

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental laboratorium. Ekstrak labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) dibuat dalam bentuk sediaan formulasi bedak padat variasi konsentrasi basis, F1 (3%), F2 (5%), F3 (7%), F4 (15%), F5 (25%) dilakukan pengujian aktivitas tabir surya secara in vitro dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis, uji sifat fisik sediaan bedak dan uji respon iritasi secara in vivo pada kelinci.

B. Lokasi Penelitian

1. Pembuatan ekstraksi dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
2. Formulasi sediaan bedak padat ekstrak etanol 70% labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji aktivitas tabir surya penentuan kadar ekstrak etanol 70% labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) dengan metode spektrofotometri dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

4. Uji respon iritatif ekstrak etanol 70% 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.
5. Uji sifat fisik sediaan formulasi sediaan bedak padat ekstrak etanol 70% labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) dengan menggunakan variasi konsentrasi basis, 3%, 5%, 7%, 15%, dan 25% ekstrak dalam sediaan bedak padat.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah faktor yang mempengaruhi hasil atau penyebab utama perbedaan, variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak etanol 70% labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) dalam formulasi pembuatan sediaan bedak padat tabir surya.

2. Variabel Terikat

Variable terikat adalah variabel terikat yang dapat diukur atau diatur untuk menentukan aktivitas atau potensi tabir surya, respon iritasi, dan sifat fisik sediaan meliputi meliputi, organoleptis, homogenitas, pH, keretakan, daya lekat, stabilitas dipercepat, kelembapan.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol/terkendali adalah faktor yang bisa mempengaruhi hasil penelitian, seperti suhu, bahan, dan kondisi diruangan laboratorium.

E. Prosedur kerja

1. Pengumpulan Bahan

a. Tanaman

Buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) yang diambil dalam penelitian ini berbentuk bulat dengan kulit buah berwarna hijau tua, daging buah labu berwarna orange, dan biji berbentuk pipih yang diambil langsung dari Daerah Kopeng Kabupaten Semarang

b. Hewan Uji

Pada penelitian ini menggunakan hewan uji kelinci albino (*Oryctolagus cuniculus*) sebanyak 2 ekor dengan berat badan \pm 2 kilogram, dengan syarat memiliki kulit yang sehat sesuai peraturan BPOM RI tentang pedoman uji iritasi dermal (BPOM, 2014)

2. Persiapan Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu timbangan analitik, klem, spektrofotometer UV-Vis, pH meter, pengayak, cawan, stamfer, sudip, spatel, godet bedak, pipet tetes, plat KLT, pipa kipler, sinar UV, pencukur bulu, kasa steril Onemed dan plester non iritan, gunting, spidol dan penggaris.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu ekstrak buah labu kuning, titanium dioksida, kaolin, isopropol miristat, lanolin, nipagin, parfum, talcum, etanol p.a 96%, etanol 70%, butanol, asam asetat galisal, aquadest dan hewan uji kelinci albino.

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

Proses pembuatan simplisia diawali dengan mencuci bersih, memotong, mengeringkan labu kuning (*Curcuma maxima D.*) menggunakan oven pada suhu 50 °C. Simplisia kering kemudian diblender dan diayak menggunakan pengayak B.40. Serbuk simplisia yang sudah halus kemudian ditimbang sebanyak 250,17 gram.

Metode yang digunakan dalam pembuatan ekstrak labu kuning (*Curcuma maxima D.*) adalah maserasi dengan pelarut etanol 70%. Serbuk simplisia direndam dalam toples kaca dengan perbandingan pelarut 1:10 (Saidi, 2018). Pelarut yang diperlukan untuk merendam serbuk simplisia sebanyak 250,17 gram adalah 1.876,3 mL sedangkan sisa pelarut sebanyak 625,5 mL digunakan untuk remaserasi. Proses maserasi dilakukan selama 5 hari pada suhu ruangan dan disimpan pada tempat yang gelap dengan pengadukan sekali sehari pada jam yang sama. Simplisia disaring menggunakan kain flannel untuk memisahkan maserat dan ampas simplisia. Ampas simplisia kemudian diremaserasi dengan sisa pelarut sebelumnya selama 2 hari. Maserasi pertama dan kedua selanjutnya diuapkan dengan

alat *rotary evaporator* pada suhu 50° C sehingga didapatkan hasil rendemen kental rumus sebagai berikut :

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

4. Uji bebas etanol

Pengujian bebas etanol dilakukan dengan cara dimasukkan sampel kedalam tabung reaksi, tambahkan asam asetat dan asam sulfat kemudian dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Tenda *et al.*, 2013)

5. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk menganalisis kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak labu kuning.

a. Uji Flavonoid

Ekstrak labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) masing- masing ditotolkan pada lempeng KLT silika gel GF 254 nm, lempeng KLT dimasukan kedalam *chamber* yang telah dijenuhkan dengan fase gerak n-butanol : asam asetat glasial : air (4:5:1). Setelah mencapai jarak elusi lempeng di angkat dari *chamber* dan diangin-anginkan sampai kering. Lempeng KLT dilihat dibawah sinar UV 254 nm UV 366 nm, noda yang terbentuk akibat totolan kemudian dihitung nilai Rf nya (Putu *et al.*, 2017)

b. Uji Terpenoid

Fase gerak yang digunakan adalah kloroform-metanol (9:1) dengan penampak noda pereaksi Liberman-Buchard disertai dengan

pemanasan pada suhu 105°C selama 5 menit. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya noda berwarna hijau-biru pada sinar tampak 264 nm dan 366 nm serta catat nilai (Putu *et al.*, 2017).

