BAB III
METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Pada penelitian ini, objek yang diteliti adalah berbagai formulasi sediaan emulgel. Setiap formulasi mengandung ekstrak kulit buah lemon (*Citrus* x *limon* (L.) Osbeck) sebagai bahan aktif, namun dengan perbedaan konsentrasi carbopol 940 sebagai *gelling agent.*

2. Sampel

Sampel adalah bagian kecil dari kelompok yang kita teliti yang dipilih untuk mewakili seluruh kelompok. Sebagai sampel peneliti menggunakan sediaan emulgel yang memiliki zat aktif ekstrak kulit buah lemon (*Citrus* x *limon* (L.) Osbeck) dengan variasi konsentrasi Carbopol 940.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Terdapat tiga aspek utama yang menjadi fokus penelitian ini. Aspek pertama adalah pembuatan sediaan emulgel dengan variasi konsentrasi carbopol 940. Aspek kedua adalah pengujian aktivitas tabir surya sediaan dengan mengukur nilai SPF. Aspek ketiga adalah analisis mutu fisik dari sediaan emulgel.

2. Klasifikasi Variabel Utama

2.1 Variabel Bebas. Variasi konsentrasi carbopol 940, yang berperan sebagai *gelling agent*, digunakan sebagai variabel bebas yang dimodifikasi untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat.

2.2 Variabel Tergantung. Variabel terikat yang diamati dan diukur sebagai akibat dari manipulasi variabel bebas adalah karakteristik organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya lekat, daya sebar, daya proteksi (SPF), dan stabilitas.

2.3 Variabel Terkendali. Variabel yang dipertahankan konstan selama penelitian. Variabel yang dikendalikan dalam penelitian ini meliputi prosedur pembuatan emulgel yang seragam, penggunaan ekstrak dengan komposisi yang identik, serta penggunaan instrumen dan alat yang sama dan terkalibrasi.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Kulit lemon (*Citrus* x *limon* (L.) Osbeck) adalah kulit yang didapatkan dari buah lemon lokal berwarna kuning yang diambil secara acak dari B2P2TOOT Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia.

Ekstraksi metode maserasi adalah proses pengambilan senyawa aktif dari bahan alami (biasanya tanaman) dengan merendam bahan tersebut dalam pelarut, di mana pelarut yang digunakan adalah etanol 70% dengan perbandingan bahan tanaman terhadap pelarut 1:5. Proses perendaman dilakukan selama 24 jam, dan setelah itu dilakukan pemisahan ekstrak dengan cara penyaringan. Proses ekstraksi ini diulang sebanyak tiga kali untuk memastikan seluruh senyawa aktif dalam bahan tanaman terekstraksi sepenuhnya. Setelah proses ekstraksi selesai, pelarut yang digunakan akan diuapkan dengan menggunakan alat *vacuum rotary evaporator* untuk menghasilkan ekstrak yang lebih pekat, yaitu ekstrak yang mengandung senyawa aktif yang terlarut dalam etanol.

Pembuatan sediaan emulgel adalah proses pembuatan formulasi gel dengan menggunakan carbopol 940 sebagai pengental pada konsentrasi yang bervariasi yaitu 1%, 1,5%, dan 2%. Proses ini melibatkan pencampuran fase minyak dan fase air dengan carbopol 940 untuk menghasilkan sediaan emulgel yang stabil dan dapat mengakomodasi zat aktif hidrofobik. Penyesuaian konsentrasi carbopol 940 bertujuan untuk memperoleh viskositas dan tekstur yang sesuai dengan kebutuhan sediaan.

Pengujian aktivitas tabir surya adalah proses untuk mengukur kemampuan sediaan emulgel dalam melindungi kulit dari paparan sinar UV-B. Nilai SPF (*Sun Protection Factor*) adalah angka yang menunjukkan tingkat perlindungan terhadap radiasi UVB, yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk menilai transmisi sinar UV pada panjang gelombang tertentu. Nilai SPF dihitung dengan membandingkan dosis radiasi UV yang menyebabkan kerusakan kulit pada kulit yang diberi perlindungan dan yang tidak diberi perlindungan oleh sediaan.

