

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah seluruh bagian yang menjadi target dalam penelitian. Populasi yang dipakai pada penelitian adalah sediaan emulgel yang dibuat dari ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel merupakan suatu bagian dari populasi yang dipakai dalam penelitian. Sampel dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel yang memiliki zat aktif ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) pada konsentrasi 1; 2; dan 4 %.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama memuat seluruh variabel yang diidentifikasi. Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dengan variasi konsentrasi. Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas tabir surya emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama merupakan seluruh variabel yang diidentifikasi. Variabel utama yang akan diidentifikasi adalah variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas merupakan variabel yang diinginkan untuk dilakukan penelitian dan dilihat pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dengan konsentrasi 1; 2; dan 4 %.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung merupakan variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah stabilitas dan mutu fisik emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*), serta aktivitas tabir surya emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*).

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali merupakan variabel yang berpengaruh terhadap variabel tergantung sehingga perlu

ditetapkan kualifikasinya sehingga hasil yang diperoleh tidak terurai dan dapat diulangi oleh peneliti. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi peneliti, kondisi laboratorium, dan metode penelitian.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun kecombrang (*Etlingera elatior*) adalah daun tanaman kecombrang yang berada di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, sediaan emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) adalah hasil ekstraksi dari simplisia daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dengan metode maserasi menggunakan pelarut 96%.

Ketiga, sediaan emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) adalah emulgel yang diformulasikan dengan perbedaan konsentrasi ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) yaitu 1; 2; dan 4 %.

Keempat, uji stabilitas dan mutu fisik emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) yaitu pengujian organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat dan stabilitas emulgel.

Kelima, kontrol positif yang digunakan adalah sediaan tabir surya atau SPF yang beredar dan umum dipakai.

Keenam, uji aktivitas tabir surya ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dilakukan dengan pengujian *Sun Protection Factor* (SPF) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang dipakai pada penelitian ini yaitu gelas ukur, tabung reaksi, erlenmeyer neraca digital, corong kaca, wadah emulgel, stamper, mortar, sendok tanduk, batang pengaduk, sudip, cawan porselen, *beaker glass*, labu takar, *moisture balance*, piknometer, pH meter, *viscometer*, alat uji daya lekat, alat uji daya sebar dan spektrofotometri UV-Vis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kecombrang (*Etlingera elatior*), carbopol 940, Trietanolamin (TEA), propilenglikol, tween 80, span 80, parafin cair, metil paraben, propil paraben, etanol 96%, dan aqua destillata.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Langkah pertama dalam penelitian ini adalah determinasi daun kecombrang (*Etlingera elatior*). Tahap ini dilakukan untuk memastikan benar atau tidaknya tanaman daun kecombrang (*Etlingera elatior*) yang akan dipakai pada penelitian ini. Determinasi dilakukan dengan melihat ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman kecombrang (*Etlingera elatior*) terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Morfologi dan Sistematika Tumbuhan, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pembuatan serbuk daun kecombrang (*Etlingera elatior*)

Daun kecombrang (*Etlingera elatior*) yang sudah dipanen dilakukan sortasi basah dan pencucian untuk membersihkan daun dari bahan-bahan pengotor. Kemudian daun dikeringkan selama beberapa hari dalam suhu kamar dan tidak terkena sinar matahari. Daun yang telah kering dihaluskan dengan blender lalu diayak menggunakan ayakan nomor 40. Simpan serbuk di dalam wadah yang tertutup dan tidak lembab untuk selanjutnya digunakan untuk penelitian.

3. Pemeriksaan fisik serbuk daun kecombrang (*Etlingera elatior*)

3.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis merupakan pemeriksaan fisik menggunakan indra penglihatan secara langsung pada warna, bentuk, dan bau dari emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*).

3.2 Penetapan susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan serbuk daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk daun kecombrang (*Etlingera elatior*) ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dimasukkan ke dalam *moisture balance* yang diatur pemanasan sampai suhu 105 °C dan ditunggu sampai pemanasan selesai. Nilai susut pengeringan dinyatakan dalam satuan persen tertera pada alat *moisture balance* (Setyawati, 2018).

