

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah keseluruhan objek yang akan digunakan sebagai tujuan penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman obat bahan alam yaitu daun bungkus dari Sorong, Papua Barat.

Sampel merupakan salah satu bagian dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel dalam penelitian ini adalah daun bungkus yang diambil secara acak dari Sorong dengan kondisi daun yang masih segar dan serbuk halus.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Identifikasi variabel utama dalam penelitian ini ada 2 yaitu :

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah konsentrasi lotion ekstrak daun bungkus.

Variabel utama kedua adalah indeks iritasi dari lotion ekstrak daun bungkus pada kelinci *New Zealand*.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel utama yang telah dilakukan yaitu melakukan identifikasi terhadap klasifikasi dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas merupakan variabel yang direncanakan untuk diteliti dan berpengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian adalah variasi formula lotion ekstrak daun bungkus yaitu 15%, 20%, dan 25%.

Variabel tergantung merupakan inti dari persoalan penelitian yaitu pengaruh dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah potensi iritasi (eritema dan udema) yang terjadi setelah perlakuan menggunakan variasi formula lotion ekstrak daun bungkus.

Variabel terkendali merupakan variabel yang berpengaruh terhadap variabel tergantung tetapi harus terdapat penetapan kualifikasi agar tidak terjadi penyebaran hasil yang diperoleh dan dapat dilakukan pengulangan oleh peneliti secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah pengaruh yang mungkin terjadi selama proses pembuatan formula lotion ekstrak daun bungkus seperti metode pengujian, kondisi laboratorium, dan kondisi peneliti.

### 3. Definisi Operasional Variabel

Pertama, daun bungkus yang digunakan adalah daun yang masih hijau dan tidak rusak dari Sorong, Papua.

Kedua, simplisia daun bungkus adalah daun bungkus yang telah melalui proses pengeringan.

Ketiga, ekstrak etanol daun bungkus adalah penyarian simplisia daun bungkus menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi.

Keempat, konsentrasi sediaan lotion daun bungkus adalah sediaan lotion menggunakan ekstrak daun bungkus dengan konsentrasi 15%, 20%, dan 25%.

Kelima, pengujian mutu fisik sediaan lotion adalah meliputi uji organoleptis, uji homogenitas, uji viskositas, uji pH, uji daya sebar, dan uji stabilitas.

Keenam, kontrol positif yang digunakan adalah lotion dengan nama dagang Scarlett Body Lotion Jolly.

Ketujuh, hewan uji adalah kelinci albino dengan umur 5-10 bulan, BB 2-3 kg, dalam kondisi sehat, dan tidak cacat kulit.

## C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

### 1. Alat

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik, alat cukur, kandang kelinci, perban, kassa steril, plester hipoalergi, termometer, timbangan, kertas timbang, spatula, mortir, mikroskop, ember, pengayak mesh no 40, erlenmeyer, rotary evaporator, pipet tetes, gelas ukur, pH meter, plastik klip, kertas lebel, kaki 3, cawan porselin, kurs, kain flanel, botol coklat maserasi, jerigen, spirtus, korek, tabung reaksi, rak tabung reaksi, oven 105°C, wadah plastik, kompor, sabun cuci, kain lap, beaker glass, penjepit, blender, freeze dryer, batang pengaduk, objek glass, corong, sarung tangan, wadah formula, botol selai, dan masker.

### 2. Bahan

Etanol 70%, toluen, serbuk daun bungkus, ekstrak daun bungkus, air panas, lexemul cs, setil alkohol, IPM, MPG, EDTA, gliserin, phenoxyetanol, pewangi, aquades, HCL 1%, reagen dragendorf, reagen mayer, KOH 1%, FeCl 1%, dan NaOH encer.

### 3. Hewan Uji

Hewan uji pada penelitian ini menggunakan kelinci. Jenis kelinci yang digunakan adalah kelinci *New Zealand* dengan umur 5-10 bulan, BB 2-3 kg, dalam kondisi sehat, dan tidak cacat kulit.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi Tanaman Daun Bungkus**

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran dari tanaman daun bungkus yang akan digunakan pada penelitian. Tujuan dari identifikasi tanaman yaitu untuk menetapkan kebenaran mengenai ciri-ciri morfologi dari tanaman daun bungkus. Tempat determinasi tanaman daun bungkus dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah.

