

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metodologi penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mendapatkan data aktivitas antioksidan pada sediaan emulgel *Ceramide* dengan minyak jagung (*Zea mays L.*) menggunakan metode DPPH (2,2 *diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *Polyacrylate Crosspolymer-6* digunakan sebagai *gelling agent* dengan perbedaan variasi konsentrasi 0,5%; 0,75%; dan 1%.

4.2.2 Variabel Tergantung

Variabel Tergantung pada penelitian ini adalah % inhibisi hasil pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2 *diphenyl-1-picrylhydrazyl*) pada sediaan emulgel *Ceramide* dan minyak jagung (*Zea mays L.*). Parameter yang diukur meliputi % inhibisi aktivitas antioksidan dalam emulgel. Kemudian dilakukan analisis data SPSS one way ANOVA. Langkah pertama dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* terlebih dahulu, jika hasil terdistribusi dengan normal maka dilanjutkan uji *one way ANOVA* dan uji *turkey honestly signifikan difference* (HSD). Sebaliknya, jika data tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji non-parametrik yaitu uji *Kruskal-wallis*.

4.3 Definisi Operasional

1. Uji aktivitas antioksidan dilakukan untuk menilai kemampuan suatu zat dalam menangkal atau meredam radikal bebas. Pada penelitian ini aktivitas antioksidan diukur dengan metode DPPH (2,2 *diphenyl-1-picrylhydrazyl*) menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Pengujian dengan DPPH untuk mengukur aktivitas antioksidan berdasarkan perubahan warna akibat reduksi radikal bebas

2. *Ceramide* dalam penelitian ini *Ceramide* digunakan sebagai bahan aktif dalam formulasi emulgel untuk meningkatkan hidrasi kulit sekaligus mendukung afektivitas antioksidan dari minyak jagung (*Zea mays L.*).
3. Minyak jagung (*Zea mays L.*) yang berpotensi mengandung senyawa antioksidan alami. Dalam penelitian ini, minyak jagung digunakan sebagai bahan aktif yang berpotensi memberikan efek perlindungan terhadap radikal bebas.
4. Emulgel adalah sediaan semi padat m/a atau a/m yang bertujuan untuk meningkatkan stabilitas dan efektivitas bahan aktif. Pada penelitian ini dibuat dengan menggabungkan fase minyak dari bahan aktif yaitu *Ceramide* dan minyak jagung (*Zea mays L.*) dan fase air kemudian dicampur dengan *gelling agent Polyacrylate Crosspolymer-6*.
5. Variasi konsentrasi 0,5%; 0,75%; dan 1% *Polyacrylate Crosspolymer-6* sebagai *gelling agent* digunakan dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap karakteristik, stabilitas, dan aktivitas antioksidan sediaan.

4.4 Tempat dan waktu penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Pada penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Terpadu II Progam Studi Farmasi Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan mulai dari bulan April 2025 sampai dengan bulan juli 2025.

4.5 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi pembuatan emulgel *Ceramide* dan minyak jagung yaitu beaker glass, pipet tetes, kertas perkamen, batang pengaduk, sudip, sendok tanduk, pipet ukur, cawan porselin, timbangan analitik, dan *homogenizer*. Adapun alat uji aktivitas antioksidan terdiri dari vortex, kuvet, labu ukur, pipet volume dan spektrofotometer UV-Vis.

4.6 Bahan Penelitian

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini meliputi *Ceramide water-soluble (cosmetic grade)*, Minyak Jagung (*Zea mays L.*), *polyacrylate*

crosspolymer-6, *cremophor*, *Na EDTA*, *Propilen glikol*, *Phenoxyethanol*, *Aquadest*, *DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl)*, *Chlorofom* pro analisis (*Merck*), dan metanol pro analisis (*Smart Lab*).