3.3 Penetapan kadar air. Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan destilasi toluen dengan alat yang dipakai adalah *Sterling Bidwell*. Toluene yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu dengan menggunakan corong pisah. Sampel ditimbang sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat 200 ml toluen. Setelah itu dipanaskan selama kurang lebih 15 menit sampai

tidak terjadi penambahan volume. Volume air dibaca setelah air dan toluen memisah secara sempurna (Lestari, 2019).

4. Pembuatan ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*)

Serbuk daun kecombrang (*Etlingera elatior*) diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk ditimbang 900 gram kemudian dimasukkan ke dalam bejana gelap dan ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Rendam selama 2 hari dengan 6 jam pertama dilakukan penggojogan sesekali, lalu didiamkan selama 18 jam kemudian disaring. Filtrat sisa maserasi dimaserasi kembali dengan setengah pelarut pertama dengan pelarut etanol 96% dan ditambah sebanyak 3 liter lalu didiamkan selama 1 hari kemudian disaring. Ekstrak cair dikumpulkan kemudian dilakukan pemekatan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C pada kecepatan 45 rpm sampai didapatkan ekstrak kental (Kemenkes RI, 2013). Hitung rendemen ekstrak dengan menimbang hasil ekstrak kental dibagi serbuk daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dan dikali 100%.

5. Identifikasi ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*)

5.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis merupakan pemeriksaan sifat fisik yang bisa dinilai dengan mata tanpa menggunakan alat. Pemeriksaan organoleptis ini meliputi bentuk, bau, warna dan rasa (Lestari, 2019).

5.2 Penetapan kadar lembab. Ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) ditimbang sebanyak 2 gram pada pan aluminium yang sudah disediakan pada *moisture balance*. Sampel dilakukan pemanasan sampai suhu 105°C dan ditunggu sampai selesai, kemudian hasil yang tertera pada *moisture balance* dicatat (Setyawati, 2018).

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*)

6.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak kental ditimbang 0,5 gram kemudian dilarutkan dengan 10 ml *aqua destillata* dan dipanaskan dalam waktu 5 menit setelah itu disaring. Filtrat diambil sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi setelah itu ditambah 0,1 gram serbuk magnesium lalu ditambah 1 ml HCl pekat dan 1 ml amil alkohol. Campuran dikocok dan didiamkan sampai terpisah. Hasil positif flavonoid diperlihatkan dengan tanda larutan warna merah, jingga, atau kuning pada lapisan amil alkohol. Flavon jika jingga

hingga merah, flavanol jika merah hingga merah tua, flavanon merah tua hingga magenta (Depkes RI, 1995).

6.2 Identifikasi tanin. Ekstrak kental ditimbang 0,5 gram kemudian dilarutkan dengan 10 ml *aqua destillata* dan dipanaskan selama 5 menit setelah itu disaring. Filtrat diambil sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,1 gram FeCl₃. Hasil positif tanin diperlihatkan dengan tanda larutan warna biru kehitaman (tanin galat) atau hijau kehitaman (tanin katekol) (Widiastuti, 2014).

6.3 Identifikasi saponin. Ekstrak kental ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air panas setelah itu ditunggu sampai dingin dan dikocok kuat. Hasil positif diperlihatkan dengan tanda larutan ada busa setinggi 1 cm yang stabil setelah dibiarkan selama 1 jam atau pada penambahan 1 tetes HCl 2 N (Ditjen POM, 2014).

6.4 Identifikasi steroid. Ekstrak kental ditimbang 0,5 gram lalu dilarutkan dengan 10 ml n-heksan selama 1 jam setelah itu disaring. Filtrat diambil sebanyak 5 ml lalu diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard pada residu. Hasil positif steroid ditunjukkan dengan adanya warna biru hingga hijau (Widiyati, 2006).

7. Formulasi emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*)

7.1 Formula. Formula sediaan emulgel daun kecombrang (*Etlingera elatior*) terdiri atas fase emulsi terdiri atas fase minyak dan fase air. Fase minyak yaitu parafin cair, fase air yaitu propilenglikol. Emulgator yang digunakan dalam adalah kombinasi emulgator tween 80 dan span 80. Fase gel menggunakan *gelling agent* carbopol 940. Bahan aktif ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dengan perbedaan konsentrasi.

Formula yang direncanakan pada penelitian ini sesuai dalam tabel 4.

