

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium. Ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) dibuat dalam formulasi sediaan bedak padat dalam variasi konsentrasi yang berbeda yang akan diuji aktivitasnya sebagai tabir surya dengan menentukan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dan uji respon iritatif menggunakan hewan uji pada kelinci albino. Formulasi bedak padat diuji sifat fisiknya yaitu organoleptis, homogenitas, daya lekat, kerapuhan, pH, kelembaban dan stabilitas dipercepat.

B. Lokasi Penelitian

1. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
2. Pembuatan formulasi sediaan bedak padat ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji sediaan sifat fisik formulasi sediaan bedak padat ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Uji aktivitas tabir surya penentuan nilai SPF ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) dengan metode spektrofotometri dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

5. Uji respon iritatif ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) untuk mengetahui efek samping yang terjadi pada kulit hewan uji dilakukan di Laboratorium Biologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) dengan menggunakan variasi konsentrasi 3%, 5%, 7%, 15% dan 25% ekstrak dalam sediaan bedak padat. Pembuatan konsentrasi ekstrak yang bervariasi berdasarkan pertimbangan rentang untuk nilai SPF (*Sun Protection Factor*) dan karakteristik fisik sediaan bedak padat yang baik.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan faktor yang dapat mempengaruhi hasil penyebab utama perbedaan, variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) dalam formulasi pembuatan sediaan bedak padat tabir surya.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel bebas yang diukur atau diatur untuk menentukan ada atau tidaknya pengaruh, variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai *Sun Protection Factor* (SPF), respon iritatif dan sifat fisik meliputi organoleptis, pH, homogenitas, daya lekat, kerapuhan, stabilitas dipercepat serta uji kelembaban.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali merupakan faktor yang dapat mempengaruhi hasil penelitian, yaitu bahan, suhu, dan kondisi laboratorium.

E. Prosedur Kerja

1. Pengumpulan Bahan

a. Tanaman

Buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Kopeng, Salatiga. Karakteristik untuk pemilihan buah yang dipilih yaitu kulit yang berwarna kuning kecoklatan, daging buah berwarna orange, daging bertekstur keras, bentuk biji pipih dan sedikit berair.

b. Hewan Uji

Hewan uji kelinci albino (*Oryctolagus cuniculus*) yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 3 ekor, berat badan \pm 2 kilogram, serta memiliki kulit yang sehat sesuai dengan Peraturan BPOM RI tahun 2014 tentang Pedoman Uji Iritasi Dermal.

2. Penyiapan Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah magnetic stirrer, timbangan analitik, soklet, klem, spektrofotometer UV-Vis, pH meter, sinar UV 254 dan 366 nm, labu pencukur bulu, climatic chamber, vakum rotary evaporator, pipet tetes, pengayak, cawan, mortar, stamper, sudip, spatel,

godet bedak, plat KLT, pipa kapiler, kasa steril Onemed dan plester non iritan, gunting, spidol dan penggaris.

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.), titanium dioksida, kaolin, isopropol miristat, lanolin, nipagin, parfum, talcum, etanol p.a 96% (Merck®), etanol teknis 96%, butanol, asam asetat glacial, aquadest dan hewan uji kelinci albino.

