

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini menggunakan daun tanaman binahong yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman binahong yang memiliki daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, segar, dan bersih yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian adalah krim ekstrak etanol 70% daun binahong terhadap eritema.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah ekstrak daun binahong dari daun segar 18 kg.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah krim ekstrak etanol 70% daun binahong sebagai tabir surya dapat melindungi kulit dengan mencegah eritema dinyatakan dengan SPF pada kulit punggung kelinci.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi sebelumnya dapat diklasifikasikan ke dalam variabel yang berbeda: variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perubahan konsentrasi ekstrak daun binahong dalam pembuatan produk tabir surya yaitu : 0,85, 0,95, dan 1%.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dibuat konstan. Oleh karena itu, validitasnya harus ditentukan agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diperbanyak dengan baik oleh peneliti lain. Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah media, sterilisasi, kondisi fisik hewan laboratorium meliputi berat badan, umur dan jenis kelamin,

lokasi luka, suhu, makanan dan minuman kelinci, proses produksi tabir surya, penelitian dan laboratorium termasuk kondisi. dari bahan steril.

Variabel terikat merupakan titik sentral dari masalah yang menjadi pilihan dalam penelitian. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah adanya aktivitas SPF pada kulit punggung kelinci, yang terlihat sebagai eritema yang luas, nilai SPF, $Te(\%)$, dan $Tp(\%)$.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun binahong adalah daun tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, masih segar dan bebas dari penyakit, diambil dari Kecamatan Semin, Kabupaten Gunungkidul

Kedua, ekstrak etanol daun binahong adalah ekstrak kental hasil remaserasi daun binahong dengan pelarut etanol 70%.

Ketiga, uji SPF adalah metode untuk penentuan nilai efektivitas perlindungan terhadap sinar UV dengan alat spektrofotometer UV-VIS.

Keempat, menentukan aktivitas SPF pada kulit punggung kelinci dengan cara menghitung luas eritema, nilai SPF, $Te(\%)$, dan $Tp(\%)$.

Kelima, Efektivitas sediaan tabir surya salah satu dapat dinyatakan sebagai nilai SPF, yang didefinisikan sebagai jumlah energi UV yang diperlukan untuk mencapai MED pada area kulit yang dilindungi tabir surya, dibagi dengan jumlah energi UV yang diperlukan untuk mencapai MED pada kulit yang tidak dilindungi.

Keenam, Persen transmisi eritema $Te(\%)$ menggambarkan banyaknya sinar matahari yang terus menerus setelah menyentuh tabir surya dapat menyebabkan kulit menjadi kemerahan (eritema).

Ketujuh, persen transmisi pigmentasi $Tp(\%)$ menggambarkan banyaknya sinar matahari yang ditransmisikan setelah menyentuh tabir surya, dapat menyebabkan kulit menjadi gelap.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu : Sendok, blander, alat penyerbukan, ayakan no. 60, jerigen, botol kaca besar gelap, corong, kain flannel, timbangan analitik, plastik, oven, *moisture balance*, pipet volume, *grapple plate*, tabung reaksi, pipet tetes, alat destilasi, Erlenmeyer, *vacuum rotary evaporator*, beaker glass, labu takar, gelas ukur, spektrofotometer UV-VIS, kertas saring, vial, kertas

HVS, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, alat uji pH, lempeng kaca, mortir, stamper, cawan porselin, sudip, pot salep, batang pengaduk, kendang kelinci, alat pencukur bulu, gunting, jangka sorong, penggaris, lampu *Exoterra*

2. Bahan

Ekstrak daun binahong, tabir surya, aquadest, Kelinci *New Zealand White*, pakan kelinci, etanol 70%, etanol pro analis.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi untuk menentukan keaslian sampel tanaman daun binahong dengan cara membandingkan sifat makroskopik dan morfologi tanaman yang diteliti dengan kunci identifikasi untuk menghindari kesalahan pada tanaman yang digunakan dalam penelitian. Pengujian dilakukan di B2P2TOOT.

2. Pengumpulan bahan

Daun binahong diambil dari Tawangmangu, Jawa Tengah. dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran lain yang menempel pada daun binahong, lalu dikeringkan dengan metode kering angin selama ± 1 minggu kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 50°C selama 1-2 hari.