Tabel 4 Formula Emulgel Ekstrak Etanol Daun Kecombrang (*Etlingera elatior*)

Bahan	Satuan	F1	F2	F3	F4
Ekstrak etanol daun kecombrang	(% b/v)	-	1	2	4
Carbopol 940	(% b/v)	1	1	1	1
TEA	(% b/v)	1	1	1	1
Parafin cair	(% b/v)	5	5	5	5
Span 80	(% b/v)	0,42	0,42	0,42	0,42
Tween 80	(% b/v)	1,08	1,08	1,08	1,08
Propil paraben	(% b/v)	0,01	0,01	0,01	0,01
Metil Paraben	(% b/v)	0,03	0,03	0,03	0,03
Propilenglikol	(% b/v)	10	10	10	10
Aquadest	(% b/v)	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Keterangan :

F1 = Emulgel tanpa ekstrak etanol daun kecombrang

F2 = Emulgel ekstrak etanol daun kecombrang 1%

F3 = Emulgel ekstrak etanol daun kecombrang 2%

F4 = Emulgel ekstrak etanol daun kecombrang 4%

7.2 Pembuatan emulgel. Alat disiapkan dan bahan yang akan digunakan ditimbang sesuai dengan formula. Carbopol 940 dikembangkan dengan cara memasukkan serbuk carbopol 940 ke dalam mortir yang berisi aquades panas secara sedikit demi sedikit dan diaduk hingga carbopol 940 terdispersi homogen kemudian TEA ditetaskan sedikit demi sedikit untuk menetralkan pH carbopol 940 dan diaduk hingga terbentuk disperse jenuh yang ditandai dengan basis gel kental dan jernih (fase gel). Tween 80, metil paraben, propil paraben dilarutkan ke dalam propilen glikol pada cawan porselen, dicampur dan diaduk di atas *water bath* pada suhu 60-70°C sampai homogen (fase air). Span 80 dan parafin cair dicampurkan pada cawan porselen, diaduk di atas *water bath* pada suhu 60-70°C sampai homogen (fase minyak). Ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dimasukkan ke dalam fase air, aduk sampai homogen. Fase air ke dalam fase minyak dicampurkan dan diaduk konstan sampai emulsi homogen dan terbentuk emulsi kemudian fase gel dimasukkan di fase emulsi sedikit demi sedikit sampai homogen dan terbentuk emulgel.

8. Pengujian sifat fisik dan stabilitas emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*)

8.1 Uji organoleptik. Uji organoleptik sediaan emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) meliputi pemeriksaan warna, bau, dan konsistensi emulgel secara fisik (Lestari, 2019).

8.2 Uji homogenitas. Uji homogenitas dilakukan dengan mengoleskan sediaan emulgel ekstrak etanol daun kecombrang

(*Etlingera elatior*) pada gelas objek bagian atas, tengah dan bawah. Dinyatakan homogen apabila tidak terdapat butiran kasar pada gelas objek. Uji ini dilakukan 3 kali replikasi (Safitri *et al.*, 2014).

8.3 Uji viskositas. Uji viskositas dilakukan dengan menggunakan alat *viscometer* Brookfield dengan nomor *spindle* 5 dengan kecepatan 100 rpm (Garg *et al.*, 2002). Pengukuran dimulai dengan melakukan pemasangan *spindle* searah jarum jam, lalu mengatur kecepatan. Hasil pengukuran akan muncul pada layar *viscometer*.

8.4 Uji pH. Uji pH sediaan emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dilakukan dengan menggunakan alat pH meter. Sampel ditimbang 1 gram kemudian dilarutkan dalam air sampai 10 ml. alat dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan dapar pH 4 dan 7 kemudian elektroda pH meter dicelupkan ke dalam sediaan emulgel. Skala dibaca setelah pH meter stabil (Safitri *et al.*, 2014).

8.5 Uji daya sebar. Uji daya sebar dilakukan dengan menggunakan alat kaca bulat berskala. Sampel ditimbang sebanyak 0,5 gram dan diletakkan di atas kaca bulat. Kaca bulat lainnya diletakkan di atas massa sampel, biarkan selama 1 menit. Ukur diameter sampel yang menyebar (pengukuran diambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi), beban ditambahkan di atas kaca sebesar 50; 100; 150 g. Beban diberikan secara bertahap dan setiap tahapan diamkan selama 1 menit kemudian catat diameter yang menyebar. Pengujian dilakukan 3 kali replikasi pada setiap formula (Voight, 1994).

