

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan individu yang terdapat dalam ruang lingkup

yang ingin diteliti, populasi pada penelitian ini yaitu daun sawi hijau diperoleh dari Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel merupakan sebagian dari populasi yang ingin diteliti dimana keberadaannya diharapkan mampu menggambarkan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan adalah daun sawi hijau diambil yang masih segar dan tidak rusak diperoleh dari Karanganyar, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah formulasi dan uji aktivitas gel pelembab kulit ekstrak etanol daun sawi hijau dengan konsentrasi carbopol.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam variabel bebas dan variabel terikat.

Variabel bebas didefinisikan sebagai suatu kondisi atau nilai yang apabila terjadi akan menghasilkan atau mengubah kondisi atau nilai yang berbeda. Variabel bebas pada penelitian ini ialah konsentrasi carbopol.

Variabel terikat adalah suatu situasi atau nilai yang timbul karena keberadaan variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini adalah uji mutu fisik gel dan uji gel pelembab kulit ekstrak etanol daun sawi hijau.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sawi adalah daun sawi hijau yang diambil secara acak diperoleh dari Karanganyar, Jawa Tengah dengan identitas daun sawi hijau masih segar tidak kekuningan ataupun layu.

Kedua, serbuk simplisia daun sawi hijau adalah serbuk yang diperoleh dari tanaman daun sawi hijau segar dan sudah dipotong-potong, kemudian dipanaskan dengan menggunakan oven pada suhu 45-50 °C, selanjutnya diblender hingga menjadi serbuk dan diayak menggunakan pengayak nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun sawi hijau adalah hasil ekstrak daun sawi hijau yang dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Keempat, kelinci percobaan adalah kelinci *New zealand* jantan umur 7-8 minggu dengan berat 2-4 kg dan bagian punggung kelinci yang telah dicukur.

Kelima, sediaan gel daun sawi hijau merupakan sediaan yang sudah diformulasikan menggunakan ekstrak etanol daun sawi hijau pada berbagai konsentrasi dan adanya polivinil alkohol sebagai pembentuk gel dengan konsentrasi 10%.

Keenam, uji mutu fisik sediaan gel adalah pengujian sediaan yang dibuat berdasarkan pengamatan organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, uji iritasi kulit kelinci, dan uji kelembaban dilakukan kepada 20 orang relawan.

Ketujuh, uji organoleptis adalah teknik penilaian sediaan berdasarkan indera manusia untuk mengetahui warna, bentuk dan bau dari hasil formulasi.

Kedelapan, uji homogenitas adalah uji yang dilakukan untuk melihat ketercampuran dari sediaan dengan baik.

Kesembilan, uji pH adalah uji yang dilakukan untuk melihat keasaman sediaan gel dan memastikan bahwa sediaan gel tidak menimbulkan reaksi iritasi pada kulit.

Kesepuluh, uji viskositas adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui konsistensi sediaan dan menunjukkan tingkat kekentalan suatu sediaan.

Kesebelas, uji daya sebar adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan penyebaran gel dengan cepat di atas kulit ketika digunakan.

Keduabelas, uji iritasi adalah uji yang dilakukan pada punggung kelinci dengan cara kassa dioleskan setiap formula (0.5 gram) kemudian ditempelkan pada punggung kelinci dan ditutup dengan plastik tipis dan plester selama 24, 48, 72 jam.

Ketigabelas, uji kelembaban adalah kadar air di dalam lapisan kulit responden yang diukur dengan alat *skin analyzer*.

C. Bahan, Alat dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sawi hijau yang diperoleh dari Kecamatan Karanganyar, Jawa Tengah, etanol 96%, carbopol, TEA, propilenglikol, metil paraben, akuades.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah hand scoon, batang pengaduk, *beaker glass*, blender, gelas ukur, kertas saring, pipet tetes, *rotary evaporator*, *skin analyzer*, kaca arloji, mortir stamper, cawan porselen, batang pengaduk, tabung reaksi, timbangan analitik, *waterbath*, pH meter, viskositas *brookfield*, anak timbangan, botol bejana, rak tabung reaksi, kain flanel, kaca bulat skala diameter, *moisture balance*, ayakan.