Analisis mutu fisik adalah serangkaian uji yang dilakukan untuk menilai kualitas fisik dari sediaan emulgel, yang meliputi evaluasi karakteristik organoleptik (warna, bau, tekstur), homogenitas (keseragaman sediaan), pH (nilai keasaman atau kebasaan sediaan),

viskositas (tingkat kekentalan sediaan), daya lekat, dan daya sebar (kemampuan sediaan untuk tersebar merata pada kulit). Uji ini bertujuan untuk memastikan bahwa sediaan emulgel memenuhi standar kualitas fisik yang diperlukan untuk aplikasi yang efektif dan nyaman.

Formula terbaik adalah formula yang memiliki hasil mutu fisik memenuhi syarat ketentuan sediaan yang baik seperti homogen, nilai pH 4,5-6,5, memiliki viskositas sediaan emulgel 2000-50000 cPs, memiliki daya lekat minimal 1 detik, dan daya sebar 5-7 cm. Formula terbaik juga dilihat dari nilai SPF yang paling tinggi.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang dipergunakan pada penelitian adalah pisau, talenan, neraca analitik, ayakan no.40, oven, bejana maserasi, penangas, *moisture balance*, pH meter, cawan porselin, batang pengaduk, corong kaca, pipet tetes, pipet volume, beaker glass, mortir, kertas saring, kain flanel, lempeng KLT, blender, *Brookfield*, *rotary evaporator*, glass plate method, oven, kulkas, dan spektrofotometri UV-Vis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian adalah ekstrak kulit lemon, carbopol 940, TEA, tween 80, parafin cair, span 80, propilen glikol, metil paraben, aquadestilata, propil paraben, sitroborat, etanol 70%, dan etanol p.a.

D. Metode Percobaan

1. Determinasi Tanaman

Determinasi merupakan langkah awal untuk memastikan bahwa sampel kulit lemon yang digunakan adalah jenis yang benar. Verifikasi taksonomi tanaman yang dilakukan dengan membandingkan karakter morfologinya dengan deskripsi pada literatur serta melalui konsultasi dengan para ahli di B2P2TOOT Tawangmangu.

2. Pembuatan Serbuk Simplisia Kulit Buah Lemon

Kulit buah lemon dikupas dan dipotong tipis, kemudian di oven dengan suhu 50-60°C. Kulit lemon yang telah dikeringkan sebelumnya diproses lebih lanjut dengan cara dihaluskan menggunakan blender hingga mencapai tekstur serbuk.

3. Pengujian Mutu Fisik Serbuk Kulit Buah Lemon

3.1 Pemeriksaan organoleptis. Uji organoleptis adalah metode yang digunakan untuk mengevaluasi karakteristik fisik serbuk secara kualitatif. Dengan mengamati bentuk partikel, warna, bau, dan rasa, sehingga dapat diperoleh gambaran awal tentang sifat-sifat serbuk tersebut (Depkes RI, 2000).

3.2 Penetapan susut pengeringan. 2 g serbuk simplisia diletakkan pada *pan* aluminium *moisture balance,* atur pada suhu 105°C dan dengan menekan tombol auto. Tunggu sampai pemanasan selesai maka akan muncul nilai susut pengeringan yang dinyatakan dengan satuan persen (Setyawati, 2018).

3.3 Penetapan kadar air. Kandungan air dianalisis dengan metode destilasi toluen. Toluen yang digunakan terlebih dahulu dijenuhkan dengan air. Sebanyak 10 gram simplisia dan ekstrak dimasukkan ke dalam labu alas bulat, lalu diekstraksi dengan toluen jenuh air. Campuran dietilisasi selama 15 menit, kemudian laju destilasi diatur pada 2-4 tetes per detik. Setelah air terdestilasi sempurna, pemanasan dilanjutkan selama 5 menit. Setelah proses destilasi selesai, biarkan tabung penampung mendingin sampai suhu ruangan. Ukur volume air yang sudah terpisah dari toluen, kemudian hitung berapa persen volume air dibandingkan dengan total volume cairan (Depkes RI, 2008).

4. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Lemon

Proses ekstraksi dimulai dengan merendam 700 gram serbuk kulit lemon dalam 3,5 liter etanol 70% selama 24 jam. Maserasi diulang dua kali dengan etanol 96%. Semua filtrat digabungkan dan dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C dan kecepatan 45 rpm, kemudian dilanjutkan dengan penguapan pada waterbath (Putri dkk, 2022 dan Paat dkk 2022). Rendemen ekstrak dihitung dengan cara hasil ekstrak kental dibagi bobot serbuk dikali 100%.

5. Pengujian Mutu Fisik Ekstrak Kulit Buah Lemon

5.1 Uji Organoleptis. Pemeriksaan organoleptis adalah uji untuk mengetahui karakteristik serbuk. Uji organoleptik ekstrak dilakukan dengan cara mengamati bentuk, warna, bau dan rasa (Depkes RI, 2000).

5.2 Uji Susut Pengeringan. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan menimbang sebanyak 1-2 g ekstrak, lalu masukkan ke dalam botol timbang dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan

pada suhu 105ºC selama 30 menit dan ditimbang untuk mendapatkan tara. Sebelum proses penimbangan, ratakan ekstrak di dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol hingga terbentuk lapisan setebal sekitar 5 mm hingga 10 mm, kemudian masukkan botol tersebut ke dalam ruang pengering. Buka tutup botolnya dan keringkan pada suhu 105ºC hingga bobotnya tetap. Sebelum setiap pengeringan, biarkan botol dingin terlebih dahulu dalam eksikator hingga mencapai suhu kamar. Setelah itu, lanjutkan pengeringan pada suhu yang ditetapkan hingga bobotnya stabil (Depkes RI, 2000).

6. Identifikasi Kandungan Flavonoid Dengan Uji KLT

Pemeriksaan awal terhadap kandungan senyawa kimia dilakukan sebelum proses Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan reagen tertentu. Uji flavonoid dilakukan dengan reagen Mg-HCl. Tahap awal pemisahan senyawa flavonoid adalah dengan menerapkan metode KLT. Fase diam yang digunakan adalah lempeng silika gel 60 F254, sedangkan fase gerak yang dipilih adalah campuran n-butanol:asam asetat:air dengan perbandingan 4:1:5 (Haeria dkk, 2013). Kuersetin digunakan sebagai standar perbandingan, sementara sitroborat digunakan untuk menunjukkan noda. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan sinar tampak, sinar UV 254, dan sinar UV 365 (Depkes RI, 2000).

7. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Kulit Lemon

7.1 Identifikasi Alkaloid. Memasukan 1 mL ekstrak kulit lemon ke dalam tabung reaksi. Setelah penambahan HCl 2%, tabung dibagi menjadi dua bagian. Pada tabung A, ditambahkan reagen Dragendorff, sedangkan pada tabung B, ditambahkan reagen Mayer. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna khas (Depkes RI, 1977).

7.2 Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 0,5 mL ekstrak ke dalam tabung reaksi. Setelah penambahan etanol panas, magnesium, dan HCl pekat, tabung diamati. Terbentuknya warna kuning atau jingga pada lapisan amil alcohol mengindikasikan adanya flavonoid (Depkes RI, 1995).

7.3 Identifikasi Tanin. Didihkan ekstrak kulit lemon dalam 10 mL air pada tabung reaksi dan kemudian saring. Ambil sebanyak 1 mL ekstrak masukan kedalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 3 tetes pereaksi $FeCl_3$ 1%. Hail positif ditunjukan dengan terbentuknya warna hijau violet atau hijau kehitaman (Depkes RI, 1977).

7.4 Identifikasi Saponin. Uji saponin dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak dalam 10 mL air panas. Setelah didinginkan, larutan dikocok secara kuat selama 10 detik. Jika busa stabil dan tidak hilang setelah ditambah HCl 2N menunjukan hasil positif saponin dalam sampel (Depkes RI,1995).

7.5 Identifikasi Triterpenoid dan Steroid. Sebanyak 1 gram ekstrak direndam dalam 20 mL n-heksan di dalam cawan. Saring larutan hasil rendaman, dan filtratnya diuapkan diatas penangas air. Kemudian diberi pereaksi Liebermann-Burchard (asam asetat anhidrat 4 tetes dan asam sulfat pekat 2 tetes). Munculnya warna merah-keunguan membuktikan keberadaan terpenoid, sedangkan warna biru-hijau membuktikan ekstrak positif steroid (Depkes RI,1995).

