BAB III
METODE PENELITIAN

3.1. Bahan

Beras merah (*Oryza nivara*) dari area persawahan di Kecamatan Tempuran Karawang, Etanol 96%, Metanol p.a, Paraffin Liqud, Setil Alkohol, Asam Stearat, Tween 80, Span 80, Gliserin, Natrium Benzoat, Oleum Rosae, Aquadest, DPPH (1,1- Difenil-2-Pikrilhidrazil) p.a, Vitamin C (p.a).

1.2. Alat

Alat yang digunakan adalah Viskometer (LAMMYRHEOLOGY), Maserator, Rotatory Evaporator (CECIL), Neraca Analitik (ADAM SCIENTIFIC), gelas ukur (PYREX), beaker glass (PYREX), pipet tetes, water bath (CECIL), tabung reaksi (PYREX), cawan porselin, pH meter (NEOMET), Blender (PHILIPS), alat uji daya sebar, object glass, alat uji daya lekat, alat uji homogenitas, Spektrofotometer UV-Vis (THERMO SCIENTIFIC).

1.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboraturium Bahan Alam, dan Laboraturium Semi Solid Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilakukan selama 3 bulan terhitung dari bulan Februari-Agistus 2020.

Tanaman yang akan dilakukan penelitian ini dideterminasi terlebih dahulu untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang dipakai. Determinasi dilakukan di Laboraturium Teknologi Fakultas Insitut Teknologi Bandung.

1.4. Formulasi

Tabel 1. Formulasi Sediaan Body Cream

Bahan	Konsentrasi % (b/v)			Fungsi
	F1	F2	F3	
Ekstrak Beras Merah	0,5	1	2	Zat aktif
Asam Stearat	6	6	6	Basis
Setil Alkohol	2	3	3,5	agen pengemulsi
Paraffin liquid	3	3	3	Emolient
Gliserin	8	8	8	Humektan
Tween 80	6	6	6	Emulsyifing agent
Span 80	5	5	5	Emulsyifing agent
Triethanolamine (TEA)	0.5	0,5	0,5	Alkalizing agent
Na benzoate	0.3	0.3	0.3	Pengawet
Ol. Rosae	1-2 tetes	1-2 tetes	1-2 tetes	Pewangi
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Pelarut

1.5. Prosedur Kerja

1.5.1. Proses Pembuatan Ekstrak

Beras merah yang digunakan untuk penelitian diperoleh dari area persawahan di Kecamatan Tempuran Karawang Jawa Barat. Beras merah (*Oryza nivara*) yang sudah dihaluskan kemudian diayak, setelah diayak kemudian beras ditimbang menggunakan timbangan gram sebanyak 500 gram, kemudian dimasukan kedalam wadah coklat atau alat maserator, rendam beras merah dengan etano 96% 2500 ml. rendam selama 24 jam sambil sesekali diaduk, setelah 24 jam kemudian disaring dengan menggunakan vakum elektrik, kemudian filtrat direndam kembali dengan etanol 96%. Ulangi perlakuan yang sama sampai mendapatkan hasil yang jernih. Filtrat di uapkan menggunakan *evaporator* (Eyela OSB-2100), setelah ekstrak di *evaporasi* kemudian di *water bath* (CECIL) untuk mendapatkan ekstrak kental.

1.5.2. Prosedur pembuatan sediaan

Proses pembuatan krim diawali dengan penimbangan bahan-bahan, bahan yang digunakan untuk pembuatan sediaan krim terdiri dari fasa air dan fasa minyak. Bahan yang termasuk fasa air yaitu natrium benzoat, Gliserin dan aquadest. Bahan yang termasuk fasa minyak c*etil alcohol*, Asam Stearat*, tween 80, Span 80* dan *paraffin liquidum* dileburkan diatas *waterbath*. sambil diaduk hingga konstan, kemudian fase

minyak ditambahkan sedikit demi sedikit kedalam fase air dengan proses pengadukan homogenizer dengan kecepatan 200 rpm selama 15 menit agar tidak terbentuk gelembung-gelembung udara, kemudia jika fase sudah tercampur dengan baik, kecepatan dinaikan menjadi 650 rpm selama 10 menit agar terbentuk basis krim. Setelah terbentuk basis krim dimasukan zat aktif (ekstrak beras merah) sampai homogen. Krim yang sudah terbentuk di pindahkan ke dalam wadah penyimpanan.

