

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental (*experimental*). Penelitian eksperimen adalah penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendali, kondisi yang terkendali di maksud adalah adanya hasil dari penelitian dikonversikan ke dalam angka-angka, untuk analisis yang digunakan adalah dengan menggunakan analisis statistik data (Sugiyono, 2011:72)

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### 1. Lokasi Penelitian

- a. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- b. Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Universitas Diponegoro Semarang.
- c. Pengujian kadar flavonoid total dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

##### 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2020 - Maret 2020

### C. Definisi Operasional Variabel

#### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas yaitu faktor yang menjadi pokok permasalahan yang ingin diteliti atau penyebab utama suatu gejala. Variabel bebas pada penelitian ini ialah sediaan emulgel ekstrak etanol buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.). Konsentrasi yang digunakan pada penelitian yaitu 0,5%, 1,5%, 3% b/b (Mahdi et al., 2018).

#### 2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah variabel bebas yang diberikan dan diukur untuk menentukan ada tidaknya pengaruh. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu :

##### a. Stabilitas Fisik

- 1) Organoleptis : pengamatan terhadap warna, bau, tekstur dan homogenitas.
- 2) Homogenitas : kemampuan mengetahui homogenitas bahan aktif sediaan ekstrak buah labu kuning. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar pada sediaan.
- 3) pH : derajat keasaman yang digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan yang dimiliki oleh suatu larutan.
- 4) Daya sebar : kemampuan emulgel menyebar pada kulit, sehingga diharapkan emulgel mudah menyebar tanpa menggunakan penekanan yang berlebihan. Semakin besar daya sebar, luas permukaan kulit yang kontak dengan emulgel akan semakin luas.

- 5) Daya lekat : kemampuan lamanya daya lekat sediaan emulgel buah labu kuning pada kulit. Semakin kental konsistensinya maka waktu untuk memisahkan objek gelasnya semakin lama.
- 6) Viskositas : kemampuan konsistensi suatu sediaan yang berpengaruh pada penggunaannya secara topical.
- 7) Sentrifugasi : proses pemisahan campuran yang dilakukan dengan memanfaatkan gaya sentripetal.

b. Kelembaban Kulit : kondisi yang dipengaruhi oleh kadar air dalam kulit. Apabila tingkat kelembapan kulit rendah atau kadar air tidak adekuat dapat menyebabkan kulit kering atau *xerosis cutis*.

### 3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali adalah faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian yaitu suhu, tanaman yang diperoleh dari daerah yang sama, waktu, bahan, kondisi keadaan laboratorium.

## **D. Prosedur Penelitian**

### 1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau, blander, kain flanel, kain hitam, hotplate stirer, pot salep, sendok tanduk, batang pengaduk, arlogi glass, objek glas, seperangkat gelas, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, cawan porselin, pH meter, *waterbath*, tabung sentrifuge, sentrifugator, neraca analitik, rotary evaporator, stopwatch dan alat *skin analyzer moisturizer*.

Bahan yang digunakan adalah ekstrak buah Labu kuning (*Cucurbita maxima* D), carbomer 940, span 60 , tween 60, Setil alcohol, paraffin cair (Merck), TEA, propilen glikol, aquadest (CV.Bratachem), metil paraben, propil paraben.  $FeCl_3$  (Merck).

## 2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dari buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan utama penelitian dan mencegah kemungkinan tercampur dengan tanaman lain.

## 3. Penyiapan Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) yang diperoleh dari daerah Kopeng, Kabupaten Salatiga, Jawa Tengah. Buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) yang dipilih merupakan buah yang matang berwarna kuning jingga / orange. Daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) yang segar dikupas kulitnya dan bijinya dibuang, kemudian daging buah labu kuning dipotong kecil – kecil jika dibelah akan terlihat penampang yang berbentuk bintang, lalu dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan lalu dikeringkan dengan cara dibawah sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutup kain berwarna hitam agar kandungan flavonoid pada buahnya tidak rusak oleh sinar matahari. Sampel yang telah dikeringkan dihaluskan sampai menjadi serbuk yang halus.

#### 4. Ekstraksi Buah Labu Kuning (*Cucurbita maxima* D.)

Serbuk daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Tahap pertama dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 900 gram simplisia. Pelarut ditambahkan dengan perbandingan 1:10 yaitu 900 gram simplisia : 5000 ml pelarut etanol 96%. Pelarut pertama sebanyak 6750 ml dan sisanya 2250 ml untuk remaserasi. Ekstraksi dilakukan selama 3x24 jam dengan pengadukan secara berkala dalam ruangan yang terlindung dari sinar matahari kemudian diaduk hingga seluruh serbuk kasar terbasahi merata dengan pelarut.

