

BAB III

METODOLOGI

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang diambil dari Desa Anggaswangi, Kecamatan Godong, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang masih segar, hijau dan bebas dari penyakit..

B. Teknik Sampling

Penelitian ini menggunakan teknik *purposive sampling*, yaitu sampel ditentukan setelah melakukan pertimbangan tertentu. Daun yang diambil adalah daun yang tidak rusak, tidak berjamur, dan tidak berwarna kuning.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang berubah secara disengaja. Variabel penelitian ini adalah konsentrasi gliserin dalam pembuatan sediaan krim (dengan variasi konsentrasi 10%, 15%, 20%).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah suatu variabel yang dapat berubah karena pengaruh variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini adalah stabilitas fisik yang meliputi ; Uji Organoleptik, Uji Homogenitas, Uji pH, Uji Daya Sebar, Uji Viskositas, Uji Daya Lekat dan Uji Tipe Krim.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variable yang tidak bisa diubah-ubah. Variabel kontrol pada penelitian ini meliputi : Cara Pengujian Stabilitas, Pengambilan Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Metode ekstraksi daun Belimbing Wuluh (*Avverhoa bilimbi* L.).

D. Definisi Operasional

1. Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang diambil dari desa Anggaswangi, Kecamatan Godong, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah. Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dipilih yang berwarna hijau, segar, dan tidak terserang hama.
2. Serbuk daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) diperoleh dengan cara sampel yang telah diambil, dicuci, dirajang, dikeringkan, kemudian dilakukan penggilingan dan pengayakan. Setelah itu di uji susut pengeringan.
3. Ekstrak daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) didapat dari proses perendaman serbuk dengan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi.
4. Parameter Spesifik meliputi pengujian organoleptik, uji kandungan ekstrak, yang terdiri dari uji tabung dan KLT untuk mengetahui senyawa flavonoid, alkaloid, tannin, saponin daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.).
5. Parameter non spesifik meliputi pengujian susut pengeringan dan bebas etanol.
6. Pembuatan Sediaan krim dengan konsentrasi ekstrak 7% dan divariasi konsentrasi gliserin. Variasi konsentrasi gliserin yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10%, 15%, dan 20%.
7. Pengujian Stabilitas adalah serangkaian evaluasi yang dilakukan untuk menilai perubahan yang terjadi pada sediaan krim selama penyimpanan, termasuk pengamatan terhadap perbedaan fase, perubahan warna, bau, dan tekstur.
8. Stabilitas Fisik mencakup beberapa parameter yang diukur untuk menilai kualitas sediaan krim, antara lain:
 - a. Uji Organoleptik adalah pengujian yang dilakukan dengan mengamati warna, aroma, dan bentuk dari preparat sampel.
 - b. Uji Homogenitas bertujuan untuk melihat keseragaman partikel pada sediaan krim sehingga memberikan kualitas yang baik dan maksimal ketika digunakan.
 - c. Uji pH adalah Ukuran keasaman atau kebasaan krim, yang penting untuk memastikan keamanan dan kenyamanan saat digunakan pada kulit.

- d. Uji Daya Sebar adalah kemampuan krim untuk menyebar pada permukaan kulit, diukur dengan metode uji sebar.
- e. Uji Viskositas dilakukan untuk mengetahui kekentalan dari sediaan krim yang diuji.
- f. Uji daya lekat dilakukan untuk menentukan seberapa baik krim dapat melekat pada kulit.
- g. Uji tipe krim bertujuan untuk menentukan jenis sediaan krim yang dibuat, apakah termasuk tipe air dalam minyak (A/M) atau minyak dalam air (M/A).

