

## **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi merupakan seluruh objek yang menjadi sasaran dari suatu penelitian. Populasi yang diambil dalam penelitian ini ialah gel dari ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*). Karakteristik daun stroberi yang segar, berwarna hijau, tidak rusak dan tidak layu diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel merupakan suatu bagian dari populasi yang diambil dengan suatu kriteria tertentu, sehingga memenuhi syarat. Yang digunakan dalam penelitian ini merupakan daun stroberi. Semua sampel diperoleh dan dideterminasi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT).

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah gel ekstra etanol daun stroberi yang divariasikan, serta penentuan uji mutu fisik dengan beberapa parameter mutu.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama dibagi menjadi 3 bagian: variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel disengaja yang dibuat untuk mempelajari efek dari variabel terkait. Pada penelitian ini variabel bebas adalah ekstrak etanol daun stroberi yang divariasikan Carbopol 940 dengan konsentrasi 0,5%; 1%; 1,5%.

Variabel terkendali adalah syarat utama masalah disyaratkan dalam penelitian ini. Parameter utama dari penelitian ini adalah keefektifan gel daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) diformulasikan menjadi sediaan gel.

Variabel tergantung merupakan titik awal permasalahan dari masalah ini. Pada penelitian ini, variabel tergantung yang digunakan adalah mutu fisik sediaan gel variasi Carbopol 940 ekstrak etanol daun stroberi.

#### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) adalah tanaman yang biasa digunakan sebagai tanaman hias atau juga dapat dijual buahnya oleh petani. Daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) jarang

dijumpai di pasar-pasar tradisional di Indonesia karena tempat tumbuh stroberi yang baik adalah 1.00-1.500 mdpl., suhu udara (14-24°C), dan kelembaban yang relatif tinggi (85-95%), dan tidak mengalami suhu dan kelembaban yang ekstrim, yang berbentuk trifoliolate terdiri dari satu daun dan tiga anak daun dengan tepi bergerigi, berwarna hijau, segar dan tidak layu. Untuk penelitian kali ini daun stroberi diambil di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) adalah pembuatan serbuk dengan cara dipetik kemudian dicuci dengan air mengalir, dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C kemudian digiling. Hasil gilingan lalu diayak menggunakan pengayakan no.60 hingga diperoleh serbuk halus.

Ketiga, ekstrak etanol daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) adalah hasil dari ekstraksi dari serbuk daun stroberi dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian lalu dipekatkan dengan rotary evaporator (40-50°C) sampai memperoleh ekstrak pekat daun stroberi.

Keempat, sediaan gel yang sudah diformulasikan dengan ekstrak etanol daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) dengan konsentrasi 1% dan variasi Carbopol 940 0,5%; 1%; 1,5% dengan pengujian mutu fisik.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Pada penelitian ini menggunakan alat sebagai berikut:

*Toothed discmills*, bejana untuk maserasi, neraca analitik, oven, *moisture balance*, *sterling biltwell*, kuvet, penangas air, viscometer VT-04, *vacuum rotary evaporator*, alat-alat gelas (gelas ukur 100 ml, 10 ml, *beaker glass* 250 ml, dan 500 ml, labu ukur 100 ml, 50 ml), pipet ukur, batang pengaduk, cawan porselin, *erlenmeyer*, kaca arloji, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, *pH* meter, pipet volume 5 ml, stamper, mortir, kain flanel, kertas saring, mesh no.60, *objek glass*, *deck glass*, sendok tanduk, kertas label, pot gel, mikropipet, corong dan *beaker glass* 200 ml.

#### 2. Bahan

Pada penelitian ini menggunakan bahan sebagai berikut:

Daun stroberi segar, carbopol 940, gliserin, propilenglikol, trietanolamin, phenoxy etanol, citrit acid, aquadest, serbuk Mg, HCl pekat, FeCl<sub>3</sub>, larutan *dragendorf*, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, amil alkohol, dan n-heksan.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Pengambilan bahan

Pengumpulan bahan daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) diambil didaerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun yang segar tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, daunnya masih segar, tidak rusak dan tidak layu merupakan bagian tanaman yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak etanol daun stroberi yang baik. Setelah diperoleh, kemudian daun stroberi dipisahkan dari batangnya dan dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih, ditiriskan kemudian dikeringkan dioven suhu 50°C hingga kering.