1.5.3. Uji Evaluasi Fisik Sediaan Krim

1. Uji Organoleptik

   Uji organoleptis diamati secara langsung, meliputi warna, aroma, tekstur

2. Uji Homogenitas

   Dengan menggunakan *object glass*, sediaan dihimpit dengan dua *object glass* dengan memastikan bahwa sediaan sudah homogen dengan tidak adanya butiran kasar. Menurut Ida dan Noer, (2012) Syarat Homogenitas Krim adalah tidak terlihat adanya butiran kasar.

3. Uji pH

   Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter, dan pH sediaan disesuaikan dengan pH kulit yang berkisar antara 4,5-6,5. Pembacaan pada alat pH meter dilakukan setelah 5 menit untuk memastikan angka sudah stabil dan tidak bergerak lagi (Froelich *et al.,* 2017). berdasarkan SNI 16-4954-1998 rentang pH sediaan krim yang memenuhi syarat adalah 3,5 – 8.

4. Uji daya sebar

   Krim ekstrak beras merah ditimbang 1 gram dan diletakan ditengah kaca berskala. Sebelumnya ditimbang dahulu kaca yang lainnya dan diletakan kaca tersebut diatas krim lalu dibiarkan selama 1 menit. Kemudia diukur berapa diameter gel yang menyebar dengan mengambil Panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi, perlakuan yang sama diulang dengan tiap kali beban tambahan 10, 20, 50, 100, 200 mg. dicatat diameter krim yang menyebar selama 1 menit (Voight, 1994). Diameter daya sebar sediaan krim antara 5 cm-7 cm (Garg *et al.,* 2001).

5. Uji Viskositas

Dengan menggunakan alat viskometer (*LAMYRHEOLOGI FIRST TOUCH*) 15.04.T F016, krim dimasukan kedalam beaker glass kemudian diatur *spindle* dan kecepatan yang disesuaikan. Nilai Viskositas sediaan krim menurut SNI 16-4399-1996 berada pada kisaran 2000-5000 cP (*centipoise)*.

6. Uji Daya Lekat

Dilakukan dengan menimbang 1 gram sediaan *Body Cream* ekstrak beras merah pada kaca plat. Kedua plat ditempelkan sampai plat menyatu, diletakan dengan beban 1kg selama 5 menit, lalu diberi beban pelepasan 80g. waktu pelepasan dicatat sampai kedua plat saling lepas.

1.6. Standarisasi Ekstraksi

1.6.1. Parameter spesifik

1. Organoleptik

   Mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa

2. Penentuan kadar senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

   a. Kadar senyawa yang terlarut dalam air

   Sejumalah 2 gr ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 20 ml air-klorofom (air 1000 ml di campur dengan 10 ml kloroform), menggunakan labu bersumbat sambil dikocok pada 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18jam, kemudian di saring. Diuapkan 10 ml hasil saringan hingga kering dalam cawan penguap, residu dipanaskan pada suhu 105° C sampai bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen senyawa yang terlarut.

   $$\% \text{ kadar senyawa larut dalam air} = \frac{W2-W0}{W1} \times \frac{100}{10} \times 100\%$$

   Keterangan :

   W0 = berat cawan kosong

   W1 = bobot ekstrak awal

   W2 = berat cawan + hasil pengeringan

   b. Kadar senyawa yang terlarut dalam etanol

Sejumlah 1 gram ekstrak di maserasi selama 24 jam dengan 20 ml etanol 95% menggunakan labu tersumbat sambil sesekali dikocok pada 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam, kemudian disaring. Diuapkan 10ml filtrat hingga kering dalam cawan penguap, residu dipanaskan pada suhu 105˚C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air terhadap berat awal ekstrak pada ekstrak etanol (Departemen RI, 2000).

% kadar senyawa larut dalam etanol $= \frac{W2-W0}{W1} \times \frac{100}{10} \times 100\%$

Keterangan :

W0 = berat cawan kosong

W1 = bobot ekstrak awal

W2 = berat cawan + hasil pengeringan

1.6.2. Parameter Non Spesifik

1. Kadar air

   Menggunakan metode gravimetri. Sebanyak 1 gram ekstrak dalam cawan yang telah ditara. Dikeringkan pada suhu 105˚C selama 5 jam dan ditimbang.

