

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi dalam penelitian ini adalah daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang diperoleh dari Karanganyar, Jawa tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah serbuk dari daun sirih merah yang diekstraksi dengan etanol 96% dengan cara maserasi dan difraksinasi dengan etil asetat.

Variabel utama kedua adalah konsentrasi dari fraksi etil asetat dalam sediaan krim yang akan dibuat.

Variabel utama ketiga adalah penentuan *Sun Protecting Factor* (SPF) tabir surya pada sediaan krim fraksi daun sirih merah.

Variabel utama keempat adalah mutu fisik krim yang meliputi uji organoleptis, uji homogenitas, uji viskositas, uji daya sebar, uji waktu lekat, uji stabilitas dan uji tipe krim.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi etil asetat daun sirih merah.

Variabel kendali adalah variabel yang dianggap berpengaruh agar dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah absorbansi pada spektrofotometri, proses pembuatan krim, pemilihan alat spektrofotometri dan peneliti. Pengendalian absorbansi dilakukan dengan preparasi sampel yang tepat dan pengenceran sampel bila diperlukan.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah mutu fisik krim yang memiliki kemampuan melindungi kulit dari sinar ultraviolet (UV) dengan kandungan fraksi etil asetat daun sirih merah yang diuji pada spektrofotometer UV.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun sirih merah adalah daun sirih merah yang diperoleh dari Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, fraksi etil asetat daun sirih merah adalah fraksi etil asetat daun sirih merah dari proses fraksinasi ekstrak etanol 96% sirih merah yang sebelumnya diekstraksi dengan cara maserasi.

Ketiga, alat pengujian *Sun Protector Factor* sediaan krim adalah alat pengujian *Sun Protector Factor* yaitu spektrofotometri UV panjang gelombang pengujian 280-320 nm karena sinar UV matahari yang paling banyak menembus lapisan ozon adalah UV B dengan panjang gelombang antara 280-320 nm sehingga pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang antara 280-320 nm.

Keempat, mengencerkan fraksi etil asetat adalah melarutkan fraksi etil asetat dengan etanol 96 % pro analisis kemudian dibaca pada panjang gelombang 290 – 320 nm menggunakan spektrofotometer UV, dengan replikasi 3 kali.

Kelima, peneliti yang baik adalah peneliti yang harus mempunyai ketrampilan menggunakan alat spektrofotometer UV.

Keenam, penentuan *Sun Protecting Factor* (SPF) adalah penentuan SPF yang dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan Spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280-320 dengan interval 5 nm, yang memiliki serapan minimal 0,05. Selanjutnya hasil absorbansi ditentukan nilai SPF nya menggunakan persamaan Mansur.

Kedelapan, mutu fisik sediaan krim fraksi etil asetat daun sirih merah adalah mutu yang diperoleh dari hasil uji organoleptis, uji homogenitas, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat dan uji tipe krim.

C. Bahan Dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) sebagai bahan aktif yang dimaserasi dengan etanol 96%. Bahan untuk pembuatan krim yang digunakan adalah vaselin alba sebagai basis krim. Parafin, asam stearat, dan trietanolamin sebagai pengemulsi. Metil paraben dan propil paraben sebagai pengawet. *Oleum rosae* sebagai pewangi, aqua destilata sebagai pelarut. Bahan yang digunakan dalam formula merupakan bahan dengan derajat farmasetis. Etanol 96 % pro analisis sebagai blanko dan pelarut pada pengukuran absorbansi.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini botol kaca gelap sebagai alat untuk maserasi yang melindungi zat aktif dari cahaya supaya tidak rusak. Neraca analitik (OHAUS PIONEER PA 214) untuk menimbang bahan. *Rotary evaporator* (HEIDOLPH-HEISBAD HB DIGIT) untuk menguapkan pelarut. Ayakan no 60 untuk mengayak hingga didapatkan serbuk halus. Viscometer VT-04E (Rion CO, Ltd) untuk mengukur kekentalan krim. Spektrofotometer UV-VIS (SHIMADZU UV-1800) untuk mengukur absorbansi fraksi dan ekstrak yang telah di encerkan dengan etanol 96 % *pro analysis*. Alat alat gelas pyrex antara lain labu takar, corong, gelas beker, pengaduk, kaca arloji dan pipet. Seperangkat alat uji daya sebar untuk mengukur diameter penyebaran krim. Seperangkat alat uji daya lekat untuk menentukan lamanya krim melekat dan pH meter (EUTECH PH 6+) untuk mengukur pH sediaan krim dan oven (MEMMERT) untuk uji stabilitas krim.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi daun sirih merah

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun sirih merah berkaitan dengan, ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman sirih merah di Laboratorium Biologi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan

Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Sampel yang digunakan adalah tanaman sirih merah segar lengkap dengan bagian-bagiannya.