3. Pembuatan serbuk binahong

Serbuk daun binahong kering sebanyak 11 kg diblender, kemudian diserbuk lalu diayak menggunakan ayakan no 60. Hasil serbuk 1 kg disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat, kemudian dilakukan persentase bobot kering terhadap bobot basah.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk binahong

Penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dengan menggunakan alat *Moisture balance*. Timbang sebanyak 2 gram serbuk dan mengatur suhu 105°C sampai bobot konstan dan terdapat bunyi dari *moisture balance*, tunggu hingga diperoleh bobot konstan yang memiliki kadar air kurang dari 10% (Kemenkes RI, 2010). Proses enzimatik dan mikroorganisme akan rusak jika kadar air lebih dari 10%, sehingga penyimpanan jangka panjang dapat mengubah kandungan bahan kimia yang terbentuk (Sayuti, 2015).

5. Penetapan kadar air serbuk daun binahong

Metode yang digunakan adalah destilasi toluen, dilakukan dengan menimbang serbuk 20 gram ditambah 200 mL toluen jenuh air

kedalam labu. Panaskan labu selama 15 menit, atur kecepatan penyulingan kurang lebih 2 tetes per detik, kemudian naikan kecepatan hingga 4 tetes per detik. Hitung kadar air dalam % v/b (Courtney, 2017).

6. Pembuatan ekstrak etanol daun binahong

Sampel daun kering kemudian dihaluskan menggunakan blender bahan kering khusus. Daun binahong sebanyak 900 gram dimaserasi selama 3 hari dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan bubuk dan pelarut 1:10, kemudian proses maserasi serbuk Simplisia yang dibenamkan didiamkan sambil diaduk secara berkala setiap 6 jam untuk mengganti pelarut setiap 24 jam. Proses ekstraksi dilanjutkan dengan maserasi kembali, ditambahkan etanol 70% pada residu dan didiamkan selama 18 jam, lalu disaring dengan kain flanel dan kertas saring, selanjutnya dilakukan remaserasi. Filtrat yang dihasilkan diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk memisahkan pelarut dari ekstrak. Ekstrak hasil ekstraksi diuapkan dan air yang tersisa diuapkan dalam oven pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\% \dots\dots\dots (7)$$

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun

7.1. Pemeriksaan flavonoid. Sebanyak 100 mg ekstrak etanol 70% daun binahong ditambahkan beberapa tetes HCl pekat yang kemudian ditambahkan sedikit serbuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna merah dan orange dalam waktu 3 menit. Adanya flavonoid adalah akibat dari reduksi oleh asam klorida pekat dan magnesium yang diatndakan dengan adanya warna merah (Mustikasari dan Aryani, 2010).

7.2. Pemeriksaan saponin. Sampel 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan air panas 10 ml, kemudian dikocok dengan kuat. Apabila terdapat busa dengan tinggi 1 – 10 cm yang stabil dan tidak kurang dari 10 menit dan busa tidak hilang ketika ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1979).

7.3. Pemeriksaan tanin. Ekstrak 1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dengan 10 ml air panas dan dididihkan 5 menit, setelah itu filtrat ditambah FeCl₃ 3 – 4 tetes. Apabila hasil berwarna hijau biru (hijau – hitam) menandakan adanya tannin katekol dan apabila hasil

berwarna biru hitam menandakan adanya tannin pirogalol (Ergina *et al.*, 2014).

7.4. Pemeriksaan steroid. Ekstrak sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan 2 ml etil asetat lalu dikocok. Pada plat tetes ditetaskan lapisan etil asetat dan biarkan hingga kering. Setelah kering, tambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika hasil berwarna hijau menandakan adanya steroid (Ergina *et al.*, 2014).

7.5. Pemeriksaan terpenoid. Sampel ekstrak daun binahong sebanyak 2 gram diambil lalu ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Apabila terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Ergina *et al.*, 2014).

7.6. Pemeriksaan alkaloid. Ekstrak sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan 5 ml HCl 2 N lalu dipanaskan dan didinginkan lalu dibagi menjadi 3 bagian dengan takaran masing – masing 1 ml. Setiap tabung ditambahkan dengan masing pereaksi. Pada tabung yang ditambahkan pereaksi Mayer, jika terbentuk adanya endapan putih atau kuning maka terdeteksi adanya alkaloid. Pada tabung yang ditambahkan pereaksi Wagner akan terbentuk endapan coklat yang menandakan positif alkaloid. Pada penambahan pereaksi Dragendrof jika terbentuk endapan berwarna jingga maka akan menandakan adanya kandungan alkaloid pada ekstrak (Mustikasari dan Aryani, 2010).

