

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Farmasetik Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan menggunakan rancangan penelitian *eksperimental*.

#### 4.2 Variabel Penelitian

##### 4.2.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah stabilitas asam askorbat dilihat dari konsentrasinya di dalam sediaan.

##### 4.2.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ALA yang ditambahkan dalam sediaan untuk meningkatkan kestabilan asam askorbat.

#### 4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasetik Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk pembuatan dan pengamatan terhadap pengaruh penambahan alpha lipic acid terhadap stabilitas asam askorbat dalam sediaan krim.

#### 4.4 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.4.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang dilakukan pada penelitian ini antara lain asam stearat, sorbitan stearat, setil alkohol, *alpha lipoic acid* (ALA), asam askorbat (vitamin C), propilenglikol, paraffin liquid, aquades, kalium hidroksida (KOH), metilparaben dan propilparaben, metanol, asam fosfat.

##### 4.4.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan sebagai bahan penelitian adalah gelas beaker, gelas ukur, batang pengaduk, pipet tetes, termometer, gelas arloji, cawan porselen, pipet ukur, pipet volume, labu ukur, *overhead stirrer* (IKA), timbangan analitik, pH meter, *waterbath*, spektrofotometer UV, sentrifuge, sonikator dan oven.

#### 4.5 Definisi Istilah/ Operasional

1.  $t_{1/2}$  atau waktu paruh adalah waktu yang dibutuhkan untuk asam askorbat terdegradasi 50% dari konsentrasi awal
2.  $t_{90}$  atau waktu kadaluarsa adalah waktu yang dibutuhkan untuk asam askorbat terdegradasi 10% dari konsentrasi awal, dimana konsentrasi dalam sediaan hanya tersisa 90%
3. Konsentrasi optimum adalah konsentrasi yang dapat meningkat kanstabilitas asam askorbat paling baik diantara formula yang lain

## 4.6 Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data

### 4.6.1 Metode Pembuatan Sediaan Krim

#### 1. Formula Krim

Nama Bahan	Fungsi	Konsentrasi dalam formula (%)	
		Formula 1	Formula 2
Fase Minyak			
Asam stearat	<i>Emulsifier</i>	12	7,805
Sorbitan stearat	<i>Emulsifier</i>	-	2,195
Setil alcohol	<i>Thickener</i>	3	5
Paraffin liquid	Basis minyak	-	5
<i>Alpha Lipoic Acid</i>	Bahan Aktif	0,5	0,5
Fase Air			
Asam askorbat	Bahan Aktif	2	2
KOH	<i>Neutralizer</i>	0,7	0,5
Propilenglikol	Pelarut	5	5
Aquades	Pelarut	Ad 100	Ad 100
Metilparaben dan propilparaben	Pengawet	0,18 dan 0,02	0,18 dan 0,02

#### 2. Formula kombinasi Asam Askorbat dan ALA

Nama Bahan	Fungsi	Konsentrasi dalam formula (%)		
		Formula I	Formula II	Formula III
Fase Minyak				
Asam stearat	<i>Emulsifier</i>	12	12	12
Setil alcohol	<i>Thickener</i>	3	3	3
<i>Alpha Lipoic Acid</i>	Bahan Aktif	0,3	0,5	0,7
Fase Air				
Asam askorbat	Bahan Aktif	2	2	2
KOH	<i>Neutralizer</i>	0,7	0,7	0,7
Propilenglikol	Pelarut	5	5	5
Aquades	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100
Metilparaben dan propilparaben	Pengawet	0,18 dan 0,02	0,18 dan 0,02	0,18 dan 0,02

### 3. Cara Pembuatan Krim

Asam stearat dan setil alkohol dipanaskan bersamaan dalam cawan porselen pada suhu 70-80° C menggunakan waterbath. ALA dan asam askorbat masing-masing didispersikan ke dalam propilenglikol secukupnya, metyl dan propyl paraben dilarutkan menggunakan propilenglikol secukupnya. Kemudian sisa propilenglikol, air, KOH dan larutan metylparaben dan propylparaben diletakkan dalam gelas beaker dan dipanaskan menggunakan waterbath sampai suhu 70-80° C. Setelah itu fase air pada gelas beaker distirrer menggunakan stirrer dengan kecepatan 1500 rpm dan tambahkan fase minyak yang telah dilelehkan sedikit demi sedikit sampai terbentuk basis krim. Stirrer sampai suhu mencapai kurang lebih 40° C dengan kecepatan 1500 rpm kemudian tambahkan ALA yang sudah didispersikan dalam propilenglikol dan asam askorbat yang didispersikan dalam propilenglikol pada gelas beaker. Distirrer dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit.

