

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran dari penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) yang diperoleh dari Pasar Legi, Surakarta.

2. Sampel

Sampel adalah suatu bagian dari populasi yang ada atau bagian yang diambil dengan kriteria tertentu, sehingga memenuhi syarat random dan representatif. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) yang berwarna hijau dan segar bebas dari hama yang dibuat menjadi gel dari ekstrak etanol daun kemangi dengan variasi konsentrasi ekstrak yaitu 0,24%, 0,48%, dan 0,96%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) yang diformulasikan dalam sediaan gel.

Variabel utama pada penelitian ini adalah aktivitas perlindungan gel tabir surya ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum* L.).

2. Klasifikasi variabel utama

Klasifikasi dari variabel utama terbagi menjadi berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel kendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya tergantung variabel tergantung. Variabel yang dimaksudkan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol dari daun kemangi dalam variasi konsentrasi yaitu 0,24%, 0,48%, dan 0,96%.

Variabel tergantung merupakan pusat permasalahan dari penelitian ini. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah stabilitas mutu fisik sediaan gel,

penentuan nilai SPF (*Sun Protecting Factor*), dan aktivitas perlindungan sebagai tabir surya gel ekstrak etanol daun kemangi.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasi agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lainnya secara tepat. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah metode pengeringan simplisia, metode penyerbukan simplisia, metode ekstraksi, proses pembuatan gel, suhu pembuatan gel, komponen basis yang digunakan, bahan dan alat instrumen analisis, preparasi larutan uji, banyaknya pengolesan pada kulit hewan, tebal tipisnya pengolesan, dan derajat eritema.

3. Definisi variabel utama

Pertama, daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) adalah tanaman yang hidup secara liar atau di budayakan dan mudah diperoleh di Asia seperti di Indonesia, yang berwarna hijau dan segar diperoleh dari Pasar Legi, Surakarta.

Kedua, serbuk daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) adalah serbuk yang dibuat dengan mencuci pada air yang mengalir, dipetik, dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C kemudian digiling hingga diperoleh serbuk lalu diayak menggunakan pengayakan no.40 hingga diperoleh serbuk.

Ketiga, ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) adalah hasil ekstraksi dari serbuk daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Keempat, sediaan gel tabir surya adalah tabir surya yang sudah diformulasikan dengan ekstrak etanol daun kemangi dengan berbagai konsentrasi ekstrak yaitu 0,24%, 0,48%, dan 0,96%.

Kelima, untuk hewan uji yang digunakan untuk uji aktivitas perlindungan tabir surya pada penelitian ini adalah kelinci betina (*New zealand*) yang diperoleh dari peternak hewan khusus hewan penelitian.

Keenam, uji SPF (*Sun Protecting Factor*) adalah metode untuk penentuan nilai efektivitas perlindungan terhadap sinar UV dengan alat spektrofotometer UV-VIS.

Ketujuh, uji aktivitas perlindungan tabir surya secara *in vivo* adalah dengan mengamati efek terjadinya eritema pada kulit punggung kelinci yang disinari dengan sinar UV. Menggunakan masing-masing formula gel tabir surya dengan ekstrak etanol daun kemangi dalam berbagai konsentrasi, kontrol negatif (tanpa ekstrak etanol daun kemangi) dan kontrol positif adalah gel produk pasaran (Parasol *sunscreen* gel SPF 15 dengan agen SPF (*Octyl methoxycinnamate*, *4-methylbenzylidene camphor*, dan *Butyl methoxydibenzoylmethane*).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah *toothed discmills*, bejana maserasi dari bahan gelas, timbangan analitik, oven, spektrofotometer UV-VIS, *moinsture balance*, kuvet, penangas air, Viskometer VT-04, *vacuum rotary evaporator*, alat-alat gelas (gelas ukur 100 ml, gelas ukur 10 ml, beaker glass 250 ml, beaker glass 500 ml), *erlenmeyer*, pipet ukur, batang pengaduk, cawan porselin, kaca arloji, labu ukur 100 ml, labu ukur 50 ml, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, *pH* meter, pipet volume 5 ml, stamper, mortir, kain flannel, kertas saring, ayakan no.40, *object glass* dan *deck glass*, sendok tanduk, kertas label, pot gel, corong, perangkat penggaris, pencukur bulu, sarung tangan, masker, kandang hewan dan lampu exoterra UV B.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kemangi segar, serbuk daun kemangi, ekstrak etanol daun kemangi, etanol 96%, *Aquapec* HV-505, gliserin, propilen glikol, trietanolamin, metil paraben, aquadest, minyak jeruk manis, serbuk Mg, HCl pekat, FeCl₃, larutan Dragendroff, larutan Liebermann Boucard, H₂SO₄, Amil alkohol, dan *n*-heksan.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran dari tanaman kemangi (*Ocimum americanum* L.) yang akan digunakan pada penelitian

