

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Pengambilan dan Determinasi Simplisia

Tahapan penyiapan daun teh putih meliputi pengumpulan bahan yakni bagian daun teh putih yang sudah jadi, diperoleh dari Pusat Penelitian Teh dan Kina di Gambung, Jawa Barat. Determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) Institut Teknologi Bandung, Bandung.

4.2. Penetapan Parameter Standar

4.2.1. Penetapan kadar air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara destilasi azeotrop. Tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan seksama, kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan. Toluene sebanyak 200 mL dikocok dengan sedikit aquadest, biarkan memisah, buang aquadest. Masukkan toluene yang telah dijenuhkan, kemudian masukkan sejumlah simplisia 25 gram yang diperkirakan mengandung air 2-3 mL ke dalam labu bundar. Lalu dididihkan perlahan-lahan selama kurang lebih 15 menit (tambahkan serpihan batu didih). Setelah toluene mulai mendidih, larutan disuling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik hingga sebagian air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan ditingkatkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluene,

sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan lebih dibasahi dengan toluen. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima pendingin dibiarkan hingga mencapai suhu kamar. Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin dibiarkan hingga mencapai suhu kamar. Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin tabung penerima digosok dengan karet yang dikaitkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen hingga tetes air turun. Biarkan air dan toluene dalam tabung penerima memisah. Baca volume air dalam tabung penerima. Hitung kadar air dalam % dengan rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{volume air (ml)} \times \text{Bj air (g/ml)}}{25 \text{ gram simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

(Departemen Kesehatan RI, 2000: 14)

4.2.2. Penetapan kadar abu

a. Penetapan kadar abu total

Lebih kurang 2-4 gram simplisia halus atau ekstrak kental, masing-masing ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam krus plarina atau krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, diratakan. Krus berisi simplisia dipijarkan perlahan-lahan pada suhu 500-600°C hingga arang berwarna putih, yang menunjukkan tidak adanya karbon. Dinginkan dalam desikator lalu timbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, dinginkan krus, uapkan residu dengan 2 ml air atau larutan jenuh amonium nitrat R. Keringkan diatas penangas air dipijarkan hingga bobotnya tetap. Residu didiamkan dingin dalam desikator selama 30 menit, lalu ditimbang segera. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

$$\text{Kadar abu total (\%)} = \frac{W_{\text{akhir}} - W_{\text{cawan}}}{W_{\text{sampel}}} \times 100\% \quad (2)$$

(Departemen Kesehatan RI, 2000:17).

b. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, tambahkan dengan 25 ml asam klorida encer, tutup dengan kaca arloji, didihkan selama 5 menit. Bilas kaca arloji dengan 5 ml air panas dan masukkan ke dalam krus. Dikumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan hingga bobot tetap, ditimbang, dihitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. Residu didiamkan dingin dalam desikator selama 30 menit, lalu ditimbang dengan segera. Dihitung kadar abu tidak larut asam terhadap bahan yang telah dikeringkan.

Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara, kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam (g)}}{\text{berat bahan awal (g)}} \times 100\% \quad (3)$$

(WHO,1998:28)

c. Penetapan kadar abu larut air

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, didihkan dengan 25 ml air selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut, saring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas dan pijarkan selama 15 menit pada suhu tidak lebih dari 450°C, hingga bobot tetap, timbang. Perbedaan bobot sesuai dengan jumlah abu yang larut dalam air. Hitung kadar abu yang larut

dalam air terhadap bahan yang dikeringkan di udara (Departemen Kesehatan RI, 1978).

$$\text{Kadar abu larut air} = \frac{\text{berat abu total (g)} - \text{berat abu tidak larut air (g)}}{\text{berat bahan awal (g)}} \times 100\% \quad (4)$$

(Departemen Kesehatan RI, 1978)

4.2.3. Penetapan kadar sari

a. Penetapan kadar sari larut air

Sejumlah 5 gram bahan yang telah dikeringkan, dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air-kloroform P (1000 ml : 2,5 ml), menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat disaring, sebanyak 20 ml filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam air dinyatakan dalam persen(%), dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. Kadar sari larut dalam air dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{berat sari larut air (gram)}}{\text{berat bahan awal (gram)}} \times 100\%$$

(5)

(Departemen Kesehatan RI, 2000:31)

b. Penetapan kadar sari larut dalam etanol

Sejumlah 5 gram bahan yang telah dikeringkan, dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat disaring, sebanyak 20 ml filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari

larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. Kadar sari larut etanol dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{berat sari larut etanol (gram)}}{\text{berat bahan awal (gram)}} \times 100\% \quad (6)$$

(Departemen Kesehatan RI, 2000:31)

4.3. Ekstraksi Simplisia

Ekstrak yang akan dibuat adalah ekstrak etanol dari daun teh putih. Pembuatan ekstrak etanol daun teh putih dilakukan dengan menggunakan metode reflux menggunakan pelarut pengestrak etanol 96%. Daun teh putih diekstraksi dalam suhu ruangan, kemudian ekstrak disaring dengan kertas saring. Filtrat dipekatkan dengan menggunakan rotary vacuum evaporator untuk memperoleh ekstrak kental daun teh putih.