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah alat-alat kain hitam, blender, *beaker glass* (pyrex), *moisture balance*, ayakan 60 mesh (6B/T6003 1-2022[®]), *rotary evaporator* (B-one[®]), water aspirator (B-one), *waterbath* (Bio maise), corong *buchner*, tabung reaksi (pyrex), hotplate, pipet kapiler (Maner feld[®]), *chamber glass*, plat KLT *silica Gel GF_{l254}*, sinar UV 366 (ATN T5 W8 220 V Black[®]), sinar UV 254 366 (ATN T5 W8 220 V Black[®]), botol kaca, mortir dan stamper, batang pengaduk, kaca objek (GEA MEDICAL[®]), pH universal (new star[®]), kaca, *viscometeter Brookfield* (NDJ/8s[®]), Disintegration tester, anak timbang, kaca arloji timbangan analitik (CHQ type AJ20022B[®]), tabung reaksi, pH meter, gelas ukur (pyrex), pipet tetes, aluminium foil (bagus kitchen care), oven, wadah krim, lemari pendingin, kertas saring.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan, yaitu daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), Etanol 96%, H₂SO₄, CH₃COOH, HCl pekat, Mg serbuk, akuades, klorofom, mayer, dragendroff, wagner, FeCl₃, methanol, etil asetat, asam stearate, setil alkohol, gliserin, TEA, paraffin cair, metil paraben, metilen biru.

F. Jalannya Penelitian

1. Determinasi

Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang diperoleh di perkebunan Belimbing di Desa Anggaswangi, Kecamatan Tawang harjo, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah. Determinasi Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dilakukan di laboratorium UPF Yankestrad Tawangmangu, Jalan Raya Lawu No. 11 Kec. Tawangmangu Kab. Karanganyar, Jawa Tengah. Determinasi dilakukan untuk memastikan keaslian dan ketepatan identifikasi tanaman yang dijadikan sampel.

2. Pengumpulan dan Pengeringan

Pengumpulan bahan dilakukan dengan cara mengambil daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dari Desa Anggaswangi, Kecamatan Godong, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah sebanyak 5 kg. Kemudian dilakukan sortasi basah dan pembersihan untuk menghilangkan kotoran, lalu keringkan selama 7 hari dibawah sinar matahari sambil ditutup dengan kain hitam. Daun yang diambil yang segar, berwarna hijau, dan bebas dari penyakit. Setelah itu dilakukan proses sortasi basah dan pembersihan untuk menghilangkan kotoran. Daun yang telah dibersihkan kemudian ditiriskan dan dipotong kecil-kecil. Selanjutnya daun dikeringkan selama 7 hari dengan menjemurnya di bawah sinar matahari, sambil ditutup dengan kain hitam (Anrina *et al.*, 2023). Setelah sampel kering dihaluskan menggunakan blender samapi menjadi serbuk, kemudian diayak dengan ayakan mesh 60 (Ariem *et al.*, 2020).

3. Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, di mana 500 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana dan tambahkan 2500 ml etanol 96% dengan perbandingan 1:5 rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Kemudian, disaring menggunakan kertas saring yang menghasilkan filtrat pertama dan sisa padatan (debris 1). Sisa padatan ini kemudian direndam kembali (remaserasi) dengan pelarut yang sama sebanyak 1.500 mL, sambil diaduk satu kali sehari. Setelah remaserasi, disaring kembali untuk memperoleh filtrat kedua dan sisa

padatan. Filtrat pertama dan filtrat kedua kemudian dicampurkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°, kemudian dilakukan penguapan menggunakan waterbath dengan suhu 50° untuk mendapatkan ekstrak kental (FHI, 2017).

$$\text{Rendeman} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

4. Parameter Spesifik

a) Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik terhadap ekstrak daun belimbing wuluh dengan menggunakan panca indera manusia untuk menilai karakteristik warna, bau, dan bentuk (Arziyah *et al.*, 2022).

b) Uji Kandungan Ekstrak

1) Uji Tabung

a. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara melarutkan 0,5 gram ekstrak dalam 5 mL etanol, kemudian dipanaskan selama kurang lebih 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 10 tetes HCl pekat dan 0,2 gram serbuk magnesium. Terbentuknya warna hitam kemerahan, kuning, atau jingga menunjukkan hasil positif adanya senyawa flavonoid (Ningsih *et al.*, 2020).

b. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 gram ekstrak dan 2 tetes HCl 2N dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL akuades panas. Campuran tersebut dikocok kuat selama sekitar 1 menit, lalu didiamkan selama 10 menit. Terbentuknya buih atau busa menandakan adanya senyawa saponin, yang menunjukkan hasil uji positif (Mailuhu *et al.*, 2020)

c. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan mencampurkan 0,5 gram ekstrak dengan 2 mL kloroform, 10 mL ammonia, dan 10 tetes asam sulfat (H₂SO₄). Campuran ini dikocok hingga berbentuk terbungk dua

lapisan, kemudian lapisan H_2SO_4 dipisahkan dan dibagi ke dalam tiga tabung reaksi, masing-masing berisi 2,5 mL. Selanjutnya, larutan tersebut di uji dengan menambahkan 3 tetes Dragendroff, dan 3 tetes wagner. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih dengan pereaksi mayer, endapan merah atau jingga pada pereaksi Dragendroff, serta endapan coklat pada pereaksi Wagner (Ningsih *et al.*, 2020).

d. Uji tannin

Uji tanin dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak dalam 10 mL air panas, kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Munculnya warna hijau kehitaman menandakan adanya kandungan senyawa tannin (Ningsih *et al.*, 2020).

2) Uji Kromatografi Lapis Tipis

Uji kualitatif terhadap senyawa metabolit sekunder dalam sampel dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Plat yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ berukuran 10×5 cm sebagai fase diam. Penotolan sampel dilakukan dengan pipet kapiler pada plat KLT yang telah diberi garis batas 1 cm dari tepi atas dan bawah, serta diberi jarak antar titik 2 cm. Plat dikembangkan dalam *chamber glass* yang telah dijenuhkan terlebih dahulu dengan fase gerak yang sesuai untuk masing-masing golongan senyawa. Kemudian pengembangan, plat dikeringkan dan disemprot dengan reagen penampak noda spesifik sesuai jenis senyawa yang diuji. Identifikasi senyawa didasarkan pada warna noda pada lampu UV 366 nm dan UV 254 nm yang terbentuk setelah penyemprotan reagen. (Sari *et al.*, 2023).

a. Uji Flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid, dilakukan menggunakan sistem fase gerak berupa campuran air : metanol : etil asetat dengan perbandingan (5 : 4 : 1). Setelah pengembangan selesai, plat disemprot dengan larutan FeCl_3 sebagai reagen penampak noda. Munculnya warna abu-abu pada plat menunjukkan adanya senyawa

flavonoid dalam sampel positif flavonoid (Sari *et al*, 2023).

b. Uji Saponin

Identifikasi senyawa saponin, dilakukan menggunakan fase gerak berupa campuran air : methanol : klorofom dengan perbandingan (2 : 5 : 3). Setelah proses kromatografi selesai, plat disemprot dengan reagen vanillin dalam asam sulfat (H_2SO_4). Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru violet, yang menandakan keberadaan senyawa saponin dalam sampel (Sari *et al*, 2023).

c. Uji Alkaloid

Identifikasi senyawa alkaloid, dilakukan menggunakan fase gerak berupa campuran kloroform : metanol dengan perbandingan (7 : 3). Setelah pengembangan, plat disemprot dengan reagen Dragendorff. Keberadaan senyawa alkaloid ditandai dengan munculnya noda berwarna oranye hingga coklat, yang menunjukkan hasil positif terhadap senyawa alkaloid (Sari *et al*, 2023).

d. Uji Tanin

Identifikasi Senyawa tanin, dilakukan menggunakan fase gerak yang berupa campuran kloroform : etil asetat : metanol dengan perbandingan (5 : 3 : 3). Setelah proses kromatografi, plat disemprot dengan larutan $FeCl_3$. Adanya senyawa tanin ditunjukkan oleh terbentuknya warna biru kehitaman pada plat KLT (Sari *et al*, 2023).

$$RF = \frac{\text{jarak yang ditempuh solut}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

5. Parameter Non Spesifik

a. Susut Pengeringan

Penetapan kadar susut pengeringan serbuk dilakukan menggunakan alat moisture balance. Simplisia dihaluskan menggunakan blender kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 60. Proses pengeringan dilakukan pada suhu $105^{\circ}C$, dengan cara menimbang 2 gram serbuk pada lempeng yang sudah ditara sebelumnya. Serbuk kemudian diratakan diatas lempeng dan dikeringkan hingga alat memberikan sinyal berupa bunyi sebagai tanda

proses selesai (Putri *et al.*, 2023).