### 2. Pembuatan serbuk simplisia

Pembuatan serbuk simplisia merupakan proses awal pembuatan ekstrak. Serbuk simplisia dibuat dari simplisia utuh atau potongan-potongan halus simplisia yang sudah dikeringkan melalui proses pembuatan serbuk dengan derajat kehalusan tertentu. Derajat kehalusan serbuk simplisia terdiri dari serbuk sangat kasar, kasar, agak kasar, halus, dan sangat halus. Kecuali dinyatakan lain, derajat kehalusan serbuk simplisia untuk pembuatan ekstrak merupakan serbuk simplisia halus (Kemenkes RI, 2013).

**2.1. Identifikasi serbuk daun stroberi.** Identifikasi serbuk dapat diketahui dari panca indera melalui bau, warna, rasa dan bentuk. Daun stroberi yang telah melalui proses pencucian diiris tipis kemudian dikeringkan. Daun stroberi kering kemudian dihaluskan menggunakan *toothed discmills* sampai diperoleh serbuk daun stroberi (*Fragaria x ananassa*). Serbuk yang diperoleh diayak menggunakan saringan No. 60 sampai diperoleh serbuk yang seragam dan halus.

**2.2. Uji susut pengeringan.** Hasil penetapan susut pengeringan serbuk. Susut pengeringan menggunakan metode gravimetri dipilih karena metodenya cukup sederhana, alat yang digunakan juga sederhana yaitu *moisture balance* dan waktu yang cukup singkat. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan mengkalibrasi alat terlebih dahulu, lalu kalibrasi alat yang akan digunakan dengan akurasi sesuai. Setelah alat setara kemudian menimbang serbuk sebanyak 2gram dan memasukkan ke dalam plat tersebut, setelah terdengar bunyi 'beep' pada alat, kemudian pada layar *moisture balance* terdapat pengukuran berupa angka dalam persen dan mencatat hasil. Farmakope Indonesia mensyaratkan batas maksimum susut pengeringan untuk daun adalah  $\leq 10\%$ . Batasan maksimal tentang

besarnya senyawa yang hilang dapat diketahui pada proses pengeringan (F1 edisi VI, 2020).

### 3. Pembuatan ekstrak etanol daun stroberi

Proses pembuatan ekstrak etanol daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Timbang serbuk daun stroberi sebanyak 700 gr kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca gelap dan menambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 75 bagian pelarut (5,25L). Kemudian direndam selama 3 hari sembari 6 jam sesekali digojok, maerat yang diperoleh dipisahkan dengan penyarian menggunakan kain flanel, pada tahap penyaringan agar dapat terpisahnya ampas dan filtrat. Proses penyarian diulang kembali dengan ampas pada penyarian pertama dengan menambahkan pelarut yang sama yaitu etanol 96% dan jumlah volume 25 bagian pelarut (1,75L) selama 2 hari. Setelah dilakukan penyaringan dua kali, semua maserat dikumpulkan, kemudian diuapkan menggunakan alat *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 50°C pada kecepatan 45 rpm hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen dihitung antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia (KemenKes RI, 2020).

$$\%rendemen = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{bobot simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

**3.1. Identifikasi ekstrak daun stroberi.** Identifikasi ekstrak dilakukan menggunakan panca indera. Pemeriksaan terhadap ekstrak meliputi warna, bau, bentuk dan rasa.

**3.2. Uji kadar air ekstrak.** Uji kadar air menggunakan metode azeotrofi. Kadar air yang diperoleh pada simplisia dan ekstrak masing-masing sesuai dengan syarat mutu yaitu  $\leq 10\%$ . Ekstrak kental memiliki kadar air antara 5–30% (Voight, 1994). Penentuan kadar air juga terkait dengan kemurnian ekstrak. Kadar air yang terlalu tinggi ( $\geq 10\%$ ) menyebabkan tumbuhnya mikroba yang akan menurunkan stabilitas ekstrak (Saifudin dkk., 2011).