### **2. Pengumpulan Sampel Daun Bungkus**

Tanaman daun bungkus diperoleh dari Sorong, Papua Barat. Bagian yang digunakan dari tanaman daun bungkus adalah bagian daun muda, berwarna hijau dan masih segar, hal tersebut dilakukan agar diperoleh ekstrak dengan kualitas yang baik.

### **3. Pengeringan Simplisia dan Pembuatan Serbuk Daun Bungkus**

Daun bungkus yang telah dikumpulkan selanjutnya dilakukan sortir basah dengan pencucian menggunakan air mengalir untuk membersihkan kotoran yang masih melekat pada daun bungkus, kemudian yang sudah bersih dilakukan pengeringan di bawah sinar matahari hingga daun kering yang ditandai dengan daun yang mudah patah.

Daun bungkus yang sudah dikeringkan lalu disortasi terlebih dahulu agar tidak ada benda asing yang masuk. Proses pembuatan serbuk dilakukan menggunakan blender untuk mempermudah proses ekstraksi. Setelah di blender, serbuk simplisia daun bungkus diayak menggunakan ayakan mesh nomor 40.

### **4. Identifikasi Serbuk Daun Bungkus**

**4.1 Penetapan Organoleptis Serbuk.** Menurut Rusli (2019), identifikasi serbuk daun dilakukan secara organoleptis seperti bentuk, bau, dan warna dari serbuk daun bungkus.

**4.2 Penetapan Susut Pengeringan Serbuk Daun Bungkus.** Penetapan susut pengeringan serbuk daun bungkus bertujuan untuk mengetahui banyaknya senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan. Penetapan susut pengeringan serbuk menggunakan alat moisture balance pada suhu 105°C. Serbuk ditimbang sebanyak 2 g, kemudian dimasukkan ke dalam piringan aluminium foil yang sudah di tara. Serbuk diratakan sama rata hingga bagian atas aluminium foil tertutupi, pengeringan dilakukan selama  $\pm 15$  menit atau hingga alat berbunyi dan mendapatkan bobot yang konstan. Bobot konstan dari

hasil susut pengeringan serbuk yaitu yang tidak lebih dari 10%. Penetapan susut pengeringan serbuk dilakukan menggunakan 3 replikasi.

**4.3 Penetapan Kadar Air Serbuk Daun Bungkus.** Menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI 2017), penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan metode destilasi toluen menggunakan alat Sterling-Bidwell. Reaksi yang digunakan adalah toluen jenuh air yang dibuat dengan cara 200 ml toluen dikocok dengan 10 ml air dan dibiarkan memisah kemudian lapisan air di buang. Lalu 20 gram serbuk ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu kering. Toluene jenuh air dimasukkan lebih kurang 200 ml ke dalam labu dan rangkaian alat dipasang. Toluene jenuh air dimasukkan ke dalam tabung penerima melalui pendinginan sampai leher apa alat penampung. Labu dipanaskan selama 15 menit. Pemanasan dihentikan sampai tidak ada lagi air yang menetes di dalam tangki. Kadar air kemudian diukur menggunakan alat Sterling-Bidwell dengan mengamati volume pada skala alat.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

## **5. Pembuatan Ekstrak Daun Bungkus**

Menurut Farmakope Herbal Indonesia (FHI 2017), metode ekstraksi maserasi dilakukan dengan simplisia ditimbang sebanyak 900 gram, kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi yang dilakukan dengan merendam sampel bersama etanol 70% dengan perbandingan 1 bagian serbuk dengan 10 bagian pelarut.

Serbuk daun bungkus dimasukkan ke dalam botol coklat, kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sesuai perbandingan. Rendam selama 6 jam pertama lalu di gojok, diamkan lagi selama 18 jam, kemudian saring menggunakan kain flanel. Ampas dimasukkan kembali ke dalam botol coklat untuk remaserasi dan ulangi kembali proses penyarian dengan volume pelarut setengah kali pelarut pertama menggunakan kertas saring. Hasil ekstraksi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C menggunakan kecepatan 70 rpm, kemudian ekstrak diuapkan di dalam oven pada suhu 45°C hingga diperoleh ekstrak kental.

