

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode eksperimental laboratorium. Penelitian ini menggunakan sampel daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh diuji secara kualitatif dan diformulasikan dalam sediaan shampo dan dievaluasi sifat fisiknya, meliputi analisis organoleptis, pengukuran pH, pengukuran viskositas, pengukuran tinggi busa, uji stabilitas, dan uji stabilitas dipercepat.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2021-Februari 2022

2. Tempat Penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang
- b. Pembuatan serbuk simplisia dan ekstrak daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran
- c. Pengujian secara kualitatif ekstrak daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) dilakukan di Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran

- d. Pembuatan sediaan shampo ekstrak daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) dilakukan di Laboratorium Farmasetika Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran
- e. Evaluasi dan uji sifat fisik sediaan sediaan shampo ekstrak daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) dilakukan di Laboratorium Teknologi dan Laboratorium Analisis Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah shampo ekstrak daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.). Labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) diperoleh dari petani lokal daerah Kopeng, Jawa Tengah.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Formulasi shampo menggunakan ekstrak buah labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) dengan berbagai konsentrasi yaitu 1%, 5%, dan 10%.
2. Evaluasi sifat fisik shampo meliputi pengamatan organoleptis diperoleh penjelasan deskripsi wujud sediaan shampo, pengukuran pH menggunakan pH meter digital diperoleh nilai pH sediaan, pengukuran viskositas menggunakan alat viskometer Brookfield diperoleh nilai dalam satuan Cps, pengukuran tinggi busa diperoleh nilai dalam satuan cm, uji stabilitas dan uji stabilitas dipercepat diperoleh dalam bentuk grafik kestabilan selama penyimpanan.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) dalam formula shampo yaitu 1%, 5%, dan 10%.

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah sifat fisik sediaan shampo ekstrak daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) meliputi organoleptis, pH, viskositas, tinggi busa, kestabilan selama penyimpanan, dan kestabilan penyimpanan dipercepat.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) asal daerah Kopeng, Jawa Tengah, suhu pada pembuatan simplisia ekstrak dan shampo, serta jumlah komponen lain kecuali ekstrak buah labu pada formula shampo.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Alat untuk pembuatan serbuk simplisia daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) yaitu blender, ayakan 40 mesh, dan plastik
- b. Alat untuk pembuatan ekstrak yaitu toples dengan tutup rapat, kain hitam, kertas saring, gelas ukur, *beaker glass*, cawan penguap, aluminium foil, pot salep, sendok tanduk, *rotary evaporator* RE-2000E, *waterbath* Memmert, dan neraca analitik OHAUS

- c. Alat untuk pengujian ekstrak secara kualitatif yaitu tabung reaksi, pipet tetes, plat KLT
 - d. Alat untuk pembuatan sediaan shampo yaitu *beaker glass*, gelas ukur, batang pengaduk, termometer
 - e. Alat untuk evaluasi sifat fisik shampo ekstrak buah labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) yaitu pH meter OHAUS, viskometer Brookfield DV2T, *Climatic Chamber* memmert, *beaker glass*, pendingin.
2. Bahan
- Ekstrak daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.), zat-zat pereaksi uji tabung, *Sodium Lauryl Sulfate*, *Cocamide* DEA, HPMC, Propil paraben, Asam Sitrat, Menthol, dan Aquades.

G. Prosedur Penelitian

1. Determinasi tanaman

Sampel labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) dilakukan determinasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

2. Pembuatan Simplisia

Labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) yang diperoleh dari petani lokal daerah Kopeng, Jawa Tengah dikupas pisahkan dari biji dan selaput buahnya, selanjutnya daging diiris tipis-tipis agar memudahkan proses pengeringan. Proses pengeringan menggunakan oven dengan suhu

50°C selama 5 hari atau sampai daging buah kering sempurna. Proses pengeringan dengan menggunakan oven mempunyai keunggulan yaitu prosesnya lebih cepat dan suhu lebih terukur (Indrianingsih *et al.*, 2019). Setelah pengeringan dilakukan hasil simplisia diserbukkan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan ukuran 40 mesh.

