

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah krim tabir surya daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah krim tabir surya daun stroberi dengan variasi konsentrasi yang berbeda yaitu 0,125 % ; 0,250 % dan 0,500 %.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah krim tabir surya daun stroberi yang diformulasikan dalam berbagai konsentrasi ekstrak daun stroberi, dengan menggunakan emulgator dan basis tipe M/A dan akan dilakukan pengujian krim dengan berbagai parameter pengujiannya.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi 3 bagian yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel kendali.

Variabel bebas adalah variasi yang sengaja dibuat untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daun stroberi yang ditambahkan dalam formulasi krim tabir surya daun stroberi.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kestabilan fisik krim dan aktivitas krim daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) sebagai tabir surya.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah metode pengeringan simplisia, metode penyerbukan simplisia, metode ekstraksi, proses

pembuatan krim, suhu pembuatan krim, komponen basis krim yang digunakan, serta bahan, alat instrumen analisis dan pengolesan sediaan krim pada kelinci.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun stroberi adalah bagian dari tanaman daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) yang berbentuk trifoliolate terdiri dari satu daun dan tiga anak daun dengan tepi bergerigi, yang diambil dari Cemoro Sewu, Magetan, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) adalah serbuk yang dibuat dengan mencuci daun stroberi kemudian dihaluskan dengan menggunakan glinder sampai diperoleh serbuk daun stroberi lalu dikeringkan dalam udara terbuka, lalu sampel ditimbang dan diayak dengan ayakan mesh 60 sehingga diperoleh serbuk halus.

Ketiga, ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) adalah ekstrak kental yang diperoleh dari proses maserasi serbuk daun stroberi selama 5 hari dengan menggunakan pelarut etanol 96 % kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator (40-50°C) sehingga diperoleh ekstrak pekat daun stroberi.

Keempat, krim tabir surya ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) adalah krim yang mengandung ekstrak kental daun stroberi dengan konsentrasi yaitu 0,125 % ; 0,250 % dan 0,500 % menggunakan basis tipe M/A.

Kelima, sifat fisik krim adalah sifat-sifat dari krim tabir surya ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) yang akan diuji meliputi organoleptis, homogenitas, viskositas, daya sebar, daya lekat dan pengujian pH.

Keenam, aktivitas tabir surya adalah kemampuan dari ekstrak krim daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*)

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *toothed discmills*, Cawan porselin, kertas saring, kurs porselin, cawan porselin, botol kaca, seprangkat alat kaca, kaca arloji, penangas air, rotary evapoerator, oven, moisture balance, pipet

volume 1 ml dan 5 ml, labu takar 10 ml dan 25 ml, tabung reaksi, stop watch, ayakan no.60, separangkat alat maserasi, spektrofotometer UV-VIS shimadzu, kuvet, viskometer stokes, alat uji daya lekat, objek dan deek glass dan *pH* meter oakion.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*), etanol 96%, toluen, metilen *blue*, serbuk Mg, HCl, FeCl₃, larutan meyer, larutan bouchardad, asam stearat, setil alkohol, trietanolamin, propilen glikol, isopropil miristat, asam askorbat, metil paraben, propil paraben, etanol pro analisis dan air suling.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi dan identifikasi dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) yang akan digunakan dalam penelitian ini. Determinasi dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) terhadap kepustakaan yang telah dibuktikan oleh Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat Tradisional.

