar 50%.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat gelas lainnya, bejana kaca, cawan porseline, centrifuge (Hettich EBA), grinder (Fomac), homogenizer (IKA T25), hot plate (IKA C-MAG HS 7), kompor (Maspion S-301), mikropipet (COVA Bio Labware), mikroskop (*olympus CX23*), moisture, neraca analitik, oven, pH meter (Hanna HI 98190), sendok kayu, sonikator (GT SONIC), spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific genesys 10S UV-VIS), viskometer (Brookfield DV1), dan wajan.

2. Bahan

Alumunium foil, asam stearat (farmasetis), akuades (teknis), daun asam jawa, DPPH (p.a), etanol (p.a), etanol 96% (teknis), FeCl_3 (merck p.a), kertas saring, metanol (p.a), metil paraben (farmasetis), metilen blue (teknis), NaOH (merck p.a), pereaksi dragendorf, pereaksi mayer, pereaksi wagner, propilparaben (farmasetis), propilen glikol (farmasetis), setil alkohol (farmasetis), dan trietanolamin (farmasetis), vitamin C (p.a).

F. Pelaksanaa Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tanaman daun asam jawa yang dipakai pada penelitian ini dideterminasi di Fakultas Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi tanaman perlu dilakukan agar meminimalisir kesalahan dalam proses pengumpulan bahan penelitian.

2. Penyiapan Simplisia

Tanaman daun asam jawa (*Tamarindus indica* L.) tepatnya diambil di Jalan Malioboro. Daun yang diambil dan dipilih dengan cara menyortir daun yang masih hijau, segar dan utuh. Sehabis dipilih, dipisahkan daun dari tangkainya, kemudian pada air mengalir dilakukan pencucian setelah itu ditiriskan dan dilanjutkan dikeringkan menggunakan oven suhu 45°C . Daun yang telah kering akan terasa kering, rapuh, dan mudah patah. Selanjutnya daun yang telah kering tersebut digrinder sampai diperoleh serbuk. Serbuk simplisia dilakukan

pengayakan agar mendapatkan serbuk dengan ukuran yang sama menggunakan ayakan 40 mesh (Anggriyani & Endriyatno, 2024).

3. Ekstraksi Daun Asam Jawa

Metode maserasi digunakan dalam ekstraksi daun asam jawa, dimana serbuk daun asam jawa seberat 500 gram dimaserasi menggunakan 5000 mL etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Kemudian wadah tersebut ditutup dan dibiarkan selama 3 hari di tempat yang terlindung terhadap cahaya, sesekali sambil diaduk. Maserat selanjutnya disaring menggunakan kain mori dan ampas diperas untuk mendapatkan ekstrak cair pertama. Sisa ampas dilakukan remaserasi dengan 2500 mL etanol 96% selama 2 hari dan sesekali diaduk. Maserat kedua disaring kembali menggunakan kain mori dan diperoleh ekstrak cair kedua. Ekstrak cair pertama dan kedua dicampur untuk menguapkan pelarutnya di atas waterbath dan diperoleh ekstrak kental etanol daun asam jawa (Fauzi *et al.*, 2020). Rendemen dapat dihitung berdasarkan ekstrak kental yang diperoleh (Patandung & Ishariyanto, 2025). Setelah itu, dilakukan perhitungan rendemen dengan rumus berikut.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Awal Simplisia}} \times 100\%$$

4. Karakterisasi ekstrak etanol daun asam jawa

a. Uji Organoleptis

Pemeriksaan ini melibatkan pemeriksaan pada bentuk warna, dan aroma dari ekstrak (Wardiyah *et al.*, 2022).

b. Uji pH

Sejumlah 1 gram ekstrak kental daun asam jawa dilarutkan dalam 100 mL akuades, kemudian pH-nya diukur dengan pH meter (Okzelia & Mardiyah, 2023).

c. Uji Kadar Air

Sejumlah 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam alat Moisture analyzer yang telah diatur pada suhu 105°C. Alat ini menggunakan pemanas halogen

yang otomatis menyala dan mulai memanaskan sampel sampai beratnya stabil. Setelah proses pengeringan selesai dan lampu padam, alat akan menampilkan kadar air dari ekstrak tersebut langsung di layar (Anindya *et al.*, 2024).

d. Pemeriksaan fitokimia ekstrak etanol daun asam jawa

1) Uji Flavonoid

Dilartukn sebanyak 0,1 gram ekstrak dalam 10 mL akuades, setelah itu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, ditambahkan 1 tetes NaOH 10%. Perubahan warna menjadi orange menandakan hasil positif mengandung flavonoid.(Anggriyani & Endriyatno, 2024).