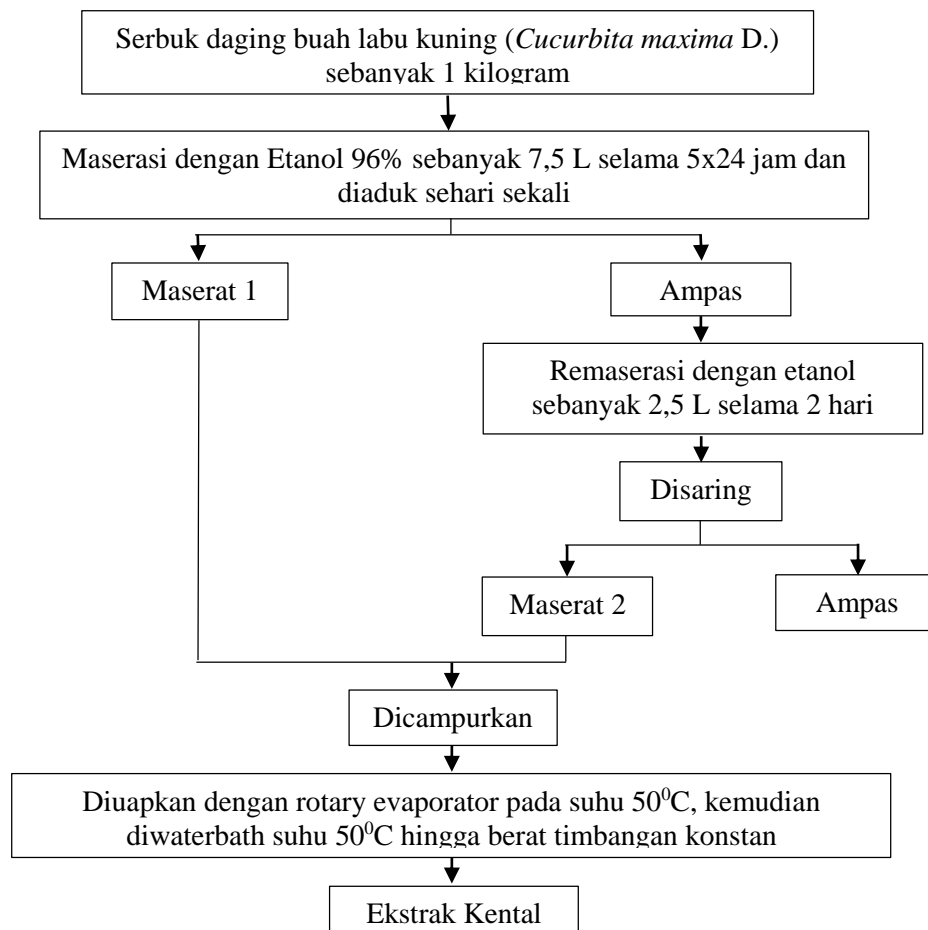
3. Pembuatan ekstrak daging buah labu kuning (*Curcuma maxima* D.)

Ekstrak daging buah labu kuning diolah menggunakan metode ekstraksi maserasi. Buah labu kuning (*Curcuma maxima* D.) diiris tipis-tipis terlebih dahulu setelah itu dikeringkan dibawah sinar matahari dan dioven pada suhu 50⁰C, setelah kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan nomor B40 hingga diperoleh simplisia dengan derajat kehalusan yang sesuai.

Serbuk simplisia sebanyak 1 kg yang telah halus dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10, yaitu 1 kg simplisia: 10 L etanol 96%. Pelarut pertama 7,5 L sisanya 2,5 L untuk remaserasi. Ekstraksi maserasi dilakukan selama 5x24 jam dengan pengadukan tiap 24 jam sekali didalam ruangan yang terlindung dari sinar matahari hingga seluruh serbuk terbasahi merata. Ekstrak dari maserat pertama disaring dengan kain flannel. Penyaringan maserat pertama selesai setelah itu dilakukan remaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 2,5 L, kemudian

maserat dipindah ke wadah tertutup dibiarkan ditempat sejuk dan terlindung dari sinar matahari selama 2 hari dengan dilakukan pengadukan 24 jam sekali. Maserat pertama dan kedua dikumpulkan menjadi satu wadah, selanjutnya diuapkan menggunakan di rotary evaporator suhu 50⁰C dan dipekatkan dengan *waterbath* suhu 50⁰C hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus :

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Bobot Total Ekstrak}}{\text{Bobot Total Serbuk}} \times 100\%$$



Gambar 3.1 Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daging Buah Labu Kuning (*Cucurbita maxima* D.)

4. Uji Bebas Etanol

Pengujian bebas etanol dilakukan dengan memasukkan sampel kedalam tabung reaksi, tambahkan asam asetat dan asam sulfat kemudian dipanaskan diatas api bunsen. Ekstrak akan dikatakan bebas etanol jika tidak terdapat bau ester yang merupakan khas dari etanol (Indriyanti *et al.*, 2018).

5. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan agar mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning.

a. Uji Flavonoid

Uji Flavonoid dengan fase diam Silica gel GF 254 atau plat KLT diaktifkan dengan oven pada suhu 105°C selama 10 menit sebelum dilakukan penotolan sampel. Fase gerak n-butanol - asam asetat glacial - air (4:5:1), kemudian disemprot penampak noda uap ammonia. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya noda berwarna kuning cokelat setelah diuap noda ammonia dengan pengamatan sinar tampak dan warna biru di UV 366 nm dan 264 nm serta nilai RF 0,54 – 0,92 untuk menegaskan adanya kandungan flavonoid (Sunnah *et al.*, 2020).

b. Uji Terpenoid

Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini adalah kloroform-metanol (9:1) dengan penampak noda Liberman-Buchard disertai pemanasan disuhu 105°C selama 5 menit. Reaksi positif akan ditunjukkan dengan adanya noda berwarna hijau-biru pada sinar tampak 254 nm serta nilai RF 0,39-0,96 (Yuda *et al.*, 2017).