4.7 Formulasi Emulgel

Tabel IV.1. Rancangan Formulasi Sediaan Emulgel

Bahan	Kegunaan	Formula % b/v		
		F1	F2	F3
<i>Ceramide</i>	Zat Aktif	1,5	1,5	1,5
Minyak Jagung (<i>Zea mays L.</i>)	Zat aktif (Emollient)	15	15	15
<i>Propilen Glikol</i>	Humektan, penetration, & Enhancer	22,5	22,5	22,5
<i>Cremophor</i>	Emulgator	15	15	15
<i>Phenoxyethanol</i>	Pengawet	0,75	0,75	0,75
<i>polyacrylate crosspolymer-6</i>	Gelling Agent	0,75	1,125	1,5
<i>Na EDTA</i>	Chelating Agent	0,15	0,15	0,15
<i>Aquadest</i>	Pelarut	Ad 150	Ad 150	Ad 150

4.8 Prosedur dan Skema Prosedur

4.8.1. Prosedur

Pada tahap pertama diawali dengan pembuatan fase air, disiapkan terlebih dahulu aquadest. Selanjutnya masukkan bahan-bahan seperti *Ceramide*, *propilen glikol*, *Na EDTA*, *phenoxyethanol* ke dalam beaker glass. Campurkan dengan aquadest menggunakan *magnetic stirrer* hingga seluruh komponen larut ad homogen. Setelah larutan fase air terbentuk, campuran tersebut dibagi menjadi dua bagian yaitu satu bagian yang akan digunakan dalam pembuatan basis gel dan bagian lainnya untuk proses pembuatan emulsi.

Pada tahap kedua pembuatan basis gel, bagian fase air yang telah disiapkan sebelumnya sebagai dasar. kemudian *polyacrylate crosspolymer-6* ditambahkan secara perlahan sambil terus diaduk agar tercampur dengan baik. Setelah penambahan selesai, campuran tersebut dibiarkan selama 15 hingga 30 menit hingga terbentuk massa gel. Selanjutnya gel diaduk lagi secara perlahan hingga basis gel stabil dan homogen.

Sementara itu, proses pencampuran fase minyak diawali dengan menyiapkan bahan yang akan dicampur meliputi minyak jagung (*Zea mays L.*), dan kremofor kedalam beaker glass. Fase minyak di aduk terlebih dahulu menggunakan *homogenizer* untuk memastikan pencampuran optimal. Kemudian sisa fase air dicampurkan sedikit demi sedikit sambil terus diaduk menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 5000 rpm selama 60 menit hingga terbentuk masa emulsi. Setelah masa emulsi terbentuk masukkan basis gel secara bertahap sambil terus diaduk agar tercampur merata hingga terbentuk massa emulgel. Langkah akhir cek pH sediaan dengan rentang 4,5 hingga 6,5. Masukkan sediaan emulgel pada wadah penyimpanan.

4.8.2. Skema Kerja

a. Pembuatan fase air

Siapkan terlebih dahulu aquadest, kemudian campurkan *Ceramide*, *propilen glikol*, *Na EDTA*, *Phenoxyethanol* kedalam beaker glass aduk dengan *magnetic stirer* ad larut

Setelah larut, pisahkan campuran ini menjadi 2 bagian
(digunakan untuk campuran gel dan emulsi)

b. Pembuatan basis gel

Diambil bagian fase air yang akan digunakan untuk basis gel, kemudian tambahkan *polyacrylate crosspolymer-6* secara perlahan sambil diaduk ad tercampur rata

Kemudian diamkan terlebih dahulu 15-30 menit ad membentuk massa gel

Aduk kembali hingga gel stabil dan homogen

c. Pembuatan fase minyak dan emulsi

Siapkan fase minyak yaitu minyak jagung (*Zea Mays L.*), dan *Cremophor* kedalam beaker glass

Aduk terlebih dahulu fase minyak menggunakan *homogonizer*

Kemudian tambahkan sisa dari fase air yang digunakan untuk pembuatan emulsi, tambahkan sedikit demi sedikit sambal diaduk dengan *homogenizer* dengan kecepatan 5000 rpm selama 60 menit ad terbentuk massa emulsi