ini. Determinasi dilakukan berdasarkan pada ciri-ciri morfologi yang ada di tanaman kemangi (*Ocimum americanum* L.) dengan mencocokkan ciri dan morfologi tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi untuk menghindari kesalahan dari tanaman yang digunakan untuk penelitian. Determinasi daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat Tradisional, Karanganyar, Tawangmangu.

2. Pengambilan bahan

Pengambilan bahan daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) untuk penelitian ini diambil dari Pasar Legi, Surakarta. Bagian tanaman yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak etanol daun kemangi adalah daun yang segar tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih, daun dilakukan pengeringan pada oven dengan suhu 50°C. .

3. Pembuatan serbuk simplisia

Simplisia kering sebanyak 1500 gram digiling lalu diayak dengan pengayakan no.40. hasil penyerbukan simplisia yaitu 500 gram, menimbang serbuk lagi untuk menentukan bobot kering dan bobot bobot basah, kemudian disimpan dalam wadah yang kering kemudian ditutup rapat.

4. Pembuatan ekstrak daun kemangi (*Ocimum americanum* L.)

Pembuatan ekstrak daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ditimbang serbuk sebanyak 400 gram kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca gelap ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1: 10. Kemudian direndam selama 6 jam sambil sesekali digojok. Lalu ditutup dan disimpan dalam ruangan yang terhindar dari sinar matahari selama 18 jam, disaring dengan menggunakan kain flanel, setelah itu memisahkan ampas dengan filtrat. Proses penyarian diulang dengan ampas pada penyarian pertama ditambahkan pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali dari jumlah pelarut pada penyarian pertama. kemudian semua maserat dikumpulkan, lalu diuapkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 50°C pada kecepatan 45 rpm hingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI 2013).

$$\% \text{ randemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

5. Identifikasi serbuk daun kemangi (*Ocimum americanum L.*)

5.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari serbuk daun kemangi (*Ocimum americanum L.*). pemeriksaan organoleptis ini meliputi bentuk, warna, dan bau.

5.2 Penetapan susut pengeringan. Susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Mengkalibrasi alat terlebih dahulu, lalu menara alat yang akan digunakan terlebih dahulu dengan akurasi sesuai dengan jumlah ekstrak yang diujikan. Kemudian menimbang serbuk sebanyak 2 gram dan memasukkan ke dalam plat tersebut, mencatat hasil pengukuran berupa angka dalam persen yang terdapat pada layar *moisture balance*.

6. Identifikasi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum L.*)

6.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum L.*). pemeriksaan organoleptis ini meliputi bentuk, warna, dan bau.

6.2 Penetapan susut pengeringan. Menara alat yang akan digunakan terlebih dahulu dengan akurasi sesuai dengan jumlah ekstrak yang diujikan. Menimbang kurang lebih 2 gram ekstrak daun kemangi lalu memasukkan ke dalam alat tersebut kemudian mencatat hasilnya berupa angka dalam persen yang terdapat pada layar *moisture balance*.

