

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian akan dilakukan dengan metode eksperimental untuk dapat mengetahui adanya aktivitas antioksidan dalam sediaan sabun mandi cair ekstrak bunga telang secara in vitro dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil).

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan konsentrasi 5 %, 10 %, 15 % pada pembuatan sabun mandi cair.

4.2.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah hasil % inhibisi dengan menggunakan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) pada sediaan sabun mandi cair.

4.3 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu :

- Sabun mandi cair adalah sediaan pembersih kulit berbentuk cair yang dibuat dari bahan dasar sabun atau deterjen dengan penambahan bahan lain yang diijinkan dan digunakan untuk mandi tanpa menimbulkan iritasi pada kulit. (SNI, 1996).
- Sabun mandi cair ekstrak bunga telang adalah sediaan cair (*liquid*) yang berupa sabun cair yang menggunakan surfaktan *cocomide dea* dan *Sodium Lauret Eter Sulfat* (SLES) sebagai basis serta bahan tambahan lainnya dalam formula dengan penambahan bahan aktif ekstrak bunga telang sebagai antibakteri, antioksidan dan anti iritasi.
- Dilakukan pengujian antioksidan pada ekstrak etanol bunga telang dan sediaan sabun mandi cair, serta uji stabilitas dengan metode DPPH.

4.4 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi, Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan mulai pada bulan November 2023 sampai dengan bulan April 2026.

4.5 Bahan

a. Bahan Pembuatan Sabun

Bahan yang digunakan untuk pembuatan sediaan sabun mandi cair meliputi: Ekstrak bunga telang, *Sodium Lauret Eter Sulfat* (Texapon), CMC-Na (Nurra Gemilang Lab), Cocamide DEA (Nurra Gemilang Lab), gliserin (Onemed), NaCl (Merck), Sodium metabisulfite (Nurra Gemilang Lab), Natrium EDTA (Nurra Gemilang Lab), dan Aquadest (Hydrobatt).

a. Bahan Pengujian Antioksidan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian sediaan sabun mandi cair sebagai berikut : Ekstrak bunga telang, vitamin C (Merck), sediaan sabun mandi cair (F0, F1, F2, F3), DPPH (Smart Lab), methanol pro analisis (Nurra Gemilang Lab), Aquadest (Hydrobatt).

4.6 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian sediaan sabun mandi cair meliputi: Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV-1280), kuvet (Hellma), beaker glass (Herma), aluminium foil (Cling Wrap), botol timbang kaca hitam (Nurra Gemilang Lab), corong (Herma), pipet tetes (Nurra Gemilang Lab), labu ukur (Pyrex), neraca analitik (Mettler Toledo), pipet volume (Pyrex), batang pengaduk (Nurra Gemilang Lab), sendok stainless (Nurra Gemilang Lab), kaca arloji (Nurra Gemilang Lab).