2) Uji Saponin

Ekstrak sejumlah 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 mL akuades dan dikocok kuat selama 1 menit. Jika terbentuk busa yang tidak hilang maka sampel positif mengandung saponin (Oktavia & Sutoyo, 2021).

3) Uji Tanin

Ekstrak sebanyak 1 gram masukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 mL larutan FeCl_3 10%. Apabila terjadi perubahan warna menjadi biru kehitaman, biru tua, atau hitam kehijauan, ini menandakan terdapat senyawa tanin (Tunny *et al.*, 2020).

4) Uji Fenolik

Ekstrak sebanyak 1 gram masukkan dalam tabung reaksi kemudian ditetes dengan metanol sebanyak 10 tetes, digojog hingga larut, kemudian ditambahkan dengan FeCl_3 5%. Positif mengandung fenolik menunjukkan hasil perubahan warna biru, hijau, ungu, atau merah kemerahan (Oktavia & Sutoyo, 2021).

5) Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan dengan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL air suling, kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan, dan disaring. Filtrat yang dihasilkan diambil sebanyak 3 tetes, kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer yang menghasilkan

endapan putih atau kuning. Selanjutnya, filtrat yang sama diambil 3 tetes dan ditambahkan 2 tetes pereaksi Wagner, menghasilkan endapan coklat-hitam. Selanjutnya, filtrat diambil 3 tetes dan ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff yang menghasilkan endapan merah bata. Alkaloid dianggap positif jika terbentuk endapan pada setidaknya dua atau tiga percobaan di atas (Wahyuni & Marpaung, 2020).

5. Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Daun Asam Jawa

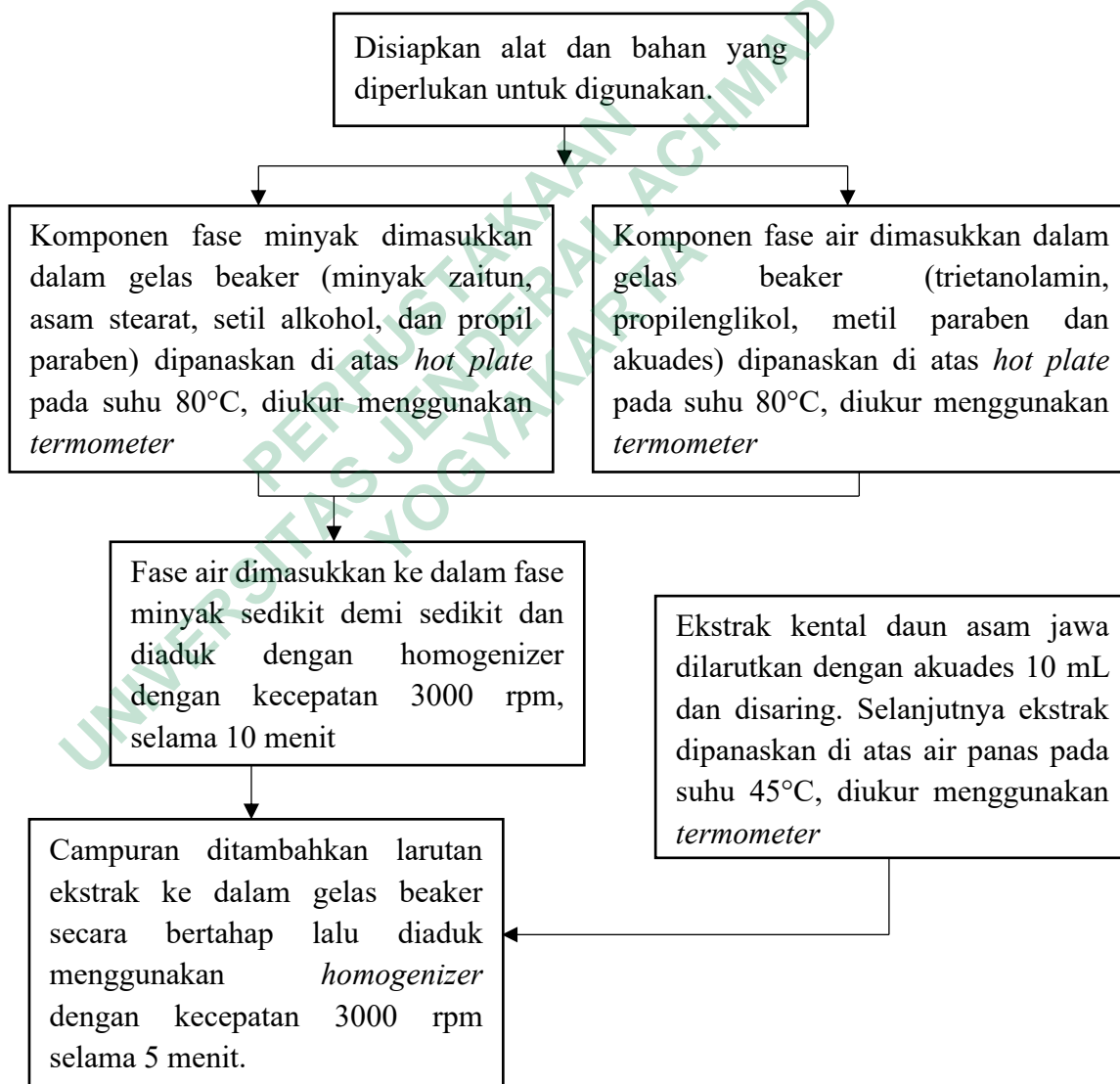
Sediaan krim menggunakan tiga variasi konsentrasi kombinasi emulgator asam stearat dan trietanolamin mengacu pada penelitian Safitri, (2018) sedangkan konsentrasi ekstrak dan formula krim yang digunakan mengacu pada penelitian Arifin *et al.*, (2022). Formula ekstrak etanol daun asam jawa yang akan dibuat tercantum pada tabel 3.