8. Formula Emulgel

Formulasi emulgel terdiri dari fase minyak dan fase air. Fase minyak formulasi ini terdiri dari span 80, parafin cair, dan propil paraben, sedangkan fase air terdiri dari tween 80, carbopol 940, TEA, dan metil paraben. Variasi konsentrasi carbopol 940 yang ditambahkan yaitu pada formula 0 (1,5%) sebagai kontrol negatif, formula 1 (1%), formula 2 sebanyak (1,5%), formula 3 sebanyak (2%), dan untuk kontrol positif menggunakan *sunscreen* Facetology SPF 40. Rancangan formula pembuatan sediaan emulgel sebagai berikut :

Tabel 4. Formula Emulgel Ekstrak Kulit Lemon.

Bahan	Formula %				Fungsi
	F0	F1	F2	F3	
Ekstrak kulit buah lemon	-	5	5	5	Zat aktif
Carbopol 940	1,5	1	1,5	2	*Gelling agent*
TEA	2	2	2	2	*Alkalizing agent*
Parafin cair	5	5	5	5	*Emollient*
Span 80	0,5	0,5	0,5	0,5	*Emulgator*
Tween 80	1	1	1	1	*Emulgator*
Propilen glikol	10	10	10	10	Humektan
Metil Paraben	0,18	0,18	0,18	0,18	Pengawet
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	Pengawet
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Pelarut

Keterangan :
F0 : Basis sediaan emulgel Carbopol 940 1,5%
F1 : Sediaan emulgel Carbopol 940 1%.
F2 : Sediaan emulgel Carbopol 940 1,5%.
F3 : Sediaan emulgel Carbopol 940 2%.

9. Pembuatan Emulgel Tabir Surya Kulit Buah Lemon

Pembuatan basis fase minyak dilakukan dengan mencampurkan span 80, parafin cair, dan propil paraben dipanaskan pada suhu 70°C

menggunakan penangas air. Kemudian, membuat fase air dengan memasukan tween 80, propilen glikol, dan metil paraben ke dalam mortir kemudian tambahkan sedikit air panas aduk ad homogen, kemudian ditambahkan ekstrak kulit buah lemon. Fase air secara perlahan ditambahkan ke dalam fase minyak yang telah dipanaskan pada suhu 70°C sambil dilakukan pengadukan konstan hingga terbentuk emulsi yang homogen. Tahap selanjutnya adalah pembuatan basis gel. Carbopol 940 didispersikan dalam air panas dan dinetralkan dengan TEA untuk membentuk gel. Gel yang terbentuk kemudian dicampurkan dengan emulsi yang sudah jadi hingga diperoleh sediaan emulgel yang homogen.

10. Pengujian Mutu Fisik Sediaan Emulgel Kulit Buah Lemon

10.1 Uji Organoleptik. Uji organoleptik emulgel ekstrak kulit buah lemon (*Citrus* x *limon* (L.) Osbeck) dilakukan dengan evaluasi sediaan dengan mengamati warna, bau, dan bentuk emulgel secara fisik (Lestari, 2019)

10.2 Uji Homogenitas. Homogenitas sediaan emulgel diperiksa dengan membuat lapisan tipis di atas kaca. Kemudian, lapisan ini diamati untuk melihat apakah ada bagian yang tidak rata atau menggumpal (Safitri dkk, 2014).

10.3 Uji pH. Pengujian pH dilakukan dengan cara melarutkan 1 g emulgel dalam 10 mL air. pH meter yang telah dikalibrasi dengan larutan standar (pH 4-6,5) kemudian dicelupkan ke dalam larutan tersebut. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali untuk setiap formula emulgel guna mendapatkan hasil yang lebih akurat dan reliabel (Yenti dkk, 2014 dalam Dewi dkk. 2018).