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum L.*)

Identifikasi kandungan kimia adalah untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kemangi. Identifikasi kandungan senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, dan saponin. Dilakukan di Laboratorium Fitokima Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Pengujian fitokimia dapat dilakukan sebagai berikut :

7.1 Identifikasi flavonoid. Ditimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak kental kemudian dilarutkan dengan 10 ml air panas dididihkan selama 5 menit. Lalu menyaring larutan ekstrak, dan diperoleh filtrat A. Diambil sebanyak 5 ml filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan serbuk Magnesium

sebanyak 0,1 gram ditambahkan HCl pekat sebanyak 1 ml dan ditambahkan Amil alkohol sebanyak 1 ml. kemudian campuran dikocok kuat dan didiamkan beberapa saat hingga larutan memisah. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan Amil alkohol (Depkes RI 1987).

7.2 Identifikasi tanin. Ditimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak kental kemudian dilarutkan dengan 10 ml air panas di didihkan selama 5 menit. Lalu disaring larutan ekstrak, dan diperoleh filtrat A. Diambil sebanyak 5 ml filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan larutan FeCl_3 0,1 gram. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan larutan menjadi biru kehitaman (tanin galat) atau larutan hijau kehitaman (tanin katekol) (Farnsworth 1996).

7.3 Identifikasi alkaloid. Ditimbang sebanyak 10 mg ekstrak kental, lalu ditambahkan 10 ml kloroform, diaduk rata. Campuran disaring kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 0,5 ml H_2SO_4 1 M dan dikocok baik-baik, dibiarkan beberapa saat. Lapisan atas yang jernih dipipet kedalam tabung reaksi kecil ditambahkan pereaksi Dragendorff sebanyak 2-3 tetes. Reaksi positif apabila menunjukkan endapan kuning jingga (orange) (Ditjen POM 2014).

7.4 Identifikasi saponin. Ditimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak kental dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air panas sebanyak 10 ml, kemudian di dinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. senyawa saponin dapat ditunjukan dengan adanya busa setinggi 1 cm yang stabil setelah dibiarkan selama 1 jam atau pada penambahan 1 tetes HCl 2 N (Ditjen POM 2014).

7.5 Identifikasi steroid. Ditimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak kental kemudian dilarutkan dengan 10 ml *n*-heksan selama 1 jam, kemudian disaring dan diperoleh filtrat A. Diambil sebanyak 5 ml filtrat A lalu diuapkan dalam cawan penguap. Ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard pada residu. Hasil positif steroid ditunjukkan dengan adanya warna biru hingga hijau (Farnsworth 1996).

8. Formulasi gel ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum* L.)

Formula sediaan gel ekstrak etanol daun kemangi, komposisi tiap formulasi dapat dilihat pada tabel dibawah ini : (Wathoni *et al.* 2015)

Tabel 1. Formula yang digunakan pada penelitian

Bahan	F1(g)	F2(g)	F3(g)	F4(g)
Ekstrak etanol daun kemangi	0,24	0,48	0,96	-
Aquapec HV 505	1	1	1	1
Metil Paraben	0,2	0,2	0,2	0,2
Propilen glikol	5	5	5	5
Trietanolamin	2	2	2	2
Gliserin	25	25	25	25
Minyak jeruk manis	0,2	0,2	0,2	0,2
Aquadest ad	100	100	100	100

Keterangan:

F1 : sediaan gel dengan konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi 0,24%

F2 : sediaan gel dengan konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi 0,48%

F3 : sediaan gel dengan konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi 0,96%

F4 : sediaan gel tanpa ekstrak etanol daun kemangi (kontrol negatif)

9. Pembuatan gel

Ditimbang sebanyak 1 gram *Aquapec* HV 505 kemudian ditaburkan diatas aquadest panas didalam mortir kemudian dikembangkan, ditambahkan trietanolamin sedikit demi sedikit lalu diaduk sampai homogen dan membentuk massa gel. Ditambahkan gliserin. Dilarutkan metil paraben dengan propilen glikol sedikit demi sedikit hingga homogen, kemudian dicampurkan dengan basis yang sudah dikembangkan, aduk dengan kecepatan yang stabil hingga homogen, kemudian tambahkan dengan aquadest sambil diaduk sampai homogen, ditambahkan sedikit demi sedikit ekstrak etanol daun kemangi sambil tetap diaduk dan yang terakhir ditambahkan aquadest sedikit demi sedikit kemudian menambakk minyak jeruk manis secukupnya aduk lagi hingga homogen. Dimasukkan ke dalam wadah.

