

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang kunyit yang diperoleh dari pasar Gedhe, Kota Surakarta, Kabupaten Surakarta pada bulan November 2018.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang kunyit yang diambil secara acak, masih dalam kondisi segar, sudah tua, dan berbau khas .

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang pertama adalah konsentrasi ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit 6%, 12 %, dan 18 %.

Variabel utama yang kedua adalah nilai SPF dari krim ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit sebagai *UV protection* secara *in vitro*.

Variabel utama yang ketiga adalah nilai eritema pada kulit setelah pemberian krim ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit sebagai *UV protection* secara *in situ* .

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat dikelompokkan menjadi berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat diubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak rimpang kunyit.

Variabel terkendali merupakan variabel yang dapat dikendalikan atau dikontrol, variabel ini mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali yang dimaksud dalam penelitian ini yaitu komposisi campuran krim, metode pembuatan krim, kondisi peralatan, bahan yang digunakan dalam laboratorium, kondisi fisik hewan meliputi berat badan kelinci, galur, dan kondisi percobaan laboratorium.

Variabel tergantung merupakan titik permasalahan dalam penelitian. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu nilai SPF dan eritema dari krim ekstrak rimpang kunyit, mutu fisik dari krim tersebut diantaranya organoleptis, homogenitas, tipe krim, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan pH krim

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, rimpang kunyit adalah rimpang dari tanaman kunyit yang diperoleh di pasar Gedhe, Kota Surakarta, Kabupaten Surakarta, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak rimpang kunyit merupakan ekstrak kental yang dihasilkan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96 %.

Ketiga, formula krim ekstrak rimpang kunyit adalah formulasi krim yang dibuat dari ekstrak rimpang kunyit dengan kombinasi emulgator tween 80 dan span 80.

Keempat, uji mutu fisik krim adalah pengujian suatu sediaan yang mempengaruhi kestabilan fisik dari formula krim, uji mutu fisik diantaranya organoleptis merupakan pemeriksaan bentuk, warna dan tekstur krim yang dibuat. Homogenitas adalah pengujian dengan krim diambil secukupnya kemudian dioleskan pada sekeping kaca atau gelas objek yang bersih sehingga membentuk lapisan yang tipis, kemudian ditutup dengan kaca preparat, lalu amati ada tidaknya partikel yang menggumpal.

Pengujian tipe krim merupakan pengujian dengan metode pengenceran dan pewarnaan. Metode pengenceran dilakukan dengan cara krim diberi air sedikit demi sedikit dan diaduk, jika diperoleh krim yang homogen berarti tipe krim minyak dalam air, jika sediaan krim yang diberi air tidak homogen, maka krim merupakan tipe krim air dalam minyak. Metode pewarnaan dilakukan dengan cara krim dimasukkan ke dalam vial kemudian beri larutan metilen blue beberapa tetes, jika terbentuk warna biru yang terdispersi secara menyeluruh, maka tipe krim yaitu emulsi minyak dalam air krim.

Viskositas merupakan pengujian dengan alat viskometer *Cup and Bob*. Sampel krim yang akan diuji dimasukkan ke dalam cup, kemudian tempatkan rotor tepat di tengah-tengah cup yang telah terisi sampel, kemudian viskometer dinyalakan. Daya lekat merupakan pengujian dimana krim diletakkan pada satu sisi

kaca objek dengan sisi bawah telah terpasang tali untuk mengikat beban. Tempelkan kaca objek yang lain di atas kaca objek sebelumnya kemudian tambahkan beban 50 g dan amati waktu. Daya sebar dilakukan dengan alat *extensometer*. Sediaan krim ditimbang 0,5 gram, diletakkan di tengah kaca berskala, di atas massa krim diberi kaca bulat dan dibiarkan 1 menit, dan diameter krim yang menyebar diukur. pH krim dilakukan dengan menggunakan alat pH meter.