8.6 Uji daya lekat. Uji daya lekat dilakukan dengan meletakkan 0,5 gram sampel emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) di atas gelas objek. Gelas objek lainnya diletakkan di atas sampel dengan beban 1 kg selama 5 menit. Kaca objek dipasang pada alat ukur, beban seberat 1 kg dilepaskan dan catat waktunya sampai kedua gelas objek terlepas (Safitri *et al.*, 2014).

8.7 Uji stabilitas. Uji stabilitas sediaan emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) terhadap suhu secara *Cycling test*. Uji dilakukan sejumlah 6 siklus. Sampel disimpan pada suhu 4°C dalam waktu 24 jam kemudian sampel dipindahkan pada suhu 40°C dalam waktu 24 jam. Proses ini dikatakan sebagai 1 siklus. Sebelum dan sesudah *Cycling test* dilakukan pengujian secara organoleptis, pH, dan viskositas (Dewi, 2010).

9. Pengujian Sun Protection Factor (SPF) emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*)

Pengujian *Sun Protection Factor* (SPF) dilakukan untuk menentukan efektivitas sediaan emulgel sebagai tabir surya secara *in vitro* dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Pengujian dilakukan terhadap sediaan emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dengan variasi konsentrasi 1; 2; dan 4 % dan sediaan yang memiliki kandungan tabir surya positif.

9.1 Preparasi ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*). Ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dibuat dengan konsentrasi 1; 2; 4 % dalam etanol *pa*. Larutan diultrasonikasi selama 5 menit dan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring, lalu dimasukkan dalam labu takar 10 ml dan ditambahkan etanol *pa* sampai tanda batas kemudian dibaca absorbansinya. Hasil absorbansi terlalu tinggi dilakukan pengenceran 20 kali dengan cara mengambil larutan sebanyak 2,5 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 50 ml dan ditambahkan etanol *pa* sampai tanda batas kemudian dibaca absorbansinya. Ekstrak etanol kecombrang (*Etlingera elatior*) pengukuran serapannya memakai spektrofotometri UV dengan panjang gelombang 290-320 nm dengan interval 5 nm menggunakan blanko etanol *pa*.

9.2 Preparasi emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*). Emulgel ditimbang 100 mg pada setiap formula kemudian dimasukkan ke dalam beaker glass dan ditambah 10 ml etanol *pa* dan diaduk sampai larut. Larutan diultrasonikasi selama 5 menit kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml, kemudian ditambah volumenya dengan etanol *pa* sampai tanda batas. Kemudian diencerkan 10x dengan larutan di pipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml, kemudian ditambah volumenya dengan etanol *pa* sampai tanda batas. Kemudian baca absorbansi pada panjang gelombang 290-320 nm dengan interval 5 nm menggunakan blanko etanol *pa*.

9.3 Perhitungan nilai Sun Protection Factor (SPF). Spektrum serapan didapat dengan alat spektrofotometri UV pada panjang gelombang 290-320 nm menggunakan interval 5 nm. Nilai absorbansi dijadikan dasar dalam perhitungan SPF. Nilai absorbansi yang diperoleh dikali dengan $EE \times I$ untuk setiap interval. Jumlah $EE \times I$ yang didapat dikalikan dengan faktor koreksi dan diperoleh nilai SPF

dari sampel uji. Nilai SPF dihitung dengan memakai persamaan Mansur. Rumus persamaan Mansur seperti di bawah ini (Mishra *et al.*, 2012) :

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times \text{absorbansi}(\lambda)$$

Keterangan :

CF : Faktor koreksi (=10)

EE : Spektrum efek erytemal

I : Spektrum simulasi sinar matahari

Abs : Absorbansi produk *sunscreen*

Nilai EE x I adalah suatu konstanta yang ditunjukkan pada tabel 5.