4.7 Rancangan Formula Pembuatan Sabun Mandi Cair

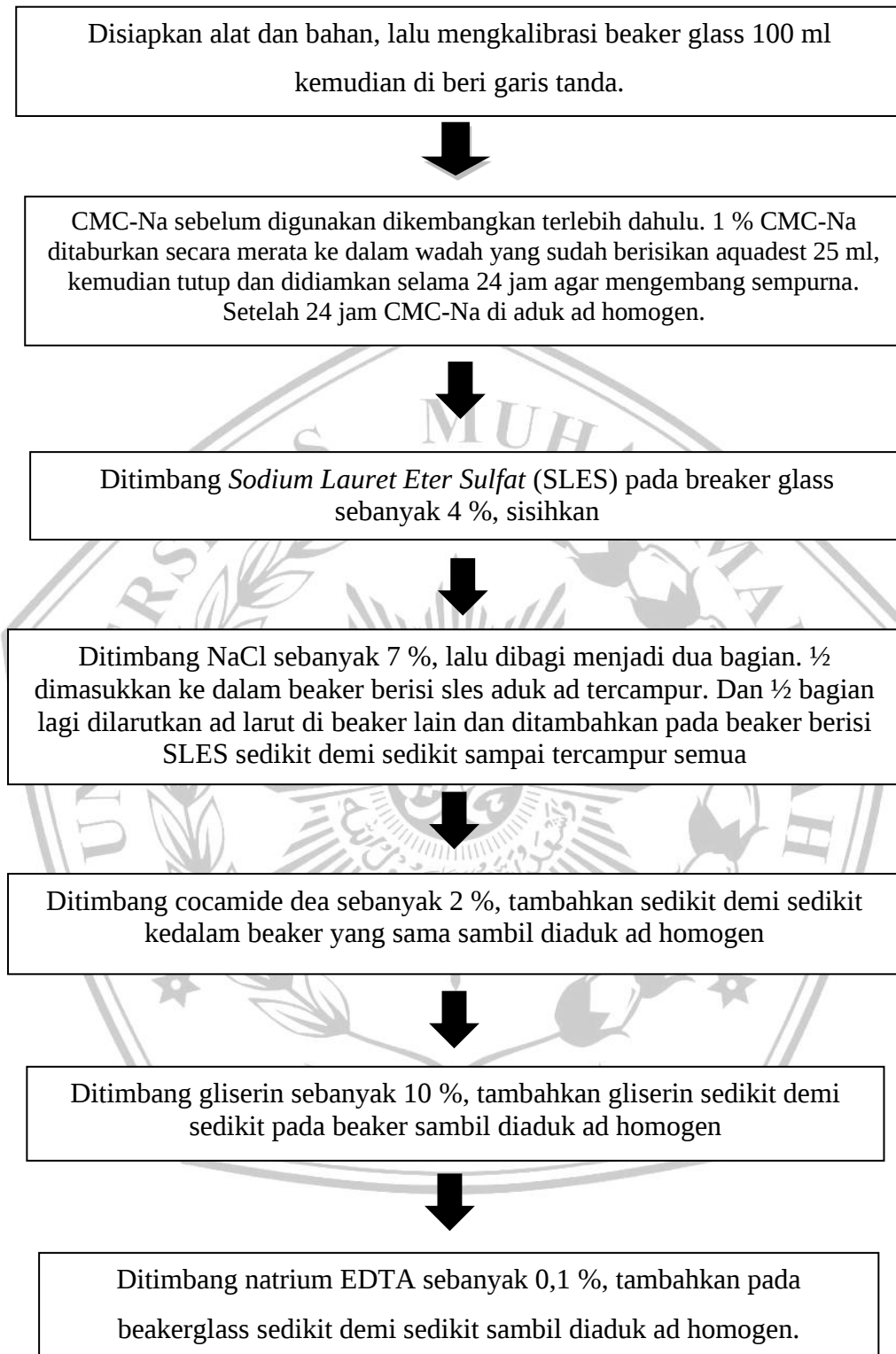
Pada penelitian ini terdapat 3 formula sabun mandi cair yang mengandung ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan berbagai jumlah konsentrasi yang berbeda dan satu formula sebagai kontrol negatif. Formula sabun mandi cair ekstrak bunga telang sebagai antioksidan dapat dilihat pada:

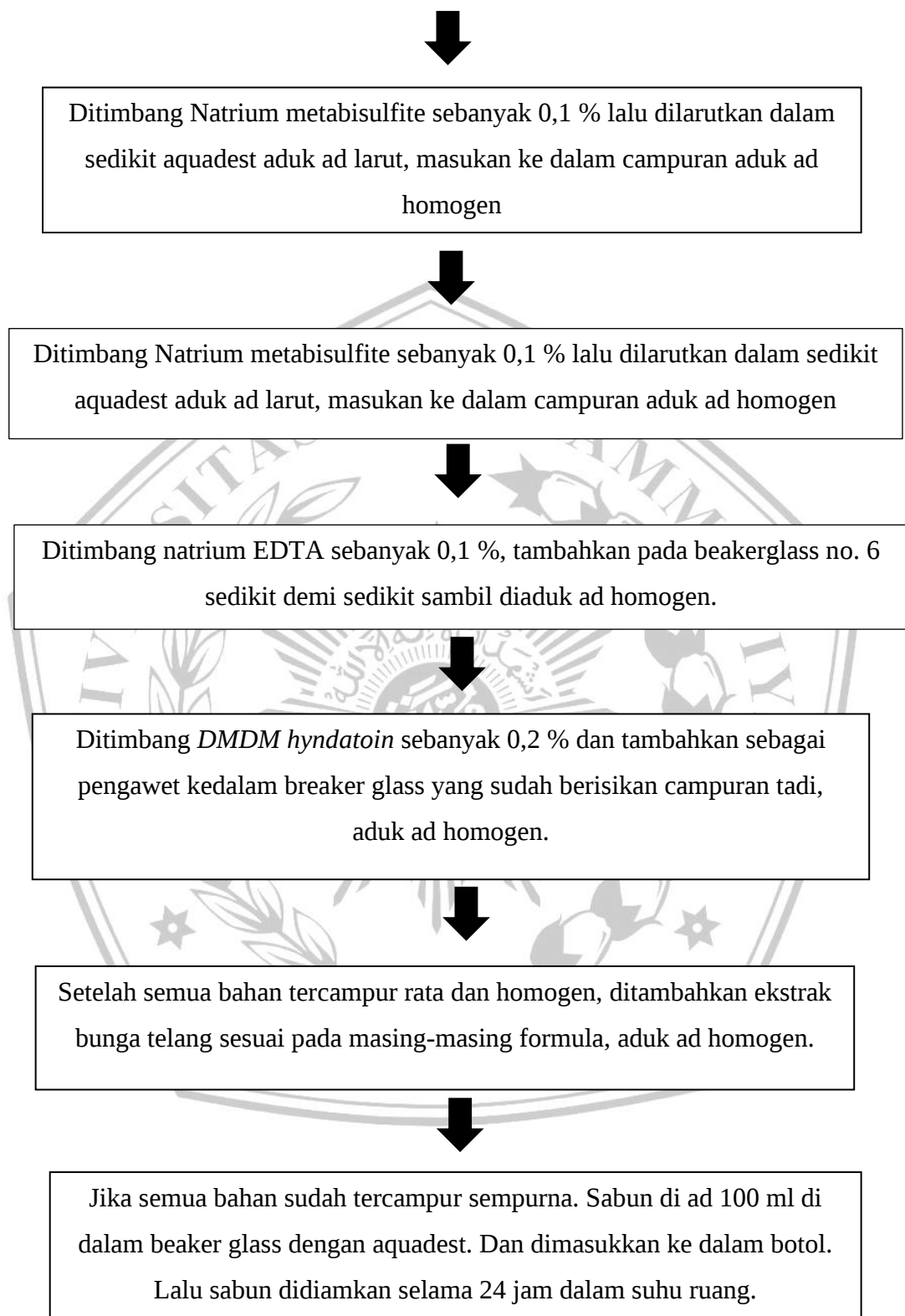
Tabel IV. 1. Formulasi Sabun Mandi Cair Ekstrak Bunga Telang

Bahan	Fungsi	Komposisi (% b/v)			
		F0	F1	F2	F3
Ekstrak bunga telang	Bahan aktif	0	5	10	15
Cocamide DEA	Basis / surfaktan	2	2	2	2
Sodium Lauret Eter Sulfat	Basis / surfaktan	4	4	4	4
NaCl	Pengental	7	7	7	7
CMC-Na	Pengental	1	1	1	1
Gliserin	humektan	10	10	10	10
DMDM hydantion	Pengawet	0,2	0,2	0,2	0,2
Natrium-EDTA	Chelating agent	0,1	0,1	0,1	0,1
Natrium metabisulfit	Antioksidan	0,1	0,1	0,1	0,1
Aquadest	Pelarut	Ad	Ad	Ad	Ad
		100ml	100ml	100ml	100ml

4.8 Metode Kerja

Tahap pertama dari penelitian ini adalah melakukan pembuatan sabun mandi cair surfaktan *cocomide dea* 2% dan *Sodium Lauret Eter Sulfat* 4% yang mengandung ekstrak bunga telang dengan kadar yang berbeda. Terdapat 4 formula sabun mandi cair yang mengandung ekstrak bunga telang dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Terdiri kontrol negatif yang tidak mengandung ekstrak bunga telang, Pada Formula 1 mengandung ekstrak bunga telang sebanyak 5 %, Formula 2 mengandung ekstrak bunga telang sebanyak 10 %, dan Formula 3 mengandung ekstrak bunga telang sebanyak 15 %.