Setelah itu, masukkan basis gel sedikit demi sedikit ad homogen dan terbentuk emulgel stabil

Cek PH sediaan pada rentang 4,5-6,5. Lalu masukkan sediaan ke dalam wadah emulgel

4.9 Uji aktivitas antioksidan sediaan emulgel *Ceramide* dan minyak jagung (*Zea mays L.*) dengan menggunakan metode DPPH

4.9.1. Pembuatan Larutan DPPH 160 ppm

Pembuatan larutan DPPH dengan konsentrasi 160 ppm dibuat dengan cara menimbang serbuk DPPH sebanyak 8,0 mg dan dilarutkan dalam labu ukur 50,0 mL *Chlorofom* pro analisis (pelarut uji vitamin E dan minyak jagung (*Zea mays L.*)) dan *Methanol* pro analisis (pelarut uji *Ceramide* dan sediaan Emulgel). Setelah larutan terbentuk, kemudian hasilnya disimpan di ruangan gelap dan dilapisi dengan aluminium foil untuk menghindari paparan cahaya yang dapat mempengaruhi stabilitasnya.

4.9.2. Pembuatan Larutan Kontrol DPPH (Larutan Blanko 32 ppm)

Pembuatan larutan kontrol DPPH dilakukan dengan memipet sebanyak 2,0 mL larutan DPPH (160 ppm), kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Selanjutnya larutan tersebut diencerkan dengan *Chlorofom* pro analisis (pelarut uji vitamin E dan minyak jagung (*Zea mays L.*)) dan *Methanol* pro analisis (pelarut uji *Ceramide* dan sediaan Emulgel) hingga mencapai garis tanda pada labu ukur sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi yang sesuai.

4.9.3. Pembuatan Larutan Vitamin E

1. Pembuatan Larutan Baku Induk 1 (1000 ppm)

Larutan kontrol postif dibuat dengan menimbang sebanyak 25,0 mg vitamin E, kemudian dilarutkan dalam labu ukur 25,0 mL tambahkan *Chlorofom* pro analisis hingga garis tanda. Larutan tersebut dikocok, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm (BI 1).

2. Pembuatan Larutan Baku induk 2 (100 ppm)

Larutan baku induk 1 dipipet sebanyak 1,0 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Kemudian diencerkan dengan *Chlorofom* pro analisis ad garis tanda batas labu ukur dan diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm (BI 2).

3. Pembuatan Larutan Baku kerja

- BK 1 : dipipet 0,2 mL dari BI 2 + 2,0 mL larutan DPPH + *Chlorofom* p.a ad 10,0 mL (konsentrasi 2 ppm)
- BK 2 : dipipet 0,4 mL dari BI 2 + 2,0 mL larutan DPPH + *Chlorofom* p.a ad 10,0 mL (konsentrasi 4 ppm)
- BK 3 : dipipet 0,6 mL dari BI 2 + 2,0 mL larutan DPPH + *Chlorofom* p.a ad 10,0 mL (konsentrasi 6 ppm)
- BK 4 : dipipet 0,8 mL dari BI 2 + 2,0 mL larutan DPPH + *Chlorofom* p.a ad 10,0 mL (konsentrasi 8 ppm)
- BK 5 : dipipet 1,0 mL dari BI 2 + 2,0 mL larutan DPPH + *Chlorofom* p.a ad 10,0 mL (konsentrasi 10 ppm)

4.9.4. Pembuatan larutan uji *Ceramide*

1. Pembuatan Larutan Baku Induk (2000 ppm)

Larutan uji *Ceramide* dibuat dengan menimbang sebanyak 100 mg *Ceramide*, kemudian dilarutkan dalam labu ukur 50,0 mL tambahkan *methanol* pro analisis hingga garis tanda. Larutan tersebut dikocok, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2000 ppm (BI).