3. Ekstraksi

Ekstraksi serbuk simplisia daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 500 gram serbuk dimasukkan ke dalam bejana, kemudian direndam menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan serbuk:pelarut adalah 1:10. Perbandingan 1:7,5 untuk maserasi dan 1:2,5 untuk remaserasi. Sebanyak 3750 mL etanol 70% dituangkan ke dalam bejana berisi serbuk simplisia tersebut, kemudian ditutup rapat dan dibiarkan selama 5 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari selanjutnya sampel yang direndam disaring menggunakan kertas saring sehingga menghasilkan filtrat 1 dan ampas 1, keduanya disebut hasil maserasi pertama.

Ampas 1 dimasukkan kembali kedalam bejana, kemudian ditambah dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1250 mL dan ditutup kembali. Perendaman dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Selanjutnya sampel tersebut disaring dan menghasilkan filtrat 2 dan ampas 2, keduanya disebut hasil remaserasi. Filtrat 1 dan 2 dicampur menjadi satu yang kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan

suhu 50°C. Hasil evaporasi selanjutnya diuapkan di *waterbath* hingga menghasilkan ekstrak kental dengan kekentalan yang dikehendaki. Ekstrak yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

(Sambodo & Yani, 2020)

4. Pengujian Ekstrak Daging Labu Kuning

a. Uji Kadar Air

Pengujian kadar air dilakukan dengan alat *moisture analyzer*. Nyalakan *moisture analyzer* atur alat dengan menekan menu, pilih metode yang akan digunakan. Ekstrak kental selanjutnya dimasukkan kedalam wadah sampel didalam *moisture analyzer* dan diratakan. Alat ditutup kemudian tunggu hingga lampu mati dan dicatat hasilnya (Diniatik, 2015).

b. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara ekstrak daging labu kuning ditambahkan dengan H₂SO₄ pekat kemudian ditambahkan dengan CH₃COOH selanjutnya dipanaskan. Hasil pengujian menunjukkan bebas etanol apabila tidak tercium bau ester (Amelia, 2020). Cara lain yang digunakan untuk uji bebas etanol ekstrak daging labu kuning yaitu dengan mereaksikan ekstrak dengan kalium dikromat (K₂Cr₂O₇) kemudian ditambahkan asam sulfat (H₂SO₄). Apabila terbentuk warna campuran dari ekstrak daging labu kuning dengan kalium dikromat (K₂Cr₂O₇) dan asam sulfat (H₂SO₄) maka hasil

pengujian menunjukkan bebas etanol. Namun bila larutan mengandung etanol akan terbentuk warna biru (Ikhsanudin *and* Mardhiyah, 2017).

c. Skrining Fitokimia

1. Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak daging labu kuning dilarutkan menggunakan 5 mL HCl 2N. Larutan yang diperoleh selanjutnya dibagi kedalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai blangko, tabung kedua ditambahkan dengan pereaksi Dragendroff sebanyak 3 tetes, dan tabung ketiga ditambahkan dengan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan berwarna jingga pada penambahan pereaksi Dragendroff dan endapan berwarna putih sampai kekuningan pada penambahan pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Simaremare, 2014).

2. Pemeriksaan Glikosida

Ekstrak daging labu kuning dilarutkan menggunakan etanol, selanjutnya diuapkan pada penangas air kemudian dilarutkan kembali dalam 5 mL asam asetat anhidra kemudian ditambahkan 10 tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna biru atau hijau menunjukkan adanya glikosida (Simaremare, 2014).

3. Pemeriksaan Sterol dan Triterpenoid

Ekstrak daging labu kuning dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform selanjutnya ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat

anhidra, kemudian melalui dinding tabung ditambahkan asam sulfat pekat. Apabila terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa sterol dan apabila terbentuk cincin kecoklatan atau violet menunjukkan adanya triterpenoid (Simaremare, 2014).

4. Pemeriksaan Saponin

Ekstrak daging labu kuning ditambahkan dengan 10 mL air panas dan didinginkan, selanjutnya dikocok kuat selama 10 detik. Apabila terbentuk buih yang menetap selama tidak kurang dari 10 menit, buih tersebut setinggi 1-10 cm dan buih tidak hilang setelah ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N maka menunjukkan adanya saponin (Simaremare, 2014).

5. Pemeriksaaan Polifenol dan Tanin

Ekstrak daging labu kuning ditambahkan dengan 1 mL larutan Fe(III) klorida 10%. Apabila terbentuk warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tanin (Simaremare, 2014).