6. Pembuatan Formulasi Bedak Padat

a. Pembuatan Formulasi Sediaan Bedak Padat Ekstrak Etanol 96% Labu Kuning

Penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% buah daging labu kuning (*Cucurbita maxima D.*)

Tabel 3.1 Formulasi Bedak Padat Ekstrak Etanol 96% Daging Buah Labu Kuning

Komposisi	Jumlah Bahan (Gram)					
	Kontrol Negatif	Formula I	Formula II	Formula III	Formula IV	Formula V
Titanium Dioksida	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Kaolin	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Isopropil miristat	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Lanolin	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Nipagin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ekstrak Daging Buah Labu Kuning	0	1,5	2,5	3,5	7,5	12,5
Ol rosae	2 tts	2 tts	2 tts	2 tts	2 tts	2 tts
Talkum	Ad 50	Ad 50	Ad 50	Ad 50	Ad 50	Ad 50

b. Cara Kerja

Sediaan talkum sebelumnya disterilkan pada suhu 150°C selama 1 jam, kemudian ditambahkan ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning dengan talkum yang telah disterilkan dan diayak dengan menggunakan pengayak B100 (campuran 1). Isopropil miristat dan lanolin dicairkan bersama terlebih dahulu (campuran 2), sedangkan kaolin, nipagin dan talkum digerus halus secara bersamaan (campuran 3). Setelah itu campuran no 2 dan 3 dicampurkan terlebih dahulu setelah itu ditambahkan

ol rosae, setelah itu dicampurkan dengan no 1 kemudian dimasukan ke dalam cetakan.

7. Evaluasi Sediaan Bedak Padat

a. Uji Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan melakukan pengamatan secara fisik menggunakan panca indera dalam mendeskripsikan warna, tekstur serta bau dari sediaan bedak padat. Parameter organoleptis dalam sediaan bedak padat antara lain, tidak memiliki bau yang menyengat dan penggunaan pengharum dalam pembuatan bedak tidak boleh terlalu banyak atau secukupnya, memiliki warna yang indah menciptakan daya tarik dan dapat menyamarkan bintik atau noda, serta tekstur sangat padat halus (Yulianti *et al.*, 2018).

b. Uji pH

Sebanyak 1 gram bedak padat dicampurkan dengan 100 mL air, setelah itu ukur menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi. Sediaan bedak padat diuji pH untuk mengetahui sediaan masih dalam rentan pH normal kulit, yaitu 4,6 – 7 (Yulianti *et al.*, 2018).

c. Uji Homogenitas

Sediaan bedak padat dioleskan tipis dan merata diatas kaca objek kemudian diamati diarah cahaya, pada sediaan bedak padat tidak boleh terlihat ada butiran kasar. Jika warna bedak pada dasar menyebar secara merata dan tidak ada terlihat butiran yang kasar, maka bedak dikatakan homogen (Yulianti *et al.*, 2018).

d. Uji Daya Lekat

Uji daya lekat bedak padat dilakukan dengan cara diaplikasikan pada punggung tangan. Penilaian daya lekat menggunakan skala penilaian 1 hingga 4, yaitu skor 1 yaitu tidak menempel, skor 2 yaitu cukup lekat dan mudah menempel, skor 3 yaitu lekat dan mudah menempel, skor 4 yaitu sangat lekat dan mudah menempel (Yulianti *et al.*, 2018).

e. Uji Kerapuhan

Uji kerapuhan bedak padat bertujuan untuk mengevaluasi kepadatan sediaan akhir sesuai persyaratan sediaan *compact powder*. Uji kerapuhan dilakukan dengan cara mengamati kerapuhan sediaan yang akan dijatuhkan dari ketinggian 20-25 cm pada permukaan rata. Syarat uji kerapuhan yang baik adalah sediaan tidak boleh pecah atau retak (Yulianti *et al.*, 2018).

f. Uji Stabilitas Dipercepat

Uji Stabilitas Dipercepat dengan metode *freeze-thaw cycling*. Sediaan bedak padat duji stabilitas dipercepat dilakukan dengan meletakkan sediaan bedak pada 2 kondisi penyimpanan suhu yang berbeda yaitu penyimpanan suhu 4°C selama 24 jam selanjutnya bedak disimpan pada suhu 40°C selama 24 jam dengan perlakuan 3 siklus dengan menggunakan alat *Climatic Chamber*. Diamati perubahan fisik meliputi organoleptis, homogenitas, pH dan kelembaban yang terjadi (Alta *et al.*, 2019).