2. Pembuatan serbuk daun sirih merah.

Simplisia kering ditimbang kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk dengan alat penyerbukan. Serbuk yang dihasilkan diayak dengan ayakan no. 60 hingga diperoleh ukuran serbuk yang seragam.

3. Pembuatan ekstrak dan fraksi

Serbuk daun sirih merah di ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi hingga diperoleh ekstrak cair. Ekstrak cair dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian di fraksinasi menggunakan etil asetat. Fraksi etil asetat kemudian dipekatkan hingga diperoleh fraksi kental etil asetat.

4. Karakterisasi ekstrak

4.1. Penentuan susut pengeringan. Menyalakan dan mengatur suhu *moisture balance* yang digunakan yaitu 105 °C. Menimbang 2 g ekstrak daun sirih merah pada wadah *aluminium foil* yang berada pada alat *moisture balance* dan meratakan permukaan ekstrak. Tutup alat dan tunggu sampai terdengar bunyi yang menandakan pengukuran susut kering sudah selesai. Pada monitor langsung terlihat prosentase dari susut pengeringan.

4.2. Penentuan berat jenis. Bobot jenis ekstrak dihitung menggunakan alat piknometer. Ekstrak sirih merah yang akan di tentukan berat jenisnya diencerkan terlebih dahulu dengan menggunakan etanol 96 % menjadi konsentrasi 5 %. Menimbang 1,5 gram ekstrak kental daun sirih merah kemudian dilarutkan dengan 30 ml etanol. Larutan ekstrak daun sirih merah dihitung bobot jenisnya menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Bobot jenis ekstrak sirih merah (5 \%)} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot air}}$$

4.3. Penentuan kadar air. Metode dalam penentuan kadar air adalah dengan destilasi. Pereaksi yang digunakan adalah toluen yang telah dijenuhkan dengan air. Alat yang digunakan untuk menjenuhkan toluen ini adalah corong

pisah, campuran toluen dikocok berulang-ulang kemudian dibiarkan memisah dan buang lapisan air.

Menimbang ekstrak daun sirih merah 20 g masukkan dalam labu alas bulat 500ml dan memasukkan toluen jenuh air hingga semua ekstrak terendam. Menghubungkan dengan pendingin balik (*condensor*) yang dilengkapi tabung penerima 5ml yang bersakal 0,1 ml. Memanaskan dengan lampu spiritus, setelah mendidih air akan naik berupa uap yang didinginkan dengan kondensor kemudian menuju penampung dan diamati banyaknya air berada pada bagian bawah karena bobot jenisnya lebih besar dari pada toluen. Perhitungan kadar air ekstrak daun sirih merah dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar air} : \frac{\text{Volume air (ml)}}{\text{Berat ekstrak (g)}} \times 100\%$$

5. Skrining Fitokimia ekstrak etil asetat daun sirih merah (*Piper crocatum*)

5.1 Identifikasi alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan sampel dengan etanol. Larutan uji dibagi ke dalam tiga tabung. Satu tabung sebagai pembanding (tidak diberi reagen) dan dua tabung reaksi diberi beberapa tetes asam sulfat 2 N kemudian diuji dengan 2 pereaksi alkaloid yaitu pereaksi *Dragendorff* dan pereaksi *Mayer*. Hasil uji positif diperoleh bila terbentuk endapan merah hingga jingga dengan pereaksi *Dragendorff* dan endapan putih kekuningan dengan pereaksi *Mayer* (Putranti 2013).

5.2 Identifikasi flavonoid. Ekstrak daun sirih merah sebanyak 5 ml ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium, 2 ml larutan alkohol : asam klorida (1:10) dan pelarut amil alkohol. Lalu digojog kuat dan dibiarkan memisah. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna merah, jingga, atau kuning pada lapisan amil alkohol. Jingga sampai merah untuk flavon, merah sampai merah tua untuk flavanol, merah tua sampai magenta untuk flavanon (Farnsworth 1966).