6. Pemeriksaan Flavonoid

Ekstrak daging labu kuning sebanyak 2 gram ditambahkan etanol kemudian dipanaskan, selanjutnya ke dalam larutan ditambahkan serbuk magnesium dan ditambahkan HCl. Apabila terbentuk larutan berwarna merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Simaremare, 2014).

d. Identifikasi Metabolit Sekunder dengan Metode KLT

Senyawa flavonoid secara kualitatif dapat diidentifikasi menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Sampel ekstrak daging labu kuning dilarutkan menggunakan etanol sehingga konsentrasi ekstrak menjadi sedikit cair, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT dan dielusikan dengan eluen butanol: asam asetat glasial: air (4:1:5). Deteksi bercak diamati pada lampu UV 366 nm dan dilakukan identifikasi senyawa flavonoid setelah ditambahkan pereaksi uap ammonia. Pola pemisahan dan warna bercak diamati, kemudian dihitung nilai Rf dari noda yang terbentuk. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna kuning coklat setelah diuapi ammonia pada pengamatan dengan sinar tampak. Nilai Rf flavonoid berkisar antara 0,28-0,83 yang menegaskan adanya kandungan flavonoid pada ekstrak daging labu kuning (Diniatik, 2015).

$$R_f = \frac{x \text{ (Jarak yang ditempuh solute)}}{y \text{ (Jarak yang ditempuh eluen)}}$$

5. Formulasi

Formula shampo ekstrak daging labu kuning dapat dilihat pada tabel 3.1

**Tabel 3.1 Formula Shampo Ekstrak Daging Labu Kuning
(*Cucurbita moschata* Duch.)**

Bahan	Konsentrasi %			
	F(-)	F1	F2	F3
Ekstrak Daging Labu Kuning	0	1	5	10
Sodium Lauryl Sulfate	10	10	10	10
Cocamide DEA	4	4	4	4
HPMC	3	3	3	3
Propil paraben	0,2	0,2	0,2	0,2
Asam sitrat	0,1	0,1	0,1	0,1
Menthol	0,25	0,25	0,25	0,25
Aquadest ad	50 mL	50 MI	50 mL	50 mL

(Sumber: Mahataranti *et al.*, 2012)

a. Pembuatan shampo

Pembuatan shampo diawali dengan memanaskan aquadest di dalam *beaker glass* sebanyak 40%. HPMC kemudian dimasukkan sedikit demi sedikit diaduk kuat hingga mengembang (massa 1). Aquadest sebanyak 33,3% dipanaskan dalam *beaker glass* yang berbeda, kemudian ditambahkan *Sodium Lauryl Sulfate* sedikit demi sedikit diaduk hingga larut. Suhu diukur hingga mencapai 60°C (massa 2).

Tahap berikutnya yaitu menthol dilarutkan dengan etanol pada Erlenmeyer, diaduk hingga larut. Kemudian ditambahkan propil paraben, asam sitrat dan aquadest sedikit demi sedikit (massa 3).

Larutan massa 2 selanjutnya dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam massa 1 sambil diaduk perlahan hingga homogen, ditambahkan *Cocamide* DEA sedikit demi sedikit (massa 4). Larutan massa 3 dimasukkan ke dalam massa 4 di aduk perlahan sampai homogen.

Tahap terakhir yaitu ekstrak etanol 70% daging labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch.) dengan konsentrasi yang dikehendaki ditambahkan sedikit demi sedikit dan diaduk hingga rata. Selanjutnya dalam wadah yang telah disiapkan sediaan dimasukkan dan ditambahkan aquadest sampai 50 mL lalu diaduk hingga homogen dan ditutup rapat (Amelia Sari, 2019).

6. Evaluasi sifat fisik

a. Evaluasi Organoleptis

Evaluasi organoleptis dilakukan dengan mengamati sediaan shampo meliputi bentuk, bau, dan warna sediaan shampo (Mahataranti *et al.*, 2012).

