# **BAB III** **METODE PENELITIAN**

## **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental (*The Experimental)*). Sampel yang digunakan adalah kulit jeruk bali, data yang dikumpulkan berupa data kualitatif dan kuantitatif.

### **3.1.1 Varibel Penelitian**

Pada penelitian ini terdapat dua jenis variabel, yaitu variabel bebas dan terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah simplisia kulit jeruk bali, ekstrak kulit jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm) Merr.), nanopartikel ekstrak kulit jeruk bali dan formulasi bedak tabur dengan berbagai konsetrasi 5%, 10% dan 15%. Variabel terikat meliputi karakteristik simplisia, skrining fitokimia, aktivitas antioksidan, karakteristik nanopartikel, evaluasi sediaan bedak tabur dan penentuan nilai SPF.

### **3.1.2 Parameter Penelitian**

Parameter yang dilakukan pada penelitian ini meliputi:

1. Parameter simplisia kulit jeruk bali: makroskopik, mikroskopik, kadar air, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam.
2. Parameteri skrining fitokimia: senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, glikosidan dan steroid/ triterpenoid.
3. Parameter aktivitas antioksidan: penetuan nilai IC50.
4. Parameter karakteristik nanopaartikel: pengujian karkteristik nanopartikel menggunakan alat Zetasizer Nano ZS (Malvern) untuk mengetahui ukuran partikel, indeks polidipersitas (adanya distribusi ukuran partikel) dan zeta potensial.
5. Parameter nilai SPF *(Sun Protection Factor*): penilaian kategori ultra.
6. Parameter evaluasi sediaan bedak tabur: uji organoleptis, homogenitas, derajat halus, daya lekat, pH, iritasi, dan hedonik.

## **3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian**

### **3.2.1 Jadwal Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2024 – Juni 2024

### **3.2.2 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan dan Laboratorium Pelayanan Pengujian Mutu (PPM) Universitas Indonesia.

## **3.3 Bahan dan Peralatan**

### **3.3.1 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: serbuk DPPH, metanol, etanol 96%, aquadest, zink stearat, zink oksida, kalsium karbonat, iron oxide (yellow & red), metil paraben, ol. citrus, talkum, kitosan, asam asetat 1% dan Na-TPP (Natrium Tri-PoliFosfat).

### **3.3.2 Peralatan Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: *rotary evaporator*, Spektrofotometer UV-Vis, Zetasizer Nano ZS (Malvern), *magnetic stirrer*, *homogenizer,* wadah maserasi, neraca analitik, blender, gelas kimia, penangas air, krus porselin, cawan porselin, lumpang dan stamper, *centrifuse*, pH meter, ayakan mesh 100 dan wadah sediaan bedak tabur.

## **3.4 Persiapan Bahan**

### **3.4.1 Determinasi Sampel**

Proses identifikasi tanaman jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm) Merr.) di Herbarium Medanense (MEDA) yang terletak di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam (FMIPA) Universitas Sumatera Utara.

### **3.4.2 Pengumpulan Sampel**

Objek penelitian ini terdiri dari buah jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm) Merr.), yang diperoleh dari tanaman yang ada di Kabupaten Batu Bara. Pendekatan pengambilan sampel dilakukan secara acak, tanpa melakukan perbandingan dengan daerah lainnya. Sampel tanaman buah jeruk bali dapat dilihat pada Lampiran 5.

### **3.4.3 Pengolahan Sampel**

Kulit jeruk bali dipisahkan dari buah, kemudian kulit bagian paling luar (eksokarp) yang berwarna hijau dipisahkan dengan kulit bagian dalam yang berwarna putih (mesokarp). Bagian eksokarp dicuci dan ditiriskan, kemudian dipotong-potong kecil dengan ukuran ±1–2cm, lalu dikeringkan dan diblender hingga menjadi serbuk (Suryanita et al., 2019).

