

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratorium, yang bertujuan untuk memformulasikan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dalam bentuk krim nanoemulsi kemudian dievaluasi karakteristik fisik dan aktivitas antioksidan.

#### **B. Lokasi Penelitian**

Pembuatan sediaan krim nanoemulsi ekstrak biji labu kuning serta uji karakteristik fisik baik dalam bentuk nanoemulsi maupun dalam bentuk sediaan krim. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

#### **C. Subjek Penelitian**

Minyak biji labu kuning yang diperoleh dari PT Tamba Sanjiwani, Jl Meliling Km 1 Br. Dinas Meliling Kawan, Meliling, Kerambitan Kab. Tabanan.

#### **D. Variabel Penelitian**

Variabel dalam penelitian ini :

1. Variabel bebas: variasi konsentrasi nanoemulsi minyak biji labu kuning.
2. Variabel terikat: karakteristik fisik dari krim nanoemulsi meliputi organoleptis, homogenitas, daya sebar, daya lekat, pH, viskositas, sentrifugasi, tipe emulsi.
3. Variabel terkontrol: suhu dan kelembaban.

## **E. Definisi Operasional**

1. Minyak biji labu PT Tamba Sanjiwani, jl Meliling Km 1 Br. Dinas Meliling Kawan, Meliling, Kerambitan Kab. Tabanan.
2. Nanoemulsi minyak biji labu kuning yaitu formulasi minyak biji labu kuning yang dibuat dalam bentuk nanoemulsi menggunakan fase minyak berupa minyak biji labu kuning dan fase air yang terdiri dari metil paraben, propil paraben, sorbitol dan aquadestilata serta emulgator tween 80.
3. Krim nanoemulsi minyak biji labu kuning merupakan krim yang mengandung nanoemulsi minyak biji labu kuning dengan konsentrasi 0,5% dan 1%.
4. Karakteristik fisik krim nanoemulsi minyak biji labu kuning meliputi organoleptis, homogenitas, daya sebar, daya lekat, viskositas, sentrifugasi, pH dan tipe emulsi.
5. Aktivitas tabir surya krim nanoemulsi minyak biji labu kuning merupakan pengujian aktivitas tabir surya dengan metode *in vitro*.

## **F. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah T25 digital ultra turrax, objek glass onelab spesifikasi kaca bening, dimensi 26 x 76 mm, alat uji daya sebar spesifikai material plat kaca, anak timbang 50 gram – 300 gram, alat uji daya lekat material plat besi, dimensi T 35 x P 40, bandul penggerak 50 gram, pH universal, viscometer brookfield DV2T, sentrifugasi gemmy Plc 05, PSA (*partikel size analyzer*) merek malvern, spektrofotometer Shimadzu UV-1800, neraca analitik ohaus,

seperangkat alat gelas merek iwaki dan pyrex, penangas air cyprus KL-0069, batang pengaduk merek mico, mortar onemed, cawan penguap omron, dan termometer merek TLab varian termometer alkohol 10 110 cairan warna merah.

## 2. Bahan

Minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) diperoleh dari PT Tamba Sanjiwani, jl Meliling Km 1 Br. Dinas Meliling Kawan, Meliling, Kerambitan Kab. Tabanan, tween 80 emulsifie food grade, PEG 400 USP grade, aquadestilata, nanoemulsi minyak biji labu kuning, asam stearat food grade, span 80 food grade, setil alkohol kosmetik grade, gliserin food grade, TEA kosmetik grade, metil paraben food grade, propil paraben food grade.

## G. Prosedur Kerja

### 1. Skrining Fitokimia secara Kualitatif

#### a. Uji Flavonoid

Minyak biji labu kuning ditimbang sebanyak 0,5 g ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 2 mg dan ditambah 3 tetes HCl pekat, diamkan beberapa menit, jika larutan berubah menjadi warna kuning menunjukkan adanya flavonoid (Debby *et al.*, 2020).

