

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental yaitu pemanfaatan minyak bunga Calendula (*Calendula officinalis*) yang diformulasikan sebagai nanoemulsi gel yang diukur nilai SPF sebagai sediaan tabir surya. Pembuatan sediaan nanoemulsi gel menggunakan minyak bunga calendula dengan konsentrasi 3%, 5%, dan 7%. Karakteristik fisik nanoemulsi gel minyak bunga calendula dianalisis melalui parameter organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, dan daya lekat. Uji stabilitas dilakukan menggunakan metode *Cycling Test* sebanyak 6 siklus selama 12 hari.

B. Lokasi Penelitian

1. Skrining fitokimia minyak bunga calendula dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo.
2. Formulasi sediaan nanoemulsi gel, uji karakteristik, dan uji aktivitas nilai SPF (*Sun Protection Factor*) sediaan nanoemulsi gel dilakukan di Laboratorium Teknologi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan pada penelitian ini adalah minyak bunga Calendula (*Calendula officinalis*). Sampel minyak bunga calendula dengan COA didapatkan dari toko Master Sun Chemical.

D. Definisi Operasional

1. Nanoemulsi minyak bunga calendula dibuat dari 2 fase yaitu fase minyak yang berupa minyak bunga calendula, dan fase air yang terdiri dari tween 80 dan PEG 400.
2. Karakteristik nanoemulsi minyak bunga calendula meliputi uji ukuran partikel, uji indeks polidispersitas (PDI), dan uji % transmitan.
3. Formulasi tabir surya nanoemulsi gel minyak bunga calendula dibuat menggunakan nanoemulsi minyak bunga calendula sebagai zat aktif dengan konsentrasi F1 sebesar 3%, F2 sebesar 5%, dan F3 sebesar 7%.
4. Karakteristik fisik nanoemulsi gel minyak bunga calendula terdiri dari uji organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya lekat.
5. Uji stabilitas nanoemulsi gel minyak bunga calendula dilakukan dengan metode *Cycling Test* sebanyak 6 siklus yang dilakukan selama 12 hari.
6. Aktivitas tabir surya secara *in vitro* adalah penentuan nilai SPF formula *sunscreen* gel nanoemulsi minyak bunga calendula dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis yang kemudian dihitung berdasarkan persamaan Mansur.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi minyak bunga calendula dalam sediaan nanoemulsi gel.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah karakteristik fisik nanoemulsi gel meliputi organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya lekat, serta nilai SPF.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah suhu, waktu, dan kelembaban.

F. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang akan digunakan pada pembuatan nanoemulsi gel minyak bunga calendula adalah *rotary evaporator* (IKA), *spektrofotometri UV-1900* (SHIMADZU), timbangan analitik (OHAUS), *climatic chamber* (memmert), *ultra turax* (IKA), viskometer (*Brookfield DV2T*), pH meter (OHAUS), *Particle Size Analyzer* (PSA) (Malvern), pipet tetes, tabung reaksi (Iwaki), batang pengaduk, beaker glass 100 mL, beaker glass 250 mL, beaker glass 500 mL, krus porselen, beaker glass (Iwaki), wadah gel.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada pembuatan nanoemulsi gel adalah Minyak Bunga Calendula, Tween 80, PEG 400, HPMC, metilparaben, propil paraben, *oleum rosae*, aquadest.

G. Prosedur Kerja

1. Skrining Fitokimia

a. Alkaloid

pengujian alkaloid dilakukan dengan menggunakan sampel minyak bunga calendula diambil 1 mL kemudian ditambahkan dengan 8 tetes H_2SO_4 2N dan juga 3 tetes reagen dragendroff (Puspa *et al.*, 2017). Pada pengujian alkaloid, apabila sampel positif mengandung alkaloid, maka akan ditemukan perubahan warna menjadi jingga atau kuning.

b. Fenolik

Pada uji fenolik dilakukan dengan mengambil 1 mL sampel minyak bunga calendula kemudian ditambahkan 1 tetes FeCl_3 1% (Putri *et al.*, 2019). Apabila sampel positif mengandung senyawa fenolik, maka akan terbentuk endapan coklat sapada sampel.

c. Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan menggunakan sampel minyak bunga calendula yang diambil 1 mL kemudian ditambahkan 2 tetes asam sulfat pekat (H_2SO_4). Apabila sampel positif mengandung senyawa flavonoid, maka akan dihasilkan warna kuning, jingga, atau kemerahan pada sampel (Ropiqa *et al.*, 2023).