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{\text{Bobot awal} - \text{Bobot Akhir}}{\text{Bobot Awal}} \times 100\%$$

b. Uji Bebas Etanol

Ekstrak kental 1ml dimasukan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan masing-masing 2 tetes H_2SO_4 dan CH_3COOH kemudian dipanaskan apabila tercium bau khas eter, maka ekstrak mengandung etanol (Tivani *et al.*, 2021)

6. Pembuatan sediaan krim variasi konsentrasi gliserin 10%, 15%, 20%

Tabel 3. 1 Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh

Nama Bahan	Formulasi			Fungsi
	FI	FII	FIII	
Ekstrak Daun Belimbing Wuluh	7 gr	7 gr	7 gr	Zat aktif
Asam Stearat	16 gr	16 gr	16 gr	Basis
Setil Alkohol	2 gr	2 gr	2 gr	Emolient
Gliserin	10 gr	15 gr	20 gr	Humektan
TEA	7 tetes	7 tetes	7 tetes	Emulgator
Parafin Cair	10 gr	10 gr	10 gr	Bahan Tambahan
Metil Paraben	0,2 gr	0,2 gr	0,2 gr	Pengawet
Aquades	ad 100 gr	ad 100 gr	ad 100 gr	Pelarut

Setiap bahan ditimbang sesuai dengan perhitungan yang telah ditentukan. Basis krim yang dibuat terdiri dari dua fase, yaitu fase minyak (yang mencakup asam stearat, parafin cair, dan setil alkohol) dan fase air (yang terdiri dari trietanolamin, gliserin, metil paraben, dan aquades). Fase-fase tersebut, bersama dengan aquades qs, dipanaskan pada suhu 70°C di atas hot plate dan dibiarkan hingga semua bahan meleleh dengan sempurna (Ariem *et al.*, 2020).

Mortir dan stamplir dipanaskan dengan menambahkan etanol 96% ke dalamnya, kemudian dibakar hingga api padam. Setelah itu, mortir dan stamplir dikeringkan. Fase air dimasukkan ke dalam lumpang yang masih panas sambil diaduk, menambahkan fase minyak. Aquades ditambahkan sedikit demi sedikit sambil terus diaduk hingga terbentuk massa krim. Setelah massa krim terbentuk, ekstrak daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

ditambahkan secara bertahap dan diaduk hingga krim menjadi homogen. Ulangi proses tersebut sebanyak tiga kali sesuai formulasi (Ariem *et al.*, 2020).

7. Stabilitas Fisik

Pengujian stabilitas dipercepat dilakukan dengan metode *cycling test*. Sediaan krim disimpan pada suhu 4 °C menggunakan lemari pendingin selama 6 siklus, di mana setiap siklus berlangsung selama 24 jam. Kemudian itu, sampel dipindahkan ke suhu panas pada 40 °C dan disimpan dalam oven selama 6 siklus yang juga masing-masing berlangsung selama 24 jam. Setiap siklus diamati melalui uji organoleptik, uji homogenitas, uji pH, uji daya sebar, uji viskositas, uji daya lekat dan uji tipe krim. (Ariem *et al.*, 2020).

a. Uji Organoleptik

Pengujian dilakukan dengan mengamati warna, aroma, dan bentuk dari preparat sampel. Pengujian organoleptik merupakan salah satu uji penting dalam evaluasi mutu sediaan krim (Arziyah *et al.*, 2022).

b. Uji Homogenitas

Pengujian dilakukan dengan mengoleskan sampel pada kaca objek, lalu menutupnya dengan kaca penutup. Homogenitas sediaan ditunjukkan oleh tidak ditemukannya butiran kasar pada preparat. uji ini penting dilakukan dalam proses formulasi dan selama uji stabilitas sediaan, untuk memastikan mutu sampel (Ardhana *et al.*, 2024).