### **3.4.4 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Bali**

Pembuatan ektrak kulit jeruk bali dilakukan dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimasukkan kedalam sebuah bejana, tuangi dengan 75 bagian cairan penyari sebanyak 3750 mL, tutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, lalu diserkai sehingga didapat maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan 25 bagian etanol 96% sebanyak 1250 mL. Pindahkan ke dalam bejana tertutup (maserat I dan II), biarkan di tempat sejuk, terlindung dari cahaya, selama 2 hari. Enap tuangkan atau saring. (Depkes RI, 1979). Maserat lalu dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* lalu ditimbang.

Berat ekstrak kental Berat simplisia kering

% Rendemen = x 100%

## **3.5 Pembuatan Pereaksi**

### **3.5.1 Larutan Pereaksi Mayer**

Sebanyak 1,569 g raksa (II) klorida dilarutkan dalam air suling hingga 60 mL. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodide lalu dilarutkan dalam 10 mL air suling. Kedua larutan dicampurkan dan tambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 mL (Depkes RI, 1995).

### **3.5.2 Larutan Pereaksi Dragendrof**

Sebanyak 0,8 g bismut (III) nitrat dilarutkan dalam asam nitrat pekat 20 mL kemudian dicampurkan dengan kalium iodide sebanyak 27,2 g dalam 50 mL air suling. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan diencerkan dengan air secukupnya hingga 100 mL (Depkes RI, 1995).

### **3.5.3 Larutan Pereaksi Bouchardat**

Sebanyak 4 g kalium iodide dilarutkan dalam air suling secukupnya kemudian ditambahkan 2 g iodium sedikit demi sedikit cukupkan dengan air suling hingga 100 mL (Dekes RI, 1995).

### **3.5.4 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%**

Ditimbang besi (III) klorida sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dengan aquades dalam labu tentukur 100 mL sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

### **3.5.5 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N**

Sebanyak 17 mL asam klorida pekat diencerkan dengan air suling sampai 100 mL (Depkes RI, 1995).

### **3.5.6 Larutan Pereaksi Liberman-Bouchard**

Dicampurkan 5 bagian volume asam sulfat pekat dengan 50 bagian volume etanol 95% P. Ditambahkan dengan hati-hati 5 bagian volume asetat anhidrida kedalam campuran tersebut, didinginkan (Depkes RI, 1995).

### **3.5.7 Larutan Pereaksi Molish**

Ditimbang alfa naftol sebanyak 3 gram dimasukkan kedalam labu tentukur 100 mL lalu larutkan dalam asam nitrat 0,5 N sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

### **3.5.8 Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 M**

Ditimbang timbal (II) asetat sebanyak 15,17 gram dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL lalu dilarutkan dalam akuades bebas CO2 sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

### **3.5.9 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2N**

Sebanyak 5,5 mL asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling sehingga diperoleh 100 mL (Depkes RI, 1995).

## **3.6 Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia**

Pemeriksaan karakterisasi simplisia meliputi: pemeriksaan makroskopik, mikroskopik, penetapan kadar air, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol, kadur abu total dan kadar abu tidak larut asam.

### **3.6.1 Pemeriksaan Makroskopik**

Pemeriksaan makroskopik di lakukan terhadap simplisia kulit bali (*Citrus maxima* (Burm) Merr.), dengan cara memperhatikan warna, bentuk, ukuran, bau dan rasa. Uji ini dilakukan bertujuan untuk mencari khususnya morfologi, ukuran, dan warna simplisia yang diuji (Fajriyah, 2018).

### **3.6.2 Pemeriksaan Mikroskopik**

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk kulit bali (*Citrus maxima* (Burm) Merr.), dengan cara serbuk simplisia ditaburkan diatas objek glass yang telah ditetesi dengan kloralhidrat dan ditutup dengan deck glass, kemudian diamati dibawah mikroskop. Pada uji mikroskopik dilakukan untuk mencari unsur-unsur anatomi jaringan yang khas. Dari pengujian ini akan diketahui jenis simplisia berdasarkan fragmen pengenal yang spesifik bagi masing–masing simplisia (Fajriyah, 2018).