3. Hewan uji

Hewan uji disesuaikan dengan lingkungan ruang percobaan selama 5 hari sebelum ditempatkan di dalam kandang individu (1 kandang 1 kelinci). Minimal 24 jam sebelum pengujian bulu kelinci sudah dicukur di area punggung untuk tempat pemaparan sampel uji. Proses pengguntingan rambut kelinci dengan panjang sisa rambut kurang lebih 0,5cm kemudian dilanjutkan dengan proses pencukuran rambut menggunakan alat cukur sehingga didapatkan kulit yang halus dan bebas dari rambut.

D. Metode Percobaan

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama pada penelitian adalah determinasi daun sawi hijau. Tahap ini dilakukan untuk memastikan benar atau tidaknya tanaman daun sawi hijau yang akan dipakai pada penelitian ini. Daun sawi hijau diambil dari perkebunan warga di Karanganyar, Jawa Tengah sebanyak satu batang diambil sampai akarnya. Daun sawi hijau diambil pada 14 agustus 2023 dengan kondisi daun sawi hijau segar dan tidak rusak. Determinasi dilakukan dengan melihat ciri-ciri morfologi baik secara mikroskopis maupun makrokopis yang ada pada tanaman daun sawi hijau terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Herbarium Rumah Sakit Umum Pusat Dr. SARDJITO.

2. Formula gel pelembab kulit ekstrak etanol daun sawi hijau

Tabel 1. Formula gel pelembab kulit ekstrak etanol daun sawi hijau

Bahan	K-	F1	F2	Kegunaan
Ekstrak etanol daun sawi hijau	-	2 gram	2 gram	Zat aktif
Carbopol	1 gram	2 gram	3 gram	Pengental
TEA	0,5 gram	0,5 gram	0,5 gram	Penstabil pH
Propilenglikol	7 gram	7 gram	7 gram	Humektan
Metil paraben	0,2 gram	0,2 gram	0,2 gram	Pengawet
Akuades	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Pelarut

Keterangan :

- K- : Kontrol negatif, basis gel tanpa ekstrak etanol daun sawi hijau dan carbopol 1 gram
 F1 : Formula 1, ekstrak 2 gram dan carbopol 2 gram
 F2 : Formula 2, ekstrak 2 gram dan carbopol 3 gram

3. Pembuatan serbuk daun sawi

Daun sawi hijau dikumpulkan dan dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang melekat, setelah dipastikan bersih, daun sawi hijau dirajang tipis-tipis dan dikeringkan di oven dengan suhu 45 - 50°C. Daun sawi hijau ditunggu hingga kering, kemudian dihaluskan dengan blender dan disaring dengan ayakan berukuran mesh 40. Pengecilan ukuran serbuk dilakukan untuk memudahkan proses penyarian dengan luas permukaan simplisia yang lebih kecil. Serbuk simplisia disimpan dalam wadah tertutup untuk proses ekstraksi selanjutnya.

4. Susut pengeringan serbuk

Pengujian susut pengeringan serbuk dilakukan dengan menimbang serbuk sebanyak 2 gram lalu dimasukkan ke dalam alat *moisture balance*, menggunakan suhu 105°C. Hasil pengukuran akan muncul pada alat *moisture balance* kemudian hasil dicatat.

5. Uji identifikasi kandungan kimia serbuk

Penandaan identifikasi ini dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dalam daun sawi hijau.

Pertama, identifikasi flavonoid. Serbuk daun sawi hijau sebanyak 0,5 gram ditambahkan air panas, kemudian dididihkan selama 5 menit, dan disaring untuk dijadikan larutan uji. Tambahkan magnesium serta HCl dan amil alkohol lalu dikocok hingga terbentuk larutan berwarna merah, jingga, atau kuning. Larutan ditambahkan dengan asam sulfat pekat, maka akan terlihat perubahan warna menjadi kuning kecoklatan yang menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid.