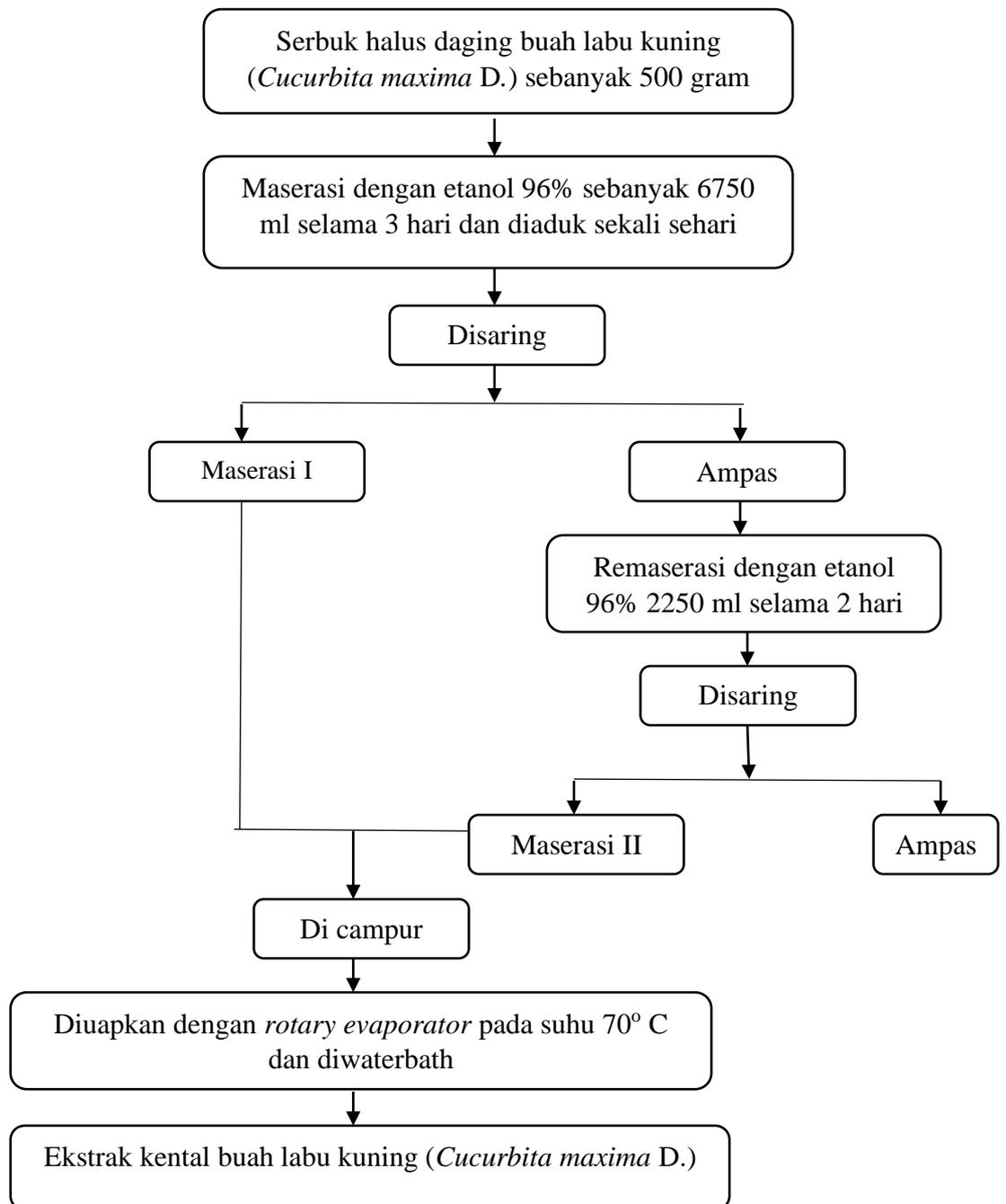
Ekstrak etanol yang diperoleh dari maserat pertama disaring menggunakan kain flanel, setelah dilakukan penyaringan maserat pertama maka dilanjutkan dengan remaserasi. Remaserasi menggunakan sisa dari pelarut etanol 96% yaitu 2250 ml, kemudian maserat dipindah dalam bejana tertutup dibiarkan ditempat sejuk dan terlindung dari sinar matahari selama 2 hari dengan dilakukan pengadukan sehari sekali. Maserat pertama dan maserat kedua diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 70°C, kemudian diwaterbath hingga diperoleh ekstrak kental dan hitung rendemen ekstrak.