## **6. Penetapan % Rendemen Ekstrak Daun Bungkus.**

Perhitungan rendemen ekstrak dilakukan untuk menentukan perbandingan jumlah ekstrak yang diperoleh dari suatu bahan terhadap

awal berat bahan simplisia serta untuk mengetahui banyaknya senyawa bioaktif yang terkandung dalam bahan yang terekstraksi.

$$\begin{aligned} & \% \text{ Rendemen ekstrak daun bungkus} \\ &= \frac{\text{bobot ekstrak daun bungkus}}{\text{bobot serbuk simplisia daun bungkus}} \times 100\% \end{aligned}$$

## 7. Identifikasi Ekstrak Daun Bungkus

**7.1 Penetapan Organoleptis Ekstrak.** Penetapan organoleptis ekstrak daun bungkus dilakukan dengan mengamati bentuk, warna dan bau dari ekstrak daun bungkus.

**7.2 Penetapan Susut Pengerinan Ekstrak Daun Bungkus.** Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI 2017), ekstrak ditimbang sebanyak 1-2 gram dalam krus yang sudah dipanaskan dalam suhu 105°C dan di tara, ekstrak diratakan dengan cara ditepuk-tepuk menggunakan tangan hingga ketebalan lapisan sama lalu krus dimasukkan kedalam oven suhu 105°C dengan posisi krus terbuka hingga diperoleh bobot tetap. Setelah setiap pengeringan, krus harus didinginkan dengan dimasukkan ke dalam desikator hingga mencapai suhu ruang lalu ditimbang.

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{bobot awal ekstrak} - \text{bobot akhir ekstrak}}{\text{bobot awal ekstrak}} \times 100\%$$

**7.3 Penetapan Kadar Air Ekstrak Daun Bungkus.** Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI 2010), penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri yaitu dengan menimbang 10 gram ekstrak daun bungkus lalu dimasukkan ke dalam krus porselin yang sebelumnya sudah ditara. Selanjutnya keringkan di dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam pertama lalu dinginkan di dalam desikator dan di timbang. Ulangi mengoven setiap 1 jam hingga diperoleh hasil kadar air yang tidak kurang dari 10%.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{bobot awal ekstrak} - \text{bobot akhir ekstrak}}{\text{bobot awal ekstrak}} \times 100\%$$

## 8. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Daun Bungkus

**8.1 Alkaloid.** Menurut Dasuki et al., (2012), sebanyak 0,6 g ekstrak dicampur dengan 8 ml HCl 1% dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 2 tabung volume 2 ml yang ditetesi dengan beberapa tetes reagen Dragendorf dan Mayer. Kekeruhan atau endapan menunjukkan adanya alkaloid.

**8.2 Saponin. Menurut** Dasuki et al., (2012), sebanyak 0,5 g ekstrak dilarutkan dalam 2 ml air mendidih dalam tabung reaksi. Setelah dingin, ekstrak dikocok hingga terbentuk busa persisten yang stabil. Hasil negatif ditunjukkan dengan tidak adanya buih, buih kurang dari 1 cm dianggap positif lemah, buih 1 cm hingga 2 cm dianggap positif, dan pembentukan buih lebih dari 2 cm dianggap positif kuat.

**8.3 Flavonoid. Menurut.** Dasuki et al., (2012), sebanyak 0,5 g ekstrak dilarutkan dalam 4 ml etanol 70% dan disaring. 2 ml filtrat dicampur dengan 1 ml KOH 1%. Terbentuknya warna kuning tua menunjukkan adanya kandungan flavonoid.

**8.4 Tanin.** Menurut Dasuki et al., (2012), sebanyak 0,5 g ekstrak dilarutkan dalam 2 ml aquades dan disaring, kemudian tambahkan larutan FeCl 1% sebanyak 0,1 ml ke dalam filtrat. Terbentuknya ion berwarna biru kehitaman menunjukkan adanya tanin yang dapat terhidrolisis.

**8.5 Kumarin.** Menurut Dasuki et al., (2012), sebanyak 50 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kertas saring yang telah dibasahi dengan NaOH encer. Tabung reaksi dimasukkan ke dalam air mendidih selama beberapa menit. Kertas saring kemudian dikeluarkan dan diperiksa di bawah sinar UV. Fluoresensi kuning menunjukkan adanya kumarin.