d. Steroid

Minyak bunga calendula sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 2 tetes larutan asam asetat

glasial. Warna larutan yang berubah biru atau ungu menandakan adanya senyawa steroid(Puspa *et al.*, 2017).

e. Saponin

Minyak bunga calendula sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air (H₂O). Larutan dikocok selama 30 detik. busa yang terbentuk menunjukkan adanya saponin (Puspa *et al.*, 2017).

f. Tanin

Minyak bunga calendula sebanyak 1 mL ditambahkan FeCl₃ 1%, adanya tanin ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan (Afifah Rukmini, 2020).

2. Formulasi Nanoemulsi Minyak Bunga Calendula

Formulasi yang digunakan mengacu pada penelitian sebelumnya (Priani *et al.*, 2024). Formula yang digunakan terdapat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Formula Nanoemulsi Minyak Bunga Calendula

Bahan nanoemulsi	Formula (%)		
Minyak bunga calendula	3	5	7
Tween 80	40	40	40
PEG 400	20	20	20

(Priani *et al.*, 2024)

Pembuatan nanoemulsi dilakukan dengan metode energi tinggi, yaitu dengan mencampurkan minyak bunga calendula, tween 80, dan PEG 400. Campuran dihomogenkan menggunakan alat *ultra turax* pada kecepatan 3000 rpm selama 60 menit. Setelah proses selesai, nanoemulsi yang dihasilkan akan diuji ukuran partikel dan indeks polidispersitasn (PDI) dan juga uji % transmitan.

3. Evaluasi Karakteristik Nanoemulsi

a. Uji ukuran partikel dan indeks polidispersitas (PDI)

Pengujian menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA), sebanyak 3 mL sediaan nanoemulsi dimasukkan ke dalam kuvet untuk tempat sampel, kemudian dilakukan pengukuran ukuran globul dan PDI dilakukan untuk mengetahui kekentalan sediaan nanoemulsi (Nurhidayati, 2020).

b. Uji % Transmitan

Uji % transmitan dilakukan dengan cara mengambil 1mL sediaan nanoemulsi kemudian dimasukkan kedalam labu takar 10mL. Uji % transmitan dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang yang digunakan 650 nm dengan aquades sebagai blanko saat pengujian (Siqhny *et al.*, 2020).

4. Formulasi Nanoemulsi Gel

Formula yang digunakan mengacu pada penelitian sebelumnya (Akbar *et al.*, 2021), formula yang digunakan terdapat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Formula Nanoemulsi Gel

Komponen	Kadar (%)		
	F1	F2	F3
Minyak bunga calendula	3	5	7
Tween 80	40	40	40
PEG 400	20	20	20
HPMC	0,1	0,1	0,1
Metilparaben	0,18	0,18	0,18
Propilparaben	0,02	0,02	0,02
<i>Oleum Rosae</i>	0,5	0,5	0,5
Aquadest ad	100	100	100

(Akbar *et al.*, 2021)

Pembuatan sediaan nanoemulsi menggunakan tween 80, PEG 400, dan minyak bunga calendula yang dihomogenkan menggunakan *ultra turax* sehingga didapatkan nanoemulsi yang jernih. Pembuatan sediaan gel menggunakan bahan HPMC yang didispersikan menggunakan aquadest panas untuk mengembangkan *gelling agent* sehingga terbentuk koloid dalam wadah A. Metilparaben, propil paraben dicampurkan dalam wadah B. Campuran wadah A dimasukkan kedalam wadah B diaduk hingga homogen, setelah homogen, dimasukkan kedalam sediaan nanoemulsi secara perlahan dan dihomogenkan menggunakan *ultra turax*.

4. Evaluasi Karakteristik Fisik Nanoemulsi Gel

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati sediaan nanoemulsi gel meliputi bau, warna dan bentuk.

b. Uji pH

Pengujian pH dilakukan untuk menentukan tingkat keasaman sediaan gel, sehingga dapat dipastikan bahwa sediaan tersebut tidak menyebabkan iritasi pada kulit. Sebanyak 1 gram sampel sediaan gel ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL air suling didalam *beaker glass*. Setelah larutan benar-benar homogen, elektroda pH meter dimasukkan kedalam *beaker glass* yang berisi sampel. Tombol baca pada pH meter ditekan, dan proses pengukuran akan berlangsung hingga angka pada layar pH meter stabil. Berdasarkan SNI 16-3499-

