

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah objek utama yang menjadi sasaran penelitian yang akan dilakukan. Populasi dalam penelitian ini adalah kulit buah delima merah (*Punica granatum* L.) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel merupakan bagian terkecil dari populasi yang akan diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit buah delima merah yang segar, bersih, tidak busuk, dan dalam keadaan baik. Sampel diambil dari B2P2TOOT Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Agustus 2021.

B. Variable Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah kulit buah delima merah. Variabel utama kedua adalah ekstrak etanol kulit buah delima merah. Variabel utama ketiga adalah emulgel ekstrak etanol kulit buah delima merah. Variabel utama keempat adalah nilai SPF. Variabel utama kelima adalah mutu fisik emulgel. Variabel utama keenam adalah stabilitas sediaan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak etanol kulit buah delima merah.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai SPF, stabilitas, dan mutu fisik emulgel ekstrak etanol kulit buah delima merah sebagai tabir surya diantaranya organoleptis, homogenitas, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan pH.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah metode pengeringan, metode ekstraksi, proses pembuatan sediaan emulgel, kondisi peralatan, komposisi emulgel, bahan yang digunakan di laboratorium.

3. Definisi operasional variable utama

Pertama, kulit buah delima merah adalah bagian dari buah delima yang berbentuk bulat dengan ujung bawah terlihat seperti kuncup yang mekar dan berwarna merah yang diperoleh dari B2P2TOOT Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Agustus 2021.

Kedua, ekstrak etanol kulit buah delima merah adalah ekstrak kental yang diperoleh dari proses maserasi serbuk kulit buah delima dengan penyari etanol 70% selama 5 hari kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Ketiga, emulgel ekstrak etanol kulit buah delima merah adalah sediaan emulgel yang mengandung ekstrak etanol kulit buah delima merah yang dibuat dengan mencampurkan fase emulsi dan fase gel.

Keempat, nilai SPF adalah nilai yang diperoleh dari pengujian aktivitas emulgel tabir surya ekstrak etanol kulit buah delima merah menggunakan instrumen spektrofotometri UV-VIS.

Kelima, mutu fisik adalah sifat-sifat fisik sediaan yang menunjukkan mutu sediaan dan berpengaruh terhadap kestabilan fisik dari formula emulgel.

Keenam, stabilitas adalah kemampuan sediaan untuk menciptakan suatu keadaan yang tetap. Uji stabilitas sediaan emulgel ekstrak etanol kulit buah delima merah dilakukan selama penyimpanan dan terhadap suhu menggunakan metode *cycling test*.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah delima merah yang diperoleh dari B2P2TOOT Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Agustus 2021.

1.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70% sebagai penyari, *hydroxylpropyl methylcellulose* (HPMC), paraffin cair, tween 80, span 80, propilenglikol, metil paraben, propil paraben, HCl encer LP, kloroform, *toluene*, besi (III) klorida 10%, pereaksi *Dragendorff*, pereaksi *Mayer*, asam asetat anhidrat, asam sulfat P, asam klorida 2N, dan aqua destilata.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam membuat simplisia adalah pisau untuk merajang, timbangan analitik, blender, dan ayakan nomor 20 atau 40. Alat yang digunakan dalam penyarian adalah timbangan, botol kaca gelap, alat-alat gelas, kain *flannel*, dan *rotary evaporator*. Alat yang digunakan untuk pembuatan sediaan emulgel mortar stemper dan wadah sediaan. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas dan stabilitas tabir surya adalah *viscometer*, pH meter, *cycling test*, spektrofotometri UV -Vis, dan alat-alat kaca.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tanaman

Kulit buah delima merah dilakukan identifikasi untuk membuktikan kebenaran dari sampel tersebut dengan melihat ciri morfologi yang ada pada kulit buah delima merah terhadap kepustakaan dan dibuktikan di B2P2TOOT Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan dan pemilihan bahan

Bahan baku yang digunakan tidak mengandung kapang, tidak dimakan serangga, dan tidak terkena kotoran hewan. Bahan baku yang digunakan adalah kulit buah delima merah yang segar, bersih, tidak busuk, dan masih dalam keadaan baik yang diperoleh dari Karanganyar, Jawa Tengah.

3. Pembuatan serbuk kulit buah delima merah

Kulit buah delima merah yang sudah melewati proses pencucian diiris tipis-tipis kemudian dikeringkan. Kulit buah delima yang sudah kering kemudian di blender. Serbuk yang didapat diayak dengan ayakan nomor 40 hingga didapat serbuk yang seragam dan halus (Salamah & Widyasari, 2015).