2. Pengambilan bahan

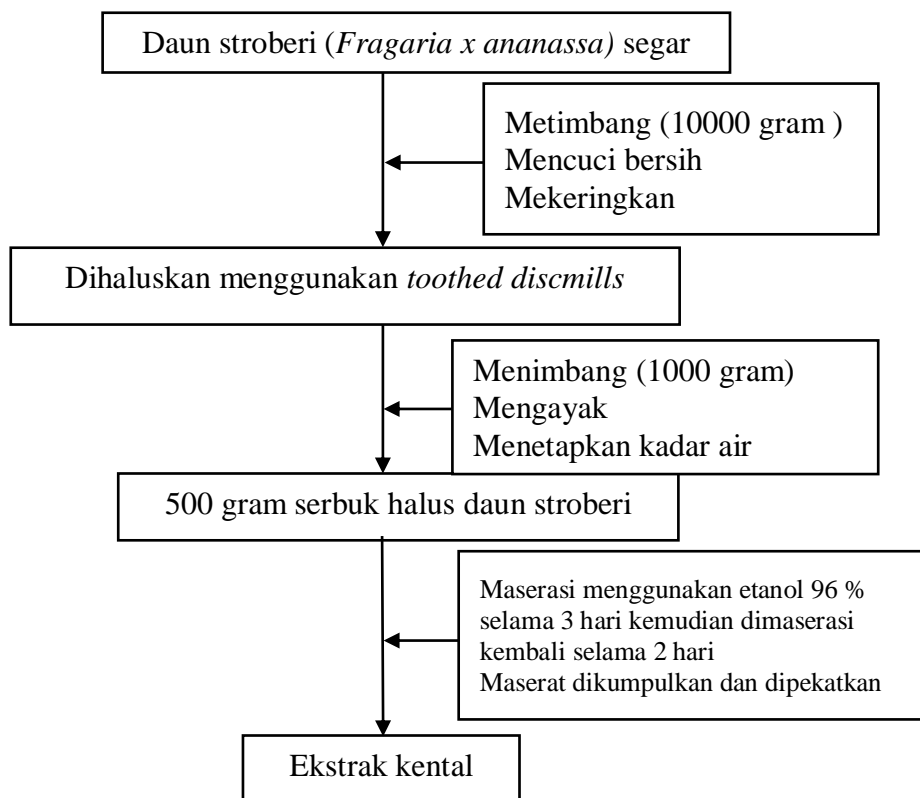
Pengambilan bahan yaitu daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) dalam penelitian diambil dari Cemoro sewu, Magetan, Jawa Timur pada bulan Desember 2018 .

3. Pembuatan serbuk daun stroberi

Daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) 5000 gram dibersihkan dari pengotor, dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C, lalu dihaluskan menggunakan *toothed discmills* sampai diperoleh serbuk daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) kemudian serbuk daun stroberi ditimbang dan diayak menggunakan mesh 40 hingga diperoleh serbuk halus daun stroberi.

4. Pembuatan ekstrak daun stroberi

Serbuk daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) ditimbang 500 gram, kemudian dimasukkan dalam bejana dan ditambahkan 75 bagian pelarut etanol 96 % (3,75L) sampai semua sampel terendam dalam pelarut dan biarkan selama 3 hari. Maserat disaring dan diperoleh ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*). Maserasi dilakukan kembali dengan menambahkan 25 bagian pelarut etanol 96% (1,25L) selama 2 hari. Ekstak etanol yang diperoleh dijadikan satu dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C dengan kecepatan 45 rpm sehingga diperoleh ekstrak pekat etanol 96% (BPOM 1986).



Gambar 12. Skema pembuatan ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*)

5. Kontrol kualitas serbuk daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*)

5.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari serbuk

daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*). Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, bau, warna dan rasa.

5.2 Penetapan kelembapan. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan metode *moisture balance*. Menghidupkan alat *moisture balance* 30 menit sebelum digunakan dengan cara menekan tombol merah sampai display menyala, setelah alat siap dioperasikan atur waktu, suhu (105 °C) dan mode pemanasan. Menekan tombol start pada display akan muncul perintah masukkan pan, kemudian buka penutup pan dan masukkan pan, tutup kembali tuup pan kemudian tekan tombol zero. Membuka tutup pan lalu tambahkan serbuk daun stroberi sebanyak 2 kemudian tutup pan kembali. Proses berlangsung sampai kadar muncul dalam display.

6. Kontrol kualitas ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*)

6.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari ekstrak kental. Pemeriksian organoleptis meliputi bentuk, bau, warna dan rasa.