Tabel 3. Formulasi Krim Ekstrak Etanol Daun Asam Jawa

Bahan	Kegunaan	Formulasi Krim (% b/v)		
		F1	F2	F3
Ekstrak etanol daun asam jawa (g)	Zat aktif	6	6	6
Minyak zaitun (g)	Pelembab	5	5	5
Asam stearat (g)	Emulgator	17	16	15
Trietanolamin (g)	Emulgator	2	3	4
Setil alcohol (g)	Pengental	3	3	3
Metil paraben (g)	Pengawet	0,1	0,1	0,1
Propil paraben (g)	Pengawet	0,1	0,1	0,1
Propilen glikol (g)	Humektan	7	7	7
Akuades (ad)	Pelarut	100	100	100

Disiapkan alat dan bahan yang diperlukan untuk digunakan. Selanjutnya, Komponen fase minyak dimasukkan dalam gelas beaker (minyak zaitun, asam stearat, setil alcohol, dan propil paraben) dan komponen fase air dimasukkan dalam gelas beaker yang berbeda (trietanolamin, propilenglikol, metil paraben

dan akuades) setelah itu, dipanaskan di atas *hot plate* pada suhu 80°C, dan suhunya diukur menggunakan *termometer*. Fase air dimasukkan ke dalam fase minyak sedikit demi sedikit dan diaduk dengan *homogenizer* dengan kecepatan 3000 rpm, selama 10 menit. Ekstrak kental daun asam jawa dilarutkan dengan 10 mL akuades dan disaring, kemudian dipanaskan di atas air panas pada suhu 45°C sambil diukur suhunya menggunakan *termometer*. Larutan ekstrak kemudian ditambahkan secara bertahap ke dalam campuran fase minyak dan fase air di dalam gelas beaker, lalu diaduk kembali menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit.



Gambar 7. Cara pembuatan krim ekstrak daun asam jawa

6. Evaluasi fisik sediaan krim ekstrak etanol daun asam jawa

a. Uji Organoleptik

Krim ekstrak etanol daun asam jawa dilakukan uji organoleptik dengan memanfaatkan panca indra, yaitu melalui pengamatan terhadap warna, bentuk sediaan dan bau.

b. Uji Homogenitas

Krim ekstrak etanol daun asam jawa dilakukan uji homogenitas yaitu caranya dengan mengambil 1 gram krim. Kemudian krim tersebut dioleskan pada kaca preparat dan diteliti. Di katakan homogen pada krim ketika tidak terdapat butiran kasar (Anggriyani & Endriyatno, 2024).

