

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan penelitian kuantitatif berupa metode eksperimental secara *in vitro* menggunakan etanol 96% daun Kelakai (*Stenochlaena palutris* (BURM.F) BEDD) untuk mengukur aktivitas tabir surya dalam sediaan lotion. Adapun tahapan yang dilakukan meliputi determinasi tumbuhan Kelakai (*Stenochlaena palutris* (BURM.F) BEDD), penyiapan sampel, pembuatan ekstrak etanol daun Kelakai (*Stenochlaena palutris* (BURM.F) BEDD), pengujian senyawa flavonoid, pembuatan sediaan lotion, pemeriksaan mutu fisik sediaan, serta pemeriksaan efektivitas tabir surya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Absorbansi yang didapatkan dari hasil Spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk mengetahui nilai SPF yang terdapat pada sediaan.

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah daun Kelakai (*Stenochlaena palutris* (BURM.F) BEDD) yang diperoleh dari Desa Handil, Kecamatan Muara Jawa, Kabupaten Kutai Kartanegara, Provinsi Kalimantan Timur.

2. Objek Penelitian

Objek pada penelitian ini adalah aktivitas tabir surya pada daun tanaman Kelakai (*Stenochlaena palutris* (BURM.F) BEDD).

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2021 sampai dengan April 2022 yang dilaksanakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Kimia, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

D. Definisi Operasional

1. Definisi Operasional

- a. Ekstrak daun kelakai (*Stenochlaena palutris* (BURM.F) BEDD) merupakan hasil dari proses ekstraksi maserasi sederhana daun kelakai dengan pelarut etanol 96 persen.
- b. Variasi konsentrasi ekstrak daun kelakai adalah 1,0 persen, 2,0 persen, dan 3,0 persen.
- c. Ekstrak adalah sediaan kental yang dibuat dengan mengeluarkan sari komponen aktif yang terdapat dalam simplisia hewan atau tumbuhan menggunakan pelarut yang sesuai. Setelah komponen aktif diekstraksi, semua atau hampir semua pelarut diuapkan, dan massa atau bubuk residu ditangani sedemikian rupa sehingga memenuhi persyaratan yang ditetapkan (Zulharmitta *et al.*, 2017).
- d. Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang termasuk dalam kelompok polifenol. Mereka berlimpah dalam tanaman dan makanan dan memiliki efek bioaktif yang berbeda, seperti anti-virus, anti-inflamasi, kardioprotektif, anti-diabetes, anti-kanker, anti-penuaan, dan kemampuan antioksidan, di antara fitur lainnya.
- e. Spektrofotometri UV-Vis adalah teknik analisis yang menggunakan panjang gelombang ultraviolet (UV) dan panjang gelombang tampak (Visible) sebagai daerah serapan untuk tujuan mengidentifikasi keberadaan senyawa. Senyawa yang memiliki gugus kromofor dan gugus auksokrom seringkali merupakan jenis bahan kimia yang dapat dideteksi menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Jika dibandingkan dengan prosedur pengujian lainnya, pengujian yang dilakukan dengan Spektrofotometri UV-Vis tergolong kategori dan cepat (Handoyo Sahumena *et al.*, 2020).

2. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Formulasi *lotion* ekstrak daun Kelakai (*Stenochlaena palustris* (BURM.F) BEDD) dengan variasi konsentrasi ekstrak 1,0%, 2,0%, dan 3,0%.

b. Variabel Terikat

Variable terikat pada penelitian ini adalah nilai *Sun Protection Factor* (SPF), ekstrak etanol daun Kelakai digunakan untuk pembuatan sediaan *lotion* secara *in vitro*.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun Kelakai, gliserin, *TEA*, parafin cair, cera alba, asam stearat, metil paraben (nipagin), propil paraben (nipasol), *essence* mawar, aquadest, dan *Nivea Lotion* SPF 33++ (kontrol positif).

2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (labu ukur, erlenmeyer, gelas ukur, pipet ukur), *Rotary Evaporator* (*Buchi*), lumpang dan alu, cawan porselen, penangas air, batang pengaduk, spatula, oven, sudip, pipet tetes, kertas saring, neraca analitik, Kertas Indikator pH (*Merck*), objek gelas, Viskometer (*ViscoQC 100*), dan Spektrofotometri UV-Vis (*Thermo*).