### 4. Spesifikasi Krim

Krim m/a yang dibuat memiliki spesifikasi sebagai berikut:

- Berwarna putih, kental, lembut, homogen, dan tidak terjadi pemisahan fase
- Memiliki aroma khas asam askorbat dan ALA
- Tidak terasa panas saat dioleskan atau menimbulkan iritasi di kulit
- Memiliki daya sebar yang baik
- Memiliki pH antara 4,0-5,6
- Memiliki kadar asam askorbat antara 90-110%

## 4.6.2 Evaluasi Stabilitas Asam Askorbat

### 4.6.2.1 Temperature Stress Test

#### Tujuan

*Temperature Stress Test* dengan tujuan untuk melihat pengaruh suhu terhadap stabilitas asam askorbat dalam sediaan krim.

#### Metode

Sediaan dimasukkan pada pot kaca tertutup rapat dan diletakkan pada oven pada 3 suhu berbeda, yaitu pada suhu 45°, 55°, 65° C ± 2°C selama 40 menit. Kemudian diambil sampel tiap 20 menit dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV (WHO, 2006).

#### Penentuan Waktu Paruh dan Waktu Kadaluarsa (Florence dan Attwood, 2006).

Penentuan waktu kadaluarsa dilakukan dengan melihat laju degradasi dari asam askorbat. Dihitung kadar asam askorbat sisa (Ct) dengan menggunakan data absorbansi asam askorbat yang dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku yang telah diperoleh sebelumnya. Kemudian dilakukan penentuan orde reaksi. Penentuan orde reaksi dilakukan dengan membuat persamaan regresi antara waktu vs Ct untuk orde nol, waktu vs log Ct untuk orde satu, dan waktu vs 1/Ct untuk orde dua. Orde reaksi yang dipilih adalah orde reaksi yang memiliki nilai koefisien korelasi yang paling mendekati ±1. Setelah ditentukan orde reaksi yang digunakan

kemudian ditentukan harga k untuk masing-masing suhu pada masing-masing formula menggunakan persamaan:

$$X = k_0 \cdot t \text{ (orde nol)}$$

$$\text{Slope} = -k / 2,303 \text{ (orde satu)}$$

$$\text{Slope} = k \text{ (orde dua)}$$

Hasil perhitungan dari 3 suhu yang digunakan kemudian dibuat persamaan garis linier antara  $1/T$  vs  $\log k$  dan slope dari persamaan garis linier tersebut digunakan untuk menghitung nilai energy aktivasi ( $E_a$ ) dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Slope} = \frac{-E_a}{2,303 \cdot R}, R = 8,314 \text{ J/mol}$$

Setelah didapatkan nilai  $E_a$  kemudian dapat dilakukan perhitungan laju reaksi pada suhu kamar ( $k_{25}$ ) dengan menggunakan persamaan *Arrhenius* sebagai berikut:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a (T_2 - T_1)}{2,303 \cdot R \cdot T_2 \cdot T_1}$$

Harga  $k_{25}$  yang didapatkan kemudian dapat digunakan untuk menentukan waktu paruh dan waktu kadaluarsa dari sediaan, dengan persamaan sebagai berikut:

$$t_{1/2} = 0,693/k$$

$$t_{90} = 0,105/k$$

#### 4.6.2.2 Pengukuran Kadar Asam Askorbat

##### Tujuan

Evaluasi kandungan asam askorbat dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui seberapa banyak kandungan asam askorbat yang terdapat dalam sediaan krim.

##### Metode

Kandungan asam askorbat dalam sediaan diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 245 nm (Ahmad *et al*, 2011).

##### 1. Preparasi larutan Standar

Disiapkan larutan stok asam askorbat dengan konsentrasi 20 ppm pada *acidified methanolic* (pH 2). Kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4, 6, 9, 12ppm.