8. Pembuatan krim dengan ekstrak daun binahong

Krim Ekstrak Daun Binahong diproduksi berdasarkan M/A menggunakan eksipien yang terdiri dari fase air (akuades, nipagin, TEA, gliserin) dan fase minyak (setil alkohol, stearic acid, nipasol). Eksipien kemudian ditambahkan secara terpisah ke dalam mortar, yaitu fase minyak dan fase air.

Krim dibuat dengan memanaskan secara terpisah antara fase air dan fase minyak pada suhu 60-70 °C. Fasa air dan fasa minyak dipanaskan diatas *water bath*. Dipanaskan hingga fase minyak meleleh dan fase air melarutkan semua komponen. Fasa cair dan terlarut, kemudian fasa minyak dan fasa air dipindahkan dari pemanas untuk pencampuran dengan menuangkan fasa air ke atas fasa minyak, diaduk terus-menerus pada suhu yang menurun sampai terbentuk dasar krim. Massa krim kemudian dicampur secara bertahap dengan ekstrak daun

binahong dan dicampur secara homogen pada suhu kamar dan disesuaikan dengan konsentrasinya, yaitu 0,85, 0,95, dan 1%.

Tabel 4. Formulasi krim ekstrak etanol daun binahong

Komposisi	F0 (g)	FI (g)	FII (g)	FIII (g)
Ekstrak daun binahong		(0,85%)	(0,95%)	(1%)
Asam stearat	6,25	6,25	6,25	6,25
Cetil alcohol	2,00	2,00	2,00	2,00
Nipasol	0,025	0,025	0,025	0,025
TEA	0,50	0,50	0,50	0,50
Gliserin	4,00	4,00	4,00	4,00
Nipagin	0,05	0,05	0,05	0,05
Akuadest	ad 50,00	ad 50,00	ad 50,00	ad 50,00

9. Pengujian sifat fisik sediaan krim ekstrak daun binahong

9.1. Uji homogenitas. Periksa homogenitasnya dengan menimbang 1 gram krim yang dioleskan di atas piring kaca. Jika krim tidak memiliki gumpalan yang terlihat atau potongan yang tidak tercampur, itu disebut sediaan homogen (Depkes, 1979).

9.2. Uji pH. Alat pengukur pH digunakan untuk menentukan tingkat pH. PH diukur setelah sepenuhnya merendam elektroda pengukur. Penting agar pH krim berada dalam kisaran alami kulit 4,2 hingga 6,5 (Wasitaatmadja, 1997).

9.3. Uji daya lekat. Bagian kaca diuji daya rekatnya dengan ditutup dengan serangkaian alas. Setelah meletakkan barang kaca di atasnya, berat 1 kg diterapkan dan ditahan di sana selama 5 menit. Sepasang gelas objek diamankan ke alat uji, berat 80 g dilepas, dan jumlah waktu yang dibutuhkan kedua gelas untuk jatuh ke tanah dicatat. Sebanyak tiga tes independen dilakukan (Asma, 2016).

9.4. Uji daya sebar. Krim 0,5 g diletakkan di atas kaca bundar. Tutupnya diletakkan di atas platform dan dibiarkan selama 1 menit. Diameter sebaran alas diukur dengan mengambil rata-rata panjang diameter beberapa sisi. Beban tambahan seberat 50 gram diletakkan di atas alas, ditiadakan selama 1 menit, dan diameter bentangan alas dicatat. Pengujian dilanjutkan dengan setiap penambahan beban 50 gram sampai dengan beban 150 gram dan diameter sebaran tanah dicatat setelah 1 menit. Eksperimen ini diulang tiga kali. Hasil yang dihitung adalah diameter rata-rata dan standar deviasi (Asma, 2016).