## 9. Formulasi Lotion Ekstrak Daun Bungkus

**Tabel 2. Formula Lotion Ekstrak Daun Bungkus**

Bahan	Satuan (%)				Fungsi
	F1	F2	F3	k (-)	
Ekstrak daun bungkus	15	20	25	-	Zat aktif
Lexemul cs	5	5	5	5	Pengental, pengeras
Setil alkohol	6	6	6	6	Pelembap
IPM	2	2	2	2	Pelumas
MPG	2	2	2	2	Pelembap
EDTA	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengikat, pengawet
Gliserin	4	4	4	4	Pengental
Phenoxyetanol	0,4	0,4	0,4	0,4	Pengawet
Pewangi	qs	qs	qs	qs	Pewangi
Aquades	Ad	Ad	Ad	Ad	Pembawa
	100	100	100	100	

Keterangan :

F1 = Lotion ekstrak daun bungkus 15%

F2 = Lotion ekstrak daun bungkus 20%

F3 = Lotion ekstrak daun bungkus 25%

K (-) = Basis lotion

K (+) = Lotion dengan nama dagang Scarlett Body Lotion Jolly

## **10. Pembuatan Lotion Ekstrak Daun Bungkus**

Bahan-bahan fase minyak dan fase air dilebur dalam cawan porselin berbeda pada suhu 65-75°C sampai melebur. Setelah semua fase terlarut, fase minyak terus diaduk lalu ditambahkan dengan fase air sedikit demi sedikit hingga homogen dan membentuk emulsi. Kemudian ditambahkan dengan ekstrak daun bungkus sebagai bahan aktif dan pewangi sakura sebagai zat pewangi.

## **11. Identifikasi Mutu Fisik Sediaan Lotion Ekstrak Daun Bungkus**

Parameter uji mutu fisik sediaan lotion dilakukan dengan beberapa pengamatan meliputi pengamatan uji organoleptis, uji homogenitas, uji viskositas, uji pH, uji daya sebar, dan uji stabilitas lotion.

**11.1 Uji organoleptis.** Uji organoleptis sediaan lotion ekstrak daun bungkus dilakukan dengan mengamati bentuk, warna dan bau dari sediaan lotion.

**11.2 Uji homogenitas.** Uji homogenitas dilakukan dengan cara menyiapkan masing-masing sediaan lotion ekstrak daun bungkus, kemudian dioleskan pada objek glass dan amati. Apabila massa lotion tidak terasa adanya zat padat maka sediaan lotion menunjukkan susunan homogen.

**11.3 Uji viskositas.** Uji viskositas menggunakan alat viskometer nomor 6, dengan memasukkan lotion ke dalam cup dan pasang pada portable viskometer. Amati jarum hingga menunjukkan angka stabil kemudian baca pada skala yang terdapat pada viskometer. Syarat viskositas lotion menurut yaitu antara 2000-50000 cP (SNI 16-4399-1996).

**11.4 Uji pH.** Pengukuran pH dilakukan menggunakan alat pH meter elektroda yang telah dikalibrasi, lotion ditimbang sebanyak 1 gram dan dilarutkan di dalam air sampai 100 ml. Stik pH dicelupkan, kemudian amati hingga skala menunjukkan kestabilan. Nilai pH sediaan lotion memiliki range 4,5-8,0 (SNI 16-4399- 1996). Safitri dan Jubaidah (2019) menyatakan bahwa nilai pH di bawah 4,5 menyebabkan iritasi dan gatal pada kulit, sementara nilai pH di atas 8,0 dapat menyebabkan kulit kering, licin, dan kehilangan elastisitas.

**11.5 Uji daya sebar.** Untuk menguji daya sebar, timbang 0,5 gram lotion dan letakkan di tengah kaca bulat, kemudian ambil kaca bulat lain dan letakkan di atasnya, lalu tunggu 1 menit. Kemudian tambahkan beban 50 gram, 100 gram, 150 gram, 200 gram, dan 250

