

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 3 bulan yaitu bulan Januari-Maret 2024. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Bahan Alam Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (*ohaus*), oven (*dehydrator*), blender (*cosmos*), *waterbath* (*biobase*), gelas beaker (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), erlenmeyer (*pyrex*), corong kaca (*pyrex*), stick pH (*supelco*), kaca arloji, cawan porselen, batang pengaduk, kaca objek, pipet tetes, toples kaca, pisau, mortir dan stamper, sudip, kertas perkamen, spatula, penjepit tabung, tisu dan pot *lipbalm*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun bayam merah, kulit buah delima, cera alba (*Cv. Kimia Jaya Labora*), gliserin (*Cv. Kimia Jaya Labora*), aquades, lanolin (*Cv. Kimia Jaya Labora*), nipagin (*Cv. Kimia Jaya Labora*), *oleum cacao* (*Cv. Kimia Jaya Labora*), dan etanol 70% (*Cv. Nurul Jaya Medicallabsains*).

3.3 Rancangan Penelitian

Metode penelitian ini adalah eksperimental. Penelitian meliputi preparasi tanaman, determinasi tanaman, pembuatan ekstrak, uji parameter ekstrak, skrining fitokimia, pembuatan sediaan, evaluasi sediaan meliputi uji organoleptik, uji homogenitas, uji pH, uji daya oles, uji stabilitas, uji kesukaan, serta uji iritasi secara *in-vivo*.

Variabel pada penelitian ini yaitu:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang secara sengaja diubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini berupa konsentrasi kombinasi ekstrak daun bayam merah 3%, 2%, 1% dan ekstrak kulit buah delima 7%, 8%, dan 9%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dapat menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji sifat fisik sediaan *lipbalm* meliputi uji organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji daya oles, uji stabilitas, dan uji kesukaan.

3. Variabel Terkontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang sengaja dikendalikan atau dibuat konstan oleh peneliti sebagai usaha untuk meminimalisir bahkan menghilangkan pengaruh lain selain variabel bebas yang dimungkinkan mempengaruhi hasil variabel terikat. Pada penelitian ini variabel terkontrol yang digunakan yaitu metode maserasi ekstrak etanol daun bayam merah

dan kulit buah delima, cara pembuatan sediaan *lipbalm*, dan uji iritasi terhadap hewan uji kelinci.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Tanaman

Sampel yang digunakan adalah daun bayam merah dan kulit buah delima. Daun bayam merah diperoleh di daerah Jatilawang Kabupaten Banyumas, sedangkan untuk kulit buah delima diperoleh di daerah Kalisapu Kecamatan Slawi Kabupaten Tegal.

3.4.2 Determinasi Tanaman

Proses determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Fakultas Ilmu Kesehatan Program Studi Farmasi Program Sarjana Universitas Bhamada Slawi. Determinasi tanaman bertujuan untuk mengetahui kebenaran mengenai jenis tanaman yang akan diteliti, menghindari kesalahan dalam proses pengumpulan bahan serta menghindari kemungkinan terjadi tercampurnya tanaman yang akan diteliti dengan tanaman lain (Klau & Hesturini, 2021).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) segar sebanyak 5 kg dicuci bersih menggunakan air mengalir kemudian tiriskan lalu keringkan di bawah terik sinar matahari sampai kering kemudian diblender sampai halus. Sebanyak 500 gram serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan pelarut yang digunakan yaitu 1:4. Total pelarut etanol 70% yang digunakan 2000 ml dan dimaserasi selama 3x24 jam pada ruangan

bersuhu kamar dalam toples tertutup serta terlindung dari cahaya. Dilakukan pengadukan sehari sekali. Setelah proses ekstraksi selesai dilakukan penyaringan hingga di dapat ekstrak cair dan diuapkan di *waterbath* hingga diperoleh ekstrak yang kental (Basuki, Prihardini, dan Hesturini., 2023).

Sampel segar kulit buah delima (*Punica granatum* L.) yang telah diperoleh sebanyak 5 kg, dicuci bersih menggunakan air mengalir kemudian tiriskan lalu keringkan di bawah terik sinar matahari sampai kering. Kulit buah delima yang sudah kering kemudian di haluskan hingga menjadi serbuk simplisia. Serbuk simplisia kulit buah delima sebanyak 500 gram direndam dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:4. Total pelarut yang digunakan sebanyak 2000 ml lalu dimaserasi selama 5 hari pada ruangan bersuhu kamar dalam toples tertutup serta terlindung dari cahaya dengan dilakukan pengadukan sehari sekali. Setelah 5 hari sampel disaring dan diperas. Hasil maserat diuapkan dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kulit buah delima yang kental (Wahid, 2020).

3.4.4 Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci albino (*New Zealand*) jantan atau betina yang sehat dan dewasa dengan 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 kurang lebih 10 x 15 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 kebawah badan pada tiap sisi. Hewan yang digunakan untuk percobaan adalah hewan yang mempunyai kulit yang sehat (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2014).