5.3 Identifikasi tanin. Melarutkan ekstrak daun sirih merah dengan aquades kemudian disaring dengan kertas saring, filtrat ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1 %. Terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman maka menandakan adanya tanin (Widiastuti 2014)

5.4 Identifikasi saponin. Melarutkan ekstrak daun sirih merah dilarutkan dengan aquades kemudian disaring dengan kertas saring kemudian filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 2 ml air panas kemudian didinginkan dan dikocok dengan kuat. Hasil positif bila terbentuk buih yang stabil (Minarno 2015)

5.5 Identifikasi triterpenoid. Ekstrak daun sirih merah dilarutkan dengan aquades kemudian ditambah kloroform sebanyak 1 ml dan 0,5 ml asam asetat pekat anhidrat setelah itu ditambahkan asam sulfat pekat sebanyak 2 ml melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin coklat atau violet menunjukkan adanya senyawa triterpenoid (Minarno 2015)

6. Pembuatan krim

6.1 Formula Krim Modifikasi dari Elmitra (2018). Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Dari Daun Puding Hitam (*Grathophyllum Pictum*)

Tabel 1. Formula Krim Fraksi Etil Asetat Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

Bahan	Konsentrasi (%)			
	Formula I	Formula II	Formula III	Formula IV
Fraksi Etil Asetat	0,2	0,4	0,6	-
Vaselin alba	20	20	20	20
Parafin cair	10	10	10	10
Asam stearat	10	10	10	10
Trietanolamin	2	2	2	2
Metil paraben	0,3	0,3	0,3	0,3
Propil paraben	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>Oleum rosae</i>	qs	qs	qs	qs
Aquadestilata hingga	100	100	100	100

Formula V (kontrol positif) menggunakan krim Wardah dengan SPF 30++

6.2 Cara Pembuatan Krim. Menimbang semua bahan, panaskan lumpang dengan air panas. Lebur vaselin alba, parafin cair, asam stearat dan propil paraben dalam cawan penguap di atas *waterbath* pada suhu 70-75°C hingga melebur semua (fase minyak). Larutkan fraksi etil asetat dalam leburan fase minyak tadi aduk hingga larut. Campurkan metil paraben, trietanolamin dan air (fase air) yang telah dipanaskan. Masukkan fase minyak dalam lumpang panas kemudian digerus, lalu tambahkan air secara perlahan-lahan sambil digerus hingga homogen dan membentuk massa krim. Tambahkan *oleum rosae* secukupnya kemudian gerus hingga homogen dan membentuk krim. Krim yang dibuat ini merupakan tipe krim minyak dalam air (M/A) karena menggunakan

pengemulsi monovalen yaitu trietanolamin dan fase air mempunyai volume yang lebih banyak dari pada fase minyak.

7. Pengujian mutu fisik emulgel fraksi etil asetat daun sirih merah

7.1 Uji Organoleptik. Uji organoleptik krim meliputi uji warna, rasa, bau dan konsistensi krim secara fisik. Pengamatan dilakukan pada hari ke-1 dan ke-21 setelah pembuatan krim.

7.2 Uji Homogenitas. Mengambil krim secukupnya dioleskan tipis pada 3 gelas obyektif. Bila tidak terdapat butiran-butiran kasar diatas gelas obyektif, maka sediaan krim homogen. Uji homogenitas ini dilakukan 3 kali replikasi. Pengujian pertama pada saat sediaan jadi, kemudian disimpan dan di uji kembali pada hari ke-21 untuk mengetahui apakah ada perbedaan dengan hasil pengujian sebelumnya.

7.3 Uji Viskositas krim. Pengukuran viskositas krim dilakukan menggunakan viskometer . Rotor dipasang pada viskometer dengan menguncinya berlawanan arah dengan jarum jam. Cup diisi sampel yang akan diuji, tempatkan rotor ditengah sampel yang akan diuji kemudian alat diputar. Rotor berputar dan jarum menunjuk viskositas secara otomatis akan bergerak ke kanan, kemudian setelah stabil viskositas dibaca pada skala dari rotor yang digunakan (Anief 1998).

7.4 Uji Daya Sebar Krim. Uji ini dilakukan dengan menggunakan alat extensiometer. Uji dilakukan dengan cara menimbang sampel krim 0,5 g diletakkan di atas kaca. Kemudian dengan kaca lainnya letakkan diatas massa gel tersebut, biarkan 5 menit. Diameter krim yang menyebar diukur dengan mengambil rata rata diameter dari beberapa sisi. Tambahkan beban di atas kaca 50 g, 100 g, dan 150 g. Setiap penambahan beban, didiamkan selama 1 menit, kemudian dicatat diameter krim yang menyebar, seperti sebelumnya. Cara tersebut diulangi untuk setiap formula. Pengujian dilakukan pada hari ke-1 dan ke-21 setelah krim dibuat.