Kelima, uji nilai SPF adalah pengujian aktivitas *UV protection* ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit yang diformulasikan dalam sediaan krim dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis yang dinyatakan dengan nilai SPF.

Keenam, uji eritema adalah pengujian aktivitas *UV protection* ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit yang diformulasikan dalam sediaan krim yang dilakukan pada kulit hewan uji dengan mengamati efek terjadinya eritema pada kulit hewan uji yang disinari dengan sinar UV selama 24 jam, kemudian diukur luas eritema tersebut dan dilihat skor eritema.

Ketujuh, wardah *sunscreen* SPF 30 adalah produk yang digunakan sebagai kontrol positif atau pembanding pada pengujian eritema. Wardah *sunscreen* SPF 30 mengandung 2-etilheksilp-metoksinamat, oxybenzone, 3-(4-metilbenzylidene) camphor, butilmetoksi dibenzilmetana, aloe vera dan vitamin E yang berfungsi untuk melindungi kulit dari sinar UV.

C. Alat, Bahan dan Hewan Percobaan

1. Alat

Alat-alat gelas, pH universal, lempeng KLT, chamber, cawan porselin, pipet tetes, pot krim, penggaris, pencukur bulu kelinci, kandang kelinci kertas saring, lampu exoterra UV B, timbangan analitik, ayakan 40, oven, spektrofotometri UV-Vis, pH meter, *viscometer*, sonicator, *evaporator*, *extensometer*, oven, *moisture balance*, wadah aluminium, labu alas bulat, kondensor, *sterling Bidwell*.

2. Bahan

Rimpang kunyit, pakan kelinci, etanol 96%, basis krim (asam stearat, tween 80, span 80, setil alkohol, propilenglikol, nipagin, nipasol, aquadest), wardah *sunscreen* SPF 30, HCL pekat, HCL 2 N, CHCl₃, H₂SO₄ pekat, kloroform.

3. Hewan percobaan

Hewan uji yang digunakan yaitu kelinci new zealand, dengan jumlah lima ekor, dalam keadaan sehat, dan berat badan masing-masing kelinci minimal 2 kg. Kelinci diadaptasikan selama ± 1 hari. Kelinci diberikan pakan kelinci berupa konsentrat sebanyak 400 gram per hari untuk individual kelinci dan dikombinasi dengan wortel atau jagung.

D. Jalannya penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman merupakan tahap untuk menetapkan kebenaran sampel rimpang kunyit yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman kunyit (*Curcuma domestica* Val.). Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk

Rimpang kunyit yang segar diperoleh dari pasar Gedhe, dikumpulkan kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, kemudian rimpang kunyit dipotong-potong, ditimbang, setelah itu dioven pada suhu 40⁰C. Pengeringan dengan oven dipilih karena tidak tergantung pada cuaca, dan suhu dapat diatur. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air agar simplisia tidak mudah ditumbuhi kapang atau bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat mengurangi zat aktif. Rimpang yang sudah kering, diserbuk dengan alat penyerbuk, kemudian diayak dengan mesh 40.

3. Penetapan sifat fisika serbuk rimpang kunyit

3.1 Pemeriksaan makroskopik. Pemeriksaan meliputi bentuk, bau, warna, dan rasa.

3.2 Penetapan susut pengeringan. Susut pengeringan diukur dengan menggunakan alat *moisture balance*. Penggunaan alat ini dengan cara yaitu alat

dinyalakan terlebih dahulu, serbuk yang akan diuji di timbang 2 gram di atas wadah aluminium secara merata, atur temperatur alat pada suhu 105⁰C, alat dinyalakan tunggu sampai alat berbunyi yang berarti bobot serbuk sudah konstan. Hasil susut pengeringan ditunjukkan dalam satuan persen.