1996, pH sediaan gel yang sesuai untuk kulit berada dalam rentang 4,5-8 (Wahidah *et al.*, 2024).

c. Uji Viskositas

Sejumlah 100 gram nanoemulsi gel dimasukkan kedalam beaker glass, diukur viskositas menggunakan alat *viskometer brookfield* dengan menggunakan spindle no 64 dengan kecepatan 30 rpm. Pembacaan skala dilakukan ketika jarum yang bergerak telah stabil (Kusuma *et al.*, 2018). Nilai viskositas yang baik berkisar antara 500-10.000 cPs (Dwi Oktaviani *et al.*, 2023).

d. Uji Daya Lekat

Sebanyak 0,5 gram sediaan gel ditimbang di atas kaca objek, lalu ditutup dengan kaca objek lainnya. Beban seberat 50 gram diletakkan di atas kaca penutup selama 5 menit. Pada kedua ujung kaca objek dipasang penjepit. Setelah 5 menit, beban diangkat, dan tuas pada alat uji daya lekat ditarik. Waktu yang diperlukan hingga kedua kaca objek terpisah dicatat sebagai waktu daya lekat sediaan (Rochman *et al.*, 2024).

e. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan gel pada kaca objek yang kemudian ditutup dengan kaca objek lainnya. Apabila tidak ditemukan butiran kasar, maka sediaan gel dikatakan homogen (Murdiana *et al.*, 2022).

5. Uji Stabilitas (*Cycling Test*)

Cycling Test dilakukan dengan cara sediaan gel ditempatkan pada suhu 4°C selama 24 jam di dalam alat *climatic chambe*, kemudian dilanjutkan pada suhu 40°C selama 24 jam berikutnya di dalam alat *climatic chamber*. Perlakuan ini disebut sebagai 1 siklus. Pengujian dilakukan sebanyak 6 siklus. Setelah 6 siklus, sediaan nanoemulsi gel dilakukan uji karakteristik fisik kembali meliputi organoleptis, pH, daya lekat, viskositas, dan juga homogenitas (Affandy *et al.*, 2021).

6. Uji Aktivitas Tabir Surya

Uji nilai SPF dilakukan dengan cara mengkalibrasi spektrofotometri UV-vis dengan blanko etanol pro analisa (Sari, 2024). Sebanyak 0,5 gram dari masing-masing sediaan nanoemulsi gel minyak bunga calendula dilarutkan hingga homogen dalam 10 mL etanol p.a dalam labu ukur 10 mL. Kalibrasi spektrofotometri dengan menggunakan etanol p.a, lalu dibuat kurva serapan uji dalam kuvet dengan panjang gelombang 290-320 nm dengan interval 5 nm. Etanol p.a digunakan sebagai blanko, kemudian hasil absorbansi dihitung nilai SPFnya (Seto *et al.*, 2024). Rumus uji SPF :

$$\text{SPF spectrophotometric} = \text{CF} \times \sum \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

Keterangan :

CF : Faktor koreksi

Abs : Absorbansi sampel

EE : efektivitas eritema yang disebabkan sinar UV pada panjang gelombang λ nm

I : intensitas sinar UV pada panjang gelombang λ nm

(D. E. M. Sari & Fitrianingsih, 2020)

f. Analisis Data

Dalam penelitian ini, data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif mencakup pengujian karakteristik fisik seperti parameter organoleptik, pH, homogenitas, daya lekat, dan viskositas. Berdasarkan hasil karakteristik fisik tersebut, dilakukan uji stabilitas fisik menggunakan metode *Cycling test* dengan variasi konsentrasi minyak bunga calendula. Perbandingan dilakukan antara kondisi awal dan akhir setelah *Cycling test*, dengan mengacu pada standar karakteristik fisik yang baik untuk sediaan nanoemulsi gel, meliputi parameter pH, tekstur, warna, bau, bentuk, dan homogenitas. Selanjutnya, analisis statistik dilakukan menggunakan SPSS versi 25 untuk menguji normalitas, homogenitas, dan ANOVA. Jika hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Selain itu, dilakukan perbandingan sebelum dan setelah *Cycling Test* menggunakan *Paired Sample T-Test* guna mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan setelah uji stabilitas. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi minyak bunga calendula yang optimal dalam formulasi tabir surya nanoemulsi gel, sehingga dapat memenuhi persyaratan sebagai sediaan topikal yang sesuai.