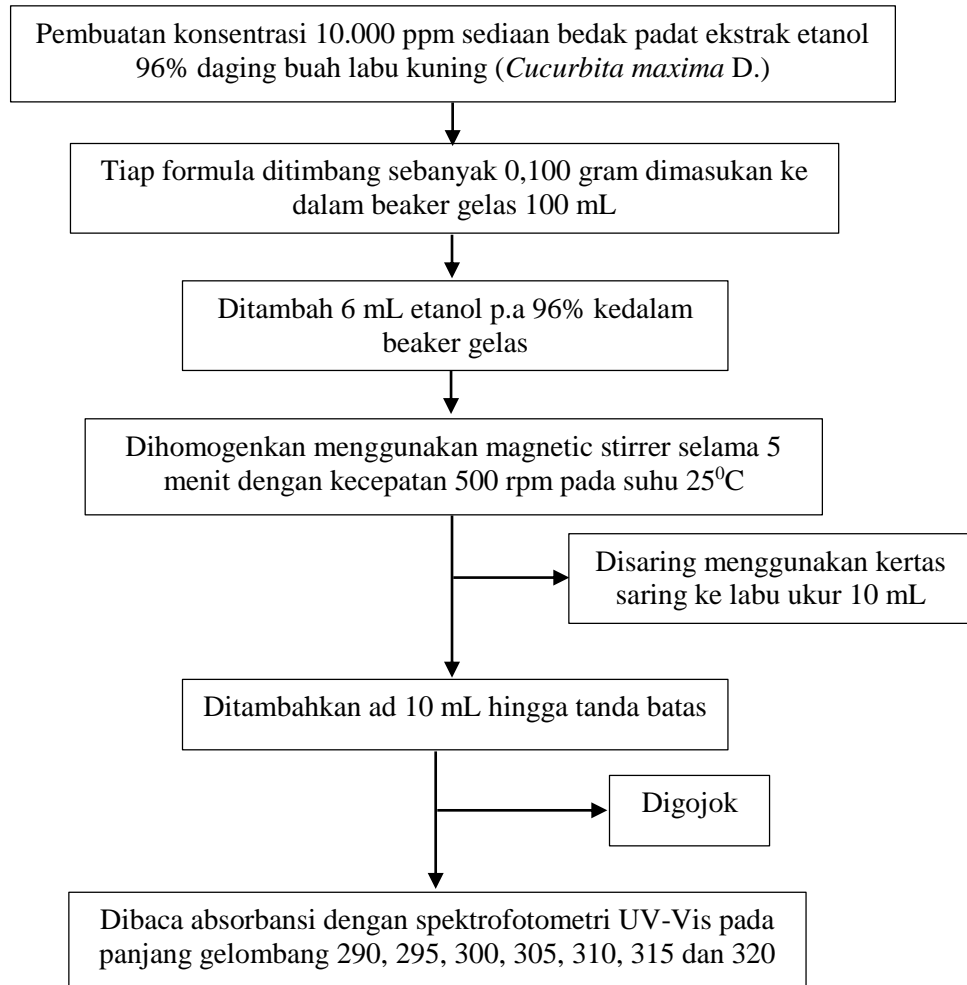
g. Uji Kelembaban

Sediaan bedak padat ditimbang sebanyak 3 gram secara akurat dan dimasukkan ke dalam alat *Moisture Balance* sampai berat konstan hingga diperoleh nilai kelembaban bedak padat dengan persentase <10% yang memenuhi persyaratan kelembaban bedak padat yang baik (Hamidah & Priatni, 2019).

8. Uji Aktivitas Tabir Surya / SPF (*Sun Protection Factor*)

Nilai SPF dihitung menggunakan persamaan Mansur, spektrum serapan sampel diperoleh menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 290-320 nm dengan menggunakan etanol p.a 96% sebagai blanko. Nilai serapan yang diperoleh dikalikan EExI untuk masing-masing interval.