#### b. Uji Terpenoid

Uji kualitatif dilakukan dengan uji tabung menggunakan reagen *Lieberman-burchard* yang terdiri dari 2 ml kloroform, 10 tetes asam asetat anhidrida, dan 3 tetes asam sulfat pekat. Uji terpenoid dilakukan

dengan mengambil 1 ml sampel kemudian ditetesi dengan reagen *Lieberman-burchard*, dikocok secara perlahan dan didiamkan beberapa menit kemudian diamati perubahan yang terjadi. Hasil uji positif terpenoid apabila terbentuk warna merah, ungu atau terbentuk cincin berwarna kecoklatan (Azalia *et al.*, 2023)

## 2. Pembuatan Nanoemulsi

Proses pembuatan nanoemulsi dengan ukuran partikel dalam bentuk nano. Emulgator yang digunakan untuk dapat menghasilkan ukuran tersebut yaitu tween 80 dan PEG 400. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh (Handayani *et al.*, 2005) menyampaikan bahwa hasil optimasi diperoleh smik dengan perbandingan antara tween 80 dan PEG 400 yaitu 4:1 dan 5: 1. Smik 4:1 dipilih karena memiliki area nanoemulsi yang paling luas dan tidak terjadi fase kontinyu. Hasil yang didapatkan jernih secara visual dari awal hingga akhir titrasi. Smik dibuat sebanyak 30 ml dengan masing-masing bahan sebanyak 24 ml tween 80 dan 6 ml PEG 400. Proses homogenisasi menggunakan ultraturak dengan kecepatan 3000 hingga 4000 selama  $\pm$  45 menit. Nanoemulsi dibuat dengan campuran antara smik, minyak biji labu kuning dan aquades. Perbandingan minyak biji labu kuning yang digunakan yaitu 8% dan 16%. Pembuatan nanoemulsi berdasarkan formula berikut:

**Tabel 3. 1 Formula Smik (Tween 80 dan PEG 400)**

<b>Bahan</b>	<b>Formu la 4:1</b>	<b>Formu la 5:1</b>
Tween 80	24 ml	25 ml
PEG 400	6 ml	5 ml
<b>Jumlah</b>	<b>30 ml</b>	<b>30 ml</b>

Sumber (Handayani *et al.*, 2005)

Berdasarkan hasil tabel 3.1, dilakukan optimasi untuk pembuatan nanoemulsi minyak biji labu kuning dengan komposisi sebagai berikut bersumber (Widyastuti & Saryanti, 2023):

**Tabel 3. 2 Formulasi Nanoemulsi**

<b>Bahan</b>	<b>Nanoemulsi (g)</b>			
	<b>F1.1</b>	<b>F1.2</b>	<b>F 2.1</b>	<b>F 2.1</b>
Minyak biji labu kuning	1,6	3,2	1,6	3,2
Smik (4:1)	6,8	0,8	-	-
Smik (5:1)	-	-	6,8	0,8
Aquadest	ad 20	ad 20	ad 20	ad 20

Keterangan:

Smik : Tween 80 dan PEG 400

F 1.1. dan F 2.1 MBLK 8%

F 1.2 dan F2.2 MBLK 16%

Minyak biji labu kuning ditambahkan dengan smik dihomogenkan menggunakan ultraturak pada kecepatan 3000 hingga 4000 rpm selama  $\pm$  45 menit. Aquadestilat dimasukkan sedikit demi sedikit dengan menggunakan pipet tetes pada campuran minyak biji labu kuning dengan smik dihomogenkan hingga terbentuk nanoemulsi dan diuji karakteristik fisik.

### 3. Uji karakteristik fisik nanoemulsi

#### a. Uji Transmittan

Sampel sebanyak 1 ml yang digunakan dilarutkan dalam aqua ad 100 ml, diukur transmittannya menggunakan panjang gelombang 650 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Blanko yang digunakan adalah aqua pada saat pengujian. Hasil transmittansi pada formulasi yang memiliki nilai persen 90-100% menunjukkan bahwa formula-formula tersebut memiliki penampakan visual yang jernih dan transparan (Lina *et al.*, 2017a).