Perhitungan Rendemen :

Berat serbuk simplisia yang diekstrak : A (gram)

Berat ekstrak yang didapat : B (gram)

$$\text{Rendemen} = \frac{B}{A} \times 100\% = x$$



**Gambar 3.1** Skema proses Ekstraksi Daging Buah Labu Kuning (*Cucurbita maxima* D.)

## 5. Uji Identifikasi Senyawa

### a. Uji Kuantitatif

Pengujian tersebut dilaksanakan di Laboratorium Kimia di Universitas Ngudi Waluyo.

### b. Uji Kualitatif

Penyiapan fase diam Silica gel GF 254/ plat KLT terlebih dahulu diaktifkan dengan oven pada suhu 110° C selama 30 menit sebelum dilakukan penotolan sampel. Fase gerak yang digunakan BAA yaitu butanol:asam asetat :air dengan perbandingan 2:1:1 dengan panjang plat 12 cm dan batas penotolan 1 cm atas dan bawah plat. Eluen yang digunakan sebanyak 5 ml dan dijenuhkan selama 30 menit.

Sebelum dilakukan penotolan ekstrak kental buah labu kuning terlebih dahulu dilarutkan dengan menggunakan etanol 96% agar konsistensi dari ekstrak yang kental menjadi sedikit cair, kemudian baru ditotolkan pada plat dengan menggunakan pipa kapiler. Pereaksi semprot yang digunakan pada uji ini adalah uap ammonia, FeCl<sub>3</sub> 5%, Sitroborat kemudian dilakukan pengamatan pada sinar lampu UV 254 nm dan UV 366 nm (Marliana et al., 2005). Berdasarkan buku Harborne (1996) disebutkan bahwa nilai RF flavonoid berkisar 0.28-0.83 yang menegaskan adanya kandungan flavonoid.

## 6. Formulasi Emulgel

### a. Pembuatan emulsi

Fase minyak dibuat dengan cara meleburkan cetil alkohol, nipasol, paraffin cair dan span 80 secara berturut-turut (berdasarkan titik lebur bahan) dalam cawan porselin diatas hot plate hingga suhu 70<sup>0</sup>C. Fase air dibuat dengan cara mencampur nipagin (dilarutkan dengan air mendidih), tween 80 dan aquadest pada suhu 80<sup>0</sup>C Fase minyak dituang ke dalam fase air, diaduk dengan homogenizer sampai terbentuk massa emulgel.

### b. Pembuatan Gel

Carbomer® 940 dihaluskan kemudian didispersikan dengan aquadest selama 1x24 jam. Setelah terdispersi, ditambahkan TEA sedikit demi sedikit sampai terbentuk basis gel yang jernih dan pH yang diinginkan.