7.5 Uji Waktu Lekat Krim. Uji dilakukan dengan meletakkan sejumlah massa krim secukupnya diatas obyektif gelas yang sudah ditentukan luas permukaannya, kemudian letakkan obyektif gelas lain nya diatas gel tersebut, dengan beban 1 kg selama 5 menit. Kemudian pasang obyektif gelas pada alat ukur, lepaskan

beban seberat 80 g dan catat waktunya hingga kedua obyek gelas tersebut terlepas. Ulangi pengujian sebanyak 3 kali. Lakukan pengujian semua formula krim. (Marhaban dan Saifullah 2014).

7.6 Uji Tipe Krim. Dilakukan dengan cara memberikan 1 tetes *methyle blue* pada 0,1 g krim pada plat tetes, kemudian diamati penyebaran *methyle blue* tersebut, jika warna menyebar secara merata pada sediaan krim maka tipe krim adalah minyak dalam air (M/A), tetapi jika warna hanya bintik-bintik tidak merata maka tipe krim adalah air dalam minyak (A/M) (Agustin 2013)

7.7 Uji pH krim. Uji ini dilakukan dengan menggunakan alat pH-meter. Menimbang sebanyak 1 gram krim dari setiap formula. Krim yang telah ditimbang kemudian diencerkan dengan aquades 10 ml dan diukur pH nya dengan mencelupkan pada bagian sensor dan nilai pH dibaca pada bagian monitor. Pengujian pada hari pertama dan diuji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan krim. Pengujian pH setiap formula diulangi sebanyak 3 kali kemudian hasilnya jumlahkan dan dibagi 3 sehingga ketemu nilai rata-rata dari pH krim.

7.8 Uji stabilitas krim. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk melihat apakah krim stabil atau tidak. Pengujian dilakukan metode *freeze thaw* yaitu dengan menyimpan sediaan krim dalam lemari pendingin pada suhu 4°C selama 48 jam kemudian memindahkan sediaan pada oven dengan suhu 48°C selama 48 jam (1 siklus). Pengujian ini dilakukan sebanyak 5 siklus pada setiap formula. Setiap satu siklus dilakukan pengamatan ada atau tidaknya pemisahan atau ketidakstabilan pada krim.

8. Penentuan *Sun Protecting Factor* (SPF) krim fraksi etil asetat daun sirih merah.

Penentuan efektivitas sediaan tabir surya dilakukan dengan menentukan SPF (*Sun Protecting Factor*) secara *in vitro* dengan spektrofotometri. Prosedur dilakukan terhadap Fraksi etil asetat daun sirih merah, sediaan krim yang mengandung fraksi etil asetat daun sirih merah (Formula 1,2, dan 3) dan sediaan mengandung tabir surya SPF 30 (kontrol positif).

8.1 Penyiapan sampel. Penyiapan sampel ini dilakukan terhadap bahan dan sediaan yang akan ditentukan nilai *Sun Protectif Factor* (SPF) antara lain adalah:

8.1.1 Fraksi etil asetat daun sirih merah. Sebanyak 0,5 gram Fraksi etil asetat daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) dilarutkan dengan etanol 96 % *pro analysis* sebanyak 10 ml, di aduk hingga larut dan disaring dengan kertas saring, masukkan labu ukur dan di tambahkan etanol 96 % *pro analysis* sampai tanda. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 290-320 nm dengan interval 5 nm menggunakan blangko etanol 96 % *pro analysis*.

8.1.2 Sediaan Krim. Sebanyak 0,5 gram sampel sediaan krim ditimbang seksama, kemudian dilarutkan dengan etanol 96 % *pro analysis*, diaduk dan disonikasi selama 5 menit. Larutan disaring dengan kertas saring kemudian tambahkan etanol hingga 10 ml pada labu ukur. Ambil larutan dengan pipet sebanyak 1 ml kemudian tambahkan etanol hingga 10 ml. Ukur absorbansi larutan dengan alat spektrofotometri UV. Hasil absorbansi digunakan untuk mendapatkan nilai SPF krim dengan menggunakan rumus Mansur.