   % Kadar Air $= \frac{W1-W2}{W1} \times 100\ \%$

   Keterangan :

   W1 = berat sebelum pengeringan

   W2 = berat akhir

2. Susut Pengeringan

   Ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak di dalam cawan yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105˚C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang ekstrak diratakan dengan bantuan batang pengaduk hingga membentuk lapisan setebal 5 sampai 10mm kemudian dikeringkan pada suhu 105˚C selama 30 menit, keluarkan lalu masukan kedalam desikator kemudian ditimbang. Ulangi perlakuan sampai bobot tetap.

$$\% \text{ Susut Pengeringan} = \frac{W1-(W2-W0)}{W1} \; x \; 100 \; \%$$

Keterangan :

W0 = berat cawan kosong

W1 = bobot awal ekstrak

W2 = berat cawan + hasil pengeringan

3. Kadar Abu Total

Sejumlah 2 gram ekstrak ditimbang dengan seksama dalam krus yang telah ditara, dipijarkan perlahan-lahan. Kemudian suhu di naikan secara bertahap hingga 600 ± 25°C sampai bebas karbon, selanjutnya didinginkan di desikator, serta ditimbang berat abu. Kadar abu dihitung dalam persen berat sampel awal.

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{(Bobot\ Abu+Kurs\ Kontan)-Kurs\ Kosong}{Berat\ Ekstrak} \; x \; 100 \; \%$$

Keterangan :

W0 = berat cawan kosong

W1 = berat ekstrak awal

W2 = berat cawan + ekstrak yang telah diabukan

1.7. Skrinning Fitokimia

Skirinning Fitokimia menurut (Harbone, 1987) meliputi :

a. Uji Alkaloid

Masing-masing tabung reaksi di isi 1 gr ekstrak, lalu ditambahkan dengan pereaksi dragendrof, mayer, dan Wagner. Terbentuknya warna jingga atau coklat dan terbentuk endapan putih menunjukan hasil uji positif untuk alkaloid.

b. Uji Flavonoid

Ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 0,2 gram logam Mg dan 2 tetes HCl, sehingga terbentuk warna jingga sampai merah. Hasil ini menunjukan uji positif flavonoid.

c. Uji Tanin

Uji fitokimia tannin dilakukan dengan penambahan larutan gelatin dalam ekstrak, apabila hasilnya positif ditunjukan dengan adanya endapan putih (Mabruroh, 2015). Sebanyak 3 ml ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 5 tetes larutan gelatin, jika terbentuk endapan putih maka positif mengandung tannin. (Kusumaningsih, 2015)

d. Uji Terpenoid dan Steroid

Ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan pereaksi Liberman-Burchard sehingga terbentuk warna merah atau violet. Hasil ini menunjukan hasil positif untuk steroid.

e. Uji Saponin

Ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi tambahkan 20 mL air didihkan, saring lalu filtrat dikocok dan didiamkan selama 15 menit. Terbentuknya busa menunjukan positif saponin.

1.8. Uji Aktivitas Antioksidan

1.8.1. Pembuatan larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dalam metanol p.a sampai tepat 100,0 mL (0,1 mM)

1.8.2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH 0,4 mM

Penentuan panjang gelombang (λ) dengan cara mengukur 4,0 mL larutan DPPH 0,1 mM pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517nm untuk mendapatkan absorbansi ± 0,2-0,8.

1.8.3. Pembuatan Larutan Blanko

Sebanyak 1 mL larutan DPPH 4,0 mL dan dimasukan dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambahkan dengan metanol sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit pada suhu 37^{o}C. kemudian diukur serapannya pada Panjang gelombang 517 nm (Rahmatika, 2017).

1.8.4. Pembuatan Larutan Vitamin C

Buat larutan Vitamin C dengan timbang sebanyak 5mg dan dimasukan kedalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan aquadest sampai tanda batas, sehingga didapat larutan vitamin C dengan konsentrasi 50 µg/mL. lalu dari larutan induk 50 µg/mL dibuat variasi konsentrasi 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL dan 1 µg/mL. dengan cara pipet larutan induk sebanyak 4 mL, 2 mL, 1 mL, dan 0,5 mL.

1.8.5. Pembuatan Larutan Ekstrak Beras Merah

Larutan induk dengan konsentrasi 200 µg/mL dibuat dengan cara ditimbang ekstrak etanol beras merah sebanyak 20 mg dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai diaduk hingga homogen lalu dicukupkan volumenya hingga 100 mL. selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL dan 100 µg/mL.

1.8.6. Uji aktivitas Antioksidan Ekstrak Beras Merah

Pengujian dilakukan dengan cara pipet larutan induk sebanyak 2 mL masing-masing konsentrasi ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Lalu diamkan pada suhu ruang dan gelap. Lalu ukur dengan menggunakan spektro UV-Vis dengan perlakuan berulang yang sama 3x.