10.4 Uji Daya Lekat. Uji daya lekat dilakukan dengan menempatkan 0,5 gram emulgel pada sebuah kaca objek. Kaca objek lainnya kemudian diletakkan di atas sampel dan diberi beban 1 kg selama 5 menit. Pasangan kaca objek ini kemudian dipasang pada alat pengukur, beban dilepaskan, dan waktu yang dibutuhkan untuk memisahkan kedua kaca dicatat (Safitri dkk, 2014).

10.5 Uji Daya Sebar. Prosedur uji daya sebar dilakukan dengan meletakkan 0,5 gram emulgel pada kaca objek. Kaca objek lain diletakkan di atasnya, lalu diberi beban secara bertahap mulai dari 50 gram hingga 200 gram. Setiap beban diberikan selama 1 menit. Setelah itu, diukur diameter penyebaran emulgel untuk mengetahui kemampuannya menyebar(Voight, 1994).

10.6 Uji Viskositas. Uji viskositas dilakukan dengan meletakkan sejumLah sediaan kedalam suatu wadah dan ditempatkan pada viskometer *Brookfield*. Siapkan spindel yang akan digunakan celupkan pada sediaan sampai batas tertentu, atur kecepatan rpm untuk perputarannya. Amati hasil torque yang dihasilkan jika <10 maka rpm bisa dinaikan jika >100 maka spindel dapat diganti dengan nomor yang lebih besar (Pratiwi dkk, 2023)

10.7 Uji Stabilitas. Stabilitas emulgel dalam penelitian ini dinilai menggunakan metode siklus suhu. Sediaan emulgel diekspos pada kondisi suhu ekstrim secara bergantian (4°C dan 40°C) selama 24 jam untuk mempercepat terjadinya perubahan fisik. Proses ini diulang sebanyak 6 siklus. Kestabilan emulgel ditentukan berdasarkan hasil analisis statistik, jika nilai sig.>0,05 maka data tidak terdapat perbedaan yang dignifikan (Sayuti, 2015)

11. Pengujian Sun Protecting Factor secara *In Vitro*

Sebelum dilakukan formulasi sediaan emulgel, ektrak kulit buah lemon dilakukan uji potensi tabir surya terlebih dahulu untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas tabir surya pada ektrak yang akan digunakan untuk membuat emulgel. Alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV Vis.

Proses persiapan sampel dimulai dengan menimbang 0,1 gram dari setiap formula emulgel (F0, F1, F2, dan F3). Masing-masing sampel padat kemudian dilarutkan dalam sedikit etanol p.a dalam labu ukur 50 mL. Setelah semua sampel larut sempurna, volume larutan dalam labu ukur diatur hingga mencapai tanda batas dengan penambahan etanol p.a. Larutan dihomogenkan dengan baik untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 2000 ppm. Untuk menyamakan dengan konsentrasi kontrol positif maka dilakukan pengenceran sebanyak 10x. Serapan larutan pengenceran diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis rentang panjang gelombang 290-320 nm interval 5 nm. Blanko yang digunakan dalam etanol p.a untuk meniadakan absorpsi latar belakang. Nilai SPF diperoleh melalui perhitungan menggunakan persamaan Mansur berdasarkan data serapan yang telah dirata-ratakan (Sayre dkk. dalam Chakraborty & Nalanda, 2022) yaitu:

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

Keterangan :
CF : Faktor koreksi
EE (λ) : Efek aritmogenik radiasi pada panjang gelombang λ
I (λ) : Spektrum simulasi sinar surya.
Abs : Nilai absorbansinya

Nilai Abs (λ) x (E (λ) x I (λ)). Kemudian dihitung hasil penjumLahan dan dikalikan dengan CF(10). Nilai EE x I merupakan suatu tetapan fungsi yang memiliki nilai konstan. Nilai EE x 1 ditetapkan sebagai dasar perhitungan dalam menentukan faktor perlindungan matahari (SPF) suatu produk (Mishra dkk, 2012).