8.2 Penentuan nilai SPF (*Sun Protecting Factor*). Nilai SPF dihitung dengan menggunakan Persamaan Mansur. Spektrum serapan diperoleh dengan alat Spektrofotometer UV pada panjang gelombang 290-320 nm dengan etanol 96 % sebagai blangko menggunakan interval 5 nm. Nilai serapan yang diperoleh dikalikan dengan spektrum efek eritema x spektrum intensitas matahari (EE x I) untuk masing masing interval. Nilai spektrum efek eritema x spektrum intensitas matahari (EE x I) merupakan nilai ketetapan yang dapat dilihat pada tabel 3 dibawah. Jumlah spektrum efek eritema x spektrum intensitas matahari (EE x I) yang diperoleh dikalikan faktor koreksi dan didapat nilai SPF dari sampel uji.

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

Keterangan :

- CF = Faktor koreksi
- EE = Spektrum Efek Erytemal
- I = Spektrum Intensitas dari Matahari
- Abs = Absorbansi dari sampel

Tabel 2. Nilai EE x I (Spektrum Efek Erytemal x Spektrum Intensitas Matahari)

Panjang Gelombang (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0187
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

Nilai EExI dan Faktor koreksi merupakan konstanta dimana spektrum Efek Erytemal x Spektrum Intensitas Matahari (EE x I) dari panjang gelombang 290-320 nm dan setiap selisih 5 nm dan Faktor koreksi 10 telah ditentukan oleh Sayre seperti pada tabel 3 diatas.

Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali replikasi untuk masing masing sampel. Untuk mengetahui perbedaan nilai SPF yang bermakna dilakukan uji statistik menggunakan metode ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan program SPSS (*Statistical Package for the Social Science*)

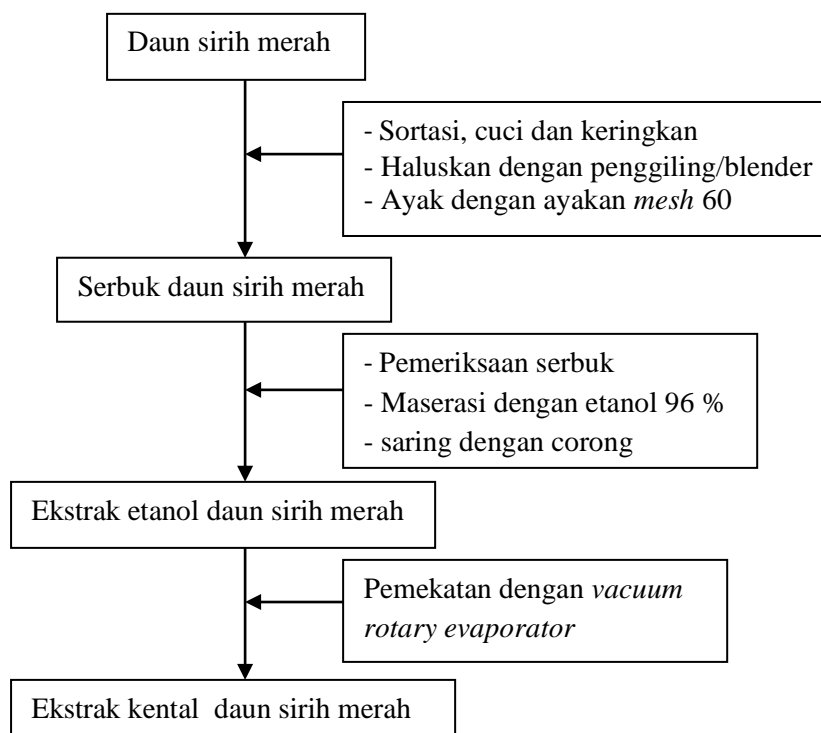
9. Uji iritasi pada kulit sukarelawan.

Uji dilakukan dengan cara uji tempel terbuka (*patch test*) yakni dengan mengoleskan sediaan pada lengan bawah bagian dalam yang dibuat pada lokasi lekatan dengan luas tertentu (2,5 x 2,5 cm), dibiarkan terbuka dan diamati apa yang terjadi. Uji ini dilakukan sebanyak 3 kali sehari (pagi, siang, dan sore hari) selama 3 hari berturut-turut. Reaksi iritasi positif ditandai oleh adanya kemerahan, gatal, atau bengkak pada kulit yang diberi perlakuan (Panjaitan 2012). Sukarelawan yang dijadikan panel pada uji iritasi berjumlah 30 orang, dengan kriteria sebagai berikut : laki-laki atau perempuan sehat berusia antara 20-35 tahun, tidak memiliki riwayat penyakit alergi, bersedia menjadi sukarelawan untuk uji iritasi, dan merupakan orang terdekat atau sering berada di sekitar pengujian sehingga lebih mudah diawasi dan diamati bila ada reaksi yang terjadi pada kulit yang sedang diuji (Ditjen POM 1985).