10. Pengujian mutu fisik sediaan gel

10.1 Pengujian organoleptis. Uji organoleptis meliputi pemeriksaan konsistensi warna, bentuk, bau dari gel untuk mengetahui kondisi fisik dari gel. Gel yang stabil harus menunjukkan karakter yang sama berupa bentuk, warna dan bau yang sama setelah penyimpanan. Pengujian pertama dilakukan di hari ke-1 gel dibuat, dan diuji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatannya (Sharon *et al.* 2013).

10.2 Pengujian homogenitas. Pengujian homogenitas dilakukan dengan mengoleskan secukupnya sediaan gel pada gelas obyek kemudian mengamati ada tidaknya partikel atau zat yang belum tercampur secara homogen. Pengujian ini dilakukan pada hari ke-1 dan pada hari ke-21 (Sudjono *et al.* 2012).

10.3 Pengukuran pH. Pengukuran pH dilakukan dengan cara mencelupkan pH meter ke dalam sediaan gel. Mengkalibrasi pH meter dengan dapar standar dengan pH 7. Sediaan gel standar yang diencerkan terlebih dahulu, pH sediaan akan tertera pada monitor. Pengukuran pH gel diulangi sebanyak 3 kali tiap formulanya. Pengujian dilakukan pada hari ke-1 dan pada hari ke-21 (Wathoni *et al.* 2015).

10.4 Pengukuran viskositas. Diukur viskositas sediaan gel dengan menggunakan viskotester VT-04, masing-masing sediaan gel menggunakan viskotester VT-04 dengan spindel yang cocok (spindel 2). Pengukuran dilakukan 3 kali untuk masing-masing sediaan gel. Pengujian dilakukan pada hari ke-1 dan pada hari ke-21 (Wathoni *et al.* 2015).

10.5 Pengujian daya sebar. Pengujian daya sebar gel dilakukan dengan cara gel ditimbang sebanyak 0,5 gram diletakkan di tengah alat (kaca bulat), bagian atas menimbang terlebih dahulu dan diletakkan di atas massa gel, dibiarkan selama 1 menit dengan diberi beban 50 g, kemudian ditambahkan beban 100 g dan 150 g dibiarkan selama 1 menit. Kemudian diukur diameter sebar gel. Pengukuran diulangi sebanyak 3 kali Pengujian dilakukan pada hari ke-1 dan hari ke-21 (Suardi *et al.* 2009).

10.6 Pengujian daya lekat. Pengujian daya lekat gel dilakukan dengan cara gel ditimbang sebanyak 0,25 gram diletakkan pada gelas obyek kemudian diberi beban 1 kg selama 5 menit. Setelah itu memasang gelas obyek pada alat tes. Alat tes diberi beban 80 g dan kemudian dilepaskan dan di catat waktu pelepasan gel dari gelas obyek. Pengukuran dilakukan 3 kali untuk masing-masing sediaan gel. . Pengujian dilakukan pada hari ke-1 dan hari ke-21 (Suardi *et al.* 2009).

10.7 Pengujian stabilitas sediaan gel. Pengujian dilakukan dengan metode *freezethow* dan uji sineresis gel.

10.7.1 Pengujian *freezethow*. Yaitu dengan menyimpan sediaan pada suhu 4°C selama 48 jam kemudian dipindahkan ke suhu 40 °C selama 48 jam (satu siklus). Setelah itu dilanjutkan sampai 5 siklus, setiap satu siklus selesai, dilihat ada tidaknya pemisahan fase atau perubahan (Priyani *et al.* 2014).