### c. Pembuatan Emulgel

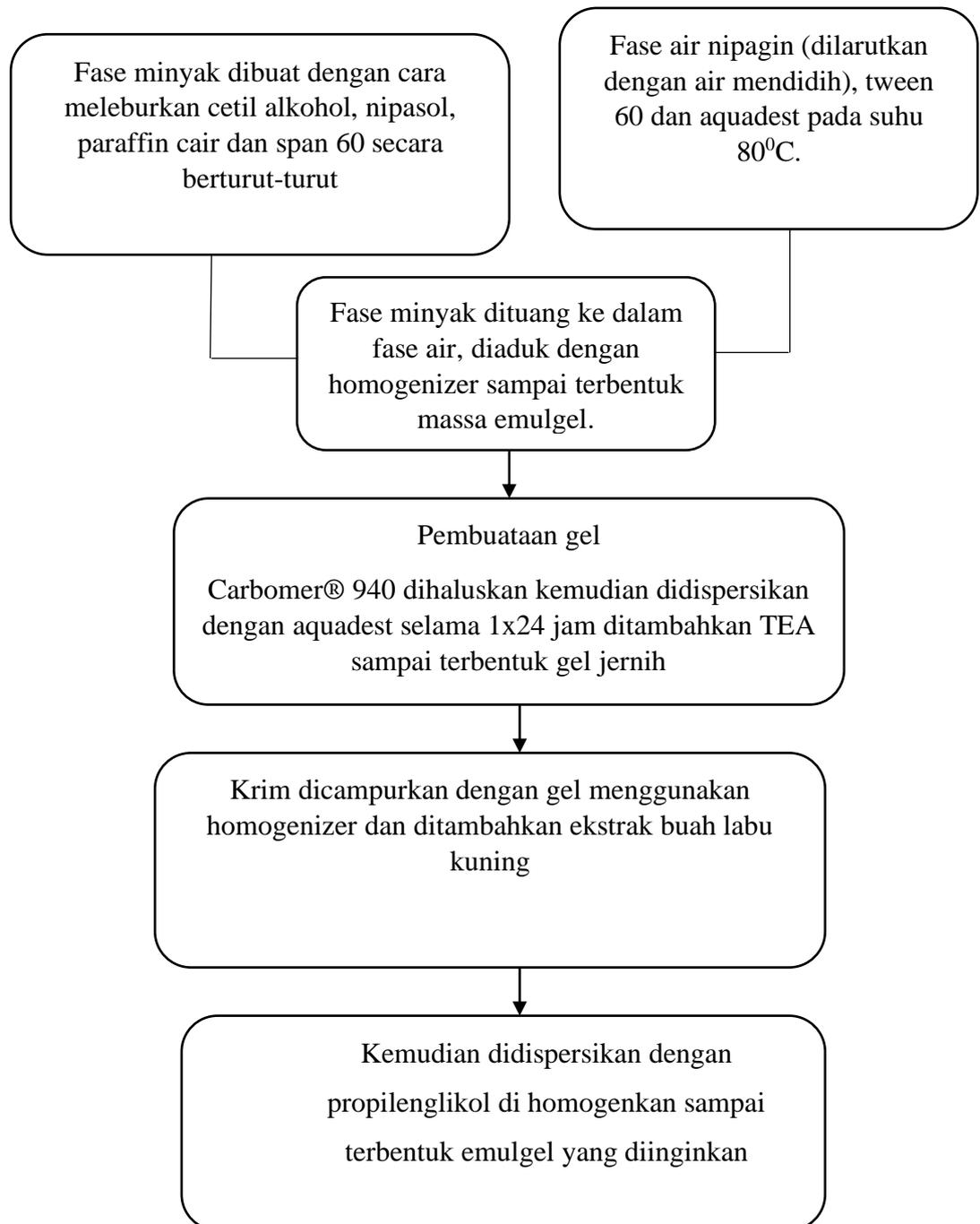
Emulgel dicampurkan dengan gel menggunakan homogenizer kemudian ditambahkan ekstrak buah labu kuning yang telah didispersikan dengan propilenglikol di homogenkan sampai terbentuk emulgel yang diinginkan.

Ringkasan formulasi emulgel dapat dilihat pada tabel 3.1 (Rizki et al.,2016).

**Tabel 3.1 Formulasi Emulgel Buah Labu Kuning**

No	Bahan	Konsentrasi %			
		F0	FI	FII	FIII
1.	Labu kuning	0%	0,5%	1,5%	3%
2.	Carbomer® 940	2	2	2	2
3.	Span 60	1,13	1,13	1,13	1,13
4.	Tween 60	3,87	3,87	3,87	3,87
5.	Minyak Zaitun	5	5	5	5
6.	BHT	0,01	0,01	0,01	0,01
7.	TEA	3	3	3	3
8.	Propilen Glikol	10	10	10	10
9.	Metil Paraben	0,18	0,18	0,18	0,18
10.	Propil Paraben	0,02	0,02	0,02	0,02
11.	Aquadest	ad 100	Ad 100	ad 100	ad 100

## 7. Pembuatan Sediaan Emulgel



## 8. Uji Stabilitas Fisik Emulgel

Uji stabilitas fisik dilakukan dengan mengujikan kestabilan emulgel pada penyimpanan selama 4 minggu. Uji stabilitas fisik penyimpanan yang diamati meliputi :

### a. Pengamatan Organoleptis

Pengamatan organoleptis sediaan emulgel meliputi pengamatan terhadap warna, bau, tekstur dan homogenitas (Faradiba et al., 2013).

### b. Uji pH

Emulgel ditimbang seberat 1 gram dan dilarutkan dengan 100 ml air kemudian diukur menggunakan pH meter. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter dan diletakkan pada tiga kondisi suhu berbeda yakni suhu kamar  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  dan  $40^{\circ}\text{C}$ . Sebelum dimasukkan ke dalam sediaan emulgel alat pH meter dikalibrasi menggunakan larutan standar buffer pada pH 7 dan pH 4 (Elya et al, 2013). Syarat mutu pH standar pelembab kulit menurut SNI 16-4399-1996 yaitu berkisar antara 4,0-8,0 (Yumas, 2016) dan kisaran pH normal kulit yaitu 4.5-6.5 (Wijaya et al., 2013).

