

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan memformulasikan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D. *Seed Oil*) dan niacinamide sebagai bahan aktif dalam sediaan krim pelembab maskne.

B. Lokasi Penelitian

1. Lokasi penelitian

- a. Formulasi dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
- b. Uji sifat fisik dan stabilitas dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
- c. Uji iritasi dilakukan di Laboratorium Farmakologi & Toksikologi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2022 - Januari 2023.

C. Subjek Penelitian

Krim pelembab dalam penelitian ini menggunakan bahan aktif berupa kombinasi dari minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D. *Seed Oil*) dan niacinamide. Minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D. *Seed Oil*) diperoleh dari PT Tamba Sanji Wani Tabanan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas (*independent* variabel) adalah variabel yang memberikan pengaruh atau faktor yang menyebabkan variabel terikat menjadi berubah (Sani K., 2016). Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata D. Seed Oil*) yaitu 5% dan 10%.

2. Variabel terikat

Variabel terikat (*dependent* variabel) adalah variabel akibat dari adanya variabel bebas (Sani K., 2016). Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu sifat fisik, stabilitas, dan uji iritasi. Uji sifat fisik dan stabilitas yang dilakukan berupa pengamatan organoleptis, pH, homogenitas, daya lekat, daya sebar, viskositas, sentrifugasi, dan *cycling test*.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol adalah variabel yang keberadaannya merupakan prasyarat bagi bekerjanya suatu variabel bebas terhadap variabel terikat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu suhu, lingkungan, bahan.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu alat-alat gelas, cawan uap, *water bath* DHH-88, mortir, stamper, pipet tetes, batang

pengaduk, spatula, pot krim, timbangan analitik Ohaus PX224/E, pH meter Ohaus Starter 3100, gelas ukur, gelas objek, alat ukur daya lekat, *stopwatch*, alat ukur daya sebar, beban 50 gram, jangka sorong Mitutoyo, viskometer Brookfield DV2T, spindle no 64, *centrifuge* PLC-05, tabung sentrifugasi, kulkas, *climatic chamber* Memmert, pencukur bulu, kapas, kassa steril, plester non-iritan, penggaris, spidol dan kalkulator.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu minyak biji labu kuning (PT Tamba Sanji Wani), niacinamide (farmasetika, PT MKR), asam stearat (farmasetika, PT MKR), setil alkohol (farmasetika, PT MKR), gliserin (farmasetika, PT MKR), trietanolamin (farmasetika, PT MKR), propilenglikol (farmasetika, PT MKR), alfa tokoferol (farmasetika, PT MKR), metil paraben (farmasetika, PT MKR) dan aquadest (farmasetika, PT MKR).

F. Prosedur Kerja

1. Formula krim

Formulasi krim pelembab mengacu pada hasil penelitian dari Dewi Karina (2019) dengan formula seperti pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Formula Krim Minyak Biji Labu Kuning

Bahan	Kegunaan	Jumlah Bahan (g)	
		Formula A	Formula B
Minyak biji labu kuning	Bahan aktif	4	8
Asam stearat	Agen pengemulsi	9,6	9,6
Gliserin	Humektan	2,4	2,4
Setil alkohol	Emolien	1,6	1,6
Propilenglikol	Humektan	1,2	1,2
Trietanolamin	Agen pengemulsi	0,8	0,8
Fenoksietanol	Pengawet	0,4	0,4
Alfa tokoferol	Antioksidan	0,04	0,04
Oleum rosae	Parfum	2 tetes	2 tetes
Aqua ad	Pelarut	80	80

2. Formula modifikasi

Formula krim dimodifikasi dengan menambahkan niacinamide sebagai bahan aktif. CIR (*Cosmetic Ingredient Review*) *Expert Panel* menyatakan bahwa niacinamide dan niacin aman pada konsentrasi (0,0001-3%) dalam produk kosmetik (Wargala *et al.*, 2021). Niacinamide topikal sebagian besar melalui sediaan kosmetik telah digunakan secara luas untuk beberapa waktu sekarang dan dianggap aman hingga konsentrasi 4% (Wohlrab & Kreft, 2014). Niacinamide dapat digunakan pada dosis tinggi secara topikal (setidaknya hingga 5% yang digunakan dalam beberapa produk kosmetik komersial) dan umumnya dapat ditoleransi dengan baik (Berson *et al.*, 2013).