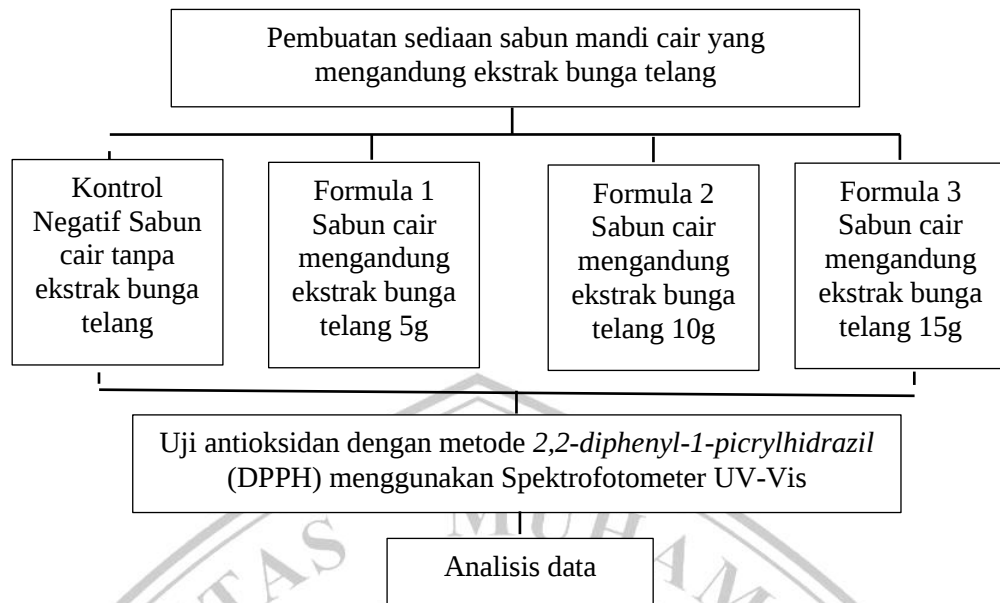
Alur kerja penelitian:



Gambar 4. 1 Alur Kerja Penelitian

Untuk proses pembuatan sabun dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Disiapkan alat dan bahan, lalu mengkalibrasi beaker glass 100 ml kemudian di beri garis tanda.
2. CMC-Na sebelum digunakan dikembangkan terlebih dahulu. 1% CMC-Na ditaburkan secara merata ke dalam wadah yang sudah berisikan aquadest 25 ml, kemudian tutup dan didiamkan selama 24 jam agar mengembang sempurna. Setelah 24 jam CMC-Na di aduk ad homogen.
3. Ditimbang *Sodium Lauret Eter Sulfat* (SLES) pada breaker glass sebanyak 4 %, sisihkan.
4. Ditimbang NaCl sebanyak 7 %, lalu dibagi menjadi dua bagian. $\frac{1}{2}$ dimasukkan ke dalam beaker berisi sles aduk ad tercampur. Dan $\frac{1}{2}$ bagian lagi dilarutkan ad larut dan ditambahkan pada beaker no. 3 sedikit demi sedikit sampai tercampur semua.
5. Ditimbang cocamide dea sebanyak 2 %, tambahkan sedikit demi sedikit kedalam no.4 sambil diaduk ad homogen,
6. Ditimbang gliserin sebanyak 10 %, tambahkan gliserin sedikit demi sedikit pada beaker no 5 sambil diaduk ad homogen.
7. Ditimbang natrium EDTA sebanyak 0,1 %, tambahkan pada beakerglass no. 6 sedikit demi sedikit sambil diaduk ad homogen.
8. Ditimbang Natrium metabisulfite sebanyak 0,1 % lalu dilarutkan dalam sedikit aquadest aduk ad larut, masukan ke dalam campuran aduk ad homogen
9. Ditimbang *DMDM hyndatoin* sebanyak 0,2 % dan tambahkan sebagai pengawet kedalam breaker glass yang sudah berisikan campuran tadi, aduk ad homogen.
10. Setelah semua bahan tercampur rata dan homogen, ditambahkan ekstrak bunga telang sesuai pada masing-masing formula, aduk ad homogen.
11. Jika semua bahan sudah tercampur sempurna. Sabun di ad 100 ml di dalam beaker glass dengan aquadest. Dan dimasukkan ke dalam botol. Lalu sabun didiamkan selama 24 jam dalam suhu ruang.