4. Penetapan kadar air serbuk

Kadar air diukur dengan metode *Azeotropi*. Sejumlah serbuk ditimbang sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan kedalam labu kering. *Toluene* jenuh air sebanyak 200 mL dimasukkan kedalam labu, kemudian alat dirangkai. Pendingin digunakan untuk mengalirkan *toluene* jenuh air ke tabung penerima. Labu dipanaskan selama 15 menit. Kecepatan penetesan air dibuat lebih kurang 2 tetes

per detik setelah *toluene* mulai mendidih. Bagian dalam pendingin dibersihkan menggunakan sikat tabung yang tersambung pada kawat tembaga dan sudah dibasahi dengan *toluene* jenuh air. Peyulingan dilanjut selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan dingin hingga suhu ruang, Volume air diukur setelah air dan *toluene* terpisah dengan sempurna. Kadar air dihitung dalam %v/b. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali dan hasilnya dirata-rata (Kemenkes RI, 2017).

5. Susut pengeringan serbuk kulit buah delima merah.

Serbuk kulit buah delima ditimbang sebanyak 2 gram. Alat *moisture balance* dinyalakan dan dipanaskan selama 10 menit. Serbuk kemudian dimasukkan kedalam wadah sampel alat *moisture balance* dan diratakan. *Moisture balance* ditutup kemudian tunggu hingga lampu mati dan catat hasilnya. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali dan hasilnya dirata-rata. Uji ini memberikan batas maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Sediarsa *et al.*, 2018).

6. Pembuatan ekstrak etanol kulit buah delima merah

Serbuk kulit buah delima merah diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi. Serbuk kering kulit buah delima sebanyak 1 bagian dimasukkan kedalam bejana, kemudian ditambahkan 10 bagian pelarut. Serbuk direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Maserat yang diperoleh dipisahkan dengan penyaringan. Proses penyarian dilakukan minimal dua kali menggunakan pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian awal. Semua maserat dikumpulkan kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Randemen dihitung antara randemen dengan bobot serbuk simplisia (Alfath *et al.*, 2013).

7. Karakterisasi ekstrak etanol kulit buah delima merah

7.1. Uji organoleptis. Pemeriksaan organoleptik dilakukan menggunakan panca indera. Pemeriksaan dilakukan terhadap serbuk meliputi warna, bau, bentuk, dan rasa.

7.2. Uji susut pengeringan. Ekstrak kulit buah delima ditimbang sebanyak 2 gram. Alat *moisture balance* dinyalakan dan dipanaskan selama 10

menit. Serbuk kemudian dimasukkan kedalam wadah sampel alat *moisture balance* dan diratakan. *Moisture balance* ditutup kemudian tunggu hingga lampu mati dan catat hasilnya. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali dan hasilnya dirata-rata. Uji ini memberikan batas maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Sediarsa *et al.*, 2018).

7.3. Uji bobot jenis. Bobot jenis ekstrak etanol kulit buah delima dihitung menggunakan alat yaitu piknometer. Ekstrak kental diencerkan hingga 5% menggunakan etanol 96%. Ekstrak cair dimasukkan ke dalam piknometer 50 ml sampai penuh dan ditimbang. Bobot air dihitung dari bobot piknometer yang telah berisi air dikurangi dengan bobot kosong. Bobot jenis ekstrak diperoleh dengan membagi kerapatan ekstrak dengan kerapatan air pada suhu 20°C. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali dan hasilnya dirata-rata (Depkes, 2000).

8. Identifikasi kandungan kimia

8.1. Pemeriksaan alkaloid. Larutan uji dibuat dengan menimbang 1 gram ekstrak kental kemudian dilarutkan dengan 50 mL etanol. Larutan sampel sebanyak 2 mL diuapkan sampaai diperoleh residu. Residu ditambah dengan 5 mL HCl 2 N agar larut. Larutan yang diperoleh dibagi ke dalam 3 tabung reaksi berbeda. Tabung pertama ditambah HCl 2 N sebagai blanko. Tabung kedua ditambah pereaksi *Dragendorff* 3 tetes dan tabung ketiga ditambah pereaksi *Mayer* 3 tetes (Dewi *et al.*, 2013). Hasil dikatakan positif bila terdapat endapan jingga pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga (Jones & Kinghorn, 2012).