6.2 Penetapan kelembapan. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan metode *moisture balance*. Menghidupkan alat *moisture balance* 30 menit sebelum digunakan dengan cara menekan tombol merah sampai display menyala, setelah alat siap dioperasikan atur waktu, suhu (105 °C) dan mode pemanasan. Menekan tombol start pada display akan muncul perintah masukkan pan, kemudian buka penutup pan dan masukkan pan, tutup kembali tuup pan kemudian tekan tombol *zero*. Membuka tutup pan lalu tambahkan ekstrak daun stroberi sebanyak 2 kemudian tutup pan kembali. Proses berlangsung sampai kadar muncul dalam *display*.

7. Skrining fitokimia ekstrak daun stroberi daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*)

Identifikasi kandungan senyawa flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid pada simplisia daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

7.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak ditimbang 0,1 gram dicampurkan dengan 50 ml air panas, kemudian ditambahkan 0,1 gram magnesium, setelah itu di tetesi dengan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Hasil positif dinyatakan apabila ekstrak berubah berwarna merah atau jingga (Depkes RI 1979).

7.2 Identifikasi tanin dan polifenol. Ekstrak diencerkan menggunakan etanol kemudian ambil sebanyak 1 ml direaksikan dengan larutan Besi (III) klorida 10%, jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa tanin dan polifenol (Wulandari 2011).

8. Rancangan formula krim tabir surya ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*)

Rancangan formula dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 6. Rancangan formula krim tabir surya ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*)

Bahan	Konsentrasi bahan (%)			
	F1	F2	F3	F4
Ekstrak daun stroberi	0,125	0,250	0,500	-
Asam stearat	3,5	3,5	3,5	3,5
Setil alkohol	2	2	2	2
Propilen glikol	5	5	5	5
Parafin Liq	20	20	20	20
Metil Paraben	0,15	0,15	0,15	0,15
Propil paraben	0,05	0,05	0,05	0,05
Isopropil miristat	4	4	4	4
Gliserin monostearat	2	2	2	2
Tea	1	1	1	1
Minyak stroberi	0,2	0,2	0,2	0,2
Aquadest ad	100	100	100	100

Keterangan :

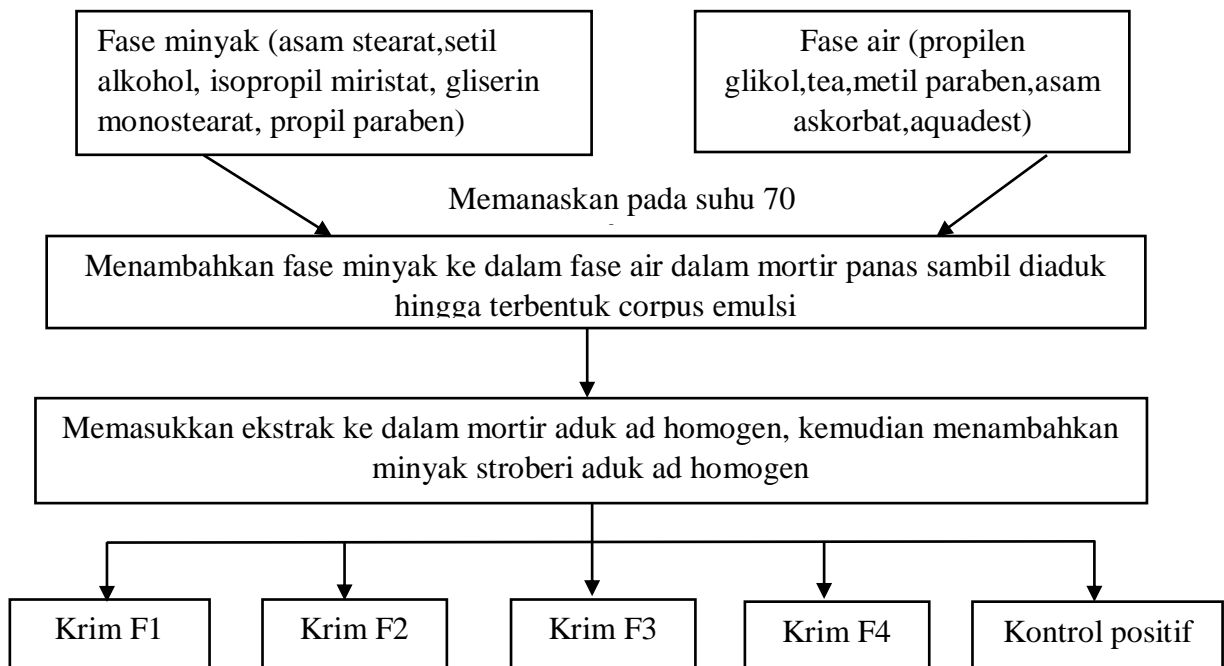
- F1 : sediaan krim dengan konsentrasi ekstrak daun stroberi 0,125%
- F2 : sediaan krim dengan konsentrasi ekstrak daun stroberi 0,250%
- F3 : sediaan krim dengan konsentrasi ekstrak daun stroberi 0,500%
- F4 : sediaan krim tanpa ekstrak daun stroberi (kontrol negatif)