Gambar 4. 2 Skema Kerja Penelitian

4.9 Spesifikasi Sediaan

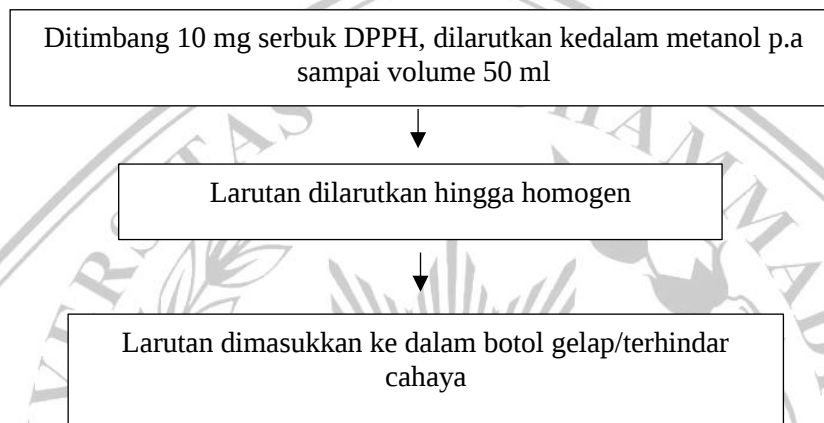
Tabel IV. 2. Spesifikasi Sediaan

Spesifikasi Sediaan	Karakteristik Sediaan
Organoleptis	Warna : biru tua Bau : khas Tekstur : cair agak kental, licin
Homogenitas	Homogen
pH	4 – 7 (4-10 SNI 4085:2017 Sabun Mandi Cair)
Viskositas	40 – 4000 Cps
Tinggi busa	60 – 100 %
Bobot jenis	1.01 – 1.1 g/mL
Stabilitas	Stabil

4.10 Uji antioksidan dengan metode DPPH dengan Spektrofotometer UV-Vis

4.10.1 Pembuatan Larutan (DPPH 200 ppm)

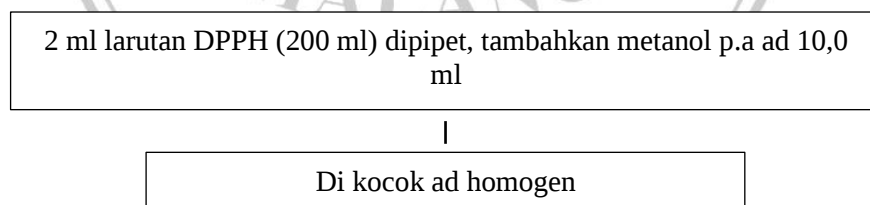
Dilakukan uji aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas metode DPPH. Pembuatan larutan DPPH dilakukan dengan cara menimbang 10 mg serbuk DPPH yang selanjutnya dilarutkan dengan metanol p.a sampai mencapai volume 50,0 ml. Dimasukkan larutan tersebut kedalam botol gelap atau vial. Proses pembuatan larutan DPPH 200 ppm dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4. 3 Pembuatan Larutan DPPH

4.10.2 Pembuatan Larutan Blanko (DPPH 40 ppm)

Dipipet 2 ml larutan DPPH 200 ppm, dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 ml dan ditambahkan dengan menggunakan metanol p.a ad 10,0 ml, selanjutnya tinggal dikocok sampai homogen. Proses pembuatan larutan blanko dapat dilihat pada gambar 4.4