### c. Uji Daya Lekat

Emulgel ditimbang 0,5 gram dan diletakkan diatas objek gelas, lalu diberikan beban 1 kg dan didiamkan selama 5 menit supaya emulgel dapat melekat pada objek gelas kemudian kedua ujung objek gelas dijepit dengan penjepit. Lama waktu hingga objek gelas terlepas. Pengukuran nilai daya lekat dilakukan pada tiga kondisi suhu berbeda

yakni suhu kamar 25<sup>0</sup>C, 2 – 8<sup>0</sup>C dan 40<sup>0</sup>C. Rentang nilai daya lekat sediaan emulgel yang baik adalah lebih dari satu detik (Azkiyaet al, 2017). Tujuan dilakukannya uji daya lekat untuk mengetahui lamanya daya lekat sediaan emulgel buah labu kuning pada kulit. Semakin kental konsistensinya maka waktu untuk memisahkan objek gelasya semakin lama.

d. Uji Daya Sebar

Emulgel sebanyak 0,5 gram ditimbang dan diletakkan ditengah alat kaca yang mula-mula sudah ditimbang bobotnya, kemudian diletakkan beban bertahap 50 gram sampai menjadi 200 gram, dibiarkan 1 menit. Diameter penyebaran emulgel diukur setelah 1 menit dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi. Rentang nilai daya sebar yang diinginkan untuk emulgel ini harus berada pada rentang 5–7 cm (Azkiya et al., 2017). Pengukuran nilai daya lekat dilakukan pada tiga kondisi suhu berbeda yakni suhu kamar 25<sup>0</sup>C, 2 – 8<sup>0</sup>C dan 40<sup>0</sup>C. Tujuan dilakukan uji daya sebar untuk mengetahui kemampuan emulgel menyebar pada kulit, sehingga diharapkan mudah menyebar tanpa menggunakan penekanan yang berlebihan. Semakin besar daya sebar, luas permukaan kulit yang kontak dengan emulgel akan semakin luas dan zat aktif akan terdistribusi dengan baik. Emulgel yang baik memiliki daya sebar yang besar sehingga dapat diaplikasikan dengan kulit luas tanpa penekanan (Azkiya et al., 2017).

e. Uji Viskositas

Pemeriksaan viskositas emulgel dilakukan dengan cara sebanyak 50 gram emulgel diukur secara langsung menggunakan alat *Viskometer Brookfield* dengan ukuran spindle no.64 dan kecepatan 100 rpm selama 1 menit. Viskositas dilihat dari skala alat setelah tercapai kestabilan dimana angka yang ditunjukkan konstan atau tidak berubah (Yassin, 2014). Viskositas optimum yang diisyaratkan SNI nomor 16-60 4399-1996 untuk sediaan emulgel adalah 2.000-50.000 cps. (Yusuf et al., 2018). Tujuan dilakukan uji viskositas untuk mengetahui konsistensi suatu sediaan yang berpengaruh pada penggunaannya secara topikal. Pengukuran nilai viskositas dilakukan pada tiga kondisi suhu berbeda yakni suhu kamar 25<sup>0</sup>C, 2 – 8<sup>0</sup>C dan 40<sup>0</sup>C.

f. Uji Sentrifugasi

Sampel emulgel sebanyak 10 gram masukkan ke dalam tabung sentrifugasi kemudian dimasukkan ke dalam alat sentrifugator. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Hal ini dilakukan karena perlakuan tersebut sama halnya dengan besarnya pengaruh gaya gravitasi terhadap penyimpanan emulgel selama setahun (Azkiya et al., 2017).

9. Uji Efektivitas Sediaan Emulgel

a. Uji Iritasi

Sukarelawan yang dijadikan panel pada uji iritasi berjumlah 20 orang dengan kriteria sebagai berikut:

- 1) Wanita berbadan sehat
- 2) Usia antara 20-30 tahun
- 3) Tidak ada riwayat penyakit yang berhubungan dengan alergi
- 4) Bersedia menjadi sukarelawan

Penelitian ini dilakukan dengan 5 perlakuan yang dibagi 4 orang pada tiap perlakuan. Sediaan sebanyak 500 mg dioleskan dibagian lengan bawah dengan diameter 3 cm dan dilakukan pengamatan. Permukaan kulit diamati untuk setiap perubahan yang terlihat seperti eritema (kemerahan) dan oedema (bengkak) selama 3 jam pertama kemudian dicuci dan dilanjutkan pengamatan pada jam ke 24, 48 dan 72 jam dari aplikasi formulasi (Bachhav, 2010).