#### b. Uji Sentrifugasi

Sampel sebanyak 10 ml nanoemulsi dimasukkan dalam tabung sentrifugasi, kemudian disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 3.000 rpm (Setyopratiwi *et al.*, 2022).

#### c. Uji Ukuran Partikel

Ukuran partikel diukur menggunakan PSA (*Particle Size Analyzer*). Sampel nanoemulsi sebanyak 4 ml dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dimasukkan ke dalam sampel holder dan dianalisis oleh instrument PSA (Jayanti & Brier, 2020).

#### d. Uji Indeks Polidispersitas

Pengujian indeks polidispersitas menggunakan PSA (*Particle Size Analyzer*). Sampel sebanyak 4 ml diambil dan dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diletakkan ke dalam sampel holder dan

dianalisis oleh instrument dan diukur indeks polidispersitas (Jayanti & Brier, 2020).

e. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH universal. Pada kertas pH ditetesi sampel dari nanoemulsi serta diamati perubahan warna. Pengamatan dilakukan visual pada kertas pH dengan spektrum warna serta nilai pH pada alat (Leboe, 2020).

Hasil uji karakteristik fisik nanoemulsi berupa pH, ukuran partikel, indeks polidispersitas dan sentrifugasi paling optimal, akan digunakan sebagai bahan aktif untuk formulasi krim nanoemulsi.

4. Pembuatan krim nanoemulsi

Formula krim nanoemulsi minyak biji labu kuning pada pengujian ini mengadopsi dari penelitian yang dilakukan oleh (Mailana, 2016).

**Tabel 3. 3 Formula Krim Nanoemulsi Minyak Biji Labu Kuning**

<b>Komposisi</b>	<b>F1 (gram)</b>	<b>F2 (gram)</b>	<b>Fungsi</b>
Nanoemulsi MBLK	0,5	1	Zat Aktif
Asam stearate	18,74	18,74	Emulgator
Tween 80	5,11	5,11	Surfaktan
Span 80	0,25	0,25	Surfaktan
Setil alcohol	4	4	Emulgator
Gliserin	12	12	Humektan
TEA	0,09	0,09	Emulgator
Metil paraben	0,20	0,20	Pengawet
Propil paraben	0,02	0,02	Pengawet
Aquades ad	100	100	Pelarut

Keterangan :

MBLK : minyak biji labu kuning

Fase minyak dibuat dengan cara melarutkan asam stearat, setil alkohol, span 80 dan propil paraben dalam cawan porselin suhu 70°C diaduk hingga

homogen. Fase air dibuat dengan air yang dipanaskan hingga 70°C ditambahkan metil paraben hingga terlarut. gliserin, tween 80 dan TEA diaduk hingga homogen. Fase minyak ditambahkan dalam fase air dan dihomogenkan dengan ultraturak kecepatan 2000 rpm, ditambahkan nanoemulsi minyak biji labu kuning hingga terbentuk massa krim (Mailana, 2016).

#### 5. Uji karakteristik fisik krim nanoemulsi

##### a. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan dengan melakukan pengamatan pada sampel secara langsung sifat fisik dari sampel mulai dari warna, bau serta tekstur (Lumentut *et al.*, 2020).

##### b. Uji Homogenitas

Sampel dioleskan tipis pada kaca objek lalu ditimpa dengan kaca objek lain, selanjutnya dilakukan pengamatan homogenitas yang ditandai dengan ada atau tidaknya partikel kasar dari sampel (Sayuti, 2015).