c. Uji pH

1 gram krim ditimbang dan dilarutkan dengan akuades 10 mL. Krim diukur dengan pH meter dimasukkan kedalam wadah yang berisi krim, pH krim kemudian diketahui dengan melihat angka yang tertera pada pH meter. pH sediaan harus sesuai dengan pH kulit yaitu berkisar 4,5-6,5 (Tari & Indriani, 2023).

d. Uji Daya Sebar

1 gram krim ditimbang dan diletakkan di bagian tengah cawan petri yang terbalik. Setelah itu, beban cawan petri lainnya ditempatkan diatas krim dan dibiarkan kurang lebih 1 menit. Selanjutnya, beban tambahan sebesar 50 g, 100 g, 150 g, dan 200 g diberikan, kemudian diukur diameter sebarannya yaitu meliputi vertikal, horizontal dan diagonal. Daya sebar yang dianggap memenuhi syarat adalah antara 5-7 cm (Anggriyani & Endriyatno, 2024).

e. Uji Daya Lekat

Pengujian daya lekat krim ekstrak etanol dari daun asam jawa dilakukan dengan cara mengaplikasikan 1 gram krim pada permukaan plat kaca (kaca preparat). Plat tersebut kemudian ditempelkan dan diberi beban 1 kg selama 5 menit agar kedua dari plat tersebut saling melekat. Setelah durasi waktu tersebut, plat dilepaskan dan diberi beban pelepas sebesar 80 g untuk

menguji daya lekatnya. Waktu yang diperlukan untuk pelepasan kedua plat dicatat, dengan daya lekat dinyatakan memenuhi kriteria jika waktu pelepasan melebihi 1 detik (Anggriyani & Endriyatno, 2024).

f. Uji Viskositas

Digunakan viskometer Brookfield untuk mengukur viskositas krim dengan memasukkan krim dalam beaker glass. Setelah itu, dipasang spindel nomor 6 dengan kecepatan 50 rpm dan dihidupkan rotor. Hasil pengukuran dicatat (Arifin *et al.*, 2022).

g. Uji Sentrifugasi (Stabilitas dipercepat)

Krim sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Selanjutnya krim disentrifugasi selama 5 jam pada kecepatan 3750 rpm. Uji coba ini sebanding dengan proses penyimpanan krim selama 12 bulan pada suhu ruang. Krim dikatakan stabil apabila tidak ada pemisahan fase setelah proses sentrifugasi (Lachman, 1987). Perhitungan rasio pemisahan dapat dilihat pada rumus:

$$F = \frac{H_u}{H_o}$$

Keterangan: H_u : tinggi krim yang stabil

H_o : tinggi awal krim

F : rasio pemisahan

h. Uji Determinasi Tipe Krim

1) Metode Pengenceran

Krim yang sudah dibuat dimasukkan ke dalam beaker glass, lalu dicampur dengan air. Jika emulsi tersebut bisa tercampur, berarti tipe emulsinya ialah minyak dalam air (M/A), sementara jika tidak tercampur maka tipe krim adalah air dalam minyak (A/M) (Zam & Musdalifah, 2022).

2) Metode Pewarnaan

Diletakkan krim yang sudah disiapkan dalam object glass, lalu beberapa tetes larutan metilen blue diteteskan di atasnya, selanjutnya kaca objek ditutup dengan kaca penutup dan diamati dibawah mikroskop. Jika terlihat warna biru pada bagian tepi maka tipe

emulsinya (M/A) minyak dalam air sebaliknya jika terlihat warna biru pada bagian tengah maka tipe emulsinya (A/M) air dalam minyak (Rahayu *et al.*, 2023).

7. Pengujian Aktivitas Antioksidan Sediaan Krim

a. Pembuatan Larutan Stok DPPH 0,1 mM

DPPH sejumlah 3,94 mg ditimbang terlebih dahulu, setelah itu dilarutkan dalam etanol p.a sehingga mencapai tanda batas labu takar 100 mL, selanjutnya campuran tersebut disimpan ke botol kaca gelap yang ditutup rapat menggunakan aluminium foil (Agustiarini & Wijaya, 2022).

b. *Scanning* panjang gelombang maksimal DPPH

Dipipet sejumlah 2 mL larutan DPPH, kemudian diukur absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 400-800 nm (Yanti *et al.*, 2023). Hasil panjang gelombang maksimum DPPH didapatkan 515 nm.