4. Pembuatan ekstrak rimpang kunyit

Pembuatan ekstrak kunyit menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1 bagian serbuk simplisia : 10 bagian cairan penyari. Serbuk kunyit 600 gram dimasukkan kedalam bejana, tuangi dengan 7,5 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari, ampas kemudian diperas, sisa ampas ditambah 2,5 bagian cairan penyari, sehingga diperoleh sebanyak 100 bagian penyari, bejana ditutup, dibiarkan terlindung dari cahaya selama 2 hari, saring, filtrat hasil maserasi diuapkan dengan evaporator, hingga diperoleh ekstrak yang kental, timbang ekstrak dan hitung rendemennya (Depkes RI 1986).

5. Pemeriksaan fisik ekstrak rimpang kunyit

5.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan meliputi bentuk, bau, warna, dan rasa.

5.2 Penetapan kadar air . Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen. Toluene yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, setelah itu dikocok dan didiamkan, kedua lapisan air dan toluene akan memisah kemudian air dibuang. Timbang seksama sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1 ml sampai 4 ml air, kemudian dimasukkan pada labu alas bulat dimasukkan 200 ml toluene pada labu. Labu dipanaskan secara hati-hati selama 15 menit, setelah toluene mendidih atur penyulingan dengan kecepatan penyulingan kurang lebih 2 tetes/detik, hingga sebagian besar air tersuling. Kecepatan penyulingan ditingkatkan hingga kurang lebih 4 tetes/detik. Bagian pendingin pada alat dibilas dengan toluene jenuh air setelah semua air tersaring. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit, kemudian didinginkan tabung pada suhu ruang. Volume air dibaca setelah air dan toluene memisah secara sempurna.

6. Identifikasi kandungan senyawa serbuk dan ekstrak rimpang kunyit

6.1 Identifikasi flavonoid. larutan sampel diuapkan hingga 1 ml, sisa dilarutkan dalam 1 ml etanol 95 % P, ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium P, dan 10 tetes asam klorida pekat P, jika terjadi warna merah ungu, menunjukkan adanya flavonoid, jika terjadi warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron (Depkes RI 1979).

6.2 Identifikasi saponin. Serbuk sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah 10 ml air panas, kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik. Saponin positif apabila terbentuk buih setinggi 1 sampai 10 cm, dan pada penambahan 1 tetes asam klorida klorida 2 N, buih tidak hilang (Depkes RI 1979).

6.3 Identifikasi terpen. Serbuk sebanyak 2 gram dimasukkan cawan penguap, ditambah 25 ml etanol, kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit. Disaring panas-panas, filtrat diuapkan dalam penangas air sampai kering. Filtrat yang kering ditambahkan CHCl_3 10 ml, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan air hingga membentuk 2 lapisan CHCl_3 dan air. Diambil lapisan CHCl_3 kemudian dikeringkan di dalam plat tetes, ditambah lieberman Burchard (10 tetes asam asetat anhidrat) dan ditambahkan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat. Terpen positif apabila terbentuk warna biru (Depkes RI 1979).

6.4 Identifikasi alkaloid. Serbuk dan ekstrak rimpang kunyit sebanyak 0,5 gram, kemudian ditambah 1 ml asam klorida 2 N dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit kemudian ditambah dengan larutan mayer. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih kuning dan dengan bouchardat terbentuk endapan coklat sampai hitam (Depkes RI 1986).

6.5 Identifikasi kurkumin pada ekstrak secara KLT. Identifikasi kandungan kimia ekstrak rimpang kunyit bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak dari rimpang kunyit mengandung kurkumin. Analisis kurkumin dengan menggunakan KLT (kromatografi lapis tipis), dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform : etanol 96 % : asam asetat glasial (94:5:1) dan menggunakan baku standar kurkumin. Bercak diamati pada sinar tampak akan terlihat warna kuning dan berfluoresensi kekuningan pada sinar UV 366 nm. Bercak sampel dianalisis

berdasarkan nilai Rf dan warnanya terhadap bercak baku kurkumin. Kurkumin dalam kunyit nampak pada bercak Rf 0,62 (Depkes RI 2008).