Data yang diperoleh dianalisis untuk memperoleh indeks iritasi primer kulit (*primary irritation index/PII*) dengan rumus sebagai berikut:

$$PII = \frac{\text{jumlah semua nilai eritema dan oedema pada waktu pengamatan}}{\text{jumlah probandus} \times \text{jumlah waktu pengamatan}}$$

**Tabel 3.2 Kategori Nilai Keadaan Kulit(Barel et al., 2009).**

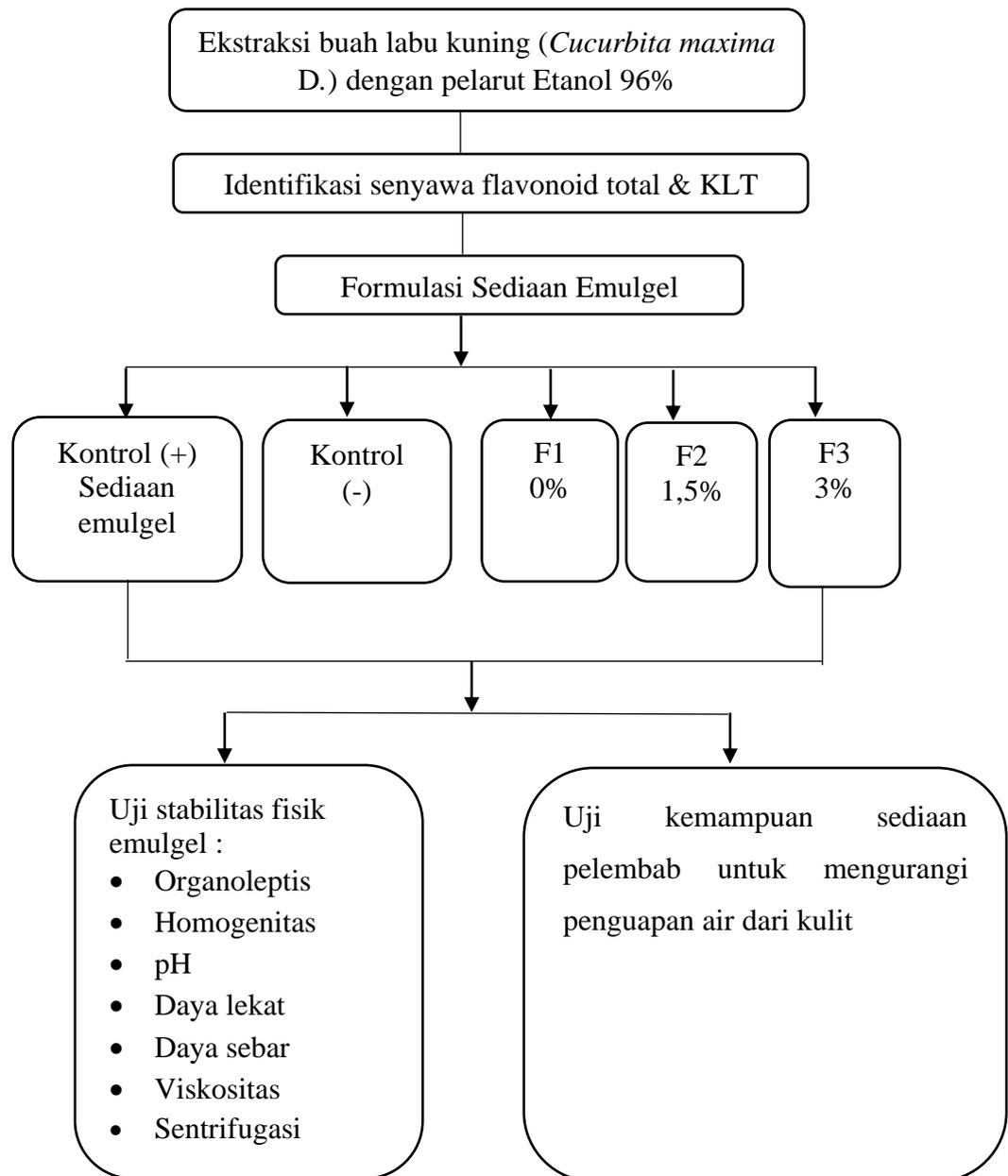
<b>Eritema</b>		<b>Oedema</b>	
Jenis	Nilai	Jenis	Nilai
Tidak ada eritema	0	Tidak ada oedema	0
Eritema sangat kecil (nyaris tidak terlihat)	1	Edema yang sangat ringan (nyaris tidak terlihat)	1
Eritema yang terdefinisi dengan baik	2	Oedema ringan (tepid dan pembesaran jelas)	2
Eritema sedang-berat	3	Oedema sedang (ketebalan >1 mm)	3
Eritema parah	4	Edema parah (meningkat > 1 mm dan memanjang di luar area paparan)	4