**3.3. Uji susut pengeringan.** Susut pengeringan menggunakan metode gravimetri dipilih karena metodenya cukup sederhana, alat yang digunakan juga sederhana yaitu moisture balance dan waktu yang cukup singkat. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan mengkalibrasi alat terlebih dahulu, lalu menara alat yang akan digunakan dengan akurasi sesuai. Setelah alat setara kemudian menimbang serbuk sebanyak 2 gram dan memasukkan ke dalam plat tersebut, setelah terdengar bunyi 'beep' pada alat, kemudian pada layar moisture balance terdapat pengukuran berupa angka dalam persen

mencatat hasil dan dilakukan replikasi 3 kali. Farmakope Indonesia mensyaratkan batas maksimum susut pengeringan untuk ekstrak adalah  $\leq 10\%$ . Batasan maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang dapat diketahui pada proses pengeringan (F1 edisi VI, 2020)

#### **4. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun stroberi**

Pengujian fitokimia dapat menggunakan uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan uji tabung dengan cara berikut:

**4.1. Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis).** Penyiapan fase diam Silica gel G60 F254/plat KLT dengan panjang 7 cm dan lebar 3 cm lalu diaktivasi dengan oven pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 ml etanol kemudian ditotolkan pada fase diam. Flavonoid. Fase gerak n-heksan:etil:methanol:air (3:4,5:2:0,5). Reaksi positif ditunjukkan dengan sinar tampak dan berwarna biru pada UV 366 nm menegaskan adanya kandungan flavonoid (Marliana, 2005). Fase gerak tannin methanol-air (6:4), dengan penampak noda Pereaksi  $\text{FeCl}_3$  5%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna hitam (Banu dan Nagarajan, 2014).

#### **4.9 Uji Tabung.**

**4.9.1 Flavonoid.** Air sebanyak 10 ml disiapkan dan dididihkan selama 5 menit, kemudian siapkan ekstrak kental ditimbang sebanyak 0,5 g lalu dilarutkan dengan air yang sudah mendidih. Setelah mendidih menyaring larutan ekstrak, dan diperoleh filtrat A. Sebanyak 5 ml filtrat A diambil dan memasukkan dalam tabung reaksi lalu menambahkan serbuk magnesium. Ekstrak kental sebanyak 0,1 gr ditambahkan HCl pekat sebanyak 1 ml dan ditambahkan lagi dengan amil alkohol sebanyak 1 ml. kemudian lakukan penggojokan hingga homogen dan didiamkan beberapa saat hingga larutan nampak memisah. Jika terlihat hasil positif flavonoid ditunjukkan pada lapisan amil alkohol akan terbentuk warna merah atau jingga berada diatas atau dibawah diantara larutan air (Putu *et al.*, 2020).

**4.9.2 Tanin.** 20 ml akuades disiapkan dalam tabung reaksi kemudian menimbang ekstrak kental daun stroberi sebanyak 0,5 gr lalu di campur dalam tabung reaksi sembari dipanaskan. Setelah mendidih kemudian saring filtrat dan setelah tersaring menambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  0,1% sampai warna berubah. Jika terlihat warna hijau kecoklatan atau warna biru hitam menandakan positif mengandung tannin (Kumalasari *et al.*, 2020).

**4.9.3 Alkaloid.** Sebanyak 10 mg ekstrak kental daun stroberi ditimbang lalu tambahkan 10 ml kloroform, lalu diaduk hingga rata dan disaring. Setelah tersaring tambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M 0,5 ml dan digojok kuat, kemudian dibiarkan beberapa waktu terlebih dahulu. Lapisan jernih berada diatas dipipet kedalam dua tabung reaksi yang berbeda. Tabung reaksi A ditambahkan pereaksi *dragendorf* sebanyak 3-4 tetes dan tabung reaksi B ditambahkan pereaksi mayer. Apabila terlihat endapan kuning jingga (orange) pada tabung reaksi A, dan endapan putih pada tabung reaksi B maka menandakan positif alkaloid (DepKes RI, 2014).