### **3.6.3 Penetapan Kadar Air**

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotropi (destilasi toluen). Alat terdiri dari labu alas bulat 500 mL, alat penampung dan pendingin, tabung penyambung dan penerima 10 mL. Penjenuhan toluene dilakukan dengan cara sebanyak 200 mL toluen dan 2 mL aquades dimasukkan ke dalam labu alas bulat, dipasang alat penampung dan pendingin, kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 mL (Kemenkes RI, 2017).

Penetapan kadar air simplisia sebanyak 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu alas bulat yang berisi toluen jenuh tersebut, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar.

Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 mL. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (v/b) (Kemenkes RI, 2017). Penentuan kadar air dilakukan bertujuan untuk melihat kemurnian ekstrak. Kadar air yang terlalu tinggi (>10%) menyebabkan tumbuhnya mikroba yang akan menurunkan stabilitas ekstrak (Utami et al., 2020).

(Volume air akhir - Volume air awal) Berat sampel (g)

% Kadar air simplisia = × 100%

### **3.6.4 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air**

Timbang saksama lebih kurang 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara. Masukkan ke dalam labu bersumbat, tambahkan 100 mL air jenuh kloroform, kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105° dan ditara, panaskan sisa pada suhu 105° hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari larut air (Kemenkes RI, 2017).

% Kadar sari larut dalam air = x FP x 100%

Berat sari larut air (g) Berat sampel (g)

### **3.6.5 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol**

Timbang saksama lebih kurang 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara. Masukkan ke dalam labu bersumbat, tambahkan 100 mL etanol P, kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam. Saring cepat untuk menghindarkan penguapan etanol, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105° dan ditara, panaskan sisa pada suhu 105° hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari larut etanol (Kemenkes RI, 2017).

Berat sari larut etanol (g) Berat sampel (g)

% Kadar sari larut dalam etanol = x FP 100%

### **3.6.6 Penetapan Kadar Abu Total**

Timbang saksama 2 sampai 3 g bahan uji yang telah dihaluskan dan masukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara, pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, aduk, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan kertas saring beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap pada suhu 800±25º. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Kemenkes RI, 2017).

Berat abu (g) Berat sampel (g)

% Kadar abu total = ×100%

### **3.6.7 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Dalam Asam**

Didihkan abu yang diperoleh pada Penetapan Kadar Abu Total dengan 25 mL asam klorida encer LP selama 5 menit. Kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan dalam krus hingga bobot tetap pada suhu 800±25º. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Kemenkes RI, 2017).

Berat abu larut asam(g) Berat sampel (g)

% Kadar abu tidak larut dalam asam = x 100%

## **3.7 Skrining Fitokimia**

### **3.7.1 Uji Alkaloid**

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditimbang, ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air suling, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 3 tabung reaksi, lalu ke dalam masing- masing tabung reaksi dimasukkan 3 tetes filtrat.

* Pada tabung I : Ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, akan terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
* Pada tabung II : Ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, akan terbentuk endapan berwarna coklat atau jingga kecoklatan.
* Pada tabung III : Ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, akan terbentuk endapan berwarna coklat sampai kehitaman.

Alkaloid disebut positif jika terjadi endapan atau kekeruhan pada dua atau tiga dari percobaan di atas (Depkes RI, 1989).

### **3.7.2 Uji Flavonoid**

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 g serbuk mg dan 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol lalu dikocok kemudian dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan alkohol (Depkes RI, 1989).

### **3.7.3 Uji Tanin**

Pemeriksaan tannin, sebanyak 0,5 g ekstrak ditimbang dimasukkan ke dalam erlenmeyer, tambahkan 10 mL air suling, didihkan 3 menit, dinginkan dan saring. Filtrat diencerkan dengan air sampai tidak berwarna. Larutan diambil 2 mL dan ditambahkan sampai 1-2 tetes pereaksi FeCl3 1%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI, 1989).