F. Metode Pengumpulan Data

Adapun metode pengumpulan data dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Studi Kepustakaan

Studi literatur yang peneliti dapatkan digunakan sebagai dasar panduan dan pedoman untuk melakukan penelitian terkait

formulasi yang didapatkan dari berbagai sumber seperti jurnal, artikel, buku, skripsi penelitian dan karya ilmiah sebagai bahan perbandingan dalam penelitian.

2. Metode Eksperimen

Metode yang digunakan dengan tujuan untuk mengetahui proses dan tahapan dalam simplisia tanaman pada pembuatan formulasi sediaan *lotion* ekstrak daun Kelakai (*Stenochlaena palutris* (BURM.F) BEDD) yang akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Kimia, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

G. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh untuk menentukan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) adalah hasil absorbansi dari sediaan *lotion* dengan metode spektrofotometri UV-Vis dari masing-masing sampel. Kemudian dilakukan perhitungan dengan rumus :

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

Keterangan :

CF= Faktor Korelasi (10), EE= Efisiensi Eriterma, I = Spektrum Simulasi Sinar Surya (Wungkana *et al.*, 2013).

H. Alur Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tumbuhan

Sampel tumbuhan yang diperoleh dari Desa Handil Kecamatan Muara Jawa, Kabupaten Kutai Kartanegara di determinasi di Laboratorium Ekologi dan Konservasi Biodiversitas Hutan Tropis, Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur, untuk dilakukan identifikasi dan memastikan kebenaran tumbuhan Kelakai (*Stenochlaena palutris* (BURM.F) BEDD).

2. Penyiapan Sampel

a. Pengambilan Sampel

Sampel terdiri dari daun kelakai yang dikumpulkan dari Desa Handil yang terletak di Kecamatan Muara Jawa Kabupaten Kutai Kartanegara di Provinsi Kalimantan Timur.

b. Pembuatan Ekstrak Daun Kelakai

Daun Kelakai yang telah dipanen dicuci untuk menghilangkan kontaminan asing dan kotoran lainnya. Setelah itu, daun dibersihkan dengan air mengalir sampai bersih dari kotoran. Setelah dibersihkan, daunnya ditiriskan dan dikeringkan baik dengan cara dijemur atau di oven. Setelah simplisia kering, dimasukkan ke dalam blender dan dihaluskan.

Metode maserasi digunakan untuk mengekstrak simplisia dari daun Kelakai, dan pelarut digunakan etanol konsentrasi 96 persen. Jumlah serbuk simplisia daun Kelakai yang dimaserasi sebanyak 500 gram, dan digunakan pelarut etanol sebanyak 3,75 liter dengan kandungan 96%. Kertas cokelat digunakan untuk melapisi stoples, dan kemudian ditutup dengan aluminium foil untuk melindungi isinya dari sinar matahari langsung. Amalan perendaman selama tiga hari sambil diaduk setiap delapan jam selama total 15 menit.

Setelah menunggu selama 3 hari, maserat ke-1 perlu disaring agar bisa didapatkan hasilnya. Untuk mendapatkan maserat ke-2, ampas hasil penyaringan direndam kembali (remaserasi) selama satu hari dalam 1,25 liter pelarut yang mengandung etanol 96 persen, kemudian disaring kembali (Puspitasari & Setyowati, 2018).

Setelah menggabungkan maserat ke-1 dan maserat ke-2, campuran dipekatkan *melalui rotary vacuum evaporator* yang diatur pada suhu 40 derajat Celcius untuk dipekatkan menjadi ekstrak cair. Setelah ekstrak cair diperoleh, kemudian

dipekatkan dengan cara dipanaskan dalam penangas air sampai suhu 50 derajat Celcius agar diperoleh ekstrak yang kental, yang kemudian disimpan dalam desikator (Mardikasari *et al.*, 2017).