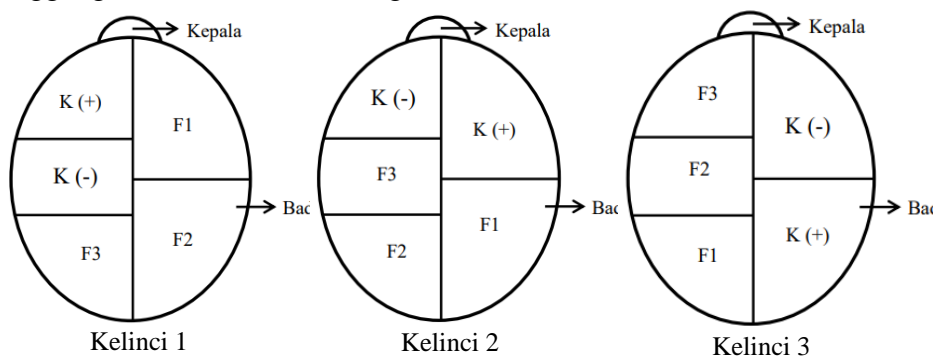
gram setiap menit, dan lihat seberapa besar daya sebarannya dan tulis. Standart daya sebar lotion berdiameter antara 5,4-6,4 (SNI 16- 4399-1996).

**11.6 Uji Stabilitas.** Uji stabilitas dilakukan dengan metode *cycling test*, yaitu menyimpan sediaan ke dalam temperatur 4°C dalam kurun waktu 24 jam, kemudian dipindahkan ke dalam suhu 40°C dalam kurun waktu 24 jam. Waktu penyimpanan pada dua suhu yang berbeda tersebut dianggap sebagai satu siklus Pengujian stabilitas berlangsung hingga 6 siklus (12 hari), pada siklus yang terakhir dilihat ada tidaknya pemisahan dari sediaan lotion. Selanjutnya kondisi diaamati dengan memeriksa organoleptis, homogenitas, viskositas, pH, dan daya sebar terhadap kestrabilan sediaan setelah dilakukan metode *cycling test*.

## 12. Perlakuan Uji Iritasi Formula Lotion Daun Bungkus pada Kelinci

Uji iritasi ekstrak daun bungkus dilakukan dengan menggunakan kelinci albino yang sehat dengan berat badan antara  $\pm 2$  dan 3 kilogram, yang telah diaklimatisasi selama setidaknya lima hari di kandang eksperimen, dengan satu kelinci di setiap kandang. Ini dilakukan supaya kelinci yang diuji dapat belajar menyesuaikan diri dengan lingkungan sekitarnya.

**12.1 Penyipapan hewan uji.** Sehari sebelum perawatan, tiga kelinci dicukur bulu punggungnya. Kemudian, lima bagian (tiga di sisi kanan dan dua di sisi kiri) dibagi menjadi satu sama lain. Pada bagian punggung kelinci, cincin dicukur sebanyak lima bagian yang berbeda. Pencukuran dilakukan pada area yang sudah diberi tanda garis batas, yang dimulai dari tulang belikat (bahu) hingga pangkal paha (tulang pinggang), dan dilakukan setengah ke bawah.



**Gambar 6. Lokasi Pemaparan Sediaan Lotion**



**12.2 Pemberian perlakuan pada hewan uji.** Efek iritasi dilakukan terhadap 3 ekor kelinci yang sudah dicukur pada 5 bagian yang berbeda di bagian punggung. Masing-masing bagian punggung diberikan perlakuan sebagai berikut :

Formula 1 : Pada kulit punggung kelinci dioleskan sediaan lotion dengan konsentrasi ekstrak daun bungkus sebanyak 15%

Formula 2 : Pada kulit punggung kelinci dioleskan sediaan lotion dengan konsentrasi ekstrak daun bungkus sebanyak 20%

Formula 3 : Pada kulit punggung kelinci dioleskan sediaan lotion dengan konsentrasi ekstrak daun bungkus sebanyak 25%

Formula 4 : Pada kulit punggung kelinci dioleskan K (-) yaitu basis lotion

Formula 5 : Pada kulit punggung kelinci dioleskan K (+) yaitu sediaan pasaran dengan nama dagang Scarlett Body Lotion Jolly

**12.3 Pengamatan padan hewan uji.** Setelah 24 jam, pemeriksaan dilakukan untuk memastikan apakah kulit punggung kelinci yang telah diobati mengalami perubahan, seperti eritema atau udem. Setelah itu, bagian tersebut ditutup kembali dengan plester yang sama, dan pemeriksaan dilakukan lagi setelah 48 dan 72 jam. Menurut Draize (1959), bahwa untuk setiap kondisi kulit diberi nilai dari 0 hingga 4 tergantung pada intensitas reaksi kulit yang dihasilkan, seperti yang ditunjukkan pada tabel 3.