Gambar 4. 4 Cara Pembuatan Larutan Blangko

4.10.3 Pembuatan Larutan Kontrol Positif (Vitamin C)

a. Pembuatan Baku Induk I 400 ppm

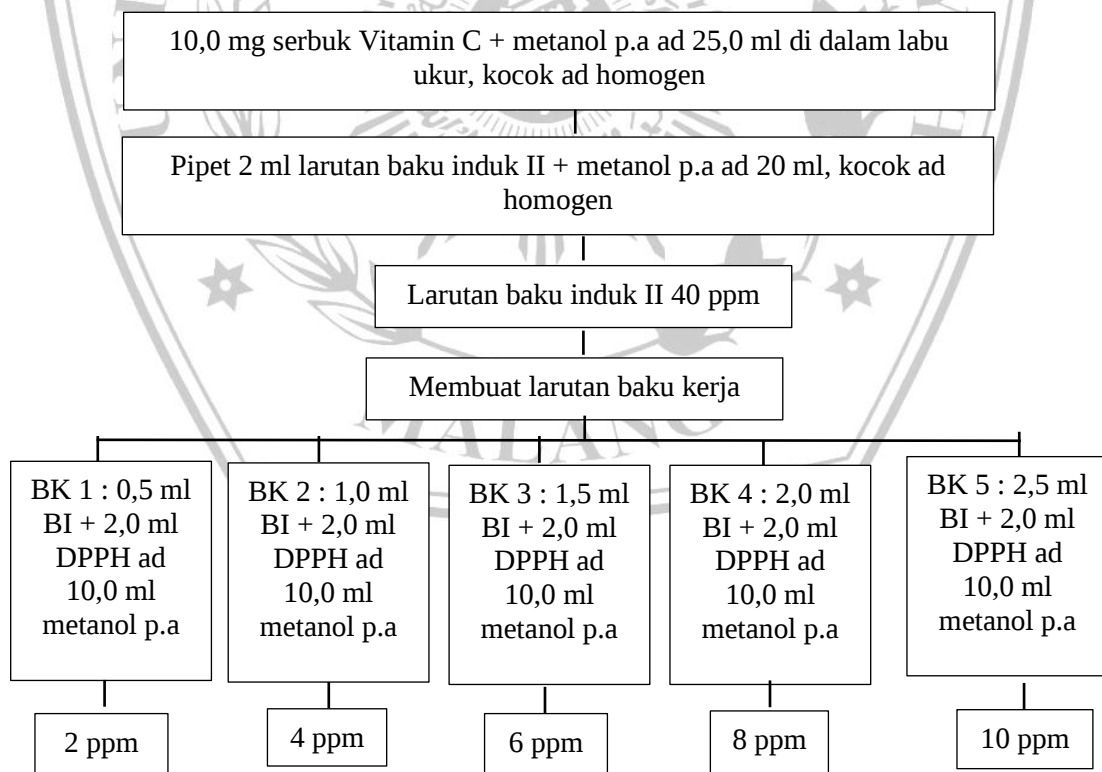
Larutan baku induk Vitamin C konsentrasi 400 ppm dibuat dengan cara menimbang serbuk Vitamin C sebanyak 10 mg secara kuantitatif, lalu dilanjutkan dengan dilarutkan dalam metanol p.a hingga volume 25,0 ml dengan menggunakan labu ukur, lalu dikocok sampai homogen.

b. Pembuatan baku induk II 40 ppm

Larutan baku induk I Vitamin C konsentrasi 400 ppm dipipet sebanyak 2 ml, lalu dilarutkan dalam metanol p.a hingga volume 20 ml dengan menggunakan labu ukur, lalu dikocok sampai homogen.

c. Pembuatan Larutan Baku Kerja

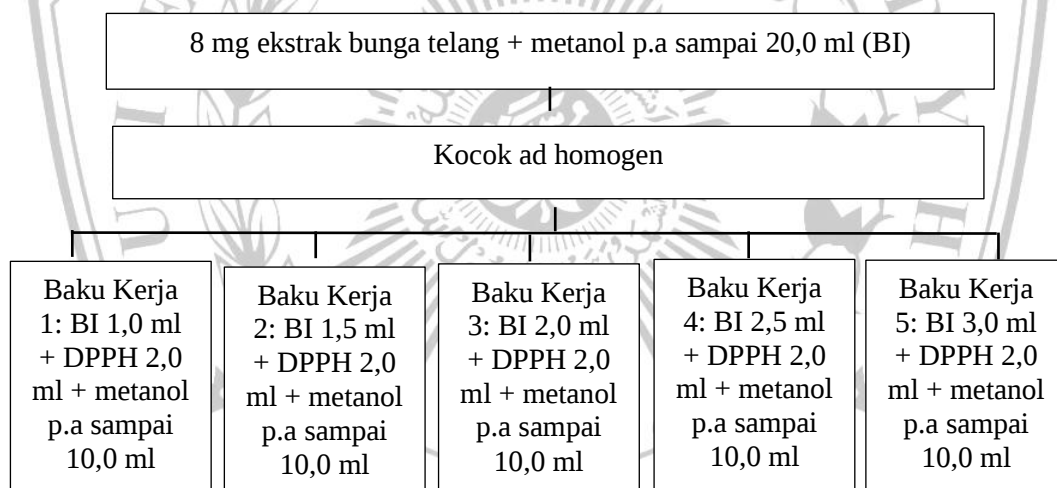
1. BK 1 : 0,5 ml BI II + 2,0 ml DPPH ad 10,0 ml metanol p.a = 2 ppm
2. BK 2 : 1,0 ml BI II + 2,0 ml DPPH ad 10,0 ml metanol p.a = 4 ppm
3. BK 3 : 1,5 ml BI II + 2,0 ml DPPH ad 10,0 ml metanol p.a = 6 ppm
4. BK 4 : 2,0 ml BI II + 2,0 ml DPPH ad 10,0 ml metanol p.a = 8 ppm
5. BK 5 : 2,5 ml BI II + 2,0 ml DPPH ad 10,0 ml metanol p.a = 10 ppm