3. Skrining Fitokimia Ekstrak

a. Uji Flavonoid

Analisis flavonoid ekstrak etanol daun kelakai, sebanyak 0,5 gram ekstrak terlebih dahulu dicampurkan dalam 5 mililiter air mendidih, setelah itu campuran dipanaskan selama lima menit dan disaring. Setelah itu ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium, 1 mL asam klorida pekat, dan 2 mL etanol dengan konsentrasi 96 persen. Untuk mendapatkan warna yang *oranye* kekuning-kuningan, hitam kemerahan, atau di antara keduanya (Utami *et al.*, 2021).

b. Uji Fenolik

Setelah 0,5 gram sampel ekstrak dilarutkan dalam 5 mL akuades sebagai bagian dari analisis fenolik ekstrak etanolik daun kelakai, sampel kemudian disaring dan direaksikan dengan 2 tetes larutan FeCl_3 5%. Sehingga terbentuk warna ungu kehitaman atau hitam kebiruan hingga hitam pekat (Utami *et al.*, 2021).

c. Uji Tanin

Pada uji tanin ekstrak etanol daun Kelakai, sampel ekstrak 0,5 gram dipanaskan dengan aquadest sebanyak 20 mL lalu disaring. Kemudian ditambahkan dengan 2 tetes FeCl_3 1%. Dan dilihat terbentuknya warna hijau kehitaman (Utami *et al.*, 2021).

4. Pembuatan Sediaan *Lotion*

a. Rancangan Formula

Formulasi sediaan losion dibuat dengan menggunakan konsentrasi ekstrak yang berbeda, masing-masing termasuk 1,0 persen, 2,0 persen, dan 3,0 persen, untuk mendapatkan

hasil yang diinginkan. Seluruh ramuan memiliki berat total seratus gram. Akan ada tiga salinan identik dari setiap formulasi. Ekstrak daun kelakai merupakan salah satu yang digunakan dalam penelitian ini. Berdasarkan jurnal yang digunakan, berikut adalah desain formulasi lotion yang akan dijadikan acuan berdasarkan jurnal Damayanti *et al.*, 2017 :

Tabel 3.1 Formulasi *Lotion*
(Damayanti *et al.*, 2017)

Bahan	Formula			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak Etanol Daun Kelakai (<i>Stenochlaena palutris</i> (BURM.F) BEDD)	-	1,0	2,0	3,0
Gliserin	5	5	5	5
Trietanolamin	1,2	1,2	1,2	1,2
Parafin Cair	7	7	7	7
Cera Alba	3	3	3	3
Asam Stearat	4,5	4,5	4,5	4,5
Setil Alkohol	2	2	2	2
Metil Paraben	0,2	0,2	0,2	0,2
Propil Paraben	0,03	0,03	0,03	0,03
Oleum Rosae	3 tetes	3 tetes	3 tetes	3 tetes
Akuades ad	100	100	100	100

Keterangan :

F 0 : Blanko (dasar *lotion* tanpa ekstrak dengan replikasi 3x)

F 1 : Konsentrasi ekstrak daun Kelakai 1,0% (dengan replikasi 3x)

F 2 : Konsentrasi ekstrak daun Kelakai 2,0% (dengan replikasi 3x)

F 3 : Konsentrasi ekstrak daun Kelakai 3,0% (dengan replikasi 3x)

b. Prosedur Pembuatan Sediaan *Lotion* Tabir Surya

Bahan yang digunakan dibagi menjadi dua kategori: yang larut dalam fase minyak dan yang larut dalam fase air. Kedua kategori tersebut kemudian dibagi lagi. Cera alba, asam stearat, parafin cair, dan propil paraben (nipasol) adalah contoh bahan kimia yang larut dalam minyak. Sementara air, gliserin, TEA, dan metil paraben (nipagin), serta air, merupakan komponen yang larut dalam air (Putri *et al.*, 2019).

Fase air (B) dan fase minyak (A) dipanaskan hingga sekitar 70 derajat Celcius dalam wadah terpisah sebelum dicampur hingga homogen. Setelah itu, fase air dipanaskan

hingga 70 derajat Celcius, dan fase minyak diaduk sambil ditambahkan sedikit demi sedikit sampai campuran menjadi homogen dan menghasilkan basis lotion. Setelah itu, diamkan di suhu ruangan hingga suhu mencapai 40 derajat Celcius (Damayanti *et al.*, 2017).