**Tabel 3. Skor Derajat Eritema dan Udem Pada Kelinci**

Pengamatan	Reaksi kulit	Skor
Eritema	Tidak ada eritema	0
	Eritema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	1
	Eritema terlihat jelas	2
	Eritema sedang sampai parah	3
	Eritema parah (merah daging) sampai	4
Udem	Tidak ada udem	0
	Udem sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	1
	Udem terlihat jelas	2
	Udem sedang sampai parah	3
	Udem parah (merah daging) sampai	4

## **E. Analisis Data**

Analisis data menggunakan metode analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif berupa pengumpulan data melalui catatan riset, observasi, dan dokumentasi dari hasil pengujian mutu fisik sediaan lotion. Analisis kuantitatif menggunakan program SPSS (*Statistical Package Social Sciences*) hasil pengujian mutu fisik sediaan lotion serta perhitungan jumlah skor derajat eritema dan udem pada

hewan uji terhadap indeks iritasi primer yang diklasifikasikan dalam kategori respon menggunakan tabel. Menurut Ermawati (2018), masing-masing sampel iritan dihitung jumlah skor dari indeks eritema dan udema selanjutnya dihitung indeks iritasi sebagai berikut :

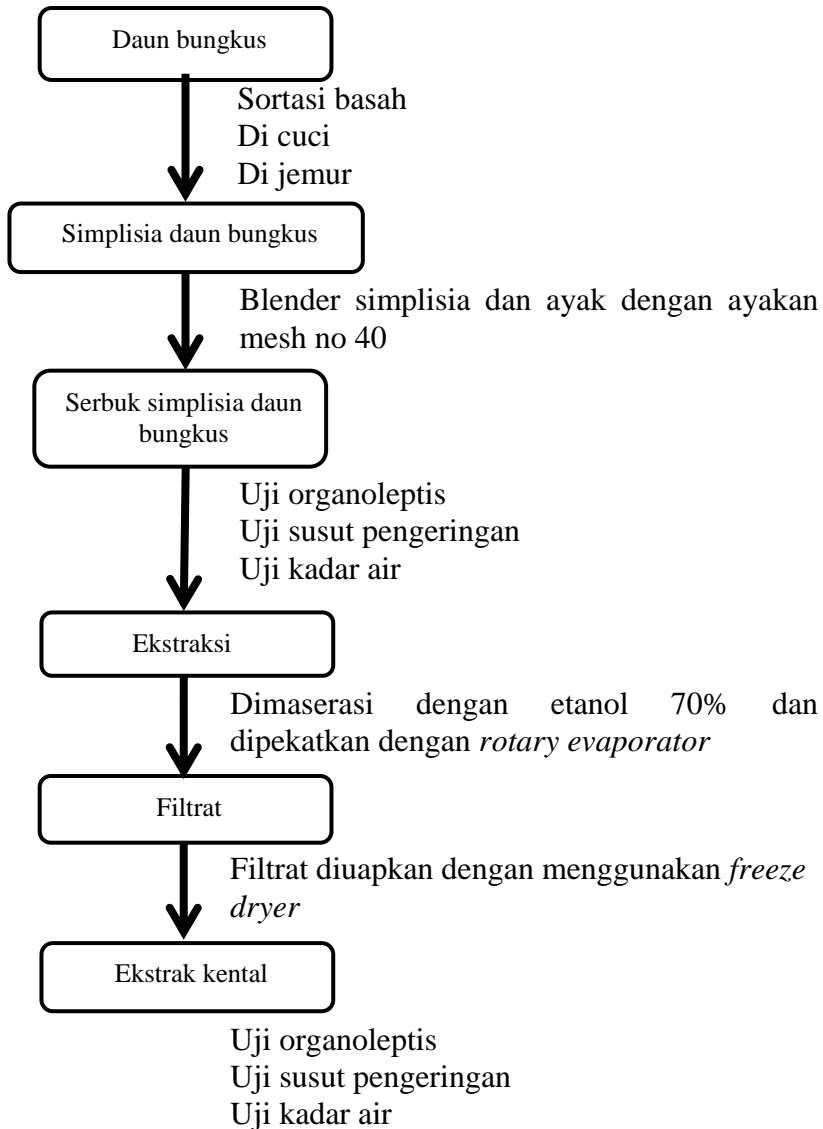
$$\text{Indeks iritasi primer} = \frac{\text{Jumlah eritema 24/48/72 jam} + \text{jumlah udema 24/48/72 jam}}{\text{Jumlah kelinci}}$$