6. Pembuatan Formulasi

a. Pembuatan Formula Sediaan Bedak Padat Ekstrak Etanol 70% Labu Kuning

Dalam penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 3.1. Formulasi Sediaan Bedak Padat Mengandung Ekstrak Etanol 70% Labu Kuning

Komposisi	Sediaan (Gram)					
	Basis	F1	F2	F3	F4	F5
Ekstrak Buah Labu Kuning	0	1,5	2,5	3,5	7,5	12,5
Kaolin	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Titanium Dioksida	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
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
Parfum	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. Pembuatan Bedak Padat

Talkum disterilkan pada suhu 150°C selama 1 jam kemudian ekstrak 70% labu kuning ditambahkan dengan talkum yang sudah disterilkan digerus hingga homogen dan diayak menggunakan pengayak B100. Isopropil, miristat dan lanolin dicairkan bersama terlebih dahulu.

Kaolin, nipagin dan talkum digerus hingga homogen ditambahkan dengan campuran talkum dan labu kuning yang sudah dihomogenkan terlebih dahulu kemudian diayak menggunakan ayakan ditambahkan ol.rosae, digerus hingga homogen kemudian dimasukkan ke dalam wadah bedak dengan cara dituang langsung ke dalam wadah.

7. Evaluasi Sediaan Bedak Padat Ekstrak Etanol 70% Labu Kuning

a. Uji Organoleptis

Sediaan bedak padat dievaluasi secara organoleptik dengan pengamatan organoleptik meliputi warna, bau dan tekstur (Nurhabibah *et al*, 2018) dalam (E. Yulianti *et al.*, 2015).

b. Uji Homogenitas

Sediaan bedak padat dioleskan tipis dan merata diatas kaca objek kemudian kaca objek tersebut diarahkan ke cahaya dan tidak boleh terlihat ada butiran kasar (Nurhabibah *et al*, 2018) dalam (Yulianti *et al.*, 2018).

c. Uji pH Sediaan

Sediaan bedak padat diuji pH untuk mengevaluasi sediaan pada rentan pH normal kulit, yaitu 4,6-7 (Nurhabibah *et al*, 2018) dalam (Yulianti *et al.*, 2018). Uji pH dilakukan dengan mengukur larutan sediaan dibuat dalam *beaker glass* dengan pelarut Aquadest 100 mL (1% b/v) menggunakan pH meter (Latelay *et al*, 2017) dalam (Yulianti *et al.*, 2018).

d. Uji Keretakan

Uji keretakan bertujuan untuk mengevaluasi kepadatan sediaan akhir sesuai dengan persyaratan sediaan *compact powder*. Uji kerapuhan dengan mengamati kerapuhan sediaan yang telah dijatuhkan dari ketinggian 8-10 inch (20-25 cm) pada permukaan rata. Syarat uji kerapuhan yang baik yaitu sediaan tidak boleh pecah atau retak (Latelay *et al*, 2017) dalam (Yulianti *et al.*, 2018).

e. Uji Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan cara bedak padat diaplikasikan pada bagian punggung tangan. Penilaian daya lekat bedak padat pada kulit menggunakan skala penilaian 1-4, skor 1 yaitu tidak menempel, skor 2 cukup lekat dan mudah menempel, skor 3 lekat dan mudah menempel, skor 4 sangat lekat dan mudah menempel (Agustina, 2015) dalam (Yulianti *et al.*, 2018).

f. Uji Stabilitas Dipercepat

Untuk produk baru biasanya pengujian dilakukan pada suhu ekstrim yang dikendalikan (4°C), untuk sediaan yang peka terhadap suhu dilakukan pada suhu ruangan (40°C). Rentang waktu pengujian untuk uji stabilitas dipercepat dilakukan dalam 24 jam pada suhu 4°C kemudian 24 jam berikutnya pada suhu 40°C , proses berlangsung secara bergantian selama 1 minggu dalam 6 siklus. Pengujian stabilitas dipercepat pada suhu 40°C menggunakan alat "*Climatic Chamber*"

untuk menjaga agar suhu ekstrim dan kelembaban nisbi terkendali (Amanda, 2017).

g. Kelembaban

Sediaan formula bedak padat ditimbang 3 gram secara akurat dan dimasukkan ke dalam *cup aluminium foil* dengan diameter 2-4 cm. Kemudian dikeringkan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*.

8. Uji Aktivitas Tabir Surya / *Sun Protecting Factor*

Nilai SPF dihitung dengan persamaan matematis Mansur, spektrum serapan sampel diperoleh dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 290-320 nm dengan menggunakan etanol sebagai blanko. Nilai serapan yang diperoleh dikalikan $EE \times 1$ untuk masing-masing interval.