**4.9.4 Saponin.** Air panas sebanyak 10 ml disiapkan kemudian menimbang ekstrak kental daun stroberi sebanyak 0,5 g dan memasukkan dalam tabung reaksi dan biarkan dingin, setelah dingin selama 10 detik digojok kuat. Adanya busa stabil setinggi 1 cm setelah dibiarkan 1 jam atau ketika ditambahkan dengan HCl 2N jika positif mengandung saponin (DepKes RI, 2014).

**4.9.5 Triterpenoid.** Sebanyak 5 mL ekstrak kental daun stroberi diuapkan dalam cawan penguap. Sisanya dilarutkan dalam 0,5 mL asam asetat anhidrida, lalu ditambah 0,5 mL kloroform, lalu dituang dalam tabung yang kering. Melalui dinding tabung, teteskan 1 mL sampai 2 mL asam sulfat dengan pipet. Pada batas kedua larutan cincin merah kecoklatan atau ungu, sedangkan larutan bagian atas menjadi hijau atau ungu. Hasil positif steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru sampai hijau. Terbentuknya warna merah sampai ungu menunjukkan positif triterpenoid (DepKes RI, 2014).

## 5. Formulasi gel ekstrak etanol daun stroberi

Formula sediaan gel ekstrak etanol daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) yaitu:

**Tabel 2. Formula yang digunakan pada penelitian**

Bahan	F1(%)	F2(%)	F3(%)	F0(%)	K (+)
Ekstrak etanol daun stroberi	1	1	1	-	
Carbopol 940	0,5	1	1,5	1	
TEA	0,5	0,5	0,5	0,5	Y.O.U
Gliserin	25	25	25	25	SPF 50
Propilen glikol	5	5	5	5	PA +++
Penoxy etanol	0,2	0,2	0,2	0,2	
Asam sitrat	0,15	0,15	0,15	0,15	
Aquades	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	

Keterangan:

FI = Formula 1 sediaan gel ekstrak daun stroberi basis Carbopol 940 0,5%

F2 = Formula 2 sediaan gel ekstrak daun stroberi basis Carbopol 940 1%

F3 = Formula 3 sediaan gel ekstrak daun stroberi basis Carbopol 940 1,5%

F0 = Kontrol negatif gel tanpa ekstrak

K+ = Kontrol positif dari gel merk Y.O.U SPF 50 PA ++++

## 6. Pembuatan gel

Pembuatan gel ekstrak etanol daun stroberi dengan konsentrasi 1% ekstrak etanol daun stroberi dan variasi Carbopol 940 0,5%; 1%; 1,5%. Menimbang sejumlah Carbopol 940 lalu dikembangkan dengan aquades panas digerus hingga mengembang. Setelah Carbopol mengembang dipindahkan kebeaker gelas 200 ml kemudian mencampurkan TEA, propilen glikol sebagai humektan, phenoxy etanol sebagai pengawet dan asam sitrat (lihat pengenceran asam sitrat dilampiran 16) sebagai penurun pH kedalam Carbopol 940 yang telah membentuk masa gel yang homogen. Pada formula 2 dan 3 dilakukan perlakuan yang sama pada formula 2 dan 3 sesuai konsentrasi Carbopol 940. Setelah bahan semua tercampur membentuk massa gel yang baik tambahkan sedikit demi sedikit ekstrak etanol daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang telah di larutkan dalam gliserin dan aquades sisa.

Sediaan yang telah homogen dilakukan pemeriksaan PH dengan alat pH meter pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi agar hasil yang diperoleh lebih akurat dan real. Untuk hasil pH yang terlalu tinggi akan di disesuaikan dengan pH kulit yang berkisar 4.5-6.5 dengan penambahan asam sitrat.

## 7. Pengujian mutu fisik gel

**7.1. Pengujian organoleptis.** Pengujian organoleptis pemeriksaan konsistensi warna, bentuk (tekstur), dan bau dari sediaan gel untuk mengetahui kondisi dari fisik gel. Saat gel yang dihasilkan itu stabil dengan menunjukkan karakteristik yang sama setelah penyimpanan dalam jangka waktu yang lama. Pengujian organoleptis pertama setelah gel dibuat dilakukan pada hari ke-1 dan uji organoleptis dilakukan kembali pada hari ke-21 (Sharon *et al.*, 2013).