Menurut Ermawati (2018), indeks iritasi yang diperoleh selanjutnya dibandingkan dengan skor derajat iritasi seperti berikut :

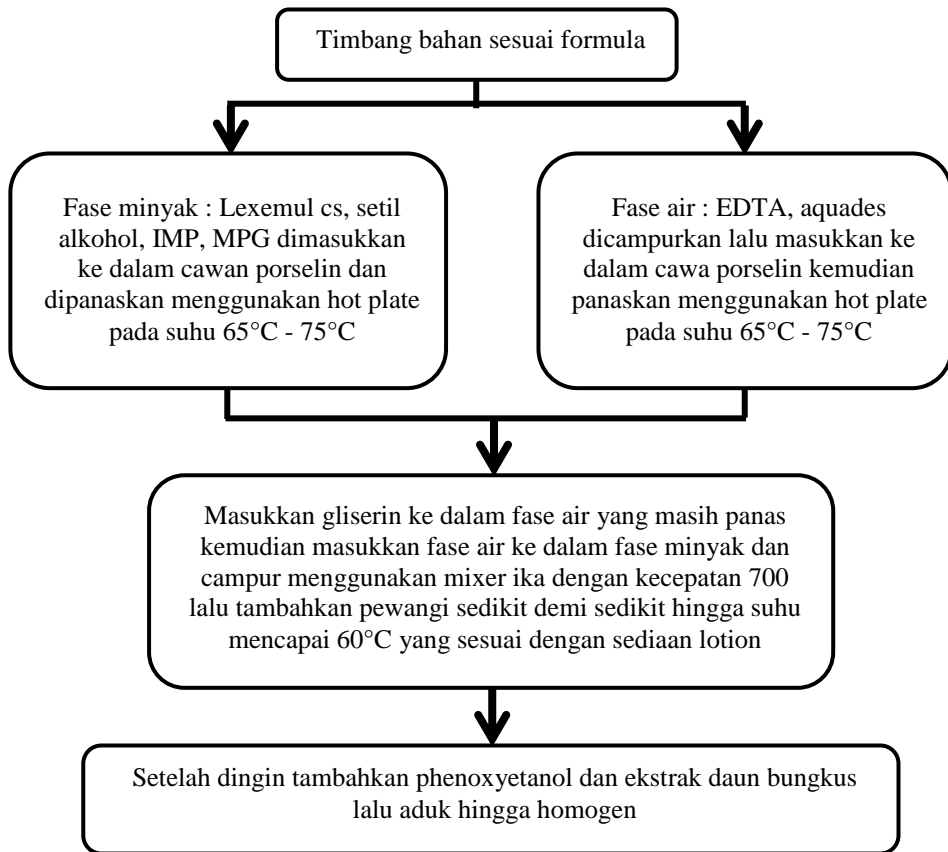
**Tabel 4. Kategori Respon Iritasi Pada Kelinci**

Nilai rata-rata	Kategori respon
0,0 – 0,4	Sangat ringan ( <i>negligible</i> )
0,5 – 1,9	Iritasi ringan ( <i>slight</i> )
2,0 – 4,9	Iritasi sedang ( <i>moderate</i> )
5,0 – 8,0	Iritasi kuat ( <i>severe</i> )