### **3.7.4 Uji Saponin**

Sebanyak 0.5 g ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, tambahkan 10 mL aquades panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Penambahan 1 tetes larutan HCI. 2 N, apabila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 199).

### **3.7.5 Uji Glikosida**

Sebanyak 3 g ekstrak disari dengan 30 mL campuran 7 mL bagian etanol 96% dan 3 bagian aquades ditambah dengan 10 mL HCI 2 N. Direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL aquades dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari dengan 20 mL campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dilakukan berulang sebanyak tiga kali.

Kumpulan sari air diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 500C. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL metanol. Kemudian diambil 0,1 mL larutan percobaan dimasukkan kedalam tabung reaksi, diuapkan di penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes pereaksi molish. Kemudian secara perlahan ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1995).

### **3.7.6 Uji Steroid/Triterpenoid**

Sebanyak 1 g ekstrak ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer ditambahkan n-heksan sampai terendam, dibiarkan selama 2 jam. Disaring kemudian 10 mL filtrat diuapkan dalam cawan poerselin sampai kering, sisanya ditambahkan pereaksi Liberman-Burchard (asam asetat anhidrat 3 tetes dan asam sulfat pekat 3 tetes). Terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoid dan terbentuknya warna biru - hijau menunjukkan adanya steroid. (Depkes RI, 1989).

## **3.8 Pembuatan Larutan Kitosan 0,1%**

Larutan kitosan dibuat dengan memasukkan 100 mL asam asetat 1% ke dalam gelas beker 250 mL. Dimasukkan 0,1 g kitosan yang kemudian diaduk dengan magnetic stirrer hingga kitosan larut dan diperoleh larutan kitosan 0,1% (Natasya, 2018).

## **3.9 Pembuatan Larutan Na-TPP 0,1%**

Larutan Na-TPP 0,1% dibuat dengan menambahkan 0,035g Na-TPP ke dalam 35 mL aquades dengan gelas beker 250 mL. Larutan tersebut diaduk dengan magnetic stirrer hingga terlarut dan diperoleh larutan NaTPP 0,1% (Natasya, 2018).

## **3.10 Pengujian Antioksidan Dengan Spektrofotometri UV-VIS**

### **3.10.1 Prinsip Metode Penangkapan Radikal Bebas DPPH**

Kemampuan sampel uji dalam meredam proses oksidasi oleh DPPH (*1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl*) sebagai radikal bebas dalam larutan metanol (sehingga terjadinya perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning) dengan nilai IC50 (konsentrasi sampel uji yang mampu meredam radikal bebas 50%) digunakan sebagai parameter untuk menentukan aktivitas antioksidan sampel uji tersebut.

### **3.10.2 Pembuatan Larutan Pereaksi DPPH**

Larutan DPPH disiapkan dengan cara menimbang 10 mg DPPH dan dilarutkan dengan metanol, kemudian dimasukkan ke dalam labu terukur 50 mL, dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda (larutan DPPH konsentrasi 200 µg/mL). Kemudian dipipet sebanyak 2 mL, dimasukkan kedalam labu terukur 25 mL, dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda (konsentrasi 40 µg/mL) (La et al., 2021).

### **3.10.3 Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum**

Larutan DPPH konsentrasi 200 µg/mL, dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam labu terukur 25 mL, dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda, diperoleh larutan DPPH konsentrasi 40 µg/mL, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm, sehingga diperoleh absorbansi maksium sebagai panjang gelombang maksimum DPPH (La et al., 2021).

### **3.10.4 Penentuan Operating Time**

Sebanyak 2 mL larutan DPPH (dari larutan konsentrasi 200 µg/mL), dimasukkan dalam labu tentukur 25 mL, dicukupkan volumenya hingga garis tanda, diperoleh larutan DPPH konsentrasi 40 µg/mL. Lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (pada poin 3.10.3), dimulai dari menit pertama hingga diperoleh absorbansi stabil, sebagai *operating time* (waktu kerja pengukuran yang baik). *operating time* (OT) dilakukan bertujuan untuk menentukan waktu paling tepat larutan uji dalam meredam radikal bebas DPPH. *Operating time* menunjukkan bahwa reaksi antara larutan uji dan DPPH telah sempurna (Putri, 2023).