8.2. Pemeriksaan saponin. Ekstrak etanol kulit buah delima merah dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 10 mL air panas, kemudian didinginkan dan digojog dengan kuat selama 10 detik. Hasil positif bila terbentuk buih yang mantap dengan tinggi 1-10 cm selama lebih dari 10 menit dan buih tidak hilang dengan penambahan HCl 2 N (Dewi *et al.*, 2013).

8.3. Pemeriksaan polifenol dan tannin. Beberapa tetes larutan ekstrak uji direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 5%, jika terjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tanin (Jones & Kinghorn, 2012).

8.4. Pemeriksaan flavonoid. Ekstrak sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan serbuk magnesium dan 2-4 tetes HCL pekat, kemudian campuran dikocok (Rahayu *et al.*, 2015). Flavon, flavanol, turunan 2,3-dihidro, dan xanthone menghasilkan warna *orange*, merah muda, merah hingga ungu. Flavanon dan flavanol menghasilkan warna merah muda lemah hingga magenta atau tidak ada warna sama sekali (Jones & Kinghorn, 2012).

8.5. Pemeriksaan sterol atau triterpenoid. Larutan uji sebanyak 2 mL diuapkan. Residu ditambah 0,5 mL kloroform untuk melarutkan, lalu ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran tersebut ditetesi 2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung (Dewi *et al.*, 2013). Bila terbentuk warna hijau kebiruan atau diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut, menunjukkan adanya triterpenoid dan atau steroid (Jones & Kinghorn, 2012).

9. Pembuatan emulgel

9.1. Formula. Formula emulgel ekstrak etanol kulit buah delima terdiri fase emulsi dan fase gel. Fase emulsi terbagi dari fase minyak dan fase air. Fase minyak mengandung span 80 dan paraffin cair. Fase air mengandung tween 80. Fase gel terdiri dari *gelling agent* (HPMC), propilenglikol, metil paraben, dan propil paraben. Ekstrak etanol kulit buah delima merah ditambahkan dengan variasi konsentrasi. Variasi konsentrasi ekstrak etanol kulit buah delima merah yang ditambahkan dalam emulgel adalah 0% untuk formula 1 sebagai kontrol negatif, 0,1% untuk formula 2, 0,2% untuk formula 3, 0,3% untuk formula 4, dan sebagai kontrol positif digunakan produk dipasaran yakni Wardah dengan SPF 30 PA+++. PA++ pada kontrol positif menunjukkan bahwa selain memberikan perlindungan terhadap UV B sediaan juga memberikan perlindungan terhadap UV A dengan perlindungan yang tinggi. Konsentrasi tersebut digunakan karena pada penelitian yang dilakukan oleh Iyan *et al* (2016) menunjukkan bahwa konsentrasi 0,055% memberikan proteksi sebesar 16,63. Rancangan formula emulgel ekstrak etanol kulit buah delima merah sebagai berikut:

Tabel 2. Rancangan formula emulgel ekstrak etanol kulit kulit buah delima (*Punica Granatum L.*)

Bahan	Satuan	F1	F2	F3	F4
Ekstrak	%	-	0,1	0,2	0,3
HPMC	Gram	2,5	2,5	2,5	2,5
Paraffin cair	mL	5	5	5	5
Tween 80	Gram	1,08	1,08	1,08	1,08
Span 80	Gram	0,42	0,42	0,42	0,42
Propilenglikol	mL	10	10	10	10
Metil paraben	Gram	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	Gram	0,02	0,02	0,02	0,02
Aquadest ad	mL	100	100	100	100

9.2. Pembuatan emulgel. Alat dan bahan yang digunakan disiapkan terlebih dahulu. Semua bahan ditimbang sesuai dengan perhitungan. Basis emulsi dibuat dengan membuat fase minyak dan fase air. Fase minyak dibuat dengan mencampurkan span 80, paraffin cair, dan propil paraben kemudian dilebur pada suhu 70° C. Fase air dibuat dengan mencampurkan tween 80 dengan air panas pada suhu 70° C. Fase minyak ditambahkan ke dalam fase air pada suhu 70° C sambil terus diaduk sampai terbentuk emulsi. Basis gel dibuat dengan cara mendispersikan HPMC sedikit demi sedikit dengan air panas (80° C) dan diaduk sampai terbentuk gel. Metil paraben ditambahkan propilenglikol lalu diaduk sampai larut kemudian dicampur dengan gel. Basis emulsi dan gel dicampur kemudian digerus sampai terbentuk emulgel yang homogen. Ekstrak etanol kulit buah delima merah ditambahkan sedikit demi sedikit dalam sediaan emulgel saat masih hangat dengan variasi konsentrasi 0,1%, 0,2%, dan 0,3% (Qamariah *et al.*, 2016) dalam (Paramawidhita, 2019).