Dibuat 3 formulasi krim tabir surya ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*) dengan menggunakan variasi konsentrasi ekstrak yaitu 0,125%; 0,250% dan 0,500%.

9. Pembuatan krim tabir surya ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*)

Krim dibuat dengan cara masing-masing bahan ditimbang sesuai dengan perhitungan kemudian, panaskan fase minyak (asam stearat, setil alkohol, isopropil miristat, gliserin monostearat, propil paraben, parafin liq) pada suhu 70°C.

Panaskan fase air (propilen glikol, TEA, metil paraben, asam askorbat, aquadest) pada suhu 70 °C. Emulsi dibuat dengan cara menambahkan fase minyak ke dalam fase air dalam mortir panas sambil diaduk hingga terbentuk corpus emulsi. Ekstrak dimasukkan ke dalam mortir aduk ad homogen, kemudian tambahkan minyak mawar aduk ad homogen. masukkan wadah kedap cahaya (Wilkinson & Moore 2009).



Gambar 13. Skema pembuatan krim ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*)

Keterangan : F1 krim menggunakan ekstrak etanol daun stroberi konsentrasi 0,125 % , F2 krim menggunakan ekstrak etanol daun stroberi konsentrasi 0,250 % , F3 krim menggunakan ekstrak etanol daun stroberi konsentrasi 0,500 % , F4 krim menggunakan ekstrak etanol daun stroberi 0% (kontrol negatif) dan kontrol positif menggunakan emina *sunscreens*.

10. Pengujian sediaan krim ekstrak daun stroberi

10.1. Mutu fisik sediaan.

10.1.1 Pemeriksaan organoleptis. Pengamatan organoleptis dari sediaan dilakukan dengan mengamati perubahan-perubahan bentuk, warna, dan bau sediaan (Septiani 2011).

10.1.2 Pemeriksaan homogenitas. Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan menggunakan kaca objek. Cara Pengujian: Pengujian ini dilakukan

menggunakan 2 kaca objek. Sejumlah tertentu sediaan dioleskan pada sekeping kaca objek dan kemudian kaca objek yang lainnya ditempelkan pada kaca objek yang sudah diolesi sediaan. Suatu sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Depkes 2014).

10.1.3 Penentuan tipe krim. Pengujian ini dengan melarutkan sediaan krim dengan salah satu pelarut yaitu air atau minyak. Jika krim merupakan tipe M/A dan dilarutkan dengan air, maka akan stabil dimana air akan terdispersi dalam media, tetapi jika dilarutkan dengan minyak, krim akan pecah dimana air dan minyak tidak akan tercampur satu sama lain. Minyak dalam air dapat dengan mudah dilarutkan menggunakan pelarut air, sebaliknya tipe krim air dalam minyak dapat dilarutkan dengan cairan minyak (Safitri *et al.* 2014).

10.1.4 Penentuan pH sediaan. Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan alat pH meter. Rentang nilai pH yang aman untuk kulit atau sediaan setengah padat adalah sekitar 4,5 – 6,5 (Soeratri *et al.* 2005).