Gambar 4. 5 Cara Pembuatan Larutan Kontrol Positif

4.10.4 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Bunga Telang

- a. Baku Induk : Ditimbang ekstrak bunga telang 8 mg ditambah metanol p.a sampai 20,0 ml (400 ppm)
- b. Pembuatan Baku Kerja :
 1. Baku Kerja 1 : dipipet 1,0 ml BI + DPPH 2,0 ml + metanol p.a sampai 10,0 ml = 40 ppm
 2. Baku Kerja 2 : dipipet 1,5 ml BI + DPPH 2,0 ml + metanol p.a sampai 10,0 ml = 60 ppm
 3. Baku Kerja 3 : dipipet 2,0 ml BI + DPPH 2,0 ml + metanol p.a sampai 10,0 ml = 80 ppm
 4. Baku Kerja 4 : dipipet 2,5 ml BI + DPPH 2,0 ml + metanol p.a sampai 10,0 ml = 100 ppm
 5. Baku Kerja 5 : dipipet 3,0 ml BI + DPPH 2,0 ml + metanol p.a sampai 10,0 ml = 120 ppm

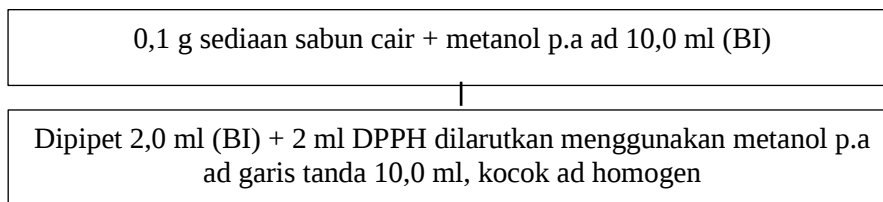


Gambar 4. 6 Cara Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Bunga Telan

4.10.5 Pembuatan Larutan Uji Sabun Cair Ekstrak Bunga Telang

- a. Pembuatan Baku Induk (10.000 ppm)
 1. Ditimbang 0,1 gram sediaan sabun cair ekstrak bunga telang secara kuantitatif
 2. Dilarutkan dalam metanol p.a ad 10,0 ml pada beaker glass, jika sudah larut tuang ke dalam labu ukur dan dikocok, (diperoleh larutan baku induk 10.000 ppm).

3. Dipipet larutan baku induk sebanyak 2,0 ml, ditambahkan 2 ml DPPH dan ditambahkan dengan menggunakan metanol p.a ad 10,0 ml (diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 2000 ppm)



Gambar 4. 7 Cara Pembuatan Larutan Uji Sabun Mandi Cair Ekstrak Bunga Telang

4.10.6 Proses Inkubasi

Pengukuran aktivitas antioksidan dimulai dengan menginkubasi larutan sampel, blanko (etanol), dan kontrol positif selama 30 menit pada suhu 37°C (Notariza & Krisnamurti, 2017).

4.10.7 Pengujian Uji Stabilitas

Pengujian *freeze-thaw* (beku-cair) merupakan teknik pengujian stabilitas yang dipercepat dengan cara ditempatkan sampel produk (seperti kosmetik atau obat-obatan) pada variasi suhu yang ekstrem antara dingin dan panas dalam beberapa siklus. Tujuannya adalah untuk menjamin bahwa produk tidak terpisah, tidak berubah teksturnya, atau tidak mengalami kerusakan selama proses pengiriman dan penyimpanan.