1.8.7. Perhitungan Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} dihitung dari kurva regresi linier antara % penghambatan serapan dengan berbagai konsentrasi (larutan uji). Pengukuran IC_{50} dilakukan dengan menggunakan rumus (Boughendjioua, 2017):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{Ab - As}{Ab} \times 100\%$$

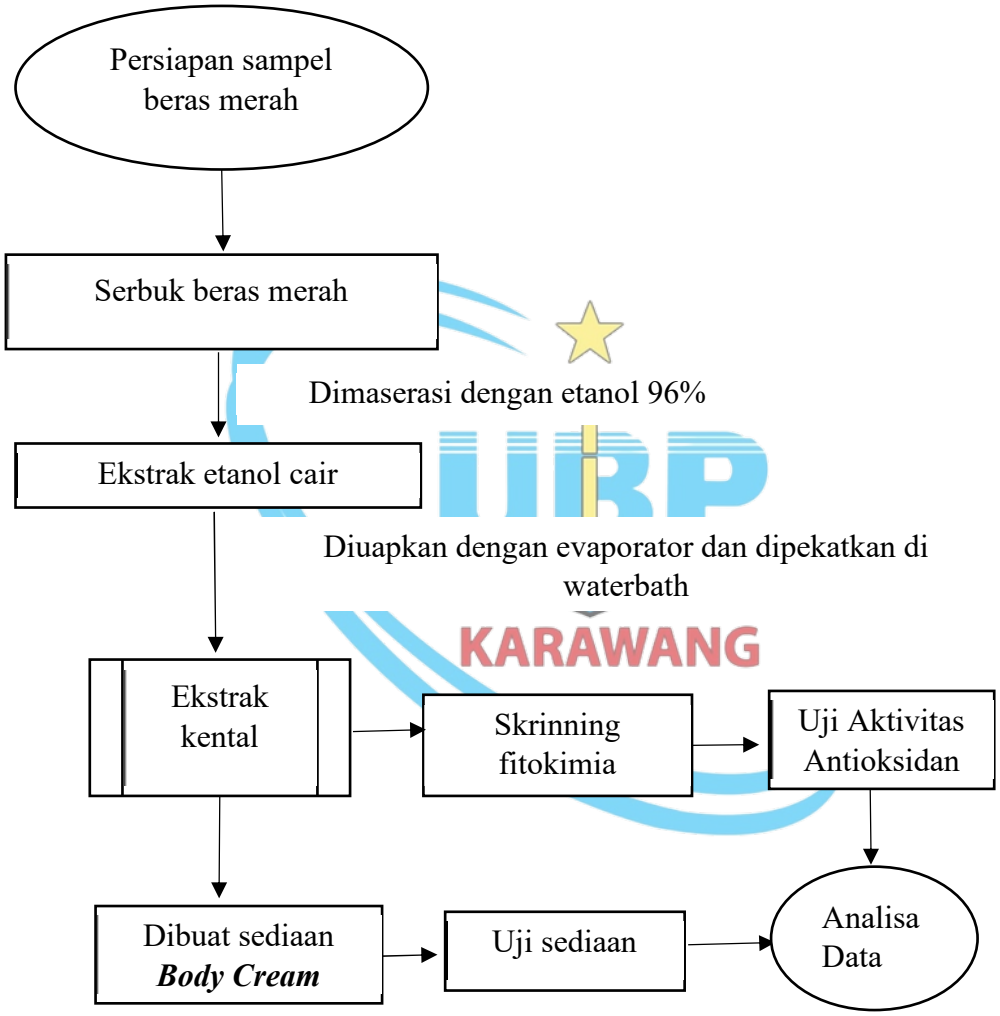
Ab = Nilai absorbansi blanko

As = Nilai absorbansi sampel

Konsentrasi sampel dan % inhibisi diplotkan masing – masing pada sumbu x dan y untuk mendapatkan persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC_{50}. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi efektif yang dibutuhkan untuk mereduksi 50% dari total DPPH. Dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan nilai 50 sebagai sumbu y (Tristiantini *et al.,* 2013).

1.9. Diagram Alir

Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian



1.10. Analisa Data

Data dianalisis secara statistik menggunakan program pengolah data statistik SPSS dengan Uji ANOVA. Bertujuan untuk melihat hasil optimal sediaan *Body cream* dari 3 formulasi yang berbeda.