Tabel 3.2 Formula Modifikasi Sediaan Krim Pelembab

Bahan	Kegunaan	Jumlah Bahan (g)	
		Formula A	Formula B
Minyak biji labu kuning	Bahan aktif	4	8
Niacinamide	Bahan aktif	2,4	2,4
Asam stearat	Agen pengemulsi	9,6	9,6
Gliserin	Humektan	2,4	2,4
Setil alkohol	Emolien	1,6	1,6
Propilenglikol	Humektan	1,2	1,2
Trietanolamin	Agen pengemulsi	0,8	0,8
Metil paraben	Pengawet	0,4	0,4
Alfa tokoferol	Antioksidan	0,04	0,04
Aqua ad	Pelarut	80	80

3. Pembuatan krim

Sediaan krim dibuat dengan menggunakan basis krim M/A.

Semua zat yang diperlukan ditimbang sesuai kebutuhan. Proses pembuatan krim pelembab *antiacne* yaitu:

- a. Bahan-bahan dalam fase minyak yaitu minyak biji labu kuning, asam stearat dan setil alkohol dimasukkan ke dalam cawan uap (bagian 1).
- b. Bahan-bahan dalam fase air yaitu niacinamide, trietanolamin, gliserin, propilenglikol, metil paraben dan aquadest dimasukkan ke cawan uap lain (bagian 2).
- c. Bahan-bahan dalam fase minyak (bagian 1) dan fase air (bagian 2) dileburkan diatas *water bath* pada suhu 70°C hingga meleleh.

- d. Mortir dan stamper dipanaskan dengan cara direndam menggunakan air mendidih pada suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$.
 - e. Pembuatan basis krim : fase air (bagian 2) dimasukkan ke dalam mortir yang telah dipanaskan. Fase minyak (bagian 1) ditambahkan sedikit demi sedikit melalui dinding mortir hingga terbentuk basis krim putih.
 - f. Alfa tokoferol ditambahkan dan sediaan diaduk kembali hingga homogen.
 - g. Krim pelembab yang sudah jadi kemudian dilakukan pengujian sifat fisik, stabilitas, dan uji iritasi.
4. Sifat fisik dan stabilitas

a. Pengamatan organoleptis

Pengamatan organoleptis dapat dinilai dari tekstur sediaan meliputi perubahan warna dan bau krim. Pengamatan dilakukan terhadap krim yang baru dibuat dan yang telah disimpan. Krim yang stabil harus menunjukkan warna dan bau yang sama sebelum dan setelah kondisi penyimpanan dipercepat (Mardikasari *et al.*, 2020).

b. pH

Pengujian dilakukan menggunakan pH meter dengan cara menimbang masing-masing sediaan krim dengan berat 1 gram kemudian dilarutkan dalam 10 ml aquadest aduk hingga larut dengan perbandingan 1:10 (Cahyani & Erwiyani, 2021).

Berdasarkan SNI 16-4954-1998 pH dari krim dikatakan memenuhi syarat jika nilainya berada pada rentang 4,5-8 (Wulandari *et al.*, 2022).

c. Homogenitas

Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan menggunakan gelas objek. Sejumlah tertentu krim dioleskan pada kaca objek dan diamati adanya butiran kasar secara visual. Krim yang homogen ditandai dengan tidak adanya butiran kasar pada gelas objek (Erwiyani *et al.*, 2021).

d. Daya lekat

Sebanyak 0,5 gram sediaan krim dioleskan diatas *object glass* hingga merata, kemudian diberi beban 1 kg dan diamkan selama 5 menit. Daya lekat diukur dengan menghitung lepasnya waktu *object glass* yang berisi krim pada alat penguji daya lekat. Pengujian dikatakan memenuhi persyaratan jika menunjukkan hasil >1 detik (Wulandari *et al.*, 2022).