Kedua, identifikasi alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan cara melarutkan dalam beberapa tetes asam sulfat 2 N kemudian diuji dengan 2 pereaksi alkaloid yaitu pereaksi Dragendorff dan pereaksi Meyer. Hasil uji positif diperoleh bila terbentuk endapan merah hingga jingga dengan pereaksi Dragendorff dan endapan putih kekuningan dengan pereaksi Meyer

Ketiga, identifikasi saponin. Serbuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan sebentar dan kocok kuat selama 10 detik. Hasilnya akan terbentuk buih mantap

selama tidak kurang dari 10 menit dengan tinggi busa 1-10 cm serta pada penambahan HCl 2N buih tidak hilang (Dewi *et al.*, 2008).

Keempat, identifikasi tanin. Serbuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam sedikit akuades kemudian dipanaskan di atas penangas air, lalu ditetaskan dengan larutan FeCl₃ 1%. Positif tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman pada reaksinya.

6. Pembuatan ekstrak etanol daun sawi hijau

Ekstraksi dilakukan melalui metode maserasi bahan simplisia dengan perbandingan serbuk daun sawi hijau : etanol 96% yaitu (600 gram : 6 liter) dimasukkan ke dalam botol gelap. Biarkan selama 24 jam di tempat gelap yang terlindung dari cahaya, dengan sesekali diaduk atau dikocok setelah 24 jam disaring menggunakan kain flanel. Dilakukan remaserasi kembali dengan penambahan etanol 96% sebanyak 3 liter selama 24 jam kemudian disaring menggunakan kertas saring. Hasil penyaringan remaserasi dikentalkan dengan menggunakan *rotary evaporator*.

7. Uji kadar air ekstrak etanol

Kadar air ekstrak menggunakan metode thermografimetri dengan cara menimbang ekstrak etanol daun sawi hijau kemudian dipanaskan ke dalam oven selama 3 jam sampel yang sudah kering di dinginkan di desikator. Sampel kering ditimbang Kembali hingga bobot konstan.

8. Uji identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun sawi hijau

Pengujian skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi jenis senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun sawi hijau.

Pertama, identifikasi flavonoid. Ekstrak daun sawi hijau sebanyak 0,5 gram ditambahkan air panas, kemudian didihkan selama 5 menit, dan disaring untuk dijadikan larutan uji. Tambahkan magnesium serta HCl dan amil alkohol lalu dikocok hingga terbentuk larutan berwarna merah, jingga, atau kuning. Larutan ditambahkan dengan asam sulfat pekat, maka akan terlihat perubahan warna menjadi kuning kecoklatan yang menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid.

Kedua, identifikasi alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan dalam beberapa tetes asam sulfat 2 N kemudian diuji dengan 2 pereaksi alkaloid yaitu pereaksi Dragendorff dan pereaksi Meyer. Hasil uji positif diperoleh bila terbentuk endapan merah hingga jingga dengan pereaksi Dragendorff dan endapan putih kekuningan dengan pereaksi Meyer

Ketiga, identifikasi saponin. Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan sebentar dan kocok kuat selama 10 detik. Hasilnya akan terbentuk buih mantap selama tidak kurang dari 10 menit dengan tinggi busa 1-10 cm serta pada penambahan HCl 2N buih tidak hilang (Dewi *et al.*, 2008).

Keempat, identifikasi tanin. Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dengan sedikit akuades kemudian dipanaskan di atas penangas air, lalu ditetaskan dengan larutan FeCl₃ 1%. Positif tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman pada reaksi.

9. Pembuatan sediaan gel

Bahan yang sudah disiapkan kemudian ditimbang sesuai dengan formula yang ditentukan. Carbopol dimasukkan kedalam mortir kemudian ditambahkan akuades kurang lebih sebanyak 20ml digerus pelan hingga mengental kemudian ditambahkan dengan TEA digerus hingga homogen. Metil paraben dilarutkan menggunakan propilenglikol, hasil larutan metil paraben dengan propilenglikol digunakan kembali untuk melarutkan ekstrak. Hasil larutan dari ekstrak, metil paraben dan propilenglikol dimasukkan kedalam mortir yang berisi carbopol dan TEA sedikit demi sedikit digerus hingga homogen, kemudian ditambahkan akuades *ad* 100.