2. Formulasi krim ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit

Tabel 1. Optimasi formula krim ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit

Nama Zat	Jumlah zat dalam formula (% b/b)		
	F1	F2	F3
Ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit	6	12	18
Setil alkohol	4	4	4
Asam stearat	4	4	4
Propilen glikol	20	20	20
Span 80	5	5	5
Tween 80	5	5	5
Propil paraben	0,02	0,02	0,02
Metil paraben	0,018	0,018	0,018
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100

3. Penetapan SPF secara *in vitro*

7.1 Penetapan nilai SPF secara *in vitro*

Metode dapat dimodifikasi yaitu sampel (ekstrak rimpang kunyit, krim ekstrak rimpang kunyit konsentrasi 6 %, 12% , 18 %, basis krim, kontrol positif krim wardah) diambil sebanyak 0,1 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan diencerkan dengan etanol pa. Larutan diultrasonifikasi selama 5 menit lalu, kemudian disaring dengan kertas saring. Larutan yang diperoleh diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 290-320 nm, blanko yang digunakan yaitu etanol pa. Setiap interval 5, nilai absorbansi dicatat, kemudian nilai absorbansi dihitung nilai SPF dengan menggunakan persamaan Mansyur berikut, dan lakukan replikasi sebanyak 3 kali (Mokodompit *et al.* 2013).

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

Dimana :

CF : Faktor koreksi (10)

EE : Spektrum efek eritema

I : Spektrum intensitas matahari
Abs : Absorbansi sampel

Tabel 2. Tetapan dalam rumus SPF

No	Panjang gelombang (λ nm)	EE x I (normal)
1	295	0,0817
2	300	0,2874
3	305	0,3278
4	310	0,1864
5	315	0,0839
6	320	0,0180
	Total	1

4. Validasi metode

Validasi metode dengan linearitas menggunakan vitamin E. Larutan induk dibuat dengan menimbang vitamin E 58,2 mg dalam labu takar 100 ml dan dilarutkan dengan etanol pa kocok sampai homogen. Penetapan kurva baku vitamin E yang dibuat dengan seri pengenceran yaitu memipet dari larutan induk sebanyak 5 ml, 7 ml, 9 ml, 11 ml dan 13 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 25 ml, dilarutkan dengan etanol pa kocok sampai homogen. Kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum 284 nm (Pambudi *et al.* 2009).

5. Penetapan eritema secara *in situ*

Metode yang digunakan dengan menggunakan kelinci sebagai hewan uji, dimana dilakukan pengamatan efek terjadinya eritema pada kulit kelinci yang disinari sinar UV

B. Kelinci yang digunakan dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu :

- a. Kontrol positif : diolesi krim wardah SPF 30
- b. Kontrol negatif : diolesi krim tanpa ekstrak kunyit
- c. Perlakuan I : konsentrasi ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit 6 %
- d. Perlakuan II : konsentrasi ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit 12 %
- e. Perlakuan III : konsentrasi ekstrak etanol 96 % rimpang kunyit 18 %

Hewan uji yang digunakan yaitu kelinci *new zealand* berjumlah lima ekor dengan berat badan minimal 2 kg. Semua kelinci yang digunakan terlebih dahulu

dicukur punggungnya. Bahan uji $\pm 0,5$ gram dioleskan pada punggung kelinci, dibiarkan kontak selama 1 jam, kemudian diradiasi dengan lampu exoterra UV B selama 24 jam. Sebelum pengamatan punggung kelinci dibersihkan dengan air untuk menghilangkan bahan uji yang menempel, kemudian dihitung eritema dengan menggunakan penggaris atau jangka sorong dan dilihat jenis eritemanya (Wulandari 2017).