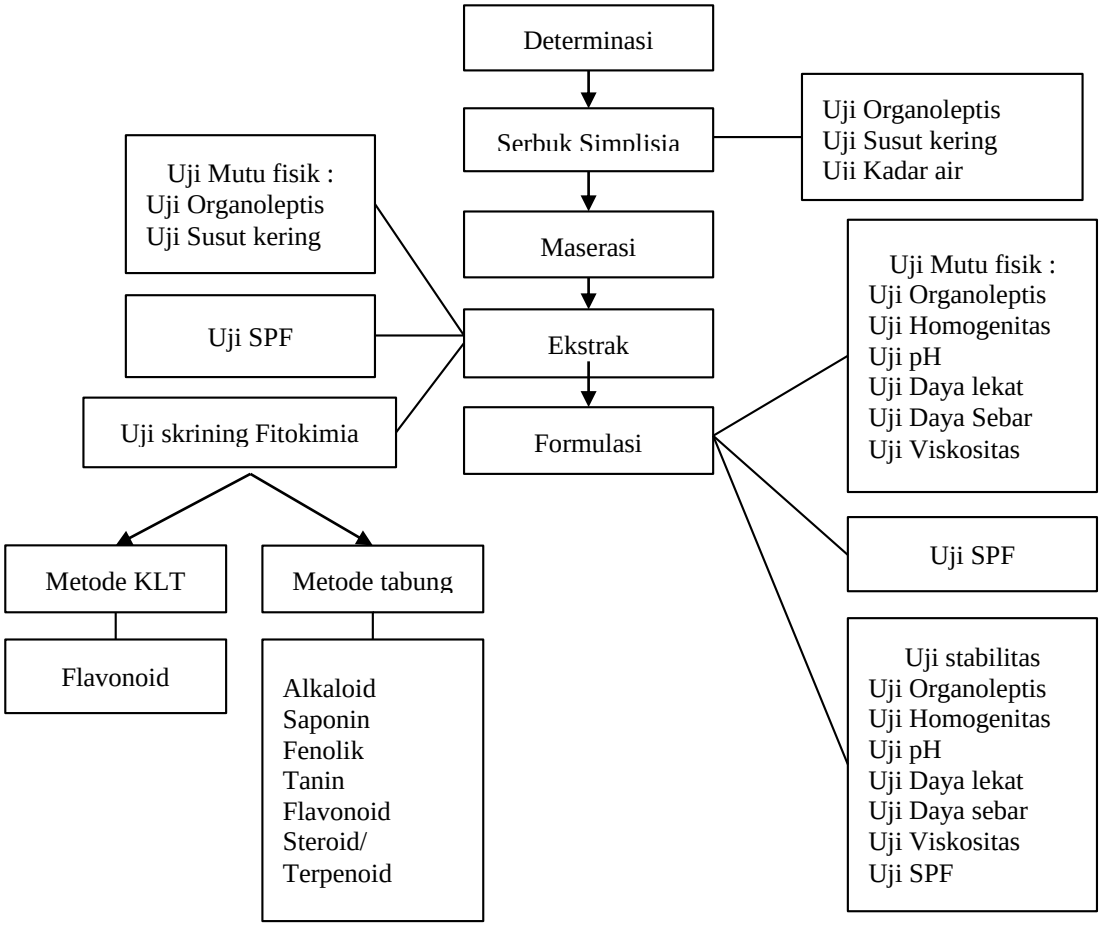
Tabel 5. Konstanta EE x I pada panjang gelombang 290-320 nm

Panjang gelombang	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1

E. Analisis Hasil

Evaluasi mutu fisik sediaan emulgel meliputi pengujian organoleptik, homogenitas, pH, daya lekat, daya sebar, viskositas, dan stabilitas (menggunakan metode *cycling test*). Nilai SPF ditentukan secara *in vitro* melalui pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan perhitungan berdasarkan persamaan Mansur. Analisis Data dan hasil dilakukan dengan pendekatan statistic menggunakan SPSS. Uji normalitas *Shapiro-Wilk* digunakan untuk mengevaluasi distribusi data. Jika data menyebar secara normal, maka dilakukan analisis *One-Way ANOVA* untuk menguji perbedaan antar kelompok. Sebaliknya, jika data tidak menyebar secara normal maka dilakukan uji t berpasangan (*Paired t-test*) untuk menentukan pengaruh uji terhadap nilai sebelum dan sesudah perlakuan, guna mengevaluasi efektivitas perlakuan terhadap variabel yang diteliti.

F. Rancangan Penelitian



Gambar 10. Rancangan Penelitian