10.7.2 Pengujian sineresis gel. Sineresis yang terjadi selama yang penyimpanan diamati dengan menyimpan gel pada suhu $\pm 10^{\circ}\text{C}$ selama 24, 48 dan 72 jam. Masing-masing gel ditempatkan pada cawan untuk menampung air yang dibebaskan dari dalam gel selama penyimpanan. Sineresis dihitung dengan mengukur kehilangan berat selama penyimpanan lalu dibandingkan dengan berat awal gel (Kuncari *et al.* 2014).

Menghitung tingkat sineresis dengan rumus:

$$\text{Tingkat sineresis} = \frac{\text{berat awal (g)} - \text{berat akhir (g)}}{\text{berat awal (g)}} \times 100\% \dots \dots \dots (5)$$

Keterangan :

Berat awal : berat gel dalam cawan

Berat akhir : berat gel dalam cawan setelah dilakukan pemisahan air yang terlepas dari sistem gel

11. Penentuan nilai SPF (*Sun Protecting Factor*)

Penentuan efektivitas perlindungan terhadap sinar UV dilakukan secara *in vitro* dengan alat spektrofotometer UV-VIS. Diambil sebanyak 0,5 gram gel ekstrak etanol daun kemangi dengan masing-masing konsentrasi ekstrak dalam sediaan gel (0,24 %, 0,48%, 0,96%) kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan etanol p.a sebanyak 10 ml. Larutan diultrasonikasi selama 5 menit lalu disaring dengan kertas saring. Larutan yang telah diperoleh diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 290-320 nm dengan menggunakan etanol p.a sebagai blanko. Kemudian dicatat nilai absorbansi setiap interval 5 nm. Hasil absorbansi kemudian dihitung nilai SPF nya dengan menggunakan persamaan Mansyur : (Wulandari *et al.* 2017)

$$\text{SPF} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE} \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda) \dots \dots \dots (3)$$

Keterangan :

CF = Faktor Koreksi (10)

EE = Spektum efek eritema

I = Spektum intensitas matahari

Abs = Absorbansi sampel

12. Pengujian aktivitas perlindungan tabir surya secara *in vivo*

12.1 Penyiapan hewan uji.

Mengadaptasikan kelinci selama 2 minggu dalam kondisi ruangan laboratorium dengan tetap diberi makanan dan minuman. Kelinci yang digunakan adalah kelinci sehat dan memiliki berat badan antara 1,5

sampai 2 kg.

12.2 Pengujian terhadap hewan uji. Kelinci sebagai hewan uji dibagi dalam 5 kelompok, masing-masing 5 kelinci dengan 6 perlakuan, yaitu :

Perlakuan I : gel ekstrak etanol daun kemangi konsentrasi 0,24%

Perlakuan II : gel ekstrak etanol daun kemangi konsentrasi 0,48%

Perlakuan III : gel ekstrak etanol daun kemangi konsentrasi 0,96%

Kontrol Positif : diolesi Parasol *sunscreen* gel SPF 15

Kontrol Negatif : diolesi gel tanpa ekstrak etanol daun kemangi

Kontrol normal : tanpa perlakuan (kulit kelinci yang ditutupi dengan kassa dan diperban)

Mencukur semua punggung kelinci dengan panjang \pm 3-4 cm dan mengoleskan bahan uji. Membiarkan bahan uji kontak selama 1 jam kemudian diradiasi dengan lampu exoterra UV B selama 24 jam.