##### c. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH universal. Pada kertas pH ditetesi sampel dari krim nanoemulsi serta diamati perubahan warna. Pengamatan dilakukan visual pada kertas pH dengan spektrum warna serta nilai pH pada alat (Leboe, 2020).



d. Uji Daya Sebar

Krim ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian diletakkan ditengah alat daya sebar dan diberikan beban 50 gram sampai 250 gram setiap 1 menit, standar daya sebar krim yaitu 5 cm – 7 cm (Lumentut *et al.*, 2020). Pengujian dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali.

e. Uji Daya Lekat

Krim ditimbang sebanyak 250 gram dioleskan pada plat kaca dan diberi beban sebanyak 1 kg selama 5 menit. Beban diangkat kemudian dicatat waktu sampai kedua plat terlepas, nilai standar daya lekat krim yaitu lebih dari 4 detik (Lumentut *et al.*, 2020). Pengujian dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali.

f. Viskositas

Pengukuran viskositas menggunakan viskometer Brookfield. Sebanyak 100 gram krim dimasukkan ke dalam *cup*, dipasang spindle dengan ukuran 64. Kemudian dijalankan rotor dengan kecepatan 10 rpm selama 1 menit. Persyaratan untuk nilai viskositas krim adalah 2000-50000 cps (Astatik 2010).

g. Sentrifugasi

Krim nanoemulsi minyak biji labu kuning dimasukkan ke tabung sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Hasil diamati terjadi pemisahan fase sediaan krim yang diuji (Erwiyani *et al.*, 2021).

#### h. Tipe Emulsi

Penentuan tipe emulsi ditetapkan dengan menambahkan reagen methylene blue. Formula nanoemulsi dipreparasi di objek glass, kemudian ditetesi dengan methylene blue dan tipe emulsi diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40 kali. Methylene blue akan terlarut ke dalam fase air, jika medium dispersi berwarna biru merata maka emulsi krim bertipe minyak dalam air (M/A) (Astuti *et al.*, 2020).

### 6. Uji Aktivitas Tabir Surya

#### a. Pengujian nilai SPF minyak biji labu kuning

Minyak biji labu kuning ditimbang sebanyak 40 mg dan ditambahkan 4 ml etanol pa. Absorbansinya diukur menggunakan alat spektrofotometer dengan spektrum absorbansi pada kisaran 290 nm hingga 320 nm setiap interval 5 nm (Ismail *et al.*, 2014).

#### b. Pengujian nilai SPF nanoemulsi minyak biji labu kuning

Nanoemulsi minyak biji labu kuning dengan perbandingan smik 4:1 dengan konsentrasi minyak biji labu kuning 8% (1,6 g) diambil sebanyak 40 ml ditambahkan etanol pa 4 ml. Pengukuran dilakukan pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 290 nm - 320 nm. pembacaan dilakukan pada absorbansi yang diperoleh (Ismail *et al.*, 2014).

c. Pengujian nilai SPF krim nanoemulsi Formula 1 dan 2

Krim formula 1 dengan konsentrasi nanoemulsi 0,5 g diambil sebanyak 40 ml dan dilarutkan dalam etanol 4 ml. Pembacaan dilakukan pada panjang gelombang 290 nm - 320 nm pada spektrofotometer dengan interval setiap 5 nm (Ismail et al., 2014). Nilai SPF dihitung menggunakan metode Mansur (Cahyani et al., 2021).

## H. Analisis Data

Hasil evaluasi karakteristik fisik sediaan meliputi organoleptis, homogenitas, sentrifugasi, dan tipe emulsi yang disajikan secara deskriptif. Analisis data yang dilakukan secara *statistic* diantaranya uji pH, uji daya sebar, uji daya lekat, viskositas, nilai SPF menggunakan *software Statistical Product and Service Solutions (SPSS) versi 26*. Uji normalitas dilakukan dengan *Shapiro-Wilk* karena data  $\leq 30$ . Pengujian homogenitas menggunakan *Levene Statistic*. Data terdistribusi normal menggunakan uji *parametric One way Anova* dan jika tidak terdistribusi tidak normal maka uji dilakukan dengan *Non Parametrik* menggunakan uji *Kruskal Wallis* dan uji *Mann Whitney*.