10. Penentuan efektivitas perlindungan terhadap sinar UV dilakukan *secara in vitro* dengan alat spektrofotometer UV-Vis

10.1. Penentuan nilai SPF. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,85, 0,95, dan 1% (0,085, 0,095, 0,1 gram dalam 10 ml), sedangkan krim 0,1 gram, kemudian dilarutkan dengan aquades 10 ml. Saring dengan kertas saring dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian tambahkan aquadest sampai tanda batas. Larutan diukur pada gelombang 290-320 nm, nilai serapan dicatat setiap interval 5. Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing konsentrasi, kemudian dihitung nilai SPFnya dengan menggunakan persamaan Mansur :

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times abs(\lambda) \dots\dots\dots (8)$$

Keterangan:

CF = Faktor Koreksi
 EE = Spektum efek eritema
 I = Spektrum intensitas matahari
 Abs = Absorbansi sampel

10.2. Penentuan nilai Te(%) dengan spektrovotometer UV-VIS. Sampel ditimbang sebanyak 0,85, 0,95, dan 1% (0,085, 0,095, 0,1 g dalam 10 ml), sedangkan krim 0,1 gram. Kemudian dilarutkan dengan aquades 10 ml . Saring dengan kertas saring dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian tambahkan aquadest sampai tanda batas. Larutan yang telah diperoleh diukur dengan panjang gelombang 292-317 nm, nilai serapan dicatat setiap interval 5. Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing konsentrasi. Hasil transmittan dicatat kemudian dihitung nilai Te(%).

10.3. Penentuan nilai Tp(%) dengan spektrofotometer UV-VIS. Sampel ditimbang sebanyak 0,85, 0,95, dan 1% (0,085, 0,095, 0,1 gram dalam 10 mL), sedangkan krim 0,1 gram. Kemudian dilarutkan dengan aquades 10 ml . Saring dengan kertas saring dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian tambahkan aquadest sampai tanda batas. Larutan yang telah diperoleh diukur dengan panjang gelombang 322-372 nm, nilai serapan dicatat setiap interval 5. Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing konsentrasi. Hasil transmittan dicatat kemudian dihitung nilai Tp(%).

11. Uji aktivitas perlindungan tabir surya secara *in vivo*

11.1. Penyiapan hewan uji. Kelinci diadaptasikan dengan kondisi laboratorium selama dua minggu sambil terus menerima

makanan dan minuman. Kelinci yang digunakan adalah kelinci yang sehat dengan berat 1,5-2 kg. Metode yang dipilih adalah untuk melihat efek eritema pada kulit hewan coba yang dipapar sinar UV. Kelinci sebagai hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing 5 ekor kelinci dalam 5 perlakuan, yaitu :

Kontrol positif : diolesi tabir surya (Y.O.U Toner up UV Elixir)

Kontrol negatif : dioles basis cream tanpa ekstrak

Perlakuan I : Krim + ekstrak etanol daun binahong 0,85%

Perlakuan II : Krim + ekstrak etanol daun binahong 0,95%

Perlakuan III : Krim + ekstrak etanol daun binahong 1%

Bahan dibiarkan kontak + 1 jam kemudian dipajan pada sinar UV-B selama 24 jam. Pengamatan dilakukan setelah 1 jam dari pajanan.