12.3 Perhitungan luas eritema. Luas eritema dihitung dengan menggunakan penggaris. Skor eritema yang digunakan yaitu :

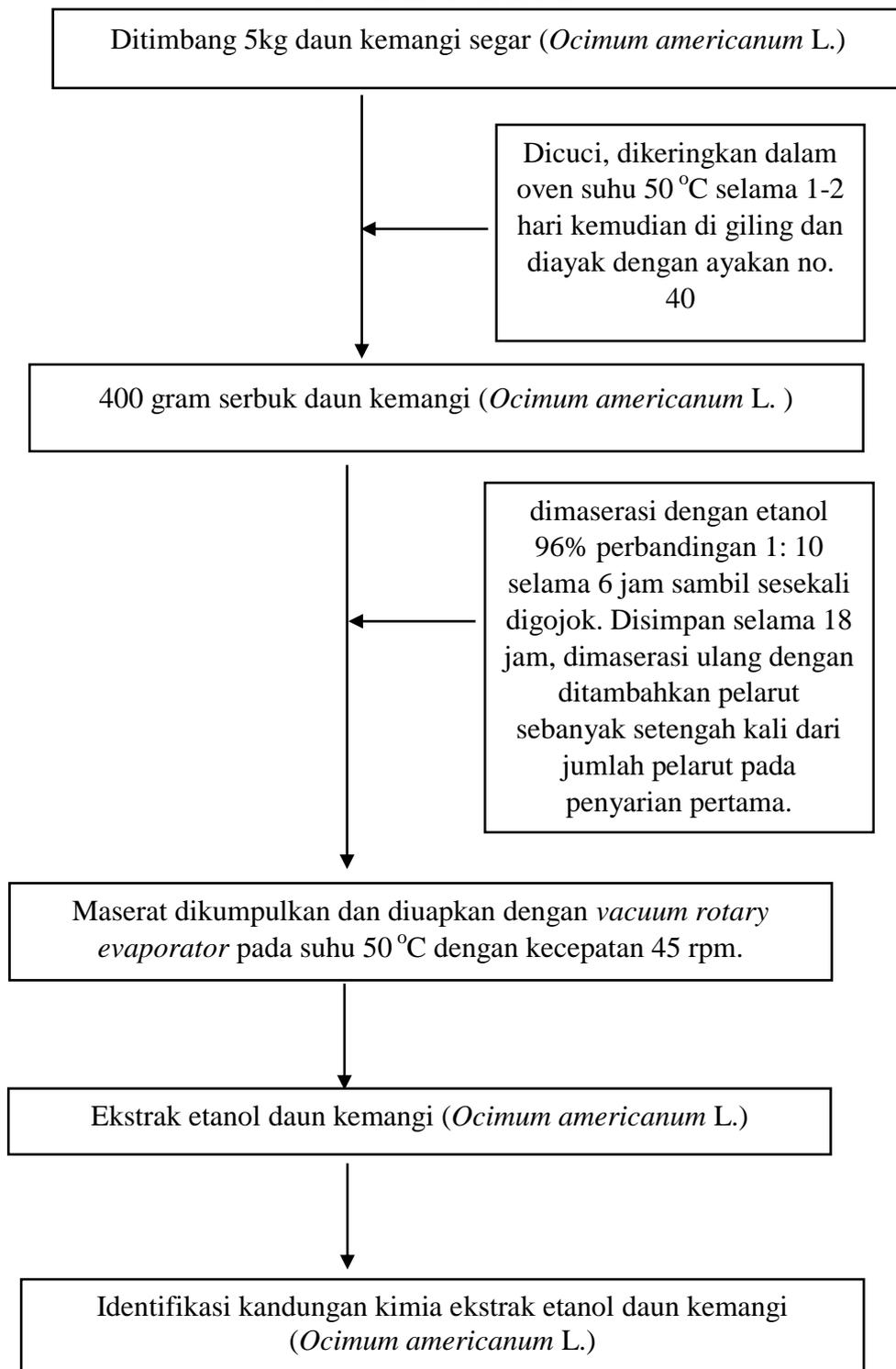
Keterangan:

- 0 : menyatakan tidak ada eritema
- 1 : menyatakan eritema sangat sedikit dengan diameter \geq 25 mm
- 2 : menyatakan eritema terbatas jelas dengan diameter 25,1-30 mm
- 3 : menyatakan eritema moderat sampai berat diameter antara 30,1-35 mm
- 4 : menyatakan eritema membentuk kerak dan merah menyala diameter \geq 35 mm