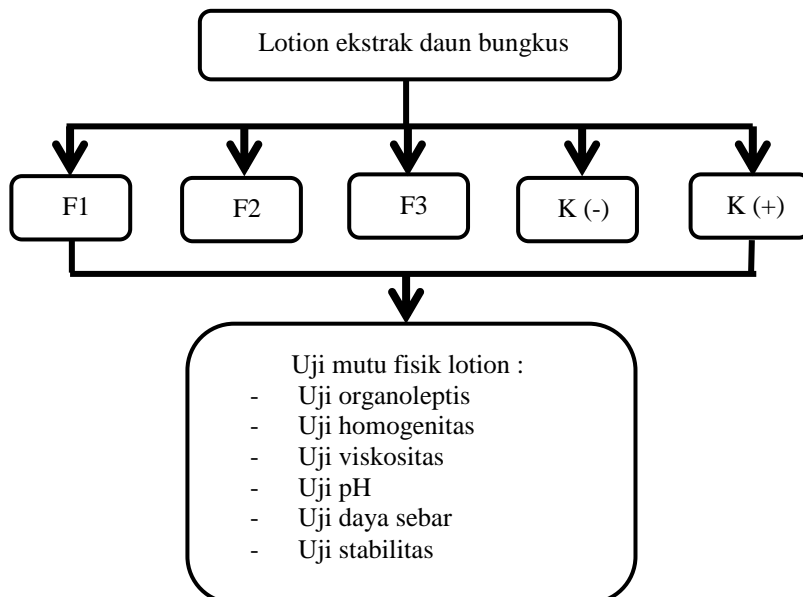
## F. Skema Jalannya Penelitian



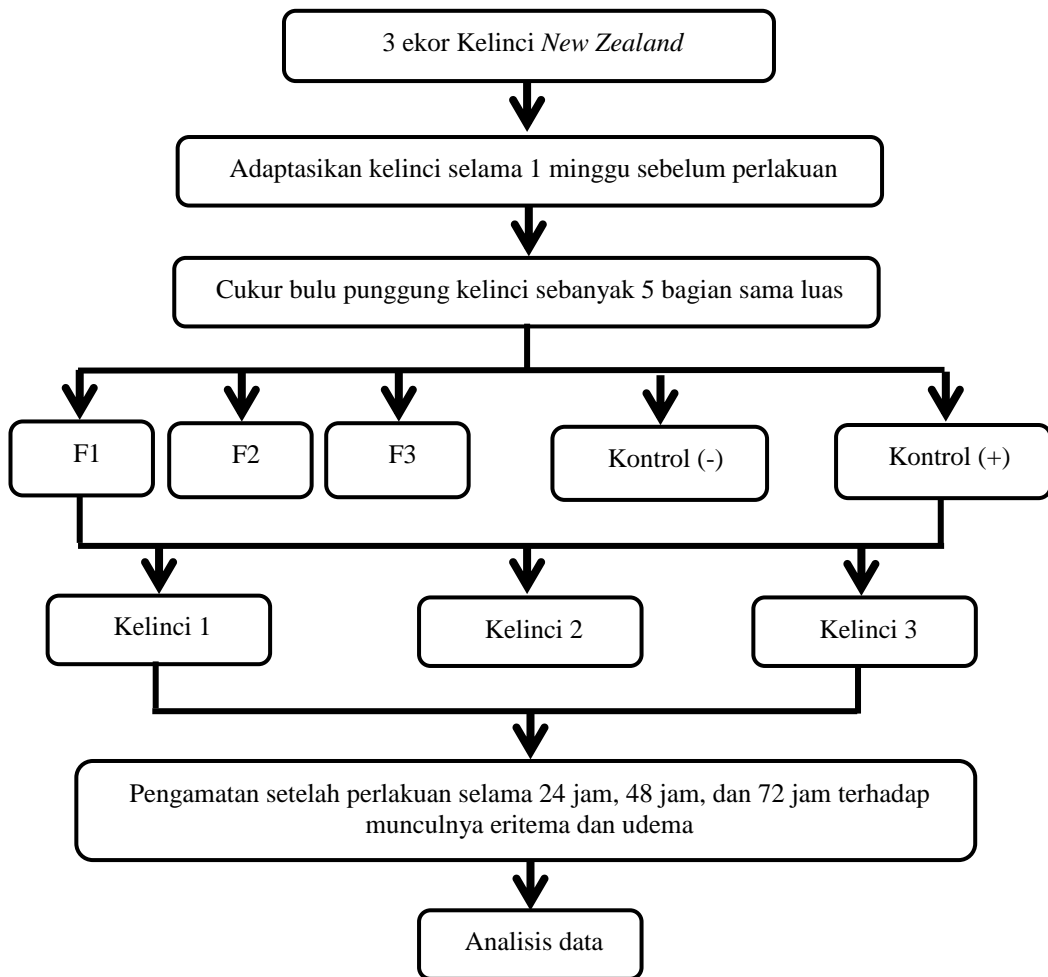
Gambar 7. Skema Pengambilan dan Pengolahan Simplisia



**Gambar 8. Skema Pembuatan Sediaan Lotion**



**Gambar 9. Skema Pengujian Mutu Fisik Sediaan Lotion Ekstrak Daun Bungkus**



**Gambar 10. Skema Pemberian Perlakuan pada Hewan Uji**