Kecepatan dalam penggerusan dan kecepatan dalam penambahan bahan harus konstan sehingga fase minyak didispersikan dengan cepat dalam fase air selama penambahan. Namun, kecepatan dalam penggerusan tidak boleh terlalu cepat karena dapat menimbulkan gelembung-gelembung udara atau busa (*foam*). Ekstrak etanol daun Kelakai digerus pada lumpang lain, kemudian dicampurkan dengan massa C sedikit demi sedikit hingga ekstrak bercampur dengan basis *lotion*. Kemudian ditambahkan odoris atau pewangi secukupnya. Setelah penambahan pewangi, pengadukan diteruskan hingga terbentuk sediaan *lotion* ekstrak etanol daun Kelakai (Dayan, 2016).

5. Pemeriksaan Mutu Fisik Sediaan *Lotion*

a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan secara visual, pengamatan yang dilakukan meliputi warna, bau, dan bentuk yang dihasilkan dari formulasi sediaan yang telah dibuat (Putri *et al.*, 2019).

b. Uji Homogenitas

Bila sediaan dalam jumlah tertentu dimasukkan ke dalam sepotong kaca atau bahan transparan lain yang sesuai, sediaan tersebut perlu menunjukkan bahwa sediaan tersebut memiliki rangkaian yang homogen dan tidak boleh ada butiran kasar yang terlihat (Ditjen POM, 1979).

c. Penentuan Tipe *Lotion* Sediaan

Metilen biru digunakan untuk jenis uji tipe pada *lotion*, dan pengujian dilakukan pada *lotion* yang telah ditetesi pewarna tersebut. Jika metilen biru dan losion tidak menyatu, hal ini

menunjukkan bahwa losion tersebut berjenis a/m, namun jika bercampur akan menunjukkan bahwa losion tersebut bertipe m/a (Putri *et al.*, 2019).

d. Pengukuran pH Sediaan

pH sediaan losion dapat ditentukan dengan merendam selembar kertas indikator pH ke dalam sediaan losion sebelum melakukan pengujian. Setelah itu, perhatikan pH-nya. Kulit dengan pH berkisar 5,0 hingga 6,5 mampu beradaptasi dengan baik ketika bersentuhan dengan senyawa yang memiliki pH berkisar 4,5 hingga 8,0 (Putri *et al.*, 2019).

e. Uji Stabilitas Sediaan

Memasukan sebanyak 2 gram ke dalam tabung sentrifus kemudian diputar dengan kecepatan 5000 rpm selama pengujian 10 menit. Setelah proses sentrifugasi, lotion diperiksa untuk menentukan apakah fase minyak dan air telah terpisah atau tidak (Putri *et al.*, 2019).

f. Uji Daya Sebar

Meletakkan kaca di atas losion dan membiarkannya selama satu menit, 0,5 gram losion secara total didistribusikan secara merata di sekitar bagian tengah peralatan, yang memiliki diameter 15 sentimeter. Setelah itu, diameter losion diukur menggunakan jangka sorong atau penggaris. Selanjutnya ditambahkan pemberat seberat 50 gram dan didiamkan selama satu menit sebelum diameter diukur kembali. Akhirnya, 100 gram berat lainnya ditambahkan ke lotion dan dibiarkan selama satu menit sebelum diameter diukur. Dieksekusi dengan replikasi tiga kali lipat (Iskandar *et al.*, 2021).

g. Uji Viskositas Sediaan

Viskositas sediaan diukur dengan viskometer Brookfield, dan prosedurnya meliputi merendam spindel viskometer dalam 100 gram sediaan yang telah ditempatkan dalam gelas

kimia dengan kecepatan yang tepat. Hasil uji viskositas dicatat. Setelah tingkat stabilitas yang diinginkan tercapai, skala pada instrumen akan menunjukkan viskositas sediaan. Uji viskositas ini dilakukan tiga kali untuk mengevaluasi konsistensi sediaan (Slamet *et al.*, 2020). Range viskositas sediaan topikal yang baik yaitu 2.000-50.000 cP (Rakhmawati *et al.*, 2019).

h. Uji Iritasi

Evaluasi ini dilakukan untuk mengetahui apakah lotion yang baru diformulasikan akan menyebabkan iritasi pada kulit pengguna atau tidak. Hal ini dapat dicapai dengan mengoleskan berbagai losion pada punggung tangan dari dua puluh responden terpisah untuk jangka waktu mulai dari lima hingga dua puluh menit dan mengamati reaksi iritasi yang dihasilkan (Zhelsiana *et al.*, 2016).