10. Uji mutu fisik sediaan gel

Uji organoleptis dilaksanakan untuk memeriksa perubahan bentuk, warna, dan aroma dari produk gel (Septiani, 2011).

Uji homogenitas dilakukan dengan meletakkan sampel antara dua objek kaca dan diperhatikan ada atau tidak partikel kasar dalam sampel (Kuncari, 2014).

Uji pH dilakukan dengan menggunakan stik pH universal yang dicelupkan ke dalam contoh yang telah dilarutkan dengan akuades, alat tersebut diawasi perubahan warnanya dan dibandingkan dengan indikator pH universal. Persyaratan pH untuk kulit adalah antara 4,5 - 6,5 (Tranggono, 2007).

Uji viskositas dilakukan dengan cara sebanyak 100 ml sediaan gel dimasukkan ke dalam *Beaker glass* lalu dipasang *spindle*. *Spindle* harus terendam dalam sediaan uji, viskometer dilakukan dengan kecepatan 30 rpm dan menggunakan spindle 6, kemudian catat hasil yang keluar pada layar viskositas (Astuti, 2017).

Uji daya sebar dilakukan untuk mengetahui kecepatan penyebaran gel pada kulit saat dioleskan. Satu gram gel dioleskan

secara hati-hati pada kaca berukuran 20 x 20 cm. Kaca tersebut ditutup dengan kaca lain dan diberi pemberat hingga bobot mencapai 100 gram, kemudian diameternya diukur setelah 1 menit. Persyaratan untuk daya sebar adalah antara 5 - 7 cm (Garg A, Deepeka A, Garg S. Singla Ak, 2002).

Uji stabilitas dilakukan dengan metode cycling test selama 6 siklus. Pada tiap siklusnya, sediaan uji disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam dilanjutkan penyimpanan pada suhu 40°C selama 24 jam (Dewi dkk., 2014).

11. Uji iritasi

Uji iritasi dilakukan untuk mengetahui efek iritasi suatu sediaan gel setelah diaplikasikan pada kulit, sehingga dapat diketahui keamanan sediaan gel sebelum dipasarkan ke masyarakat. Uji iritasi ini dilakukan untuk mencegah efek samping pada kulit (Wasitaatmadja, 1997). Uji iritasi dilakukan pada formula kontrol negatif, kontrol positif, F1, F2, dengan menggunakan 4 ekor kelinci. Pemaparan sampel uji menggunakan punggung kelinci dengan cara rambut pada punggung kelinci dicukur sampai bersih dengan ukuran 5cm X 5cm pencukuran pada kelinci dilakukan secara bertahap. Tahap pertama merupakan proses pengguntingan rambut kelinci dengan panjang sisa rambut kurang lebih 0,5cm kemudian dilanjutkan dengan proses pencukuran rambut menggunakan alat cukur sehingga didapatkan kulit yang halus dan bebas dari rambut. Pencukuran rambut kelinci dilakukan secara hati-hati dan teliti sehingga tidak melukai hewan uji. Kandang hewan uji individu dengan menggunakan 1 kandang untuk 1 hewan uji. Hewan uji ditempatkan disuatu kandang khusus yang berukuran panjang 60cm dan tinggi 70cm. Kulit kelinci dibersihkan menggunakan kapas yang dibasahi akuades. Kassa dioleskan setiap formula (0.5 gram), kemudian ditempelkan pada punggung kelinci dan ditutup dengan plastik tipis dan plester selama 24 jam, setelah itu hewan uji dikembalikan kekandangannya. Hari selanjutnya pada jam yang sama, plester dibuka secara hati-hati agar tidak menimbulkan rasa sakit pada hewan uji dan kulit hewan uji dibersihkan dengan akuades dari sisa senyawa uji yang menempel, apabila pengamatan sudah selesai bagian punggung kelinci ditutup kembali dengan plester yang sama dan pengamatan diulang setelah 48 dan 72 jam (Delia et al., 2015). Setiap kondisi kulit diberi skor dari 0 hingga 4 tergantung pada tingkat keparahan reaksi kulit (Draize, 1959).