Ditimbang sebanyak 0,100 gram sampel bedak padat dilarutkan dengan etanol p.a kurang lebih 6 ml, dihomogenkan menggunakan pengadukan magnetic stirer selama 5 menit dengan kecepatan 500 rpm pada suhu 25°C, kemudian disaring menggunakan kertas saring, dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, tambahkan etanol p.a ad 10 mL. Diukur absorbansi pada gelombang 290, 295, 300, 305, 310, 320, nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

9. Uji Iritasi

a. Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji diaklimatisasi pada ruang percobaan selama 5 hari kemudian ditempatkan pada kandang individual (1 kandang perekor). Sekurang-kurangnya 24 jam sebelum pengujian, bulu hewan harus dicukur pada daerah punggung seluas lebih kurang 10x15 cm untuk tempat pemaparan sediaan uji. Pencukuran dimulai dari area tulang belikat (bahu) sampai tulang pangkal paha (tulang pinggang) dan setengah kebawah badan pada tiap sisi (BPOM, 2014).

b. Cara pemberian sediaan uji

Sediaan bedak padat yang diuji dioleskan pada kulit kelinci dengan luas ± 6 (2 x 3) cm, kemudian ditutup menggunakan kasa dan dileter dengan plester yang bersifat non-iritan. Plester tidak boleh terlalu kencang, harus dibuat longgar selama periode paparan. Jika sediaan uji diaplikasikan ke plester, plester harus menempel dengan baik sehingga distribusi bahan uji pada kulit dapat merata. Pengaplikasian bahan uji sebaiknya dilakukan pada area yang sulit dijangkau, dimakan, dihirup oleh hewan uji.

Pada tahap uji iritasi akut dermal dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kontrol basis berupa bedak padat yang tidak berisi ekstrak buah labu kuning, dan masing-masing formula berisi ekstrak etanol 70% labu kuning dengan konsentrasi 3%, 5%, 7%, 15% dan 25% masing-masing

pada area seluas ± 6 cm. Jumlah bedak padat yang akan diujikan sebanyak 0,100 g untuk sekali pengujian.

F. Pengolahan Data

1. Penentuan nilai SPF tabir surya dengan menggunakan rumus persamaan mansur :

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

Keterangan :

CF = *Correction Faktor* merupakan faktor koreksi yang sudah mempunyai nilai yaitu 10

EE = *Erythemat Effect spectrum* menyatakan spektrum efek eritemal

I = *Solar intensity spectrum* adalah intensitas spektrum sinar

Abs = Absorbansi merupakan nilai serapan produk tabir surya

Nilai rata-rata yang diperoleh dari perhitungan diatas kemudian dikelompokkan berdasarkan variasi konsentrasi tabir surya. Kategori proteksi tabir surya terbagi menjadi 5 yaitu proteksi minimal dengan nilai 2-4, proteksi sedang nilai SPF 4-6, proteksi ekstra 6-8, proteksi maksimal 8-15, proteksi ultra >15.

2. Pengujian nilai respon iritatif dilakukan dengan pengamatan selama 24, 48, 72 jam ada tidaknya iritasi pada kelinci. Respon iritatif dikategorikan menjadi 4 yaitu kategori respon sangat ringan 0,0-0,4 iritasi ringan 0,5-1,9, iritasi sedang 2,0-4,9, iritasi kuat 5,0-8,0. Berikut adalah rumus menghitung nilai indeks iritasi primer.

$$\text{Indeks Iritasi Primer} = \frac{A-B}{C}$$

- A = Jumlah skor eritema dan edema seluruh titik pengamatan sampel
- B = Jumlah skor eritema dan edema seluruh titik pengamatan kontrol
- C = Jumlah hewan

3. Sifat fisik diuji dengan metode kualitatif secara deskriptif meliputi uji homogenitas, uji organoleptis, uji kerapuhan. Sedangkan metode kuantitatif meliputi uji pH, uji daya lekat, uji kelembaban, uji stabilitas dipercepat.

G. Analisis Data

Data hasil uji sifat fisik sediaan bedak dianalisis menggunakan uji anova satu jalan dengan menggunakan program SPSS versi 20. Analisis diawali dengan uji normalitas menggunakan rumus dari Shapiro-Wilk dan uji homogenitas menggunakan rumus dari Lavene Test selanjutnya dilakukan Uji Tukey. Uji normalitas dan uji homogenitas nilai signifikansi lebih besar dari 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 yang menggunakan uji *Anova* dilakukan. Uji Tukey dilanjutkan jika hasil uji *Anova* didapatkan sig. $F \leq 0.05$.

Data hasil uji SPF dianalisis menggunakan *Microsoft Excel*. Data hasil uji iritasi akut dermal dianalisis dengan *Microsoft Word*. Skor iritasi kulit eritema dan edema yang memperlihatkan adanya tingkat keparahan luka terhadap hewan uji pada jam 24, 48, dan 72 setelah tempelan dibuka. Skor iritasi pada sediaan uji yaitu kombinasi dari seluruh observasi dari pengujian.