### **3.10.5 Pembuatan Larutan Induk Baku Sampel**

Ekstrak ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 mL. dilarutkan dengan metanol lalu volumenya dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda (konsentrasi 1000 µg/mL) (La et al., 2021).

### **3.10.6 Pengukuran Absorbansi Larutan Sampel**

Dipipet larutan induk baku sampel (dari konsentrasi 1000 µg/mL) masing-masing sebanyak 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL; dan 2,5 mL dan ditambahkan dengan 2 mL larutan DPPH (dari larutan konsentrasi 200 µg/mL) ke dalam labu tentukur 10 mL dan dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda. Maka diperoleh larutan ekstrak konsentrasi 50 µg/mL.; 100 µg/mL; 150 µg/mL.; 200 µg/mL dan 250 µg/mL.

Selanjutnya didiamkan beberapa menit sesuai dengan waktu stabil (operating time yang diperoleh pada poin (3.10.4), diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada poin (3.10.3). Perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan, sehingga diperoleh data absorbansi dari campuran DPPH dan ekstrak kulit jeruk bali dengan berbagai konsentrasi.

### **3.10.7 Pengukuran Absorbansi Larutan Asam Askorbat**

Sebanyak 50 mg asam askorbat kemudian dimasukkan dalam labu tentukur 50 mL hingga diperoleh konsentrasi larutan 1000 μg/mL. Selanjutnya dipipet 5 mL larutan asam askorbat (dari larutan dengan konsentrasi 1000 μg/mL), diencerkan dalam labu tentukur 50 mL, dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda, sehingga diperoleh larutan asam askorbat dengan konsentrasi 100 μg/mL. Selanjutnya, masing-masing dipipet sebanyak 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; dan 0,5 mL dan ditambahkan dengan 2 mL larutan DPPH (dari larutan konsentrasi 200 µg/mL) ke dalam labu tentukur 10 mL dan dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda. Maka diperoleh larutan asam askorbat dengan konsentrasi 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL dan 5 μg/mL.

Selanjutnya didiamkan beberapa menit sesuai dengan waktu stabil (operating time yang diperoleh pada poin (3.10.4), diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada poin (3.10.3). Perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan, sehingga diperoleh data serapan dari campuran DPPH dan asam askorbat pada berbagai konsentrasi.

## **3.11 Analisis Data**

### **3.11.1 Penentuan Persen Peredaman (% inhibisi)**

Kemampuan antioksidan diperhitungkan dari angka penurunan serapan larutan DPPH (penurunan/peredaman warna unggu DPPH) akibat adanya penambahan larutan ekstrak fraksi sebagai bahan uji. Perbedaan nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan larutan uji tersebut dihitung sebagai persen inhibisi.

Absorbansi DPPH - Absorbansi Sampel Absorbansi DPPH

% inhibisi = ×100%

### **3.11.2 Penentuan Nilai IC50 Antioksidan**

Penentuan nilai IC50 digunakan untuk mengetahui besarnya aktivitas antioksidan. Nilai IC50 merupakan konsentrasi senyawa akntioksidan yang dapat menghambat radikal bebas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC50 suatu sampel maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Nilai IC50 merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji (µg/mL) yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50% (mampu menghambat atau meredam proses oksidasi sebesar 50%). Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dengan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya.

Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak (µg/mL) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai ordinatnya (Y). Kemudian dari persamaan tersebut, dihitung nilai IC50 untuk mendapatkan nilai antioksidannya.