10.1.5 Pemeriksaan viskositas dan sifat alir. Pengukuran viskositas dilakukan dengan viskometer Haake 6R. Sediaan dituang ke dalam gelas piala, selanjutnya dipasang spindle. Kemudian spindle diturunkan ke dalam sediaan hingga batas yang ditentukan. Pengukuran dilakukan dengan viskometer Haake 6R dengan kecepatan diatur mulai dari 10; 12; 20; 30; 50; 60; 100; dan 200 rpm, kemudian dibalik dari 200; 100; 60; 50; 30; 20; 12; 10 rpm. Pemeriksaan viskositas dilakukan pada minggu ke-0 dan minggu ke-4 setelah penyimpanan suhu ruang dan suhu 40 °C (Marinda 2012).

10.1.6 Pemeriksaan daya sebar. Pemeriksaan daya sebar dilakukan dengan menimbang sekitar 1 gram sediaan diletakkan diantara 2 kaca *acrylic*. Kaca *acrylic* bagian atas ditimbang terlebih dahulu kemudian diletakkan di atas sediaan dan dibiarkan selama 1 menit. Kaca *acrylic* bagian atas diberi beban dengan berat sekitar 50 gram, dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian diukur diameter sebar nya. Kemudian ditambahkan kembali beban dengan berat 100 gram dan diukur diameter sebar nya. Hal ini dilakukan hingga beban maksimum di atas sediaan seberat 150 gram. Selanjutnya dibuat grafik hubungan antara beban dan luas sebar sediaan (Swastika 2013; Voight 1994, yang sudah dimodifikasi).

10.2. Uji Stabilitas.

10.2.1 Pengamatan *cycling test*. Krim disimpan pada suhu $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke dalam oven yang bersuhu $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (satu siklus). Uji ini dilakukan sebanyak 6 siklus atau selama 12 hari kemudian diamati adanya pemisahan fase (Marinda 2012).

10.2.2 Uji sentrifugasi. Krim dimasukkan ke dalam alat sentrifugasi kemudian dimasukkan ke dalam alat sentrifugator dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Perlakuan tersebut sama dengan perlakuan adanya gravitasi selama 1 tahun. Selanjutnya diamati apakah terjadi pemisahan atau tidak (Budiman 2008).

10.3. Penentuan nilai SPF sediaan krim.

10.3.1 Preparasi sampel. Sediaan krim ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etanol PA. Larutan diultrasonikasi selama 5 menit lalu disaring dengan kertas saring. Larutan filtrat kemudian dipipet sebanyak 5 mL, dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL kemudian diencerkan dengan etanol pro analis. Larutan dibaca di spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang 290-320 nm.

10.3.2 Penentuan nilai SPF . Nilai SPF dihitung menggunakan persamaan mansur. Larutan yang telah diperoleh diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 290-320 nm dengan menggunakan etanol sebagai blanko, nilai serapan dicatat setiap interval panjang gelombang 5 nm. Nilai serapan yang diperoleh dikalikan dengan $EE \times I$ untuk masing-masing interval. Nilai $EE \times I$ tiap interval dapat dilihat pada tabel 3. Jumlah $EE \times I$ yang diperoleh dikalikan dengan faktor koreksi akhirnya diperoleh nilai SPF dari sampel yang diuji. Sampel dihitung nilai SPF dengan persamaan 1.

$$SPF = C \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \dots\dots (1)$$

Keterangan :