Tabel 3. Skor eritema

No	Skor eritema	Jenis eritema
1	0	Tidak ada eritema
2	1	Eritema dengan diameter ≤ 25 mm
3	2	Eritema dengan diameter 25,10 -30,00 mm
4	3	Eritema dengan diameter 30,10-35,00 mm
5	4	Eritema dengan diameter $\geq 35,10$ mm

6. Uji mutu fisik krim

11.1 Uji organoleptis. Pengujian organoleptis sediaan krim meliputi pemeriksaan bentuk, warna dan tekstur krim yang dibuat. Pengujian organoleptis dilakukan secara visual. Krim yang dibuat harus memiliki konsistensi lembut, warna homogen dan beraroma harum (Safitri *et al.* 2014).

11.2 Uji homogenitas. Uji homogenitas yaitu krim diambil secukupnya kemudian dioleskan pada sekeping kaca atau gelas objek yang bersih sehingga membentuk lapisan yang tipis, kemudian ditutup dengan kaca preparat, lalu amati ada tidaknya partikel yang menggumpal. Krim yang homogen, apabila dilihat melalui mikroskop, mempunyai tekstur yang rata dan tidak menggumpal (Safitri *et al.*, 2014).

11.3 Tipe krim. Pengujian tipe krim dilakukan dengan dua metode yaitu pengenceran dan pewarnaan. Pada metode pengenceran, krim diberi air sedikit demi sedikit dan diaduk, jika diperoleh krim yang homogen berarti tipe krim minyak dalam air, jika sediaan krim yang diberi air tidak homogen, maka krim merupakan tipe krim air dalam minyak. Metode pewarnaan, metode ini dilakukan

dengan cara krim diberi larutan metilen blue beberapa tetes, jika terbentuk warna biru yang terdispersi secara menyeluruh, maka tipe krim yaitu emulsi minyak dalam air (Pakki *et al.* 2009).

11.4 Viskositas. Pengujian viskositas krim dengan alat viskometer *Cup and Bob*. Sampel krim yang akan diuji dimasukkan ke dalam cup, kemudian tempatkan rotor tepat di tengah-tengah cup yang telah terisi sampel, kemudian viskometer dinyalakan. Viskositas dibaca pada skala dari rotor yang digunakan, setelah pengukuran viskositas, viskometer dimatikan, lakukan pengujian sebanyak tiga kali tiap formula (Voigt 1994).

11.5 Daya lekat. Sediaan krim diletakkan pada satu sisi kaca objek dengan sisi bawah telah terpasang tali untuk mengikat beban. Tempelkan kaca objek yang lain di atas kaca objek sebelumnya. Berikan beban 50 g, amati waktu yang dibutuhkan beban tersebut untuk memisahkan kedua kaca (Safitri *et al.* 2014).