11.2. Uji aktivitas eritema. Luas eritema dihitung dengan menggunakan penggaris. Skor eritema yang digunakan yaitu :

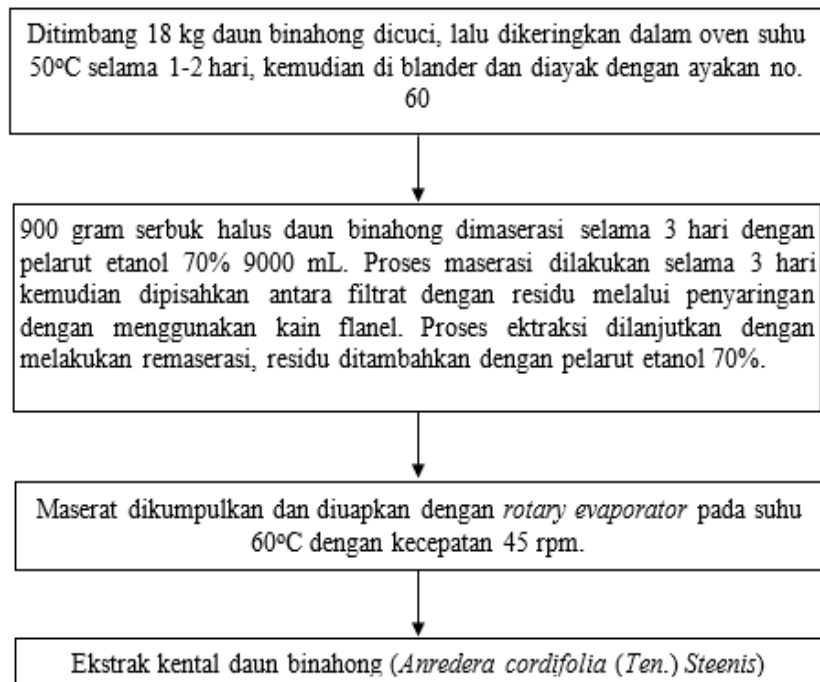
Tabel 5. Skor eritema

Skor	Diameter (mm)	Keterangan
0	≤ 25	Tidak ada eritema
1	≥ 25	Eritema sangat sedikit dengan
2	25,10 – 30,00	Eritema berbatas jelas dengan
3	30,10 – 35,00	Eritema moderat sampai berat
4	$\geq 35,10$	Eritema membentuk kerak dan merah men

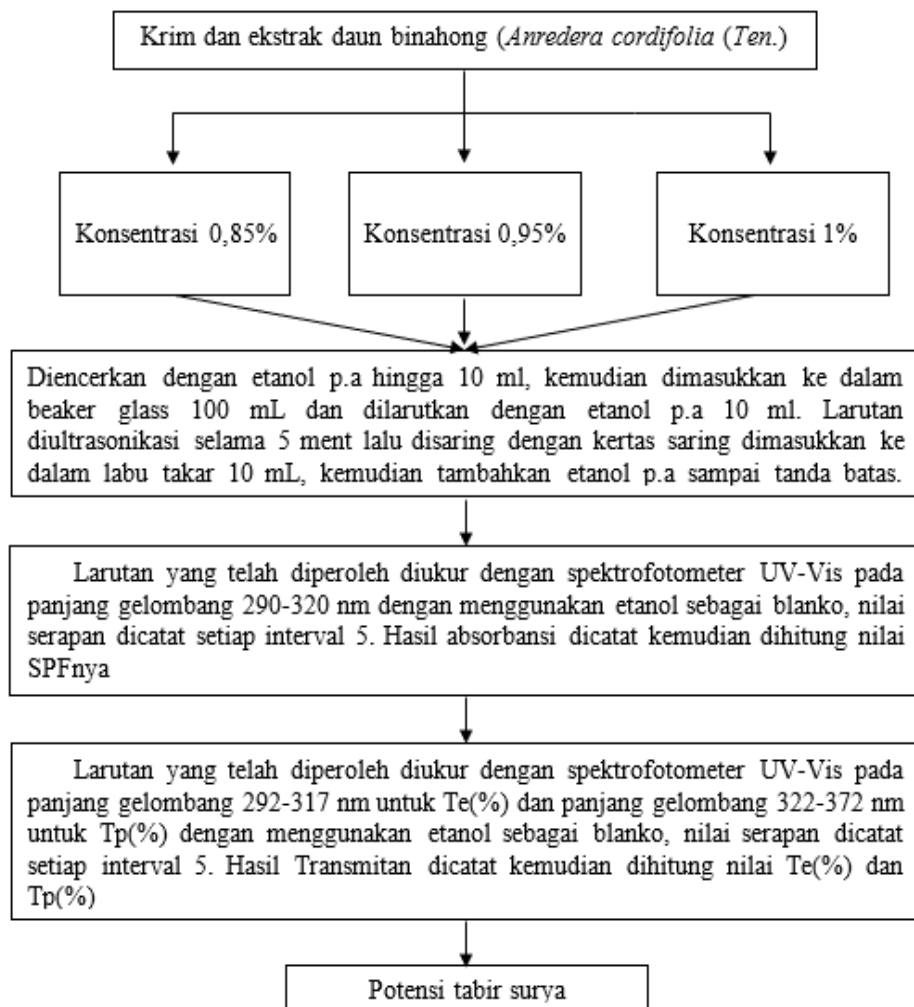
E. Analisis Hasil

Data yang didapatkan diuji normalitasnya menggunakan *Kolmogorov-Smirnov*, apabila didapatkan nilai signifikan $p > 0,05$ maka data tersebut terdistribusi normal, dan dapat dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan uji *Lavene's test* untuk mengetahui kehomogenan sebaran data, apabila didapatkan nilai signifikan $p > 0,05$ maka data tersebut terdistribusi homogen. Hasil dilanjutkan dengan metode *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95%, kemudian dilakukan uji *tukey* untuk mengetahui adakah perbedaan bermakna. Analisis data pada penelitian ini menggunakan program SPSS 26.0.