2. Pembuatan Larutan Baku kerja

- BK 1 : dipipet 0,1 mL dari BI + 2,0 mL larutan DPPH + *methanol* p.a ad 10,0 mL (Konsentrasi 20 ppm)
- BK 2 : dipipet 0,2 mL dari BI + 2,0 mL larutan DPPH + *methanol* p.a ad 10,0 mL (Konsentrasi 40 ppm)
- BK 3 : dipipet 0,3 mL dari BI + 2,0 mL larutan DPPH + *methanol* p.a ad 10,0 mL (Konsentrasi 60 ppm)
- BK 4 : dipipet 0,4 mL dari BI + 2,0 mL larutan DPPH + *methanol* p.a ad 10,0 mL (Konsentrasi 80 ppm)
- BK 5 : dipipet 0,5 mL dari BI + 2,0 mL larutan DPPH + *methanol* p.a ad 10,0 mL (Konsentrasi 100 ppm)

4.9.5. Pembuatan Larutan uji minyak jagung (*Zea mays L.*)

1. Pembuatan Larutan Baku Induk 1 (10.000 ppm)

Larutan uji minyak jagung (*Zea mays L.*) dibuat dengan menimbang sebanyak 250 mg minyak jagung (*Zea mays L.*). Kemudian dilarutkan dalam labu ukur 25,0 mL tambahkan *Chlorofom* pro analisis hingga garis tanda. Larutan tersebut dikocok, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10.000 ppm (BI 1).

2. Pembuatan Larutan Baku induk 2 (1000 ppm)

Larutan baku induk 1 dipipet sebanyak 1,0 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Kemudian diencerkan dengan *Chlorofom* pro analisis ad garis tanda batas labu ukur dan diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm (BI 2).

3. Pembuatan Larutan Baku kerja

- BK 1 : dipipet 0,25 mL dari BI 2 + 2,0 mL larutan DPPH + *Chlorofom* p.a ad 10,0 mL (Konsentrasi 25 ppm)
- BK 2 : dipipet 0,5 mL dari BI 2 + 2,0 mL larutan DPPH + *Chlorofom* p.a ad 10,0 mL (Konsentrasi 50 ppm)

- BK 3 : dipipet 1 mL dari BI 2 + 2,0 mL larutan DPPH + *Chlorofom* p.a ad 10,0 mL (Konsentrasi 100 ppm)
- BK 4 : dipipet 1,5 mL dari BI 2 + 2,0 mL larutan DPPH + *Chlorofom* p.a ad 10,0 mL (Konsentrasi 150 ppm)
- BK 5 : dipipet 2 mL dari BI 2 + 2,0 mL larutan DPPH + *Chlorofom* p.a ad 10,0 mL (Konsentrasi 200 ppm)

4.9.6. Uji aktivitas antioksidan emulgel *Ceramide* dan minyak jagung

Pengujian aktivitas antioksidan sediaan emulgel *Ceramide* dan minyak jagung (*Zea mays L.*) dilakukan pada konsentrasi 0,5%; 0,75%; dan 1 %.

1. Pembuatan Larutan Baku Induk 1 (10.000 ppm)

Ditimbang sediaan emulgel *Ceramide* dan minyak jagung (*Zea mays L.*) sebanyak 100 mg. Kemudian dilarutkan dalam labu ukur 10,0 mL tambahkan *methanol* pro analisis hingga garis tanda. Larutan tersebut dikocok, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10.000 ppm (BI 1).

2. Larutan baku kerja (2000 ppm)

Dipipet larutan baku induk sebanyak 2,0 ml, kemudian 2,0 mL larutan DPPH dan di tambahkan *methanol* p.a ad 10,0 mL dalam labu ukur sampai garis tanda. Setelah itu, larutan dikocok sampai homogen untuk memastikan pencampuran merata.