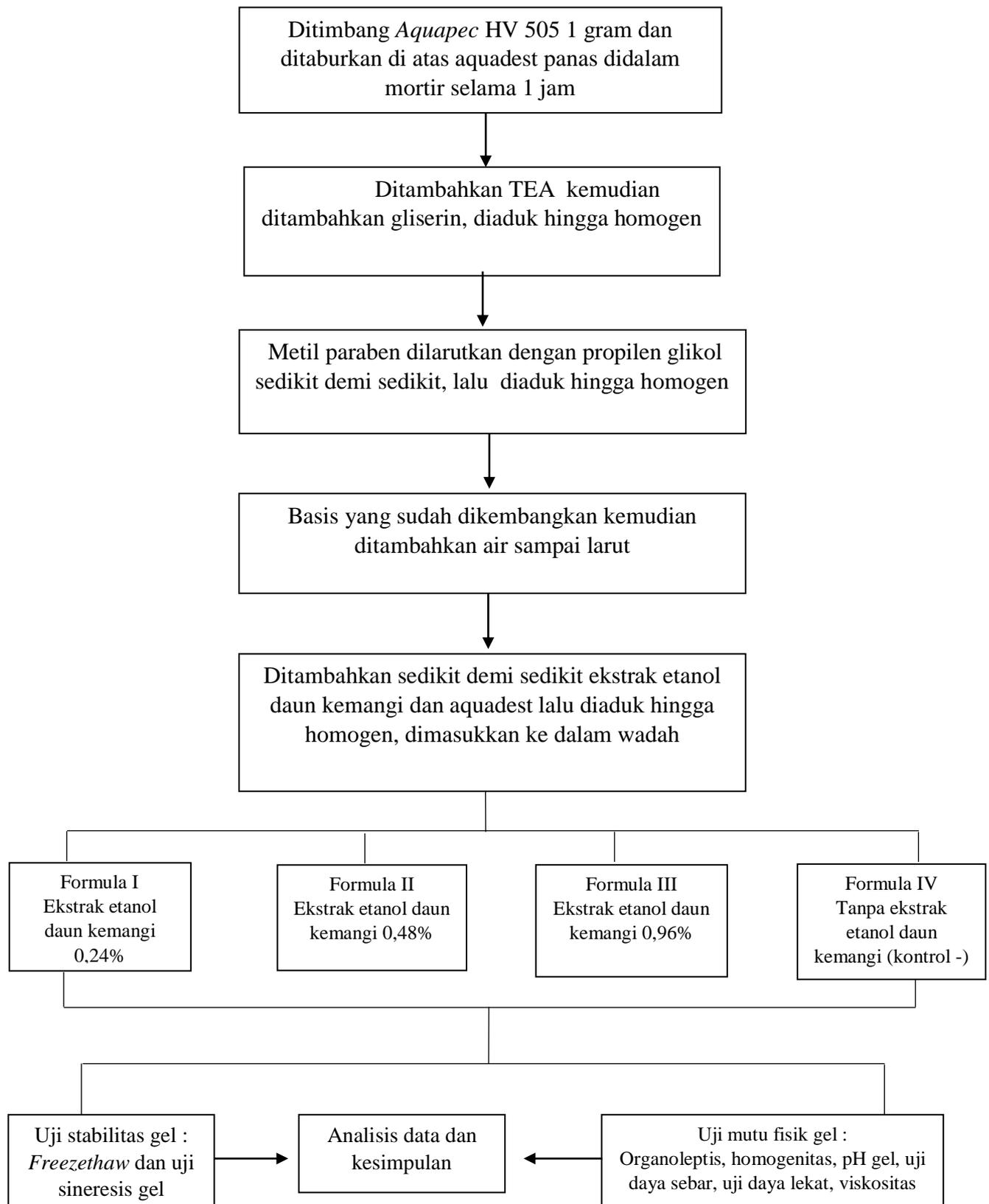
E. Analisis Data

Data penelitian yang didapat berupa daya uji sebar, daya lekat, viskositas, dan pemeriksaan pH dianalisis menggunakan *Kolmogorov Smirnov* dan *Two Way Anova* dalam program SPSS. Penentuan nilai SPF (*Sun Protecting Factor*) dianalisis menggunakan *One Kolmogorov Smirnov* dan *One Way Anova*.