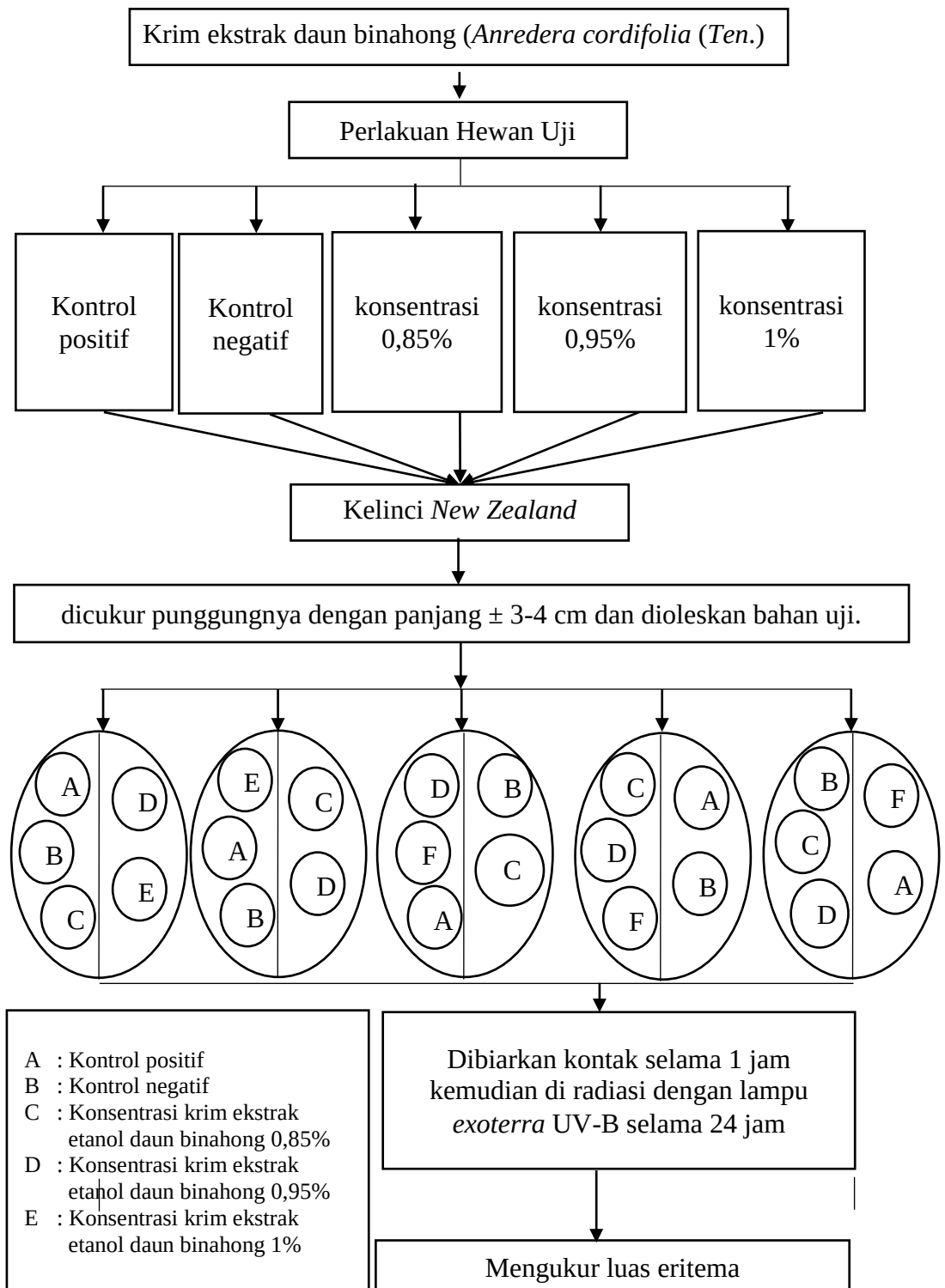
F. Skema penelitian



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak etanol daun binahong.



Gambar 6. Uji aktivitas tabir surya ekstrak etanol daun binahong secara *in vitro*.



Gambar 7. Uji aktivitas tabir surya ekstrak etanol daun binahong secara *in vivo*.