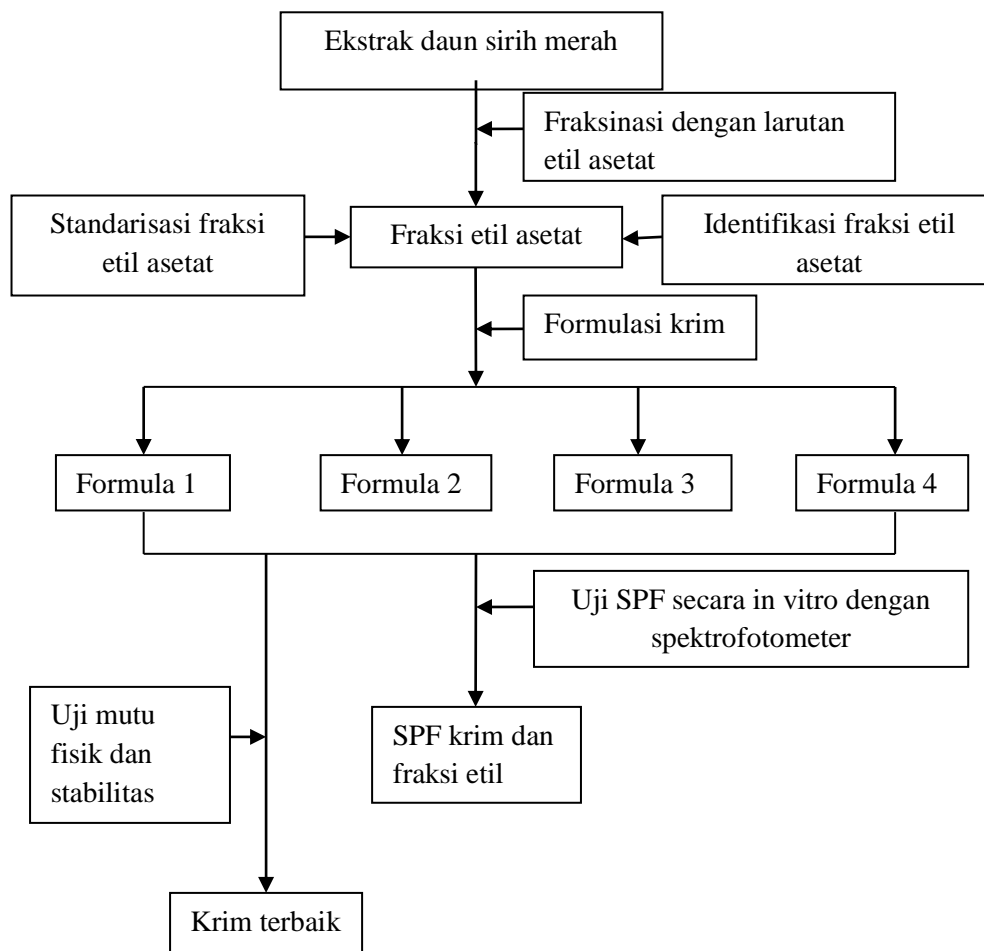
E. Teknik Analisa

Krim dari masing-masing formula diuji mutu fisiknya yang meliputi organoleptis (warna, bau dan konsistensi), pH, homogenitas, daya sebar, waktu lekat, viskositas, uji tipe krim dan stabilitas krim dengan metode *Freeze Thaw*. Hasil formulasi dilakukan pendekatan statistik dengan menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Hasil data yang diperoleh dianalisis dengan *Kolmogrov-Smirnov*, apabila data yang diperoleh menunjukkan distribusi normal maka selanjutnya dilakukan analisis dengan *One Way Anova* taraf kepercayaan 95%. Dilakukan uji *paired samples test* untuk mengetahui perbedaan signifikan krim sebelum dan setelah penyimpanan. Apabila data tidak terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan analisis *Kruskal-Wallis*. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Pada setiap uji dicari perbedaan signifikan pada hari ke-1 dan hari ke-21 setelah pembuatan (Perwitasari 2016).

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 1. Pembuatan ekstrak daun sirih merah



Gambar 2. Fraksinasi, formulasi dan evaluasi sediaan krim