e. Daya sebar

Penyebaran krim diuji dengan meletakkan krim sebanyak 0,5 gram kemudian diletakkan ditengah kaca bulat berskala lalu diberi beban dengan kenaikan sebanyak 50-250 gram tiap 1 menit (Wulandari *et al.*, 2022). Uji daya sebar dikatakan memenuhi persyaratan krim yang baik jika nilainya berada pada rentang 5-7

cm. Daya sebar diukur diameternya menggunakan jangka sorong Mitutoyo dengan ketelitian 0,02 mm.

f. Viskositas

Pengujian viskositas dilakukan dengan meletakkan krim sebanyak 75 gram ke dalam wadah, kemudian pengukuran viskositas menggunakan viskometer Brookfield DV2T, yang diatur kecepataannya 50 rpm dengan menggunakan spindle 4 selama 1 menit. Persyaratan standar viskositas krim yang baik yaitu berkisar antara 2.000-50.000 cps (Wulandari *et al.*, 2022).

g. Sentrifugasi

Sediaan krim dimasukkan dalam tabung reaksi berskala dengan ketinggian sediaan mencapai tanda batas 10 cm. Krim dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Hasil diamati apakah terjadi pemisahan fase dari sediaan krim yang diuji. Sediaan krim stabil ditandai dengan tidak adanya pemisahan fase dan terlihat krim tetap homogen setelah dilakukan uji mekanik pada kecepatan 5000 rpm selama 30 menit (Erwiyani *et al.*, 2021).

h. *Cycling test*

Cycling test merupakan salah satu metode untuk menguji stabilitas. Untuk satu siklus pengujian, krim akan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam kemudian dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu 40°C selama 24 jam. Percobaan ini dilakukan pengulangan hingga 6 siklus. Kondisi fisik dari sediaan krim akan

dibandingkan selama pengujian dengan sediaan sebelumnya (Mardikasari *et al.*, 2020).

5. Uji iritasi

Berdasarkan referensi dari BPOM (2014) prosedur untuk uji iritasi akut dermal sebagai berikut :

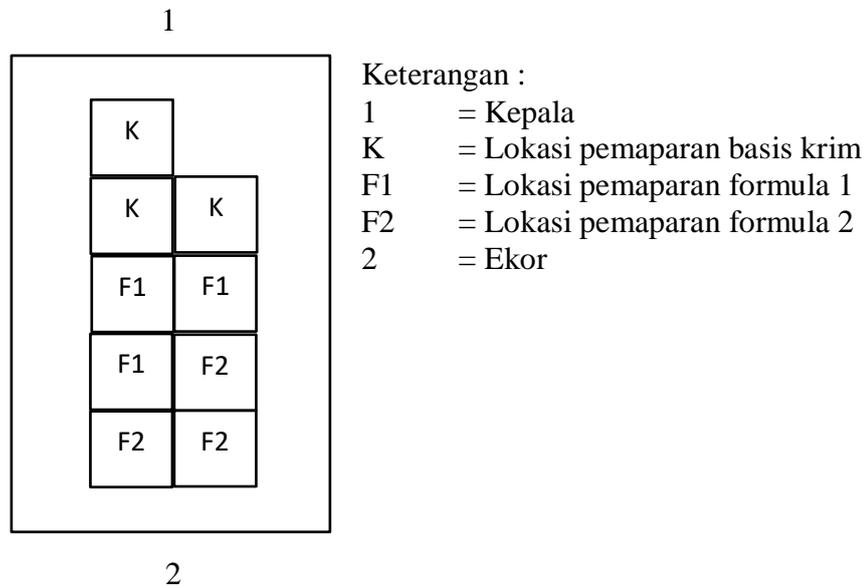
a. Penyiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci albino jenis New Zealand, jantan atau betina yang sehat dan dewasa, berat sekitar 2 kg. Sebelum pengujian dimulai, hewan uji diaklimatisasi di ruang percobaan kurang lebih selama 5 hari dan hewan ditempatkan pada kandang individual (1 kandang untuk 1 ekor). Sekurang-kurangnya 24 jam sebelum pengujian, bulu hewan harus dicukur pada daerah punggung seluas lebih kurang 10 x15 cm atau tidak kurang 10% dari permukaan tubuh untuk tempat pemaparan sediaan uji. Pencukuran dimulai dari area tulang belikat (bahu) sampai tulang pangkal paha (tulang pinggang) dan setengah ke bawah badan pada tiap sisi. Hewan yang digunakan untuk percobaan adalah hewan yang mempunyai kulit yang sehat (BPOM, 2014).