10. Identifikasi emulgel ekstrak etanol kulit buah delima merah dilakukan pada hari ke-1 dan ke-21

10.1. Uji organoleptis. Pemeriksaan organoleptik meliputi bau, warna, konsistensi, dan homogenitas. Masing-masing formula dilakukan pengujian sebanyak 3 kali.

10.2. Uji homogenitas. Pengujian dilakukan dengan menimbang 0,1 gram emulgel kemudian dioleskan tipis-tipis pada *object glass* secara merata. Emulgel yang homogen bebas dari butiran-butiran kasar. Masing-masing formula dilakukan sebanyak 3 kali (Yenti *et al.*, 2014) dalam (Dewi *et al.*, 2018).

10.3. Uji viskositas. Pengujian ini dilakukan menggunakan alat *viscometer*. Rotor dipasang pada *viscometer* dan dikunci melawan arah jarum jam. *Cup* diisi dengan 100 gram emulgel, kemudian rotor dicelupkan tepat berada di tengah-tengah *cup* hingga tanda batas dan alat dihidupkan. Rotor akan berputar dan setelah stabil nilai viskositas dapat dibaca pada layar (Kusumawati, 2018).

10.4. Uji daya sebar. Emulgel sebanyak 0,5 gram diletakkan pada tengah-tengah kaca bundar berskala, kemudian ditutup dengan kaca bundar lainnya yang sudah ditimbang kemudian dibiarkan selama 1 menit dan dihitung diameter sebarunya. Beban 50 gram ditambahkan diatas kaca dan dibiarkan selama 1 menit lalu dihitung diameter sebarunya. Beban diberikan dengan kelipatan 50 gram sampai skala stabil lalu diukur diameter dan luas sebarunya (Kusumawati, 2018).

10.5. Uji daya lekat. Emulgel sebanyak 0,5 gram diletakkan ditengah *object glass* dan satu *object glass* lainnya digunakan untuk menutup. Beban 50 gram diletakkan diatas *object glass* tersebut selama 5 menit. Ujung dua *object glass* dijepit pada alat uji, kemudian penyangga beban dilepas. Waktu lekat sediaan dihitung dari lamanya dua *object glass* terlepas dari alat uji (Naibaho *et al.*, 2013) dalam (Sari *et al.*, 2015).

10.6. Uji pH. Uji ini dilakukan menggunakan pH meter. Sediaan emulgel ditimbang sebanyak satu gram dilarutkan dalam 10 ml aquadest. Elektroda yang telah dikalibrasi dicelupkan pada larutan uji tersebut selama 10 menit dan biarkan alat menunjukkan hasil yang konstan. Masing-masing formula dilakukan sebanyak 3 kali (Yenti *et al.*, 2014) dalam (Dewi *et al.*, 2018).

10.7. Uji stabilitas. Metode *cycling tes* dilakukan dengan cara sediaan disimpan pada suhu 4° C selama 24 jam, kemudian dipindah pada suhu 40° C selama 24 jam. Waktu penyimpanan dengan 2 variasi suhu tersebut dianggap 1 siklus. Pengujian stabilitas ini dilakukan sebanyak 6 siklus (Suryani *et al.*, 2017). Hasil data yang diperoleh kemudian diolah secara *statistic* menggunakan *Paired Sampel t-Test* (Mardikasari *et al.*, 2017). Emulgel dinyatakan stabil apabila tidak terdapat perbedaan signifikan ($p\text{-value} > 0,05$) terhadap parameter yang diamati (Sayuti, 2015).