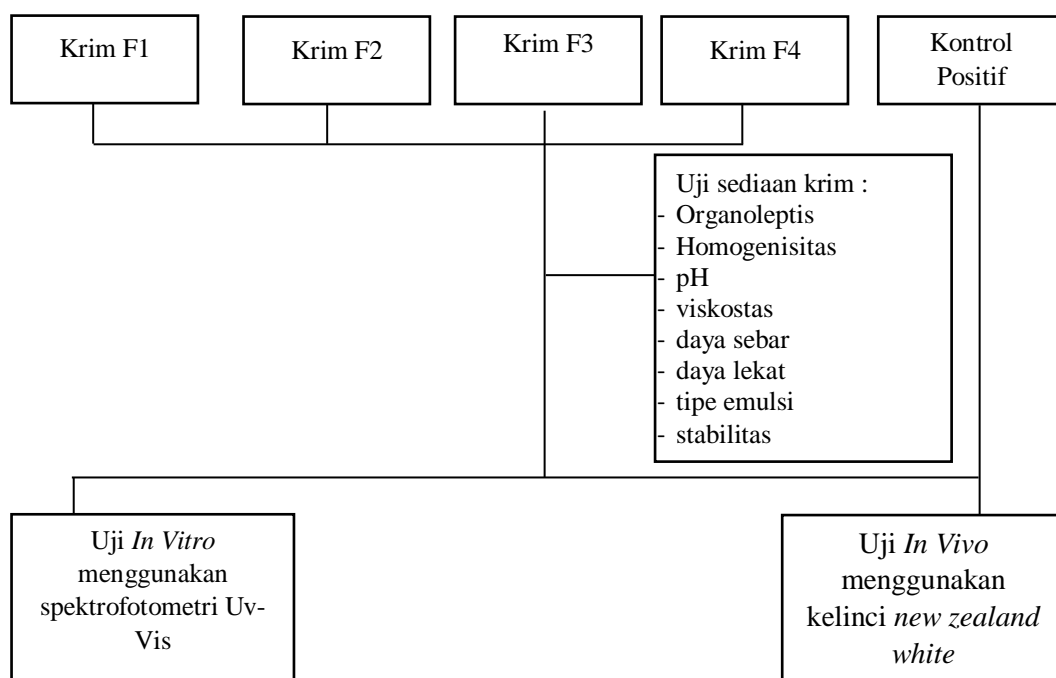
<i>CF</i>	:faktor koreksi (10)
<i>EE</i>	: spektrum efek eritema
<i>I</i>	: intensitas cahaya
<i>Abs</i>	: absorbansi sampel
Nilai $EE \times I$: nilai konstan dan telah ditetapkan

Untuk melihat perbedaan nilai SPF yang signifikan digunakan uji statistik menggunakan metode ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan program SPSS (*Statistical Package for the Social Science*).

10.4. Penentuan aktivitas tabir surya secara *in vivo*. Metode yang dipilih ialah dengan mengamati efek terjadinya eritema pada kulit hewan uji yang disinari dengan sinar UV. Kelinci putih sebagai hewan uji dibagi dalam 5 kelompok, masing-masing 1 kelinci putih dengan 6 perlakuan, yaitu : Kontrol Positif : sediaan tabir surya dipasaran (emina sun protection); Kontrol Negatif : sediaan krim tanpa penambahan ekstrak daun stroberi ; Perlakuan I : Konsentrasi 0,125% ; Perlakuan II : Konsentrasi 0,250% ; Perlakuan III : Konsentrasi 0,500% dan kontrol normal.