Pengujian uji stabilitas menggunakan metode *Freeze-thaw* dilaksanakan dengan menyimpan sediaan pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Setelah itu, sediaan dipindahkan ke oven dengan suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 jam, dan periode ini dihitung sebagai 1 siklus. Proses ini berlangsung selama 6 siklus atau 12 hari.

4.10.8 Pengukuran Absorbansi

Setelah waktu inkubasi berlalu, langkah selanjutnya adalah pengukuran proses absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis. Pengujian pada antioksidan menggunakan metode DPPH digunakan mengamati kemungkinan terjadinya perubahan warna setiap sampel setelah diinkubasi. Jika elektron dalam sampel dapat membentuk pasangan dengan elektron DPPH maka perubahan warna akan terjadi, yaitu yang awalnya berwarna ungu tua, kemudian berubah warna menjadi kuning teran. Sampel kemudian diukur nilai absorbansi dengan menggunakan

spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm (Tristantini et al., 2016).

4.11 Perhitungan absorbansi dan IC₅₀

Perhitungan persentase hambatan atau inhibisi dapat dihitung dengan dengan rumus:

$$\frac{\text{Absorban DPPH} - \text{Absorban Sampel}}{\text{Absorban DPPH}} \times 100\%$$

Rumus perhitungan IC₅₀:

$$y = bx + a$$

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

Untuk melihat adanya antioksidan pada suatu sampel yang dapat menangkalkan radikal bebas dari metode DPPH dinamai dengan IC₅₀. Pengertian dari IC₅₀ adalah konsentrasi yang dapat meredam 50% radikal bebas DPPH. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan kelompok sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, kelompok kuat IC₅₀ antara 50-100 ppm, kelompok sedang jika nilai IC₅₀ 101-150 ppm, dan kelompok lemah jika nilai IC₅₀ antara 150-200 ppm (Widyasanti et al., 2016). Nilai IC₅₀ (50% *Inhibition Concentration*) jika makin kecil maka makin tinggi aktivitas penangkapan radikal bebasnya karena dapat diibaratkan dengan konsentrasi kecil sudah dapat menghambat aktivitas dari radikal bebas DPPH sebanyak 50% (Ikhwanda et al., 2015)

4.12 Analisis Data

Data yang telah diperoleh nantinya akan dilakukan dianalisis dengan uji ANOVA *one-way* dan uji lanjutan menggunakan HSD dengan tingkat kesalahan yang digunakan adalah 0,05%. Dan melihat nilai yang diperoleh menunjukkan perbedaan yang bermakna atau tidak. Uji *Tukey's Honest Significant Difference* (HSD) adalah metode statistik yang digunakan untuk menilai signifikansi perbedaan antara pasangan rata-rata kelompok. Setelah uji ini dapat dilanjut dengan uji *paired t-test* untuk menguji sediaan yang telah melalui pengujian stabilitas (*Freeze Thaw*). Pengujian *paired t-test* bertujuan untuk menguji perbedaan sebelum dan setelah dilakukan uji stabilitas pada sediaan sabun mandi cair bunga telang. Jika nilai sig. < 0,05 dari derajat kepercayaan ($\alpha = 0,05$) menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan atau perbedaan yang bermakna. Selain HSD terdapat uji lainnya seperti:

1. Uji Duncan (DMRT - *Duncan Multiple Range Test*): Sering digunakan di bidang pertanian dan ilmu lingkungan, terutama jika koefisien keragaman (KK) besar ($> 10\%$).
2. Uji LSD/BNT (*Least Significant Difference/Beda Nyata Terkecil*): Salah satu uji yang paling umum digunakan, sering kali dipilih ketika peneliti membutuhkan uji yang lebih sensitif daripada HSD.
3. Uji Bonferroni: Sering digunakan sebagai pembanding uji Tukey HSD, terutama untuk mengontrol tingkat kesalahan tipe I secara keseluruhan.
4. Uji Scheffe: Sering digunakan untuk perbandingan pasangan yang lebih kompleks atau ketika ukuran sampel tidak seimbang.
5. Uji Dunnett: Digunakan khusus ketika membandingkan beberapa kelompok perlakuan terhadap satu kelompok kontrol.
6. Uji Mann-Whitney U/Wilcoxon: Uji non-parametrik yang digunakan jika data tidak berdistribusi normal, yang mana uji HSD atau uji parametrik lainnya tidak bisa diterapkan (Agbangba et al., 2024)