4.4. Penapisan Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Daun Teh Putih

4.4.1. Alkaloid

Simplisia atau ekstrak ditempatkan dalam mortir dan ditambahkan amoniak 25% yang kemudian digerus dan ditambahkan 20 mL CHCl_3 , gerus dengan kuat. Selanjutnya disaring dan diambil filtratnya (larutan 1). Larutan 1 tersebut ditambahkan dengan HCl 10% v/v hingga terbentuk dua fasa, kemudian pisahkan fasa air (larutan 2). Larutan 1 diteteskan pada kertas saring, semprotkan pereaksi Dragendorff. Apabila terbentuk warna merah/jingga maka positif alkaloid (Fransworth, 1966:253).

4.4.2. Flavonoid

Simplisia atau ekstrak sebanyak 1 gram ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan 100 mL air panas kemudian dididihkan selama 10 menit, campuran tersebut disaring, (Larutan A). Larutan A ini akan digunakan untuk pemeriksaan golongan senyawa flavonoid, saponin dan kuinon). Sebanyak 5 mL larutan A dicampur dengan serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat dan 8 tetes amilalkohol, kocok dengan kuat. Biarkan sampai terjadi pemisahan dan timbulnya warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menandakan positif flavonoid (Fransworth, 1966:263).

4.4.3. Tanin

Simplisia atau ekstrak sebanyak 1 gram ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan 100 mL air dan dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit kemudian didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama ditambahkan larutan gelatin 1% dan adanya endapan putih menandakan positif tanin dan bagian keduanya ditambahkan FeCl_3 1%, apabila terbentuk warna biru tua/ hitam kehijauan menunjukkan adanya tannin (Fransworth, 1966:264).

4.4.4. Polifenol

Simplisia atau ekstrak sebanyak 1 gram ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan di atas penangas air, kemudian di saring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida. Apabila timbul warna hijau atau biru- hijau, merah

ungu, biru hitam sampai hitam, maka menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Fransworth, 1996:255).

4.4.5. Saponin

Simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan air secukupnya, kemudian dipanaskan di penangas air selama 30 menit dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dibiarkan sampai dingin, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik dengan arah vertikal dan terjadinya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang bertahan selama 10 menit menandakan positif saponin dan busa tersebut masih bertahan setelah penambahan beberapa tetes HCl (Fransworth, 1966:258).

4.4.6. Kuinon

Simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya, dipanaskan di atas penangas air kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 20 mL larutan natrium hidroksida 1 N dan apabila timbul warna kuning sampai merah menandakan positif kuinon (Fransworth, 1966:265-266).

4.4.7. Triterpenoid dan steroid

Simplisia atau ekstrak digerus dengan eter kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi Liebermann-Burchard dan apabila timbul warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau-biru menandakan positif steroid (Fransworth, 1966:259).

4.4.8. Monoterpenoid dan seskuiterpenoid

Simplisia atau ekstrak digerus dengan eter kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi Liebermann-Burchard dan apabila timbul warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau-biru menandakan positif steroid (Fransworth, 1966:259).

4.5. Formulasi Sediaan Krim Tabir Surya Ekstrak Etanol Teh Putih

Sediaan krim dibuat dengan cara memanaskan masing-masing fase air dan fase minyak di atas penangas air hingga suhu 60-70°C. Fase air yaitu EDTA, metil paraben, propil paraben, triethanolamine (TEA), aquadestilata. Fase minyak yaitu asam stearat, setil alkohol, setosteril alcohol dan PEG 1000. Kemudian fasa minyak dicampur dengan fasa air dan dihomegenisasi dengan menggunakan *Ultraturrax* dengan kecepatan 12000 rpm sampai terbentuk emulsi yang kompak selama (\pm) 25 menit. *Gelling agent* dikembangkan terlebih dahulu, kemudian digabungkan dengan emulsi yang sudah membentuk. Setelah itu, sediaan dikemas dalam wadah dan disimpan pada temperatur 37°C.

Formulasi yang digunakan untuk membuat sediaan krim tabir surya ekstrak daun teh putih dapat dilihat pada **Tabel IV.1**.