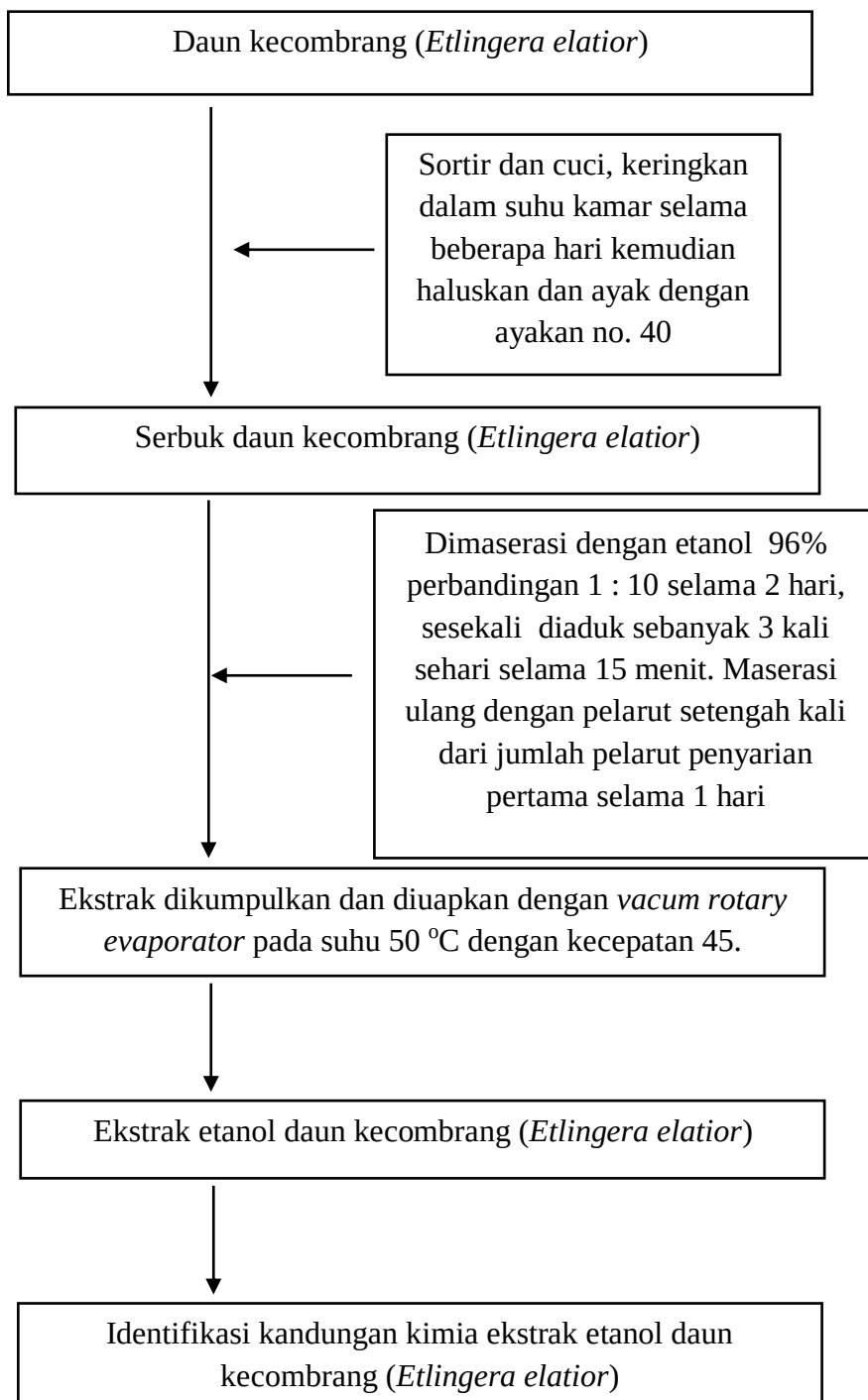
Tabel 5 Konstanta EE x I pada panjang gelombang 290-320 nm