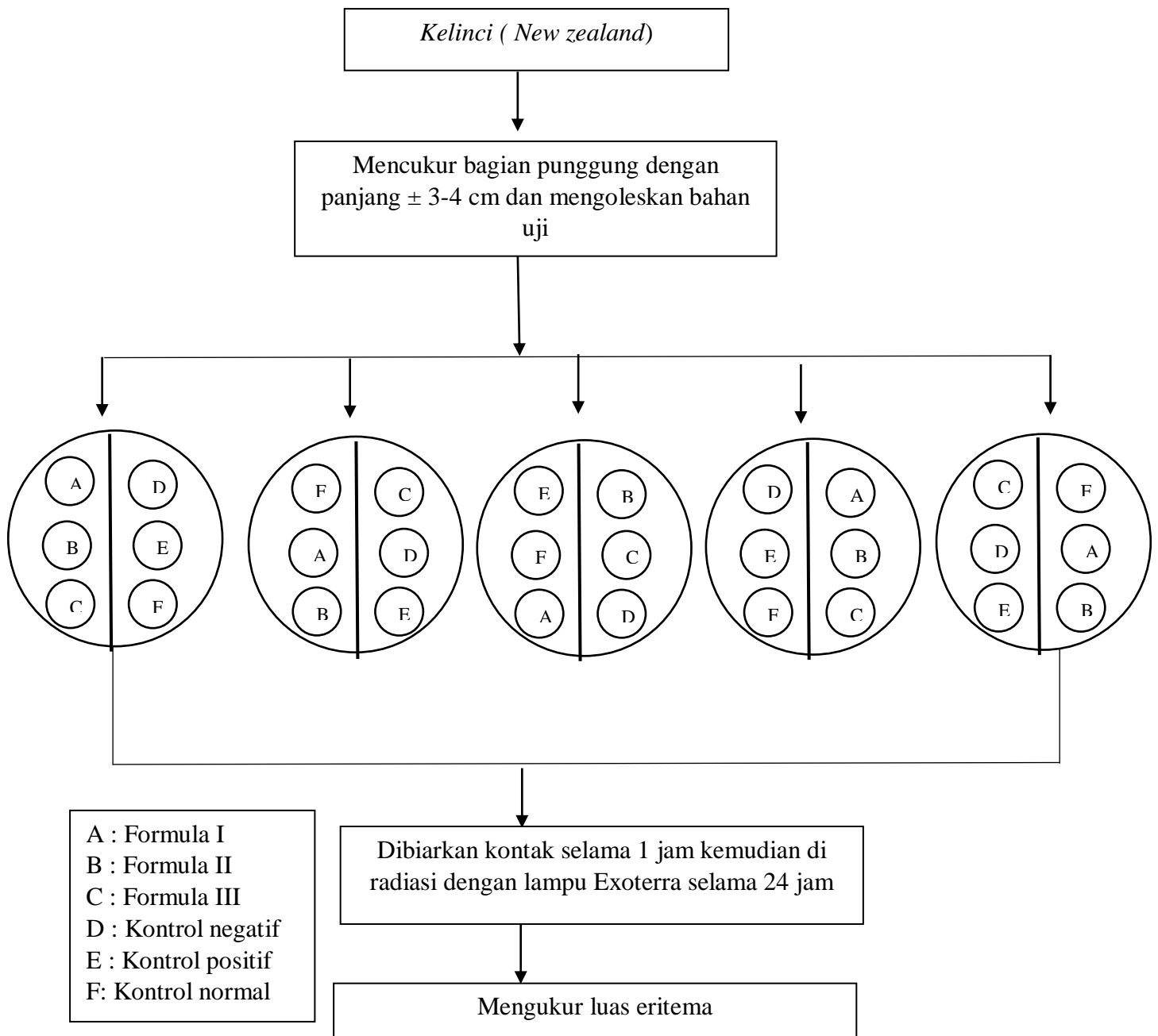
10.4.1 Perlakuan hewan uji. Hewan uji yang digunakan ialah kelinci putih dengan berat badan 2000 gram dan berusia 2-3 bulan. Semua kelinci dicukur punggungnya dengan panjang \pm 3-4 cm dan dioleskan bahan uji. Bahan uji dibiarkan kontak selama 1 jam kemudian di radiasi dengan lampu Exoterra selama 24 jam dan 48 jam.

10.4.2 Perhitungan luas eritema. Luas eritema dihitung dengan menggunakan penggaris. Skor eritema yang digunakan yaitu : 0 menyatakan tidak ada eritema ; 1 menyatakan eritema sangat sedikit dengan diameter \geq 25 mm ; 2 menyatakan eritema terbatas jelas dengan diameter 25,10 – 30,00 mm ; 3 menyatakan eritema moderat sampai berat diameter antara 30,10 – 35,00 mm dan 4 menyatakan eritema membentuk kerak dan merah menyala diameter \geq 35,10.



Gambar 14. Skema pengujian krim ekstrak etanol daun stroberi (*Fragaria x ananassa var duchesne*).

Keterangan : F1 krim menggunakan ekstrak etanol daun stroberi konsentrasi 0,125 % , F2 krim menggunakan ekstrak etanol daun stroberi konsentrasi 0,250 % , F3 krim menggunakan ekstrak etanol daun stroberi konsentrasi 0,500 % , F4 krim menggunakan ekstrak etanol daun stroberi 0% (kontrol negatif) dan kontrol positif menggunakan emina *sunscreens*.



Gambar 15. Pengujian aktivitas perlindungan tabir surya krim ekstrak etanol daun stroberi (*Fragaria ananassa var duchesne*) secara *in vivo*