c. Uji Pengukuran pH

Uji pengukuran pH menggunakan pH stik universal yang direndam kedalam krim ekstrak etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa blimbi* L.) kemudian Setelah stik terendam sepenuhnya, perubahan warna pada stik pH dianalisis dan dibandingkan dengan standar warna pH universal. pH kulit sekitar 4,5 – 6,5 memenuhi standar kulit (Kindangen *et al.*, 2022).

d. Uji Daya Sebar

Uji daya sebar krim dilakukan dengan menimbang 0,5 gram krim dan meletakkannya di tengah kaca bulat berskala, kemudian ditutup dengan kaca bulat lainnya. Diameter sebar krim diukur secara melintang dan

membujur, disertai penambahan beban bertahap hingga mencapai total berat 150 gram, dimulai dari 50 gram. pengujian ini berperan penting dalam memastikan bahwa formulasi krim tidak hanya stabil secara fisik, tetapi juga optimal secara fungsional saat diaplikasikan pada kulit. (Setyaningsih *et al.*, 2022).

e. Uji Viskositas

Pengujian viskositas dilakukan dengan cara memasukan sediaan krim ke dalam viskometer, kemudian viskositasnya diukur menggunakan rotor dengan kecepatan 30 rpm. Pengujian viskositas merupakan salah satu uji penting untuk menilai kestabilan fisik dan kenyamanan penggunaan suatu sediaan krim (Murdiana *et al.*, 2022).

f. Uji Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan meletakkan 0,5 gram krim pada permukaan kaca objek, kemudian ditutup menggunakan kaca objek lainnya dan diberikan beban seberat 1 kg selama 3 menit. Waktu yang diperlukan hingga kedua kaca objek terpisah digunakan sebagai indikator daya lekat sediaan (Murdiana *et al.*, 2022).

g. Uji Tipe Krim

Pengujian tipe krim dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 gram sediaan dan penempatan di atas kaca arloji. Kemudian, satu tetes metilen biru ditambahkan dan diaduk menggunakan batang pengaduk. Jika metilen biru tersebar merata, maka jenis krim yang dihasilkan adalah minyak dalam air (M/A). Sebaliknya, jika muncul bintik-bintik biru, maka krim yang dihasilkan merupakan jenis air dalam minyak (A/M) (Witanti & Endriyatno, 2024).

G. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan dua metode analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisa data hasil pengujian sediaan krim menggunakan program IBM SPSS Statistic ver. 25. Data hasil uji SPSS yang dianalisis menggunakan uji *One way anova* dengan syarat data terdistribusi normal dan homogen dengan nilai

signifikansi ≥ 0.05 . Jika data tidak normal dan homogen ≤ 0.05 , analisis dilakukan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann Whitne*.