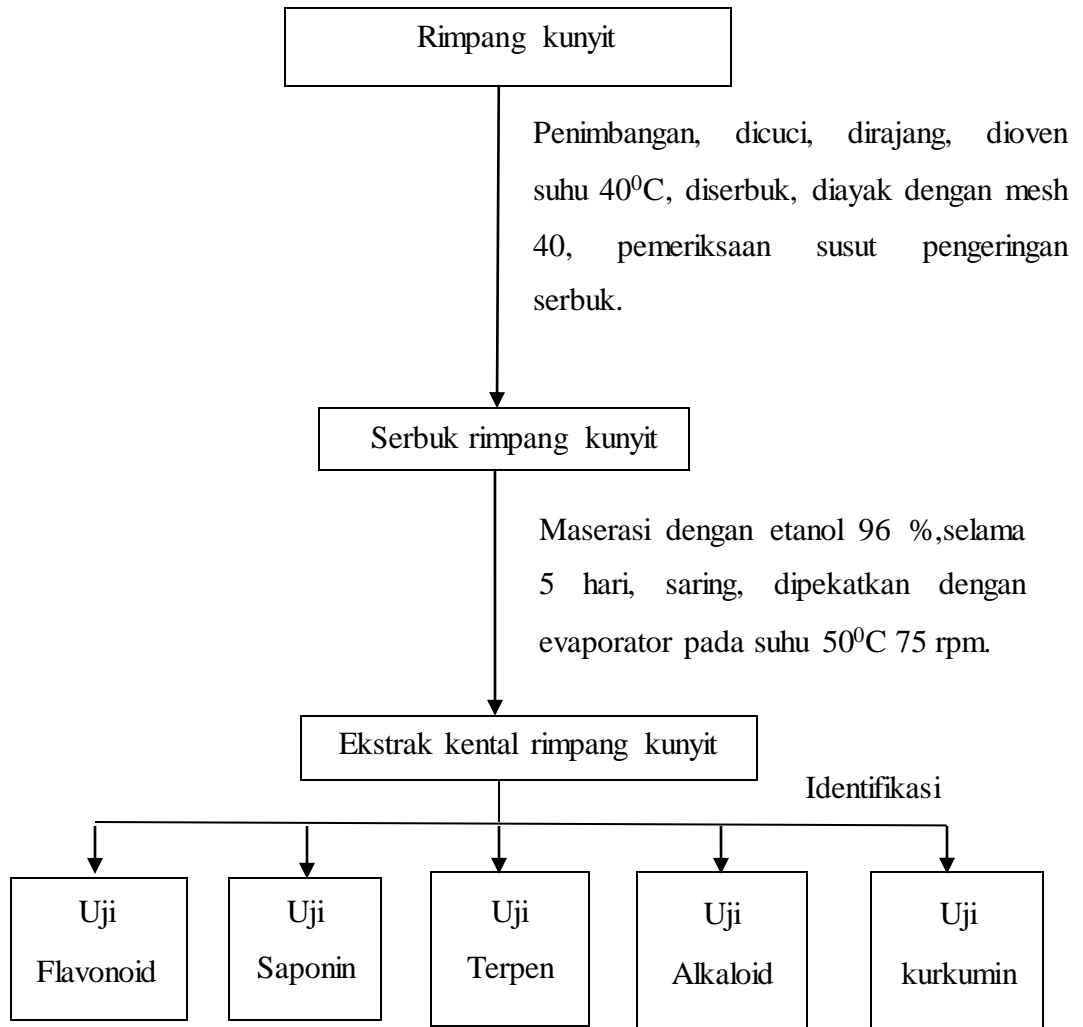
11.6 Daya sebar. Pengujian dilakukan dengan alat *extensometer*, anak timbang dan penggaris. Sediaan krim ditimbang 0,5 gram, diletakkan di tengah kaca berskala, di atas massa krim diberi kaca bulat dan dibiarkan 1 menit. Diameter krim yang menyebar diukur dengan menggunakan penggaris, ambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi, kemudian tambahkan beban 50, 100, 150, dan 200 gram dan diamati diameter yang terbentuk. Krim yang baik yaitu mudah menyebar dan merata (Voigt 1994).

11.7 pH. Uji pH pada krim dengan menggunakan alat pH meter. Sebelum digunakan alat dikalibrasi menggunakan larutan dapar pH 7 dan pH 4. Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam krim, jarum pH meter dibiarkan bergerak sampai menunjukkan posisi tetap, nilai pH yang ditunjukkan pada jarum dicatat. Sediaan krim yang baik memiliki pH yang sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5 – 7,0 (Safitri *et al.* 2014).