11. Penentuan nilai SPF emulgel ekstrak etanol buah delima merah

Penentuan aktivitas tabir surya emulgel ekstrak etanol buah delima merah dilakukan dengan menguji SPF secara *in-vitro*. Pengujian dilakukan dengan mengukur serapan emulgel menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada lamda 290-320 nm dengan interval 5 nm . Emulgel ekstrak etanol buah delima merah ditimbang 0,025 gram tiap konsentrasi dilarutkan etanol pa sebanyak 25 ml kemudian di ultrasonifikasi (Pratama & Zulkarnain, 2015). Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi optimal untuk pengukuran nilai SPF. Larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer yang telah dikalibrasi dengan cara 1 ml etanol pa dimasukkan kedalam kuvet lalu dimasukkan dalam spektrofotometer selanjutnya dibuat kurva serapan uji dalam kuvet (Mokodompit *et al.*, 2013). Apabila serapan yang diperoleh melebihi rentang 0,2-0,8 maka larutan diencerkan dan jika serapan yang diperoleh kurang dari rentang maka jumlah sampel ditambahkan sampai diperoleh serapan yang baik (0,2 – 0,8) (Suhartati, 2017). Serapan yang diperoleh dijadikan dasar perhitungan nilai SPF dengan persamaan Mansur (Mansur *et al.*, 1986) dalam (Pramiastuti, 2019).

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

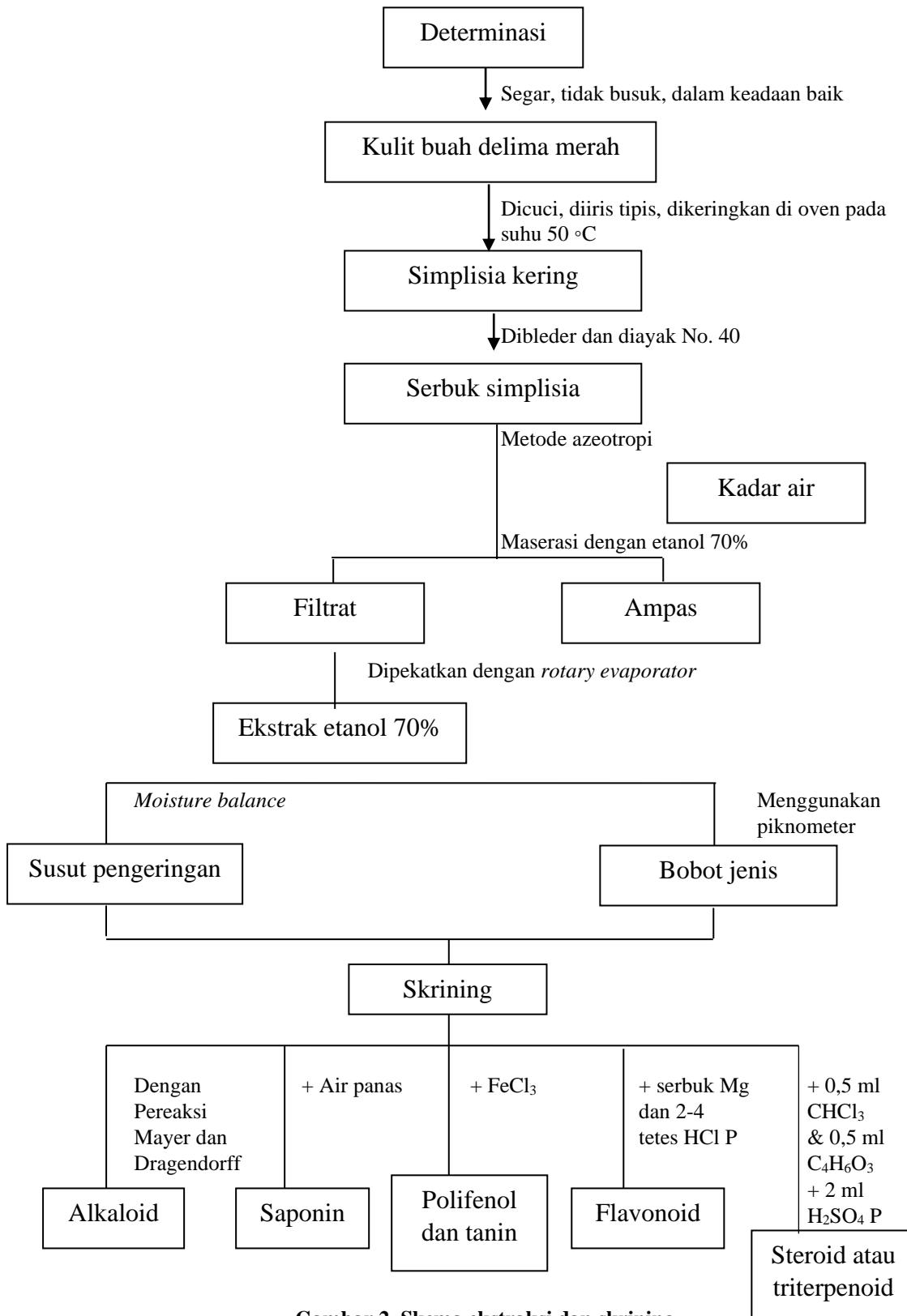
Dimana :