1. Analisis Data Kualitatif

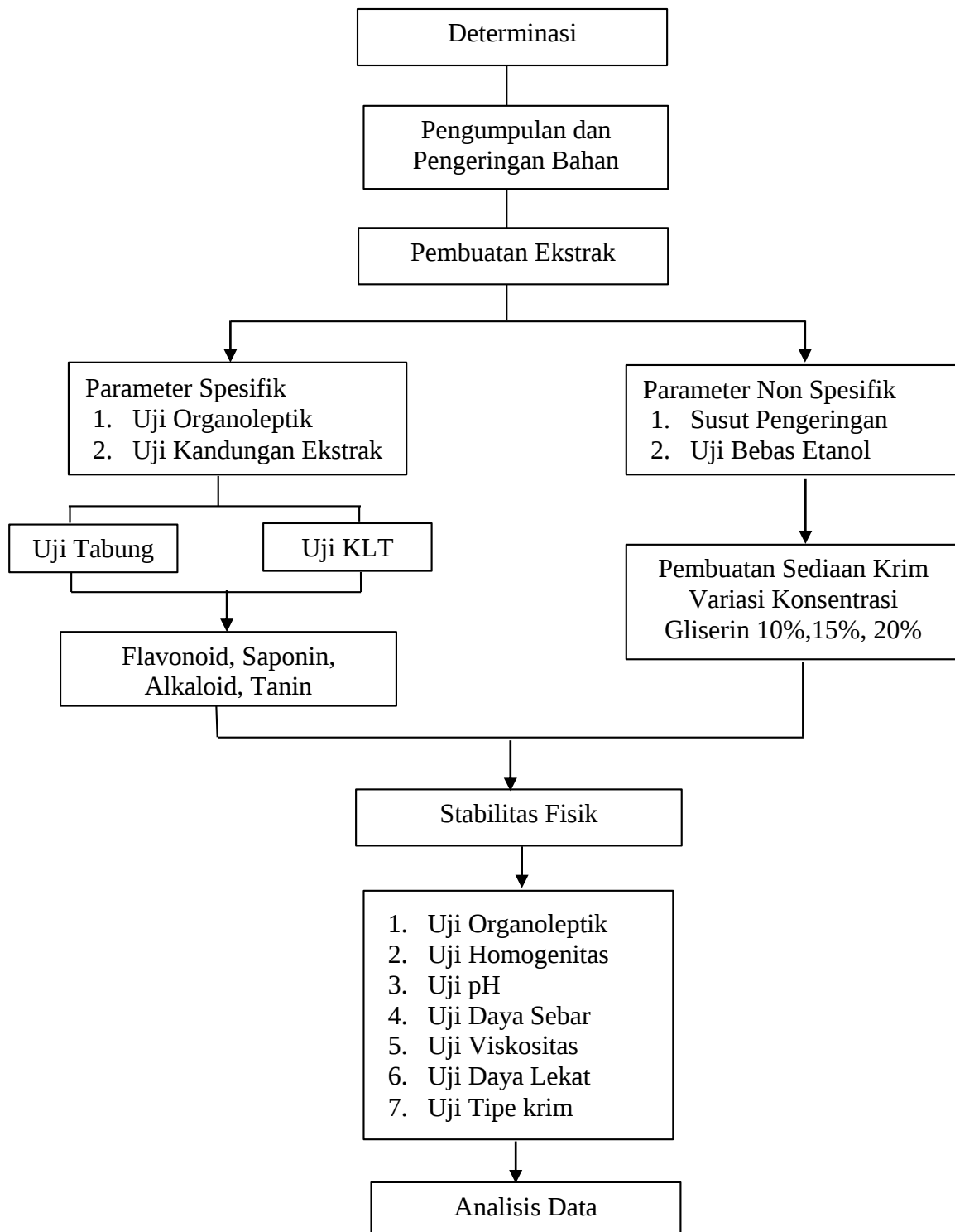
Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk analisis kualitatif senyawa aktif seperti flavonoid, Saponin, alkaloid, dan Tanin dalam ekstrak daun Belimbing Wuluh (*Averhoa blimbi* L.). Hasil dari Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dianalisis secara deskriptif berdasarkan kemiripan nilai R_f dengan standar. Untuk memperjelas hasil, plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) diamati di bawah sinar ultraviolet (UV) pada dua panjang gelombang, yaitu 254 nm dan 366 nm.

Stabilitas fisik uji organoleptik, homogenitas, dan tipe krim dianalisis secara deskriptif berdasarkan pengamatan visual, tanpa menggunakan uji statistik, untuk menilai konsistensi warna, rasa, aroma dan tekstur yang terbentuk pada setiap formula selama periode uji stabilitas.

2. Analisis Data Kuantitatif

Stabilitas fisik meliputi uji pH, daya sebar, daya lekat dan viskositas dianalisis pada tiap siklus (siklus 0 sampai 6) terhadap 3 formula dengan konsentrasi gliserin 10%, 15% dan 20%, data diuji normalitas, homogenitas dan menggunakan *One way anova* untuk mengetahui beda nyata antar formula dan perubahan selama penyimpanan.

H. Kerangka Penelitian



Gambar 3. 1 Kerangka Penelitian