**7.2. Pengujian homogenitas.** Pengujian homogenitas dilakukan dengan mengoleskan secukupnya sediaan gel pada gelas objek kemudian diamati ada atau tidaknya partikel atau zat yang belum tercampur secara homogen. Pengujian homogenitas dilakukan setelah gel dibuat pada hari ke-1 dan pada hari ke-21 (Sudjono *et al.*, 2012).

**7.3. Pengukuran viskositas.** Pengukuran viskositas bertujuan agar mengetahui kekentalan suatu sediaan gel, pengukuran dilakukan menggunakan viskometer VT-04 pada masing-masing sediaan gel dengan spindel yang sesuai (spindel 2). Pengukuran viskositas

dilakukan replikasi 3 kali pada masing-masing sediaan gel serta dilakukan pada hari ke-1 dan hari ke-21 (Wathoni *et al.*, 2015).

**7.4. Pengukuran *pH*.** Pengukuran *pH* bertujuan agar mengetahui tingkat keasaman atau basa suatu sediaan, dilakukan menggunakan *pH* meter. Sebelum diujikan terhadap sampel sediaan, alat *pH* meter dikalibrasikan terlebih dahulu menggunakan dapar standar dengan *pH* 7, karena merupakan *pH* yang netral. Pengukuran *pH* sediaan gel ekstrak etanol daun stroberi dilakukan replikasi 3 kali pada masing-masing formula serta dilakukan pada hari ke-1 dan hari ke-21 (Wathoni *et al.*, 2015).

**7.5. Pengujian daya lekat.** Pengujian daya lekat bertujuan agar mengetahui berapa waktu yang diperlukan untuk sediaan gel melekat pada kulit. Pengujian daya lekat gel dilakukan pada masing-masing sediaan dengan cara sebanyak 0,25 g sediaan gel ditimbang berbeda, kemudian diletakkan pada *object glass*, lalu diberikan beban 1 kg dan dibiarkan selama 5 menit. Setelah itu, *object glass* dipasang pada alat khusus tes pengujian daya lekat, diberikan beban 80 g, kemudian dilepaskan dan dicatat berapa waktu pelepasan gel dari *object glass*. Pengujian dilakukan 3 kali untuk masing-masing sediaan gel dan dilakukan pada hari ke-1 dan ke-21 (Suardi *et al.*, 2009).

**7.6. Pengujian daya sebar.** Pengujian daya sebar bertujuan agar mengetahui kemampuan kecepatan penyebaran sampel sediaan semi padat pada saat dioleskan pada kulit. Pengujian daya sebar gel dilakukan pada masing-masing sediaan gel dengan cara menimbang sebanyak 0,5 g gel, kemudian diletakkan ditengah alat (kaca bulat) khusus yang ada ditengahnya terdapat skala diameter dan diberikan beban yang sudah ditimbang terlebih dahulu lalu dibiarkan selama 1 menit, kemudian beban yang diberikan ditambah 50 g, 100 g, 150 g dengan masing-masing dibiarkan selama 1 menit setelah beban ditambahkan, setelah itu melakukan pengukuran diameter sebar gel. Pengukuran diulangi sebanyak 3 kali. Uji dilakukan pada hari ke-1 dan ke-21 (Suardi *et al.*, 2009).