##### 2. Preparasi Sampel

Sebanyak 50 mg sampel krim diekstraksi dengan menggunakan 30 mL *acidified methanolic* (pH 2). pH diatur menjadi 2 dengan *phosphoric acid*. Larutan kemudian disonifikasi selama 20 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 3 menit. Supernatan diambil sebanyak 1 mL dan diencerkan sampai 10 mL menggunakan labu ukur 10 mL dan larutan siap diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer

#### 4.6.3 Evaluasi Stabilitas Fisik Sediaan krim

Ada beberapa parameter yang harus diukur untuk evaluasi sediaan krim, seperti stabilitas fisik, organoleptik, pH, dan daya sebar

##### 1. Uji Sentrifugasi

###### Tujuan

Uji sentrifugasi dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kestabilan krim secara fisik.

###### Metode

Uji sentrifugasi dilakukan dengan cara memasukkan krim ke dalam *appendorf* kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.

###### Interpretasi Hasil Uji

Sediaan dikatakan stabil jika setelah dilakukan sentrifugasi tidak terbentuk lapisan yang terpisah.

##### 2. Uji Organoleptik

###### Tujuan

Uji organoleptik dilakukan dengan tujuan mengetahui karakteristik krim, baik dari segi warna maupun bau.

###### Metode

Uji organoleptik dilakukan dengan cara identifikasi warna dan bau krim.

Karakteristik krim : krim berwarna putih, berbau khas vitamin C dan ALA, kental, lembut, dan tidak kencer.

###### Interpretasi Hasil Uji Organoleptik

Hasil uji organolpetik yang baik ditandai dengan karakteristik warna, bau dan konsistensi yang tetap dalam periode penyimpanan.

### 3. Uji pH

#### Tujuan

Uji pH dilakukan dengan tujuan mengetahui tingkat keasaman dari sediaan krim dan kesesuaian dengan pH kulit wajah.

#### Metode

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter dan pemeriksaan dilakukan dengan cara:

- Elektroda dicuci dan dibilas dengan air suling, keringkan.
- Kalibrasi alat menggunakan larutan dapar standar pH 4 dan pH 7.
- Elektroda dimasukkan ke dalam larutan, catat pHnya

Karakteristik krim: pH krim diharapkan memiliki pH 4,0-5,6 yang sesuai dengan pH kulit wajah (4,0-5,6).

#### Interpretasi Hasil Uji pH

Hasil uji pH yang baik adalah pH sediaan sebesar 4,0-5,6. pH ini merupakan pH yang aman untuk sediaan topikal untuk wajah. Penurunan atau peningkatan pH juga cenderung tidak terlalu besar selama penyimpanan sehingga sediaan dapat dikatakan stabil secara termodinamika dan tidak terjadi reaksi kimia yang ditimbulkan oleh wadah tempat penyimpanan atau antara bahan-bahan yang terkandung dalam sediaan.

#### 4. Uji Daya Sebar

##### Tujuan

Uji daya sebar dilakukan untuk mengetahui penyebaran krim saat dioleskan pada kulit

##### Metode

Uji daya sebar dilakukan dengan menggunakan plat kaca. Krim ditimbang sebanyak 1 gram dan diletakkan pada plat kaca. Setelah itu diletakkan plat kaca lain di atas krim tersebut tanpa diberi tekanan. Kemudian diukur diameternya. Tambahkan beban sebanyak 50 gram, diamkan 1 menit kemudian diukur diameter dari krim. Hal yang sama dilakukan untuk beban 100, 200, dan 500 gram.

##### Interpretasi Hasil Uji Daya Sebar

Jika diameter dari krim semakin lebar saat ditambahkan beban ini berarti krim mudah menyebar pada kulit. Semakin luas diameter maka krim semakin mudah menyebar di kulit.

#### 4.7 Analisis Data

##### Tujuan

Analisis statistik dilakukan untuk mengetahui apakah tiap formula yang digunakan berbeda secara signifikan.

##### Metode

Analisis statistic dilakukan dengan menggunakan SPSS IBM 20. Pengukuran normalitas dengan menggunakan uji Shapiro-wilk karena sampel < 50. Kemudian

dilakukan uji beda dengan menggunakan uji Kruskal-wallis untuk data yang tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji Mann-whitney. Sedangkan untuk data yang terdistribusi normal digunakan uji oneway ANOVA dan dilanjutkan dengan uji post-hoc dengan ujiTukey.

### **Interpretasi Data**

Pada uji normalitas data terdistribusi normal jika memiliki nilai signifikansi sebesar  $>0,05$  dan sebaliknya. Kemudian pada uji beda, tiap formula dikatakan berbeda secara signifikan bila memiliki nilai signifikansi sebesar  $<0,05$ .