Menurut Ditjen POM, 1985 tanda-tanda untuk mencatat reaksi uji iritasi dapat dilakukan seperti berikut :

Tidak Mengiritasi	-
Kulit Kemerahan	+
Kulit Gatal-Gatal	++
Kulit Bengkak	+++

i. Uji Keberterimaan (*Hedonic Test*)

Uji keberterimaan dilakukan selama 1 hari pada 20 orang responden yang dipilih sedara acak untuk mengisi kuesioner yang telah disediakan. Setiap orang mendapatkan kesempatan untuk menilai sediaan *lotion* yang telah disediakan meliputi penampilan, warna, aroma, dan tekstur dari keempat formula yang diuji (Husni *et al.*, 2021).

Tujuan dari uji hedonis adalah untuk menentukan apakah komposisi produk akhir dapat diterima atau tidak oleh responden berdasarkan tingkat preferensi (Husni *et al.*, 2021) Skala hedonik yang digunakan adalah (-) hingga (+++)

dimana : (-) tidak diterima, (+) sedikit diterima, (++) diterima, (+++) sangat diterima.

6. Penentuan Nilai *Sun Protection Factor* (SPF)

Nilai SPF dapat ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan untuk setiap formula dan produk pembanding sebanyak tiga kali menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 290-320 nm setiap interval 5 nm. Ini akan memberikan pembacaan yang akurat tentang tingkat perlindungan matahari produk (Adawiyah, 2019). Produk pembanding yang digunakan peneliti adalah produk tabir surya yang ada di pasaran (Nivea Lotion SPF 33++).

Ditimbang masing-masing 0,5 gram sampel lotio F 1, F 2, F 3, F 0 (-), dan F 4 (+) dilarutkan dalam 25 ml (200 ppm) dengan etanol 96%. Setelah diperoleh larutan, dipintal dalam centrifuge pada 3000 rpm selama sepuluh menit untuk mengendapkan zat. Diputuskan untuk membuat larutan blanko dari etanol murni (p.a.). Untuk menghitung nilai SPF lotion, pembacaan absorbansi dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis dan rentang panjang gelombang 290-320 nm digunakan untuk pengukuran. Spektrofotometer UV-Vis dikalibrasi menggunakan etanol murni sebelum pengukuran dilakukan. Setiap percobaan dilakukan dengan menggunakan tiga ulangan dari setiap formula (Widyawati *et al.*, 2019). Setelah diperoleh data kemudian diolah dengan persamaan sebagai berikut:

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

Keterangan :

CF= Faktor Korelasi (10), EE= Efisiensi Eriterma, I = Spektrum Simulasi Sinar Surya (Wungkana *et al.*, 2013).

Tabel 3.2 Nilai EE x I Pada Panjang Gelombang 290-320 nm
(Widyawati *et al.*, 2019).

Panjang Gelombang (λ nm)	Nilai 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	

I. Jadwal Penelitian

No	Jenis Kegiatan	Bulan								
		Ok t	No v	De s	Ja n	Fe b	Ma r	Ap r	Me i	Ju n
1.	Penentuan dan penetapan judul	■								
2.	Penyusunan proposal penelitian	■	■							
3.	Pengajuan proposal			■						
4.	Desk evaluasi			■	■					
5.	Revisi hasil desk evaluasi penelitian			■	■					
6.	Perizinan			■	■	■				
7.	Pengambilan sampel			■	■	■				
8.	Pengujian sampel di Laboratorium				■	■	■	■		
9.	Penyusunan proposal hasil					■	■	■	■	■
10.	Seminar hasil						■	■	■	■