12. Uji kelembaban

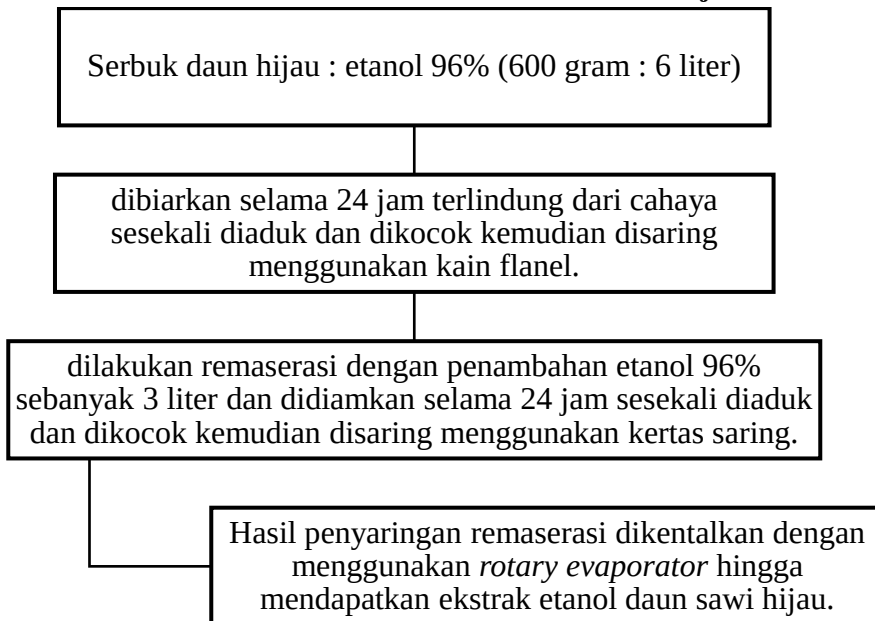
Uji kelembaban dilakukan pada formula kontrol negatif, F1, F2 untuk menghidrasi kulit diuji pada relawan berjumlah 12 orang dengan 4 kelompok perlakuan yang terdiri dari 4 orang setiap kelompok dengan menggunakan perangkat *Skin Analyzer*. Kriteria sukarelawan : Wanita atau pria yang berusia 15-25 tahun memiliki kondisi kulit kering, tidak memiliki riwayat alergi, dan bersedia jadi sukarelawan. Menurut Purba (2016), kriteria kelembapan kulit adalah <40% kurang lembab, 40-60% lembab, >60% sangat lembab. Langkah-langkah yang akan digunakan sebagai berikut : kulit pertama-tama dibersihkan, kemudian dikeringkan sepenuhnya. Kadar kelembaban kulit diperiksa sebelum sediaan gel diterapkan, dan hasilnya dicatat dalam bentuk persentase pada perangkat tersebut. Sediaan gel kemudian diaplikasikan secara merata pada kulit dibagian lengan tangan dengan luas 5x5 cm setiap malam hari, uji ini dilakukan selama 7 hari dengan pengukuran setiap hari. Kadar kelembaban kulit diperiksa kembali dan hasilnya dicatat ulang pada perangkat *Skin Analyzer*.

E. Analisis Data

Data sediaan gel daun sawi hijau diuji mutu fisik meliputi uji organoleptis, uji pH, uji homogenitas, uji viskositas, uji daya sebar. Uji kelembaban kulit dilakukan kepada 20 relawan dengan menggunakan konsentrasi gel ekstrak etanol 2 gram. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) *one way* dengan taraf kepercayaan 95% yang sebelumnya dilihat normality dan homogenitas sediaan, jika hasilnya sudah sesuai yaitu >0,05. Data hasil uji aktivitas pelembab kulit di uji menggunakan uji ANOVA *one way* dan *post hoc test Tukey*.