c. Penentuan *operating time*

Diambil sebanyak 1 mL larutan induk Vitamin C konsentrasi 6 ppm, kemudian ditambahkan 2 mL larutan stok DPPH 0,1 mM, dihomogenkan. *Operating time* ditentukan dengan cara membaca absorbansi campuran Vitamin C dan DPPH, diamati absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada menit ke 0-60. *Operating time* ditentukan saat diperoleh absorbansi yang stabil (Kusmanto *et al.*, 2020). Diperoleh hasil *Operating time* pada menit ke-26.

d. Pembuatan dan Pengukuran serapan blanko DPPH

Diambil 2 mL larutan induk DPPH, lalu didiamkan selama 26 menit, agar absorbansi DPPH mencapai kestabilan. Setelah itu, dibaca serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang 515 nm (Kusmanto *et al.*, 2020).

e. Pembuatan larutan pembanding vitamin C 100 ppm

Sebanyak 10 mg vitamin C konsentrasi 100 ppm ditimbang dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga tanda batas volume 100 mL. Kemudian diencerkan vitamin C dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dengan

memipet 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL dan 0,5 mL ditempatkan masing-masing pada labu takar 5 mL, lalu ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas (Agustiarini & Wijaya, 2022).

f. Pengujian larutan pembanding vitamin C 100 ppm

Diambil setiap konsentrasi 1 mL dan ditambahkan larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 mL dan digojog hingga homogen. Setelah itu didiamkan selama 26 menit. Serapan dari larutan diukur pada panjang gelombang 515 nm (Agustiarini & Wijaya, 2022).

g. Pembuatan larutan sampel dan pengujian aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH

Ditimbang 10 mg dari masing-masing konsentrasi krim dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga tanda batas volume 10 mL lalu disentrifugasi selama 5 menit. Lalu dibuat seri konsentrasi larutan 50 ppm; 100 ppm; 150 ppm; 200 ppm; dan 250 ppm dengan memipet 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL; 2,5 mL ditempatkan masing-masing pada labu takar 10 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Sebanyak 2 mL larutan sampel krim diambil menggunakan mikropipet, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 2 mL larutan DPPH. Campuran tersebut didiamkan selama 26 menit, kemudian diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Selanjutnya, dilakukan perhitungan % inhibisi (Pogaga *et al.*, 2020).

G. Metode Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Metode pengolahan data antioksidan terhadap DPPH

Digunakan sampel F1, F2, F3, dan Vitamin C selanjutnya dihitung pada bagian nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} adalah konsentrasi larutan sampel dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} ditentukan yaitu dengan menggunakan cara menghitung % inhibisi (Nadzifah *et al.*, 2024). Rumus perhitungan % inhibisi adalah:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol DPPH} - \text{absorbansi sampel uji}}{\text{absorbansi kontrol DPPH}} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan dapat diinterpretasikan dengan nilai IC₅₀. Semakin rendah nilai IC₅₀, maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Nilai IC₅₀ dapat dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linear $y = bx + a$. Kemudian untuk penentuan nilai IC₅₀ dapat dihitung menggunakan persamaan (Kartika *et al.*, 2024):

$$IC_{50} = \frac{50-b}{a}$$

Keterangan: IC₅₀ : Inhibitor Concentration 50% (ppm)

y : Absorbansi

a : Intersep

b : Slope

x : Konsentrasi (ppm)

2. Analisis Data

Analisis data pada uji normalitas yaitu menggunakan metode *Shapiro Wilk* ($p > 0,05 = \text{normal}$) dan uji homogenitas menggunakan metode *Levene's* ($p > 0,05 = \text{homogen}$). Apabila kedua pengujian tersebut normal dan homogen ($p > 0,05$) maka analisis dapat dilakukan menggunakan uji *One Way Anova* untuk membandingkan rata-rata persentase penangkapan radikal bebas DPPH dan sifat fisik krim pada tiga variasi konsentrasi kombinasi emulgator trietanolamin dan asam stearat. Jika terdapat data yang diperoleh tidak terdistribusi dengan normal atau tidaknya homogen maka dilakukan metode statistik non parametrik seperti metode *Kruskal Wallis* yang membandingkan distribusi antar kelompok berdasarkan ranking. Jika uji *Kruskal Wallis* menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda nyata.