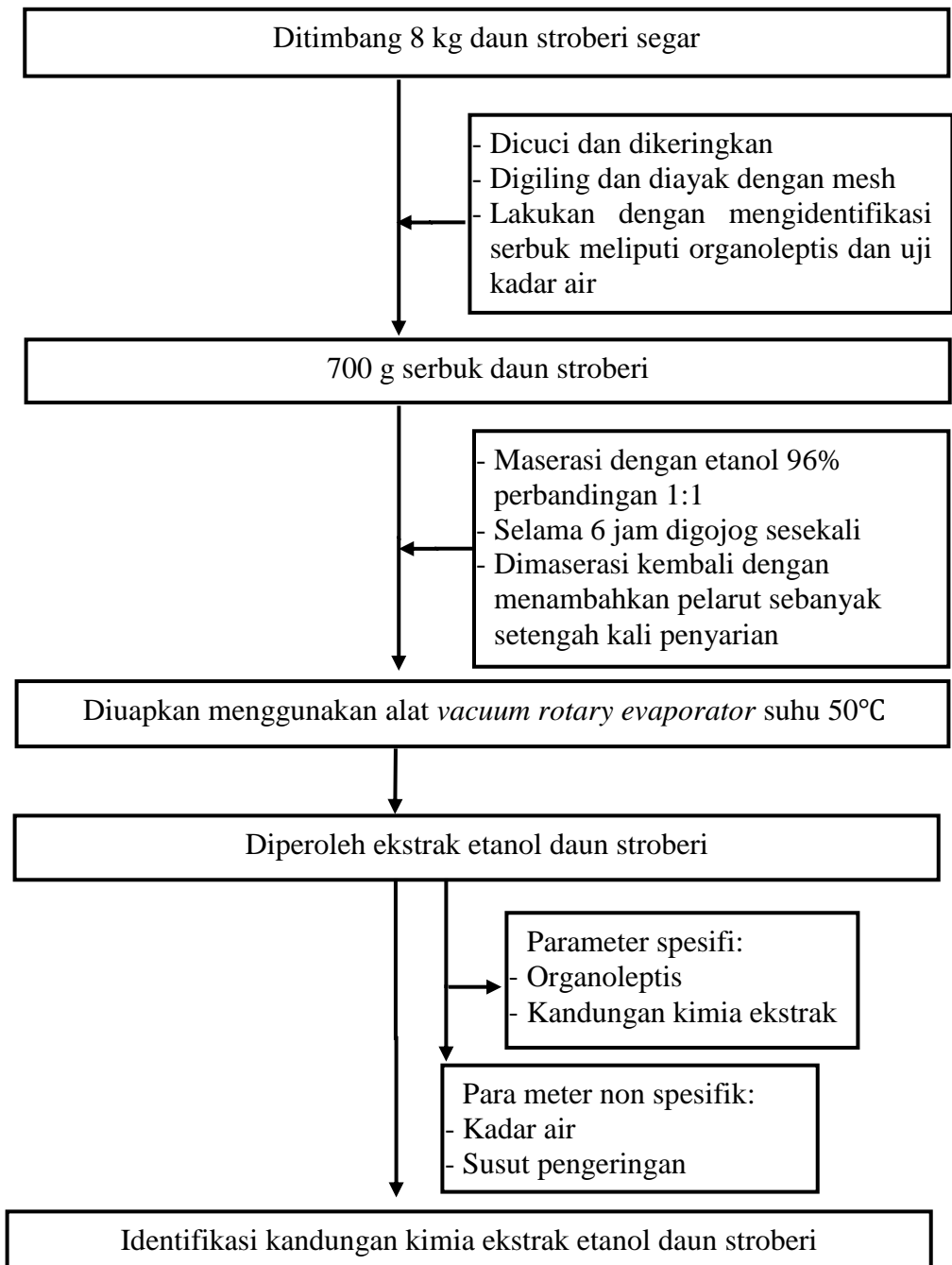
**7.7. Pengujian stabilitas sediaan gel.** Uji stabilitas dilakukan pada masing-masing sediaan dengan metode *cycling test*. Gel disimpan pada suhu  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke dalam oven yang bersuhu  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam (satu siklus). Uji ini dilakukan sebanyak 6 siklus atau selama 12 hari kemudian diamati adanya pemisahan fase (Marinda 2012).