*y = ax ± b*

Keterangan:

y = % penghambatan

a = intersep

b= koefisien regresi

x = In konsentrasi uji

## **3.12 Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Kulit Jeruk Bali**

Ekstrak ditimbang 1 g dilarutkan dalam 35 mL etanol 96% dicampur dengan 15 mL aquades dalam beker 1000 mL. Kemudian ditambahkan dengan 100 mL larutan kitosan 0,1%, kemudian ditambahkan 35 mL larutan Na-TPP ke dalam campuran sambil diaduk dengan homogenizer 2000 rpm selama 15 menit. Setelah semua bahan tercampur pengadukan dilanjutkan dengan magnetic stirrer dengan kecepatan 1000 rpm kurang lebih selama 2 jam dengan kecepatan stabil. Kemudian koloid nanopartikel kitosan dan Na-TPP dipisahkan dengan cara disentrifugasi pada *speed* 1500 rpm selama 15 menit. Padatan nanopartikel yang diperoleh dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu ±3°C hingga diperoleh serbuk kering (Fahira et al., 2023).

Nanopartikel ekstrak kulit jeruk bali dikarakterisasi menggunakan alat Zetasizer Nano ZS (Malvern) untuk mengetahui ukuran partikel, indeks polidipersitas (adanya distribusi ukuran partikel) dan zeta potensial.

## **3.13 Formulasi Bedak Tabur**

# **Tabel 3.1** Formula Bedak Tabur

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Komposisi** | **Khasiat** | **Formula (%)** | | | |
| **F0** | **F1** | **F2** | **F3** |
| Nanopartikel ekstrak kulit jeruk bali | Zat aktif | - | 5 | 10 | 15 |
| Zink stearat | Adhesif | 7,8 | 7,8 | 7,8 | 7,8 |
| Zink oksida | Astrigen | 11,1 | 11,1 | 11,1 | 11,1 |
| Kalsium karbonat | Absorben | 11,1 | 11,1 | 11,1 | 11,1 |
| Metil paraben | Pengawet | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Iron oxide (yellow) | Pewarna | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,09 |
| Iron oxide (red) | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 |
| Ol. Citrus | Pewangi | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Talkum | Basis | 100 | 100 | 100 | 100 |

Keterangan:

F0: Formula tanpa penambahan zat aktif (kontrol)

F1: Formula 1 dengan penambahan ekstrak 5%

F2: Formula 2 dengan penambahan ekstrak 10%

F3: Formula 3 dengan penambahan ekstrak 15%

Cara Pembuatan Bedak Tabur:

Pembuatan bedak tabur nanopartikel ekstrak kulit jeruk bali dilakukan dengan mengayak semua bahan padat terlebih dahulu menggunakan ayakan mesh 100. Metil paraben, zink stearat, zink oksida, kalsium karbonat, talkum dan iron oxide yellow & red yang telah lolos ayakan memiliki derajat serbuk yang halus. Talkum yang telah lolos ayakan dilakukan sterilisasi panas kering menggunakan oven pada suhu 150°C selama 1 jam (Erwiyani et al., 2022).

Dalam lumpang masukkan metil paraben, zink stearat, zink oksida, kalsium karbonat dan sebagian talkum digerus hingga homogen (MI) (Rahim et al., 2022). Pada lumpang lain, dimasukkan sedikit talkum kedalam lumpang untuk menutupi pori-pori lumpang, nanopartikel ekstrak dimasukkan kedalam lumpang lalu digerus hingga homogen (MII). Setelah itu M1 dimasukkan kedalam MII, gerus lagi hingga homogen, tambahkan iron oxide yellow & red secara bersamaan gerus ad warna homogen, selanjutnya ditambahkan sisa talkum digerus kembali sampai homogen. Hasil campuran bahan diayak dengan ayakan mesh 100, dan ditetesi oleum citrus sebanyak 0,3 mL. Serbuk hasil ayakan berupa bedak tabur kemudian dilakukan evaluasi.

## **3.13.1 Evaluasi Bedak Tabur**

### Uji Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis dilakukan secara visual dengan mengamati bentuk, warna, dan bau. Pemeriksaan warna dilakukan dengan cara menggunakan panca indera. Pemeriksaan bau dilakukan dengan cara mencium sediaan bedak tabur secara langsung (Rahim et al., 2022).

### Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan melihat homogenitas warna ekstrak dan basis bedak Bedak dikatakan homogen apabila keseragaman warna bedak merata pada pengamatan secara visual (Erwiyani et al., 2022).

### Uji Derajat Halus

Uji derajat halus digunakan untuk mengetahui kehalusan serbuk dimana semakin kecil ukuran serbuk maka semakin halus bedak digunakan. Seluruh serbuk diayak dengan menggunakan nomor ayakan 100 mesh. Goyang ayakan dengan arah putaran horizontal dan ketukan secara vertikal pada permukaan yang keras selama tidak kurang dari 30 menit atau sampai pengayakan praktis sempurna (Erwiyani et al., 2022).

### Uji Daya Lekat

Sediaan bedak tabur ditimbang sebanyak 100 mg kemudian disapukan pada permukaan kulit dengan luas permukaan 100 cm2. Lokasi kulit yang disapukan kemudian ditiup dengan peniup karet, serbuk yang jatuh dari permukaan kulit ditampung dikertas perkamen. Lalu serbuk yang jatuh dari lokasi lekatan ditimbang dan dihitung persentase serbuk yang jatuh (Rahim et al., 2022).

% = x 100%

Berat serbuk - Berat serbuk yang jatuh Berat serbuk

### Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter, dengan cara melarutkan bedak tabur dengan aquadest sampai terbentuk suspensi, kemudian masukkan pH meter ke dalam sampel. Ketentuan pH yang memenuhi syarat harus sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5-8. Uji pH dilakukan 3 kali pengulangan (Karimah et al., 2023).

### Uji Iritas

Uji iritasi dilakukan pada 4 sukarelawan dengan cara uji tempel terbuka. Sediaan ditimbang 0,1 g dioleskan dibelakang telinga dengan diameter olesan 3 cm, dibiarkan selama 1x 24 jam setelah itu amati gejala yang ditimbulkan (Futri et al., 2023). Kriteria yang diamati meliputi adanya kemerahan, bengkak serta gatal.

### Uji Hedonik/ Uji Kesukaan

Uji hedonik dilakukan dengan memberikan sediaan kepada 30 responden, selain untuk menguji iritasi sediaan, para responden juga diminta untuk menilai organoleptisnya (tekstur, aroma dan warna), homogenitas dan derajat kehalusan sediaan (Alta et al., 2023). Tingkat kesukaan meliputi sangat suka, suka, netral, tidak suka dan sangat tidak suka.

## **3.14 Penentuan Nilai SPF Sediaan Bedak Tabur**

Sampel diencerkan hingga 400 ppm dalam labu tentukur. Sebanyak 0,1 g sampel disuspensikan dalam etanol 96% hingga batas 25 mL. Larutan sampel dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 15 menit, kemudian endapan dipisahkan hingga diperoleh larutan uji. Spektrofotometer UV-Vis dikalibrasi dengan etanol 96% pada setiap panjang gelombang yang digunakan. Pengujian dilakukan pada panjang gelombang dari 290 sampai 320 nm (Karimah et al., 2023).

Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Hasil absorbansi masing-masing konsentrasi bedak tabur dicatat nilai SPF (Lumantow et al., 2023). Kemudian dihitung menggunakan persamaan Mansur (1986). Persamaannya sebagai berikut:



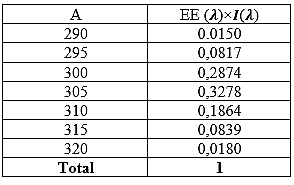
Keterangan:

CF : Faktor koreksi bernilai 10

EE : Efek eritmogenik radiasi pada panjang gelombang (λ)

I : Spektrum simulasi sinar surya (λ)

Nilai EE x I adalah suatu ketetapan atau konstan yang diitentukan oleh Sayre et al., (1979) dan ditunjukkan pada Tabel berikut:

******Tabel 3.2** Konstanta Normalisasi EE (λ)×I(λ) (Sayre et al.,1979)