- | | |
|----|--------------------------------|
| CF | = Faktor koreksi |
| EE | = Spektrum efek erythemal |
| I | = Spektrum intensitas matahari |

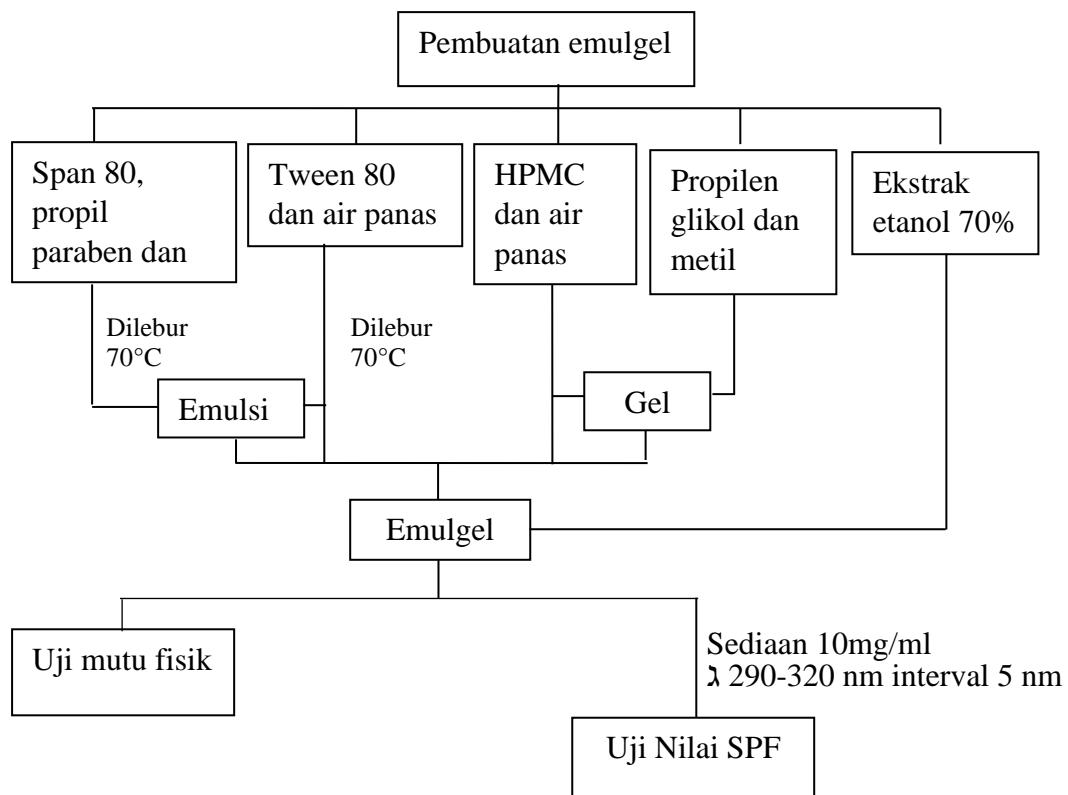
E. Analisis Hasil

Analisis data dilakukan dengan pendekatan statistik menggunakan aplikasi *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Analisis data uji mutu fisik dilakukan menggunakan *One Way Anova* dan *Paired T-Test* sedangkan data uji stabilitas dianalisis menggunakan *Paired T-Test*. Hasil data uji SPF yang diperoleh dari perhitungan dengan persamaan Mansur dianalisis dengan *Kolmogorov Smirnov* atau *Sapiro Wilk*. Apabila data yang diperoleh menunjukkan terdistribusi normal kemudian dilakukan analisis *One Way Anova* untuk melihat apakah ada perbedaan antar formula (Pramiastuti, 2019).

F. Skema Penelitian



Gambar 2. Skema ekstraksi dan skrining



Gambar 3. Pembuatan emulgel dan uji nilai SPF