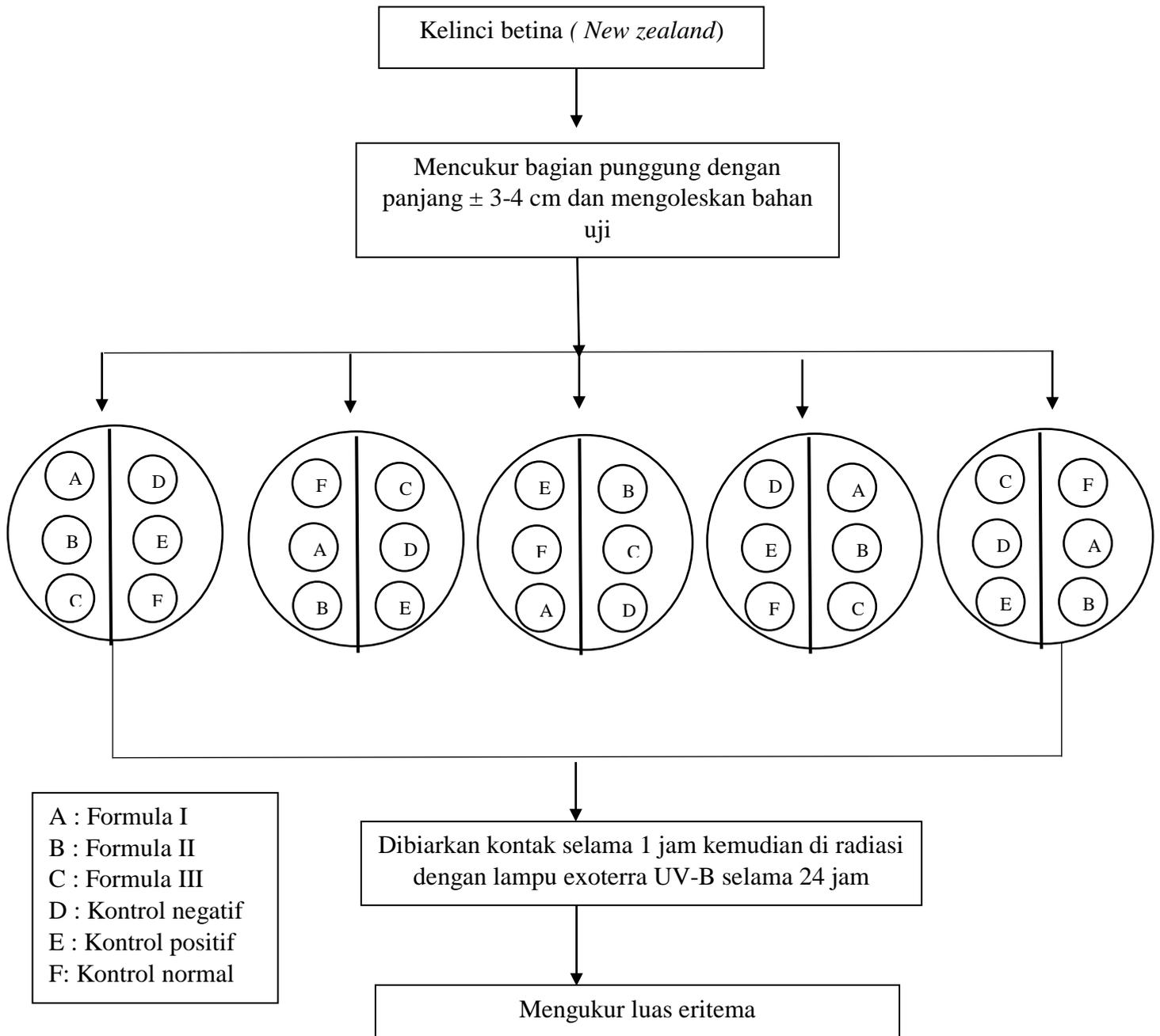
F. Skema Penelitian



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum* L.)



Gambar 2. Skema pembuatan gel tabir surya ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum* L.)



Gambar 3. Pengujian aktivitas perlindungan tabir surya gel ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) secara *in vivo*