Sebanyak 0,1 gram sampel bedak padat dilarutkan dengan etanol p.a 96% kurang lebih 6 mL kemudian dihomogenkan menggunakan pengaduk magnetic stirer selama 5 menit dengan kecepatan 500 rpm pada suhu 25°C. Kemudian disaring menggunakan kertas saring, dimasukkan ke dalam gelas beaker 10 mL, tambahkan etanol p.a 96% ad 10 mL. Absorbansi akan diukur pada gelombang 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 3.2 Skema Kerja Uji nilai SPF (*Cucurbita maxima D.*)

9. Uji Iritasi

a. Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji kelinci albino disesuaikan terlebih dahulu diruang percobaan selama 5 hari dan ditempatkan pada kandang individual (1 kandang perekor). Sebelum dilakukan pengujian selama 24 jam, bulu hewan dicukur didaerah punggung dengan luas lebih kurang 10x15cm untuk tempat pemaparan sediaan uji. Pencukuran dari area tulang bahu

sampai tulang pangkal pinggang dan setengah sampai kebawah badan pada tiap sisi (BPOM, 2014).

b. Cara pemberian sediaan uji

Sediaan bedak padat dioleskan di area kulit seluas 2 x 3 cm dilokasi pemaparan, kemudian lokasi pemaparan ditutup kasa dan diplester dengan plester yang bersifat non-iritan. Plester harus dibuat longgar menggunakan balutan semi-oklusif yang sesuai selama periode paparan. Bila sediaan uji/bahan uji diaplikasikan ke plester, plester harus menempel pada kulit sedemikian rupa hingga ada kontak yang baik dan distribusi bahan uji yang seragam dikulit. Harus dicegah hewan dapat menghirup ataupun menelan bahan uji pada plester.

Tahap uji iritasi akut dermal terbagi jadi 6 kelompok yaitu kontrol negatif berupa bedak padat yang tidak mengandung ekstrak daging buah labu kuning, kontrol positif berupa bedak padat yang berisi ekstrak daging buah labu kuning, dan kontrol normal sebagai pembanding yang merupakan hewan uji yang tidak diberi perlakuan apapun serta 3 formula dengan masing-masing formula berisi ekstrak daging buah labu kuning dengan konsentrasi 3%, 5%, 7%, 15% dan 25% masing-masing pada area seluas ± 3 cm.

c. Dosis Uji

Dosis sediaan uji cair sebanyak 0,5 mL dan untuk sediaan uji padat atau semi padat adalah sebanyak 0,5 g (BPOM, 2014).

$$\text{Indeks iritasi primer} = \frac{A-B}{C}$$

(BPOM, 2014).

Keterangan :

A = Jumlah skor eritema dan edema seluruh titik pengamatan sampel pada 24, 48 dan 72 jam

B = Jumlah skor eritema dan edema seluruh titik pengamatan kontrol pada 24, 48 dan 72 jam

C = Jumlah hewan

F. Pengolahan Data

1. Uji aktivitas tabir surya untuk menentukan nilai SPF menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 290-320 nm dengan etanol p.a 96% sebagai blanko, nilai serapan yang diperoleh dikalikan $E \times I$ untuk masing-masing interval.

Perhitungan nilai konsentrasi SPF formulasi bedak padat ekstrak daging buah labu kuning menggunakan rumus berikut :

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

Keterangan : EE = Spektrum efek erithemal
I = intensitas spektrum sinar
A = Serapan produk tabir surya
CF = Correction factor

2. Hasil data uji sifat fisik secara kuantitatif meliputi uji pH, kelembaban, daya lekat dianalisis menggunakan uji *One Way Anava* dengan program SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) versi 32.
3. Uji respon iritatif secara kualitatif dengan melakukan pengamatan selama 24, 48 dan 72 jam untuk melihat respon iritatif pada hewan uji kemudian dihitung skor indeks iritasi primer, setelah itu hasil skor dianalisis menggunakan uji

One Way Anava dengan program SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) versi 32.

G. Analisis Data

Pengujian statistika menggunakan data hasil semua nilai SPF, uji sifat fisik dan hasil skor data uji respon iritatif diuji menggunakan uji anova 1 jalan dengan program SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) versi 32. Analisis diawali dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Lavene Test* selanjutnya dilakukan Uji Tukey. Uji normalitas dan uji homogenitas nilai signifikansi $> 0,05$. Uji normalitas digunakan untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak, sedangkan uji homogenitas digunakan untuk mengetahui ragam antar perlakuan homogen atau tidak. Uji Tukey digunakan untuk membandingkan seluruh pasangan rata-rata perlakuan setelah uji analisis ragam dilakukan. Data yang diperoleh apabila tidak normal dan tidak homogen dianalisis secara non statistika non parametrik *kruskal-wall*