3.4.5 Uji Parameter Ekstrak

1. Organoleptis

Setiap ekstrak diuji menggunakan panca indra terhadap bentuk (padat, kental, cair), warna (kehijauan, kecokelatan), bau (tidak berbau), dan rasa (tidak berasa, pahit, agak pahit) (Syukri et al., 2020).

2. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan menimbang 1 gram ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam alat *moisture balance* yang telah disetarakan kemudian dibaca hasil yang tertera pada layar (Deanggi, Saptawati, dan Ovikariani., 2022).

3.4.6 Skrining Fitokimia

1. Flavonoid

Larutkan 5 mg ekstrak dalam etanol, kemudian tambahkan serbuk magnesium dan tambahkan 5 tetes HCl pekat. Jika hasilnya berwarna merah, kuning atau orange, berarti positif mengandung flavonoid (Novriyanti, Putri, dan Rijai., 2022).

2. Alkaloid

Ekstrak 15 mg dilarutkan dalam pelarut etanol, kemudian disaring hingga diperoleh filtratnya. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian masing-

masing 5 mL kemudian ditambahkan 3 reagen (*mayer*, *wagner*, *dragendof*). Jika ditambahkan pereaksi *mayer*, maka akan positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan putih atau kuning. Jika ditambahkan pereaksi *wagner*, maka akan positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan coklat. Jika ditambahkan pereaksi *dragendof*, mengandung alkaloid dan membentuk endapan berwarna jingga. Alkaloid bernilai positif bila dua atau tiga fraksi mempunyai residu yang bersangkutan (Novriyanti, Putri, dan Rijai., 2022).

3. Tanin

Ekstrak 5 mg dilarutkan dalam etanol kemudian ditambahkan pereaksi FeCl_3 . Ekstrak yang mengandung tanin akan berwarna biru atau hijau tua (Novriyanti, Putri, dan Rijai., 2022).

4. Saponin

Ekstrak 5 mg ditambahkan ke dalam 10 mL air suling panas dan dilarutkan dengan cara dipanaskan terlebih dahulu dalam penangas air kemudian dikocok. Bila tidak berbusa berarti negatif, tetapi jika setelah 10 menit masih berbusa tambahkan HCl 2N dan terlihat busanya tidak hilang, jadi positif saponin (Novriyanti, Putri, dan Rijai., 2022).

3.4.7 Formulasi Sediaan *Lipbalm*

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan *Lipbalm*

Komposisi	Konsentrasi (%)				Fungsi	Range (<i>Hand book rowe</i>)
	F0	F1	F2	F3		
Ekstrak Daun Bayam Merah	-	3	2	1	Antioksidan	-
Ekstrak Kulit Buah Delima	-	7	8	9	Asam ellagic	-
Gliserin	5	5	5	5	Humektan	2-15%
Cera Alba	9	9	9	9	Pengeras	5-20%
Nipagin	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet	0,02-0,3%
Lanolin	15	15	15	15	Pengemulsi	5-20%
<i>Oleum cacao</i> ad	20	20	20	20	Basis	-

(Tampubolon, 2023)

3.4.8 Pembuatan Sediaan *Lipbalm*

Basis yang digunakan pada penelitian ini yaitu *oleum cacao*. *Oleum cacao* dilelehkan di atas penangas air dengan suhu lelehnya yaitu 31°C sampai 34°C. *Oleum cacao* dimasukkan ke dalam cawan penguap sambil diaduk sampai meleleh sempurna, kemudian cera alba dilelehkan dengan suhu lelehnya yaitu 62°C sampai 64°C dan dimasukkan ke dalam lelehan basis tersebut. Nipagin, lanolin dan gliserin dimasukan ke dalam lelehan basis sambil terus diaduk. Ekstrak daun bayam merah dan kulit buah delima dimasukkan terakhir sambil diaduk. Setelah homogen kemudian sediaan *lipbalm* dimasukkan ke dalam wadah *lipbalm* dan dibiarkan pada suhu ruangan sampai membeku (Tampubolon, 2023).

3.4.9 Evaluasi Sediaan

1. Uji Organoleptik

Pengamatan organoleptik sediaan *lipbalm* dilakukan dengan cara mengamati warna, aroma, dan tekstur pada sediaan yang telah dibuat menggunakan panca indra (Wijaya & Safitri, 2020).

2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan kaca objek. Sediaan diaplikasikan pada kaca objek lalu diamati apakah terdapat butiran kasar atau tidak. Sediaan dinyatakan homogen apabila tidak terlihat adanya butiran kasar (Tampubolon, 2023).

3. Uji pH

Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan indikator pH universal. Celupkan indikator pH ke dalam sediaan *lipbalm* dan diamkan beberapa detik, lalu bandingkan warna pada kertas dengan warna di kemasan (Ambari et al., 2020).

4. Uji Daya Oles

Uji daya oles dilakukan secara visual dengan cara mengoleskan masing-masing formulasi sediaan *lipbalm* pada kulit punggung tangan dan diamati jumlah pengolesan sampai terlihat mengkilap dan merata (Wijaya & Safitri, 2020).