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara sediaan shampo yang dibuat ditetaskan pada kaca preparat kemudian diamati bagian-bagian yang tidak tercampurkan dengan baik (Sambodo & Salimah, 2021).

c. Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter digital. Sebanyak 1% sampel dilarutkan menggunakan aquadest. pH meter

digital terlebih dahulu dikalibrasi hingga menunjukkan pH netral (pH 7,00) menggunakan larutan dapar atau disebut larutan penyangga. Elektroda di bias dengan aquades dan dikeringkan menggunakan tisu setelah digunakan atau untuk mengukur sampel lainnya. Evaluasi sifat fisik terkait pH yang diperoleh dicatat kemudian dibandingkan dengan standar pH yang ditetapkan. Rentang pH sediaan shampo yang ditetapkan SNI No. 06-2692-1992 dalam memenuhi syarat mutu shampo yaitu 5,0-9,0 (Amelia Sari, 2019). Rentang pH fisiologis kulit yaitu antara 4,2-6,5 atau 5-6,5. Kedua acuan mengenai nilai pH tersebut dapat digunakan sebagai standar pengujian sediaan shampo (Budiman *et al.*, 2015).

d. Pengukuran Viskositas

Pengukuran viskositas dari sediaan menggunakan alat viskometer Brookfield. Sampel sediaan shampo yang akan diperiksa diletakkan pada alat viskometer Brookfield dengan spindel yang sesuai. Sediaan shampo bentuk krim menggunakan spindel no. 62 pada kecepatan 20 rpm. Caranya adalah menempatkan sediaan shampo ke dalam *beaker glass* (± 200 mL) kemudian diletakkan di bawah alat viskometer Brookfield. Spindel dimasukkan ke dalam sediaan sampai terendam (Mahataranti *et al.*, 2012). Viskositas yang masuk dalam batas standar shampo menurut SNI yaitu 400-4000 Cps dan menurut Rieger yaitu 2000-6000 cps (Amelia Sari, 2019; Sambodo & Salimah, 2021).

e. Pengukuran Tinggi Busa

Pengukuran tinggi busa dilakukan dengan cara memasukkan sampel sampo sebanyak 0,5 mL ke dalam gelas ukur 100 mL kemudian ditambahkan air secara perlahan hingga mencapai 50 mL. Selanjutnya dilakukan pengocokan ke dua arah, yaitu kanan dan kiri sebanyak 10 kali. Kemudian diukur tinggi busa yang terbentuk (Sambodo & Salimah, 2021). Standar persyaratan tinggi busa menurut wilkinson yaitu 1,3-22 cm (Amelia Sari, 2019).

f. Uji stabilitas

Uji stabilitas dilakukan dengan menyimpan sediaan shampo selama 2 minggu pada penyimpanan suhu kamar (28° - 30° C). Pengujian meliputi uji organoleptis, tinggi busa, pH, dan viskositas secara berkala pada hari ke-1, 3, 7, dan 14 (Budiman *et al.*, 2015).

g. Uji stabilitas dipercepat

Uji stabilitas dipercepat sediaan shampo dilakukan dengan metode *cycling test* caranya adalah masing-masing formula shampo yang ditempatkan dalam wadah gelas transparan ± 20 mL, sediaan selanjutnya disimpan di almari pendingin pada suhu $4 \pm 2^{\circ}$ C selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke dalam *climatic chamber* yang bersuhu $40 \pm 2^{\circ}$ C selama 24 jam. Perlakuan ini disebut 1 siklus. Pengujian dilakukan sebanyak 3 siklus atau 6 hari dan diamati ada tidaknya perubahan yang terjadi pada masing-masing sediaan meliputi uji organoleptis, tinggi busa, pH, dan viskositas sediaan dan

bandingkan kondisi sebelum dan setelah dilakukan uji tersebut (Sambodo & Salimah, 2021).

H. Analisis Data

Data pengujian ekstrak daging labu kuning akan disajikan dalam bentuk tabel dengan metode deskriptif. Pengamatan organoleptis shampo ekstrak daging labu kuning akan dibandingkan secara visual, disajikan dalam bentuk tabel dengan metode deskriptif sedangkan data pengukuran pH, tinggi busa, viskositas, uji stabilitas, dan uji stabilitas dipercepat dianalisis menggunakan statistik *one way anova* dengan signifikansi 95% $\alpha = 0,05\%$ menggunakan program SPSS versi 26. Data terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Namun apabila terjadi ketidaknormalan data bahkan setelah dilakukan transformasi data maka diputuskan untuk menggunakan uji alternatif lain seperti uji *kruskal-wallis* (Sambodo & Salimah, 2021).