Panjang gelombang (λ nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1

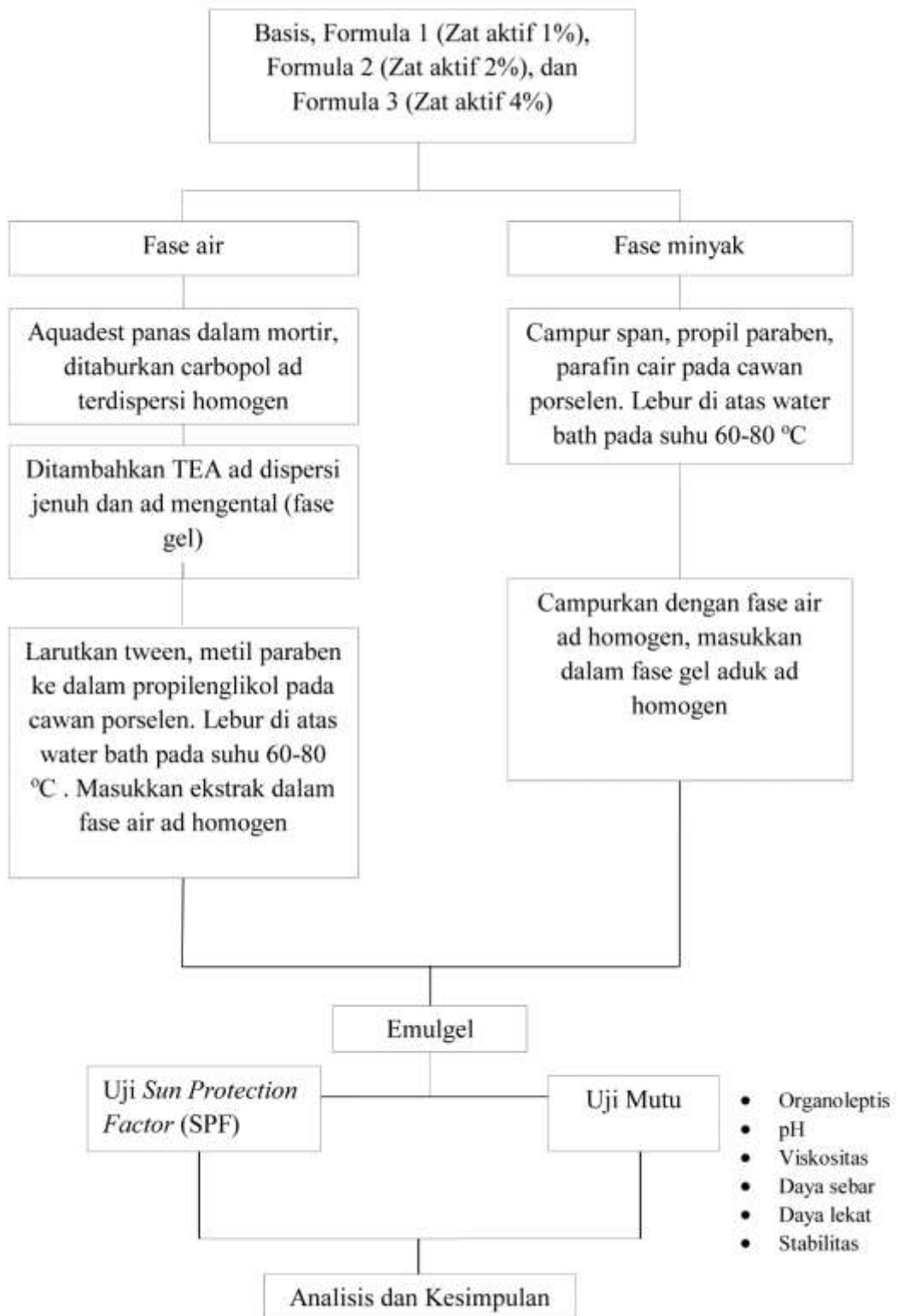
E. Analisis Hasil

Emulgel dari setiap formula diuji mutu sifat fisik meliputi organoleptis, pH, homogenitas, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan stabilitas emulgel. Stabilitas emulgel terhadap suhu dilakukan dengan metode *cycling test*. Analisis hasil data dilakukan dengan pendekatan statistic menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Hasil data yang diperoleh dianalisis dengan *Kolmogorov-smirnov/Shapiro-wilk*, jika data yang didapat menyatakan distribusi normal maka langkah berikutnya dilakukan analisis dengan *one way anova* atau uji *kruskall wallis* jika data tidak terdistribusi normal, untuk melihat apakah terdapat perbedaan antar formula. Analisis dilanjutkan dengan *paired t test/Wilcoxon*.

F. Skema Penelitian



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*)



Gambar 4. Skema formula emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior*)