**Tabel 3.3 Kategori Respon Iritasi (Kuncari et al., 2015).**

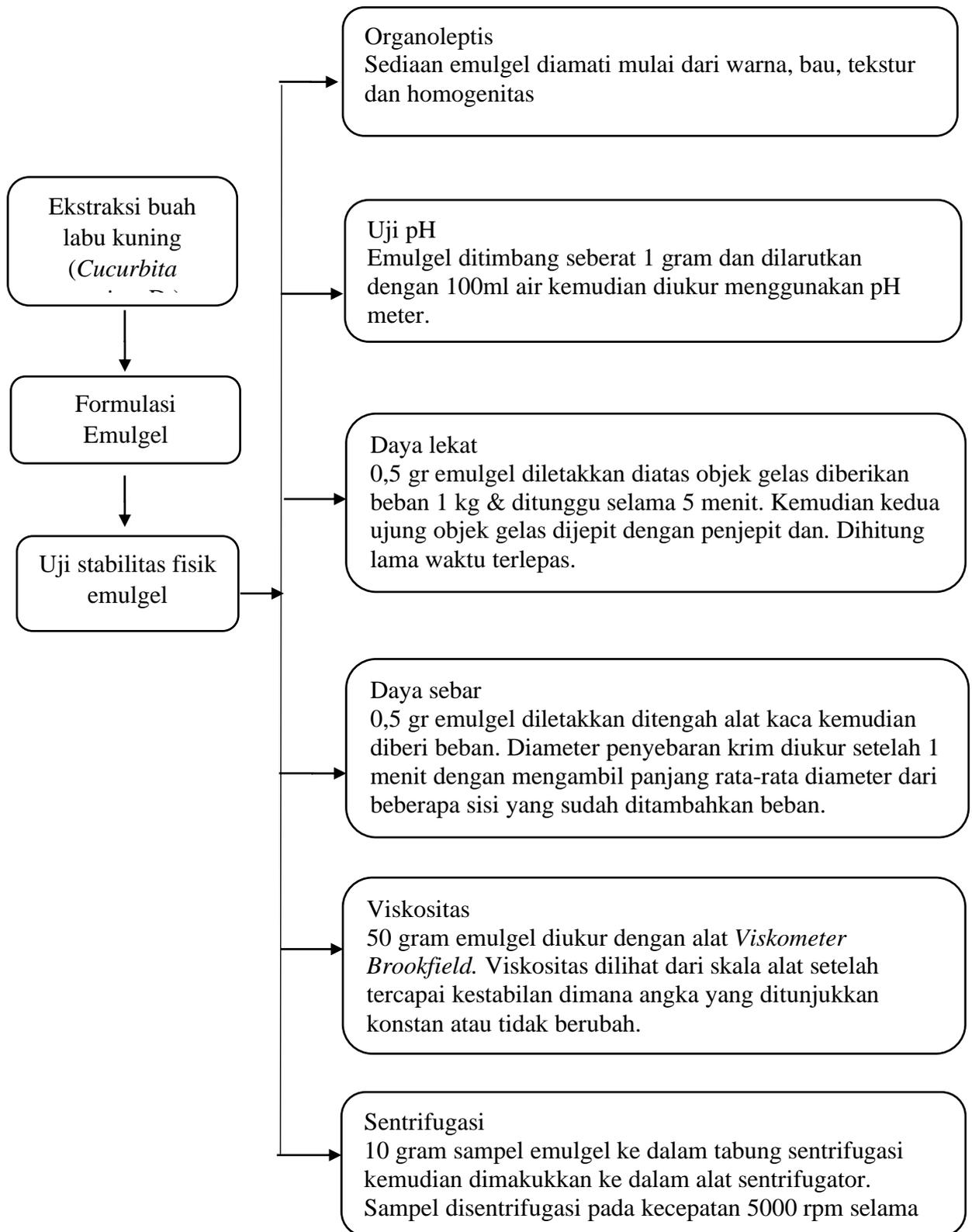
Kategori	Indeks Iritasi Primer
<b>Tidak berarti</b>	0-0.4
<b>Iritasi ringan</b>	0.5-1.9
<b>Iritasi sedang</b>	2.0-4.9
<b>Iritasi parah</b>	5.0-8.0