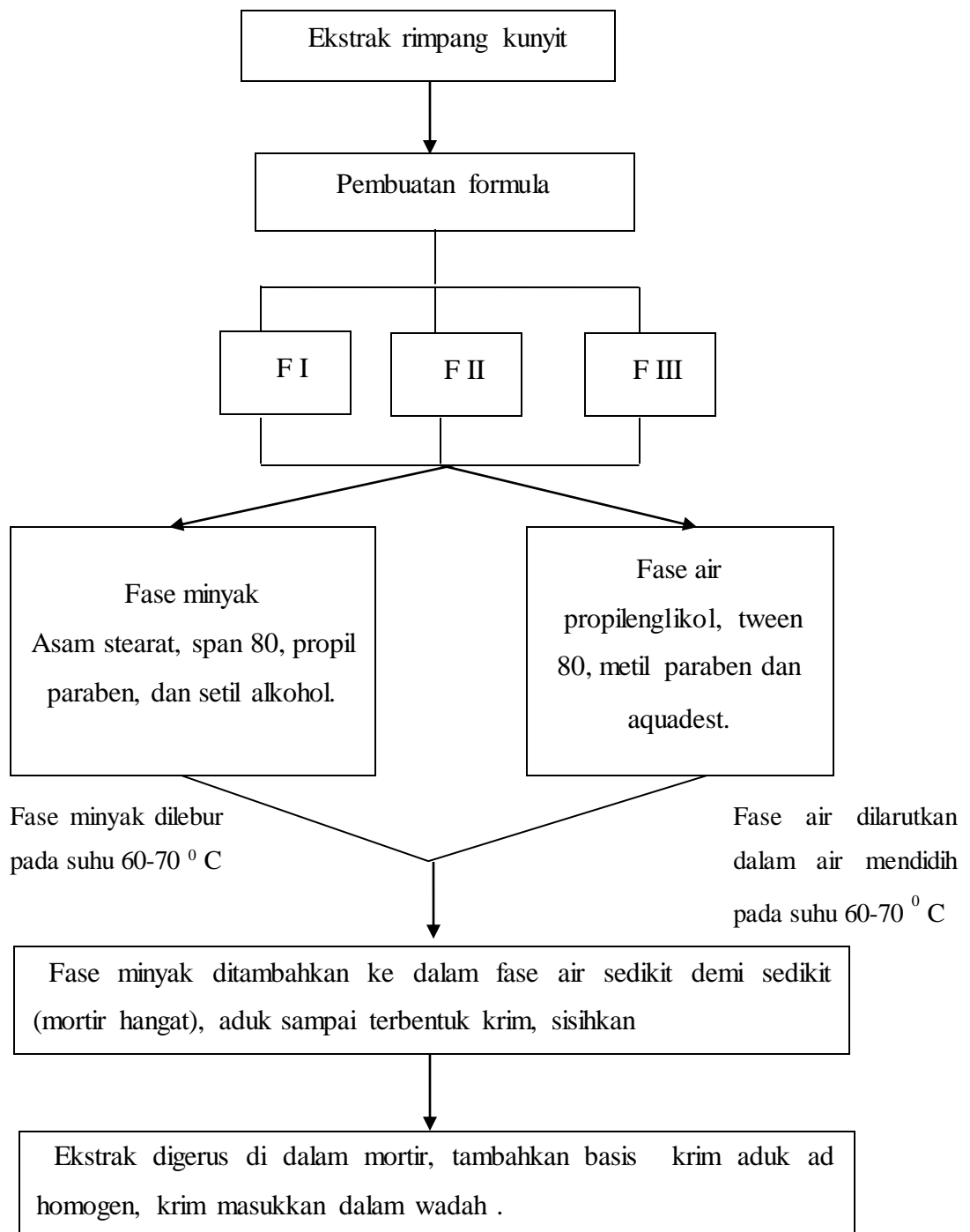
E. Analisis Hasil

Analisis hasil pengujian dari berbagai parameter yaitu pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, uji SPF dan eritema dianalisis dengan membandingkan hasil yang diperoleh dengan beberapa literatur dan pendekatan statistik menggunakan SPSS. Data dari hasil pengujian dianalisis dengan *Shapiro-Wilk*, bila hasil yang diperoleh terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan analisis *One Way Anova* pada taraf kepercayaan 95 %, kemudian dilanjutkan dengan *Post hoc Tukey* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan dan homogenitas data.