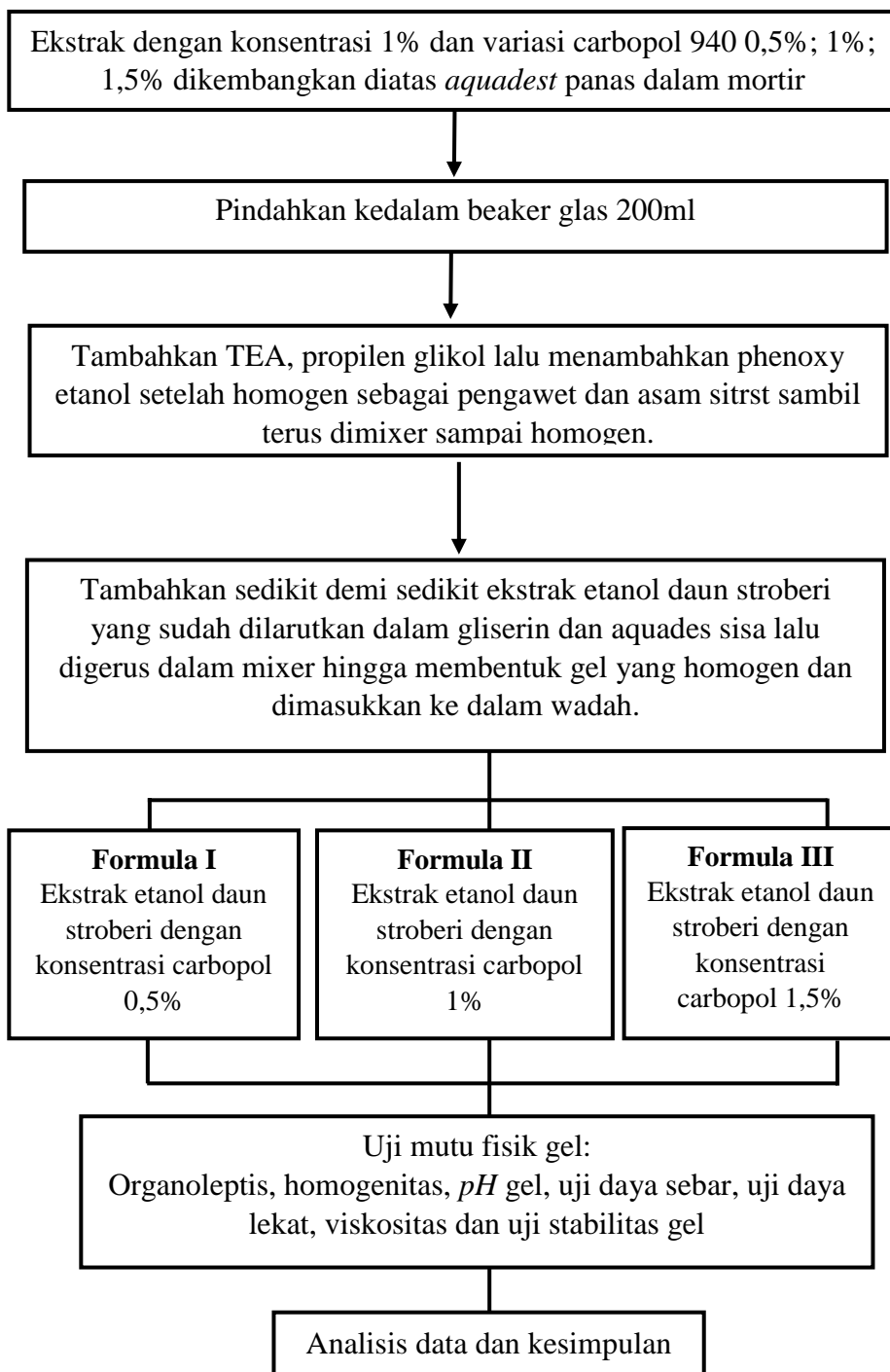
### **E. Analisis Hasil**

Data penelitian yang diperoleh berupa nilai uji daya sebar, viskositas, daya lekat dan pemeriksaan *pH* dianalisis menggunakan *Shapiro Wilk* dalam program *Statistical Product and Service* (SPSS). Suatu data dapat dikatakan terdistribusi normal juga nilai  $p \geq 0,05$  jika data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan pengujian parametrik menggunakan *Two Way* Suatu data dapat dikatakan normal pada uji anova apabila nilai  $p \leq 0,05$ . Jika data tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji menggunakan *Kruskal Wallis* atau uji *Friedman*.

### F. Skema Penelitian



Gambar 10. Skema pembuatan ekstrak etanol daun stroberi (*Fragaria x ananassa*)



Gambar 11. Skema pembuatan gel ekstrak etanol daun stroberi (*Fragaria x ananassa*)