b. Uji Kemampuan Sediaan untuk Mengurangi Penguapan Air dari Kulit

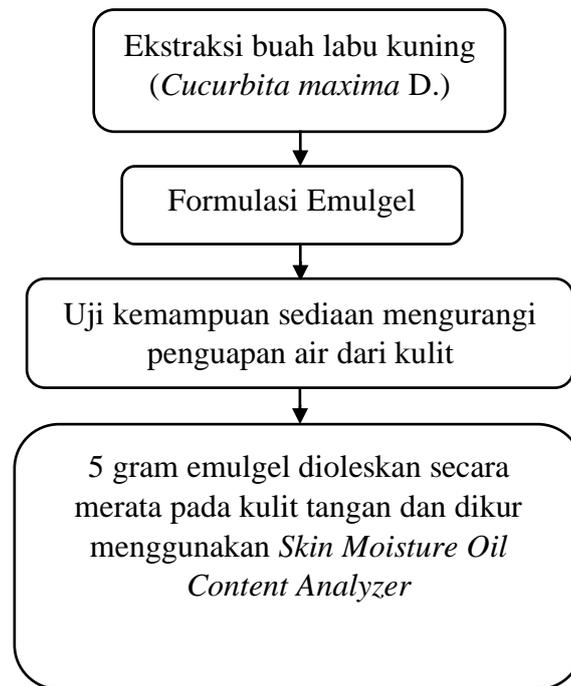
Sampel dengan berat 5 gram dioleskan merata diatas kulit tangan yang memiliki tekstur kulit yang kering, pecah-pecah dengan tingkatan ringan hingga sedang kemudian diukur menggunakan alat *Skin Moisture Oil Content Analyzer SK-8* pada hari ke-0 (*pre tes*) dan pada hari ke 14 (*post tes*). Nilai efektivitas kemampuan pelembab dapat dilihat dari kenaikan persentase kelembaban yang dihitung berdasarkan selisih nilai kelembaban yang dihasilkan pada alat *skin moisture analyzer* sebelum dan sesudah perlakuan dan dibandingkan dengan nilai kelembaban sebelum perlakuan pemberian sediaan.



**Gambar 3.3 Skema Prosedur Kerja Sediaan Emulgel**



**Gambar 3.4 Skema Uji Stabilitas Sediaan Emulgel**



**Gambar 3.5 Skema Uji Kemampuan Sediaan Emulgel**

#### **E. Analisis Data**

Dalam penelitian ini dilakukan analisis deskriptif melalui uji stabilitas dan uji efektivitas emulgel. Uji stabilitas meliputi uji pH, uji daya lekat, uji daya sebar, uji viskositas, dan uji sentrifugasi sedangkan untuk uji efektivitas meliputi Uji iritasi dan uji kemampuan sediaan emulgel dalam mengurangi penguapan pada kulit . Data dianalisa dengan perangkat lunak *SPSS 20*. Untuk mengetahui normalitas data menggunakan uji *Shapiro-wilk* karena jumlah sampel kecil (<50). Data dikatakan terdistribusi normal jika  $p > 0,05$  dan data dikatakan tidak terdistribusi normal jika  $p < 0,05$ . Pada uji kemampuan pelembab emulgel bahwa data dianalisis menggunakan uji paired t test untuk mengetahui hasil sebelum dan sesudah dilakukan tes pengolesan emulgel pada

kulit. Menurut Singgih (2014) bahwa jika nilai signifikansi  $< 0,05$  pada uji paired t test tersebut maka  $h_0$  ditolak dan  $h_a$  diterima yang mana terdapat perbedaan antara sebelum dilakukan tes dan sesudah dilakukan tes. Sebaliknya jika nilai signifikansi  $> 0,05$  maka  $h_0$  diterima dan  $h_a$  ditolak yang berarti tidak terdapat perbedaan antara sebelum tes dan setelah tes pengolesan emulgel.