4.10 Proses inkubasi

Larutan uji vitamin E dan sampel diinkubasi pada ruangan gelap selama 30 menit pada suhu 37°C (Lonteng *et al.*, 2020). Pada tahap ini bertujuan untuk mencegah kontaminasi. Selama proses inkubasi, terjadi reaksi antara senyawa antioksidan dengan DPPH yang ditandai dengan adanya perubahan warna ungu menjadi warna kuning. Perubahan ini menunjukkan bahwa dalam larutan telah berlangsung proses penangkal radikal bebas.

4.11 Proses absorbansi

Setelah tahap inkubasi, absorbansi larutan uji vitamin E dan sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang maksimum yang sesuai dengan DPPH yaitu 517 nm. Pada panjang gelombang tersebut merupakan karakteristik DPPH dalam pelarut *methanol* dan *etanol*. Pengukuran ini bertujuan

untuk menilai aktivitas antioksidan berdasarkan perubahan intensitas serapan cahayanya.

4.12 Analisis Data

4.12.1. Perhitungan % inhibisi

Pengujian aktivitas antioksidan pada sampel bertujuan untuk menentukan keberadaan dan efektivitas antioksidan dalam sediaan emulgel *Ceramide* dan minyak jagung (*Zea mays L.*). metode DPPH digunakan untuk mengevaluasi kemampuan sampel dalam menangkal radikal bebas. Perhitungan aktivitas antioksidan berfungsi untuk mengukur persentase inhibisi terhadap DPPH sebagai indikator potensi antioksidan dalam sampel, Adapun rumusnya sebagai berikut (Retno Sari, 2023).

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi awal} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi awal}} \times 100\%$$

Keterangan :

Absorbansi Awal = Absorbansi Kontrol DPPH

Absorbansi Sampel = Absorbansi Sampel yang diuji

4.12.2. Perhitungan IC50

IC50 merupakan konsentrasi sampel (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi hingga 50%, dimana semakin rendah nilai IC50 maka semakin tinggi potensi antioksidannya. Kemudian untuk menentukan nilai IC50 digunakan regresi linear $y = bx + a$, dimana x adalah konsentrasi sampel dan y adalah presentase aktivitas antioksidan. Nilai IC50 diperoleh pada titik dimana presentase inhibisi mencapai 50% sehingga dapat menggambarkan efektivitas sampel dalam menangkal radikal bebas.

Tabel IV.2. Kategori nilai IC50 (Retno Sari, 2023)

Kategori	Konsentrasi (ppm)
Sangat kuat	<50
Kuat	50-100
Sedang	100-250
Lemah	250-500
Tidak Aktif	>500

4.12.3. Analisis Data

Analisis data dilakukan terhadap sediaan emulgel untuk mengetahui pengaruh variasi *gelling agent* terhadap nilai inhibisi kadar antioksidan menggunakan metode *One-way ANOVA* dengan *software* SPSS. Metode tersebut diterapkan untuk menilai apakah terdapat perbedaan yang bermakna diantara ketiga formulasi yang diuji. Proses ini dimulai dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Jika hasil menunjukkan $p > \alpha 0,05$ maka data terdistribusi normal, dan jika $p < \alpha 0,05$ menunjukkan data tidak terdistribusi normal dan terdapat perbedaan antar formula yang dianggap signifikan. Jika data berdistribusi normal maka dilanjutkan *One-way ANOVA* untuk membandingkan rata-rata kelompok. Kemudian metode *One-way ANOVA* $p < \alpha 0,05$ menunjukkan ada perbedaan kelompok, maka perlu dilanjutkan dengan uji *turkey honestly signifikan difference* (HSD) yang berfungsi untuk memastikan perbedaan signifikan antar kelompok. Sebaliknya, setelah uji normalitas *Shapiro-Wilk* data yang dihasilkan tidak terdistribusikan secara normal maka analisis dilanjutkan dengan uji *Kruskal-wallis*. Pengujian uji *kruskal-wallis* merupakan metode statistik non-parametrik yang digunakan untuk menentukan perbedaan signifikan antara dua kelompok atau lebih.