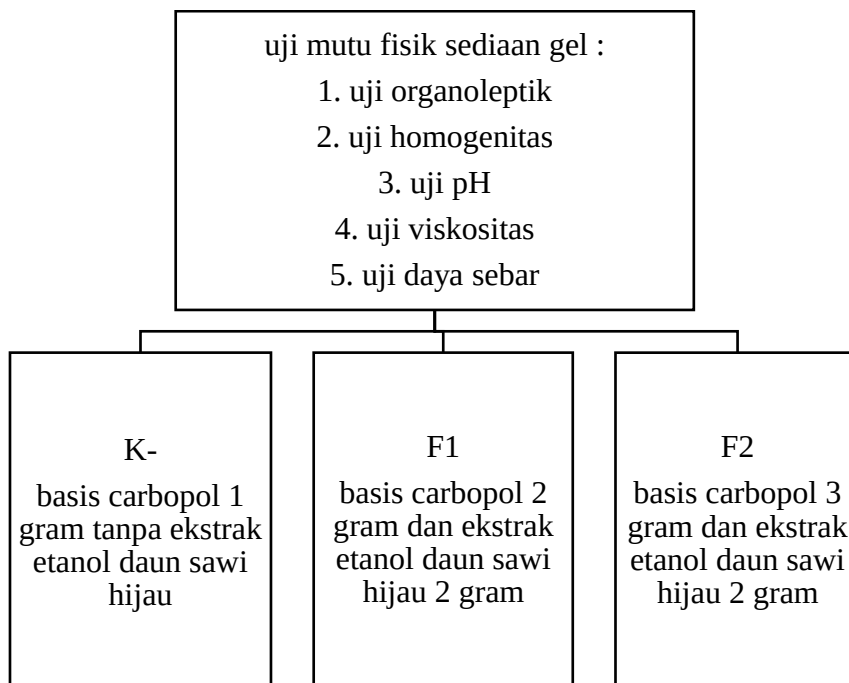
F. Skema Proses Penelitian

1. Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sawi Hijau



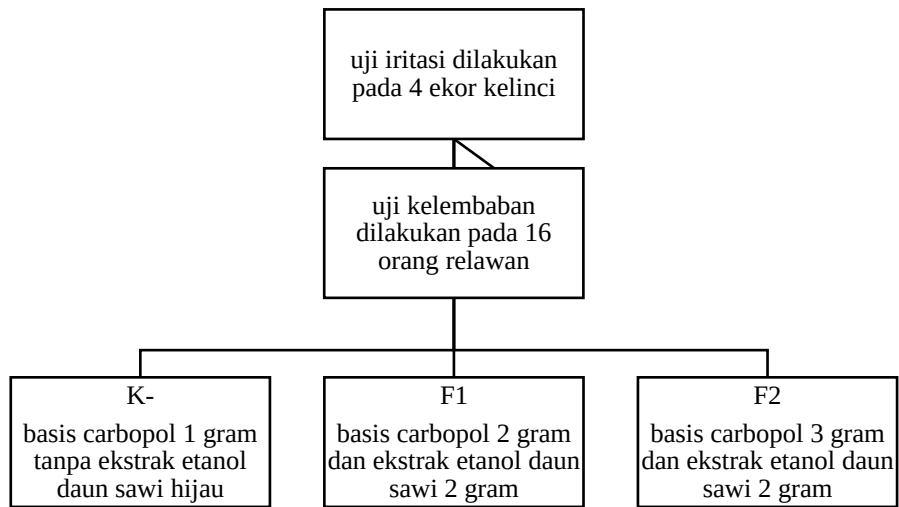
Gambar 6. Skema pembuatan ekstrak etanol daun sawi hijau.

2. Skema Uji Mutu Fisik Sediaan Gel



Gambar 7. Skema uji mutu fisik sediaan gel.

3. Skema uji aktivitas pelembab kulit



Gambar 8. Uji aktivitas pelembab kulit.