Tabel IV.1 Orientasi basis sediaan krim tabir surya ekstrak etanol teh putih

Formula Krim Tabir Surya	Formula (%)			
	F1	F1A	F2	F2A
Ekstrak etanol daun teh putih	x	x	x	x
EDTA	0,02	0,02	0,02	0,02
Metil paraben	0,3	0,3	0,3	0,3
Propil paraben	0,06	0,06	0,06	0,06
Trietanolamin	0,5	0,5	0,5	0,5
Gliserin	5	5	5	5
Carbopol	-	0,5	-	0,5
Asam stearat	2	2	2	2
PEG-1000	-	-	2	2
Setosteril alkohol	5	5	5	5
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

4.6. Evaluasi Sediaan Krim

4.6.1. Organoleptis

Pengamatan organoleptis yang dilakukan terhadap krim dengan mengamati perubahan bentuk, warna, dan bau pada sediaan yang baru dibuat dan setelah disimpan selama 0, 7, 14, 21, dan 28 hari pada sediaan yang disimpan pada suhu kamar dan suhu 40°C.

4.6.2. Homogenitas

Evaluasi homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan tipis-tipis sediaan krim yang dibuat pada kaca objek kemudian diamati homogenitas sediaanannya.

4.6.3. Penentuan viskositas

Penentuan viskositas sediaan krim dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield RV dengan spindle yang sesuai. Pengukuran dilakukan

pada sediaan yang baru dibuat dan yang telah disimpan selama 7, 14, 21, dan 28 hari pada suhu 40°C.

4.6.4. Pengukuran pH sediaan

Pengukuran pH sediaan krim dilakukan dengan menggunakan pH meter digital, dengan cara terlebih dahulu diencerkan dengan air suling dengan perbandingan 1 : 10. Elektroda pada pH meter digital dicelupkan ke dalam larutan, kemudian ditunggu sampai menunjukkan angka yang stabil. Pengukuran pH sediaan krim dilakukan pada hari ke-0, 7, 14, 28.

4.6.5. Penentuan tipe emulsi

Dengan menggunakan uji pengenceran, uji ini dilakukan dengan mengencerkan emulsi air, jika emulsi tercampur baik dengan air, tanpa memperlihatkan ketidakcampuran maka tipe emulsi adalah M/A. Hal ini dapat dilakukan dengan mikroskop untuk memberikan visualisasi baik. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa krim memiliki tipe M/A karena larut dalam air.

4.6.6. Stabilitas dipercepat

Stabilitas sediaan diuji dengan menyimpan sediaan pada 40°C selama 28 hari, yang diuji pada hari ke-0, 7, 14, 28. Aspek yang diuji meliputi pengujian fisik dan kimia seperti evaluasi organoleptik, pH, viskositas dan homogenitas.

4.6.7. Uji *freeze-thaw*

Sediaan dimasukkan ke dalam vial kemudian dilakukan pada 2 kondisi yang berbeda yaitu pada 4°C selama 24 jam, lalu dipindahkan ke dalam oven dengan suhu 40°C selama 24 jam (1 siklus). Sediaan dikatakan stabil jika selama 6-8 siklus tidak terdapat tanda-tanda pemisahan.

4.6.8. Sentrifugasi

Dilakukan uji kestabilan sediaan melalui pengamatan pemisahan beberapa fase dengan dilakukannya sentrifugasi selama 5 jam dengan kecepatan 3750 rpm.

4.7. Penentuan Nilai Faktor Pelindung Surya (FPS) Ekstrak Daun Teh Putih (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)

Pengujian dilakukan secara *in vitro* menggunakan analisis spektrofotometri (Spektrofotometri UV-Vis/ Shimadzu type UV mini-1240, Jepang). Sebanyak 25 mg sampel ditimbang, kemudian dipindahkan ke labu ukur 25 mL dan diencerkan dengan volume etanol (1000 ppm). Kemudian, larutan diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi sampel 100 ppm. Absorbansi sampel dalam larutan diukur dalam rentang panjang gelombang 290-320 nm dengan setiap interval waktu 5 nm. Setiap pengukuran dilakukan tiga kali pengulangan (*triplo*). Dilakukan juga penentuan aktivitas tabir surya metil sinamat dengan menggunakan prosedur yang sama. Nilai FPS ditentukan dengan persamaan Mansur:

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

(Mansur,1986)

Dimana:

- CF = Faktor Koreksi (=10)
- EF = Spektrum Efek Erythema
- I = Spektrum Intensitas dari Matahari
- Abs = Absorban dari sampel

Tabel IV.2 Normalisasi produk yang digunakan dalam perhitungan FPS
(Sayre, *et al.*, 1979)

Panjang Gelombang (λ nm)	EE \times I (dinormalisasi)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1