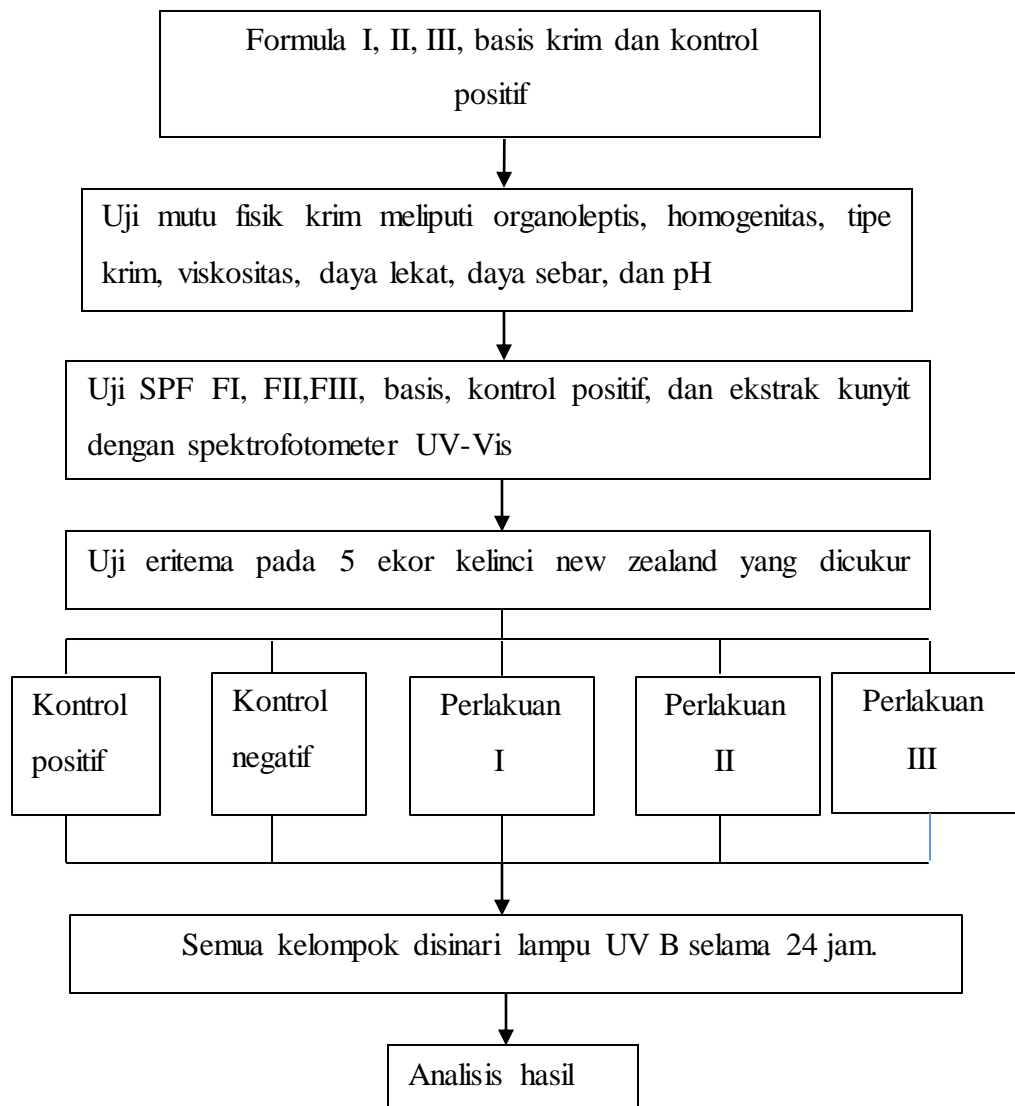
Skema Jalannya Penelitian



Gambar 1 Skema pembuatan ekstrak rimpang kunyit dan identifikasi kandungan.



Gambar 2 Skema pembuatan formula.



Gambar 3 Skema pengujian krim.