5. Uji Stabilitas

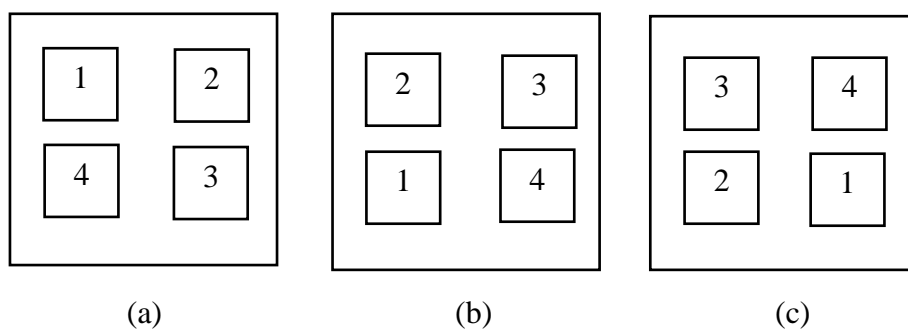
Uji stabilitas sediaan *lipbalm* dilakukan dengan mengamati perubahan secara organoleptis (bentuk, warna, dan bau), homogenitas, dan pH pada penyimpanan suhu kamar. Uji stabilitas dilakukan pada hari ke 1, 7, dan 14 (Sariwating & Syamma R Wass, 2020).

6. Uji Hedonik

Uji kesukaan dilakukan secara visual terhadap 20 orang panelis. Syarat untuk menjadi panelis yaitu pria/wanita sehat berusia 15-40 tahun, tidak memiliki riwayat penyakit alergi, dan bersedia menjadi panelis dalam penelitian. Setiap panelis diminta untuk mengaplikasikan formulasi yang telah dibuat pada kulit punggung tangan panelis. Panelis kemudian memilih variasi formulasi yang mereka sukai. Panelis menulis 1 jika mereka tidak suka, 2 jika mereka agak suka, 3 jika mereka netral, 4 jika suka, dan 5 jika mereka sangat suka. Panelis mengisi kuesioner yang diberikan, parameter yang diamati pada uji kesukaan adalah warna, tekstur, bentuk, dan aroma (Tampubolon, 2023).

7. Uji Iritasi Secara *In-Vivo*

Sediaan *lipbalm* dipaparkan diarea kulit punggung hewan uji coba kelinci albino (*New Zealand*) dengan lokasi pemaparan seperti yang terlihat pada gambar 3.1. Area uji pada punggung kelinci berukuran $\pm 5 \times 5$ cm. Kemudian lokasi pemaparan ditutup dengan kasa dan diplester dengan plester yang bersifat non-iritan. Dosis yang dioleskan sebanyak 0,5 gram. Hewan uji harus diamati ada atau tidaknya eritema dan edema, penilaian respon dilakukan setelah 24 jam, 48 jam, dan 72 jam setelah pembukaan tempelan (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2014).



Gambar 3.1 (a) Lokasi Pemaparan Sediaan Uji (Replikasi 1)
(b) Lokasi Pemaparan Sediaan Uji (Replikasi 2)
(c) Lokasi Pemaparan Sediaan Uji (Replikasi 3)

Keterangan:

1. Lokasi pemaparan uji sediaan *lipbalm* formulasi 0.
2. Lokasi pemaparan uji sediaan *lipbalm* formulasi 1.
3. Lokasi pemaparan uji sediaan *lipbalm* formulasi 2.
4. Lokasi pemaparan uji sediaan *lipbalm* formulasi 3.

Respon dari sediaan uji dinilai dengan berpedoman pada tabel berikut ini:

Tabel 3.2 Penilaian Pembentukan Eritema 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 eschar yang menghambat penilaian eritema	4

(OECD, 2015)

Tabel 3.3 Penilaian Pembentukan Udema Pada Kulit

Pembentukan Udema	Skor
Tidak ada udema	0
Udema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	1
Udema kecil (batas area terlihat jelas)	2
Udema tingkat menengah (luasnya bertambah sekitar 1 mm)	3
Udema parah (luasnya bertambah dari 1 mm dan melebar melebihi area pemaparan oleh sediaan uji)	4

(OECD, 2015)

Nilai rata-rata dari kategori respon biasanya disebut Indeks Iritasi Primer.

Tabel 3.4 Kategori Respon Iritasi Pada Kelinci

Nilai Rata-rata	Kategori Respon
0,0 – 0,4	Sangat ringan (<i>negligible</i>)
0,5 – 1,9	Iritan ringan (<i>slight</i>)
2,0 – 4,9	Iritan sedang (<i>moderate</i>)
5,0 – 8,0	Iritan kuat (<i>severe</i>)

(ISO, 2002)

3.5 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini terdiri dari uji iritasi pada hewan uji kelinci dan uji hedonik terhadap panelis. Uji hedonik terhadap panelis menggunakan skala hedonik dengan panelis berjumlah 20 orang. Parameter yang diamati warna, kemudahan penggunaan (tekstur), bentuk dan aroma. Nilai kesukaan panelis yang diperoleh dianalisis menggunakan skala *Likert*. Uji daya oles dianalisis menggunakan *Kruskal Wallis*.