b. Cara pemberian sediaan uji

Dosis yang digunakan untuk sediaan uji padat atau semi padat sebanyak 0,5 gram. Krim dipaparkan di area kulit seluas ± 6 (2 x 3) cm^2 dengan lokasi pemaparan seperti yang terlihat pada

Gambar 3.1, kemudian lokasi pemaparan ditutup dengan kasa dan di plester dengan plester yang bersifat non-iritan.



Gambar 3.1 Lokasi Pemaparan Sediaan Uji

c. Pemejanaan senyawa uji

Sebelum dioleskan, kulit kelinci dibersihkan pelan-pelan menggunakan kapas bersih yang dibasahi aquades. Setelah itu dioleskan krim sebanyak 0,5 gram pada kulit kelinci dan ditutup dengan kassa steril & plester selama 24 jam. Setelah itu hewan uji dikembalikan ke kandangnya dan hari berikutnya pada jam yang sama, plester dibuka dan kulit hewan uji dibersihkan dengan aquades dari sisa senyawa uji yang menempel. Gejala yang diamati yaitu iritasi primer berupa eritema dan edema selama 24, 48, dan 72 jam.

d. Pembacaan hasil dan pemberian *scoring*

Pada waktu pengamatan gejala toksik iritasi primer, hal yang diamati adalah adanya eritema dan edema. Kemudian dari tingkat iritasi yang timbul diberi skor sesuai Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Penilaian Reaksi pada Kulit

Pembentukan Eritema	Skor
Tidak ada eritema	0
Eritema yang sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	1
Eritema terlihat jelas	2
Eritema sedang sampai parah	3
Eritema parah (merah daging) sampai pembentukan <i>eschar</i> yang menghambat penilaian eritema	4
Pembentukan Udema	
Tidak ada udema	0
Udema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	1
Udema kecil (batas area terlihat jelas)	2
Udema tingkat menengah (luasannya bertambah sekitar 1 mm)	3
Udema parah (luas bertambah lebih dari 1 mm dan melebar melebihi area pemaparan oleh sediaan uji)	4

e. Evaluasi hasil

Skor iritasi (Indeks Iritasi Primer) sediaan uji adalah kombinasi dari seluruh observasi dari pengujian. Indeks iritasi primer dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan :

A : Jumlah skor eritema dan udema seluruh titik pengamatan sampel pada jam ke 24, 48 dan 72 dibagi jumlah pengamatan.

B : Jumlah skor eritema dan udema seluruh titik pengamatan kontrol pada jam ke 24, 48 dan 72 dibagi jumlah pengamatan.

C : Jumlah hewan

G. Analisis Data

Data kualitatif dari hasil pengamatan organoleptis dan homogenitas akan dianalisis menggunakan analisis deskriptif dalam tabel. Data kuantitatif hasil dari uji pH, daya lekat, daya sebar, viskositas dan sentrifugasi selama penyimpanan 4 minggu akan diolah dan dianalisis dengan uji parametrik *One Way Anova* (ANOVA satu arah) menggunakan *software* SPSS. Ada dua syarat yang harus dipenuhi oleh suatu data agar dapat dianalisis menggunakan uji ANOVA satu arah yaitu data harus normal dan varians data harus homogen/sama (Sani K., 2016). Untuk melihat normalitas dari datanya menggunakan uji shapiro wilk.

Perbedaan hasil uji stabilitas dari krim akibat adanya perlakuan berupa *cycling test* akan dibandingkan menggunakan uji *paired sample T test*. Hasil dari uji iritasi berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif yaitu hasil dari pengamatan reaksi eritema dan edema yang muncul pada kulit punggung kelinci. Sedangkan untuk data kuantitatif merupakan hasil dari perhitungan indeks iritasi primer.