

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam waktu 3 bulan terhitung dari bulan Januari sampai bulan Maret. Untuk tempat penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortir dan stemper, corong, *beaker glass*, kertas saring, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan porselen, neraca analitik, spatula, cawan petri, batang pengaduk, erlemeyer, gelas ukur, labu ukur, jangka sorong, *waterbath* Memmert, kompor listrik, *laminar air flow* (CV Quadrant), kapas steril, jarum ose, bunsen, batang sumuran, autoklaf *All American*, mikropipet *Fisherbrand Elite*, Viskometer touch *Lamy Rheology*, pH meter Universal, pH meter digital dan *hotplate stirrer cimarec*.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah cangkang kerang hijau, NaOH 3% dan 45%, HCl 1N, media *Tryptone Soya Agar* (TSA) OXOID CM01318, asam stearat (*pharmaceutical grade*), gliserin (*pro analysis*), metil paraben (*pro analysis*), propil paraben (*pro analysis*), TEA (*pro analysis*), setil alkohol (*pharmaceutical grade*), tokoferol (*pro analysis*) dan aquadest.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1 Penyiapan Bahan

Bahan utama dari penelitian ini adalah cangkang kerang hijau. Bahan ini diperoleh dari limbah kerang hijau yang berada di karawang.

3.3.2 Pembuatan Kitosan

Cangkang kerang hijau dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang melekat, kemudian dikeringkan dan dihaluskan. Setelah itu diayak dengan ayakan 40 mesh

- Deproteinasi

Tahap deproteinasi menggunakan NaOH 3% 1:10 (b/v) dan dipanaskan pada suhu 85°C selama 30 menit. Selanjutnya campuran ini didinginkan dan disaring, residu yang tersaring dicuci dengan aquadest sampai netral dikeringkan dalam oven dengan suhu 80°C selama 2 jam (Sinardi, 2013).

- Demineralisasi

Tahap demineralisasi menggunakan larutan HCl 1 N 1:10 (b:v) dan dipanaskan pada suhu 75°C selama 1 jam. Hasil reaksi disaring dan dicuci dengan aquades sampai netral, selanjutnya dikeringkan dalam oven dengan suhu 80°C selama 2 jam (Sinardi, 2013).

- Deasetilasi

Tahap deasetilasi, kitin hasil isolasi selanjutnya dihilangkan gugus asetilnya dengan larutan NaOH 45% 1:10 (b:v) dan dipanaskan pada suhu 95°C selama 2 jam. Hasilnya disaring dan dicuci dengan aquades sampai netral. Kitosan dikeringkan dalam oven dengan suhu 80°C selama 2 jam (Sinardi, 2013).

3.3.3 Karakterisasi Kitosan

untuk mengidentifikasi kitosan ada empat cara yaitu melakukan spektrofotometri serapan inframerah, diberikan pereaksi klorida, mengencerkan 50 ml larutan S (larutkan 0,1 g kitosan 100 ml dalam air lalu aduk selama 20 menit dengan *mechanical stirrer*) menjadi 250 ml dengan penambahkan 25% v/v larutan *ammonia R.A* sampai terbentuk massa gelatin, dan untuk 10 ml larutan S ditambahkan *acetone R.A*. (*European Pharmacopoeia 5th Edition*, 2003)

3.3.4 Pembuatan Sediaan Krim Anti Jerawat

Krim anti jerawat dibuat dalam 4 formulasi dengan konsentrasi kitosan dari cangkang kerang hijau yang berbeda yaitu 0,25%, 0,5%, 0,75

% dan 1%. Formulasi krim anti jerawat dengan bahan aktif kitosan cangkang kerang hijau dapat dilihat pada tabel 3.1. Fase minyak dibuat dengan melebur asam stearat dan setil alkohol, kemudian ditambahkan propil paraben di water bath pada suhu 70°C. Fase air dibuat dengan metil paraben dan air yang telah dipanaskan di pada suhu 70°C kemudian ditambahkan gliserin dan triethanolamin suhu dipertahankan 70°C. Lalu kedua fase tersebut dimasukan kedalam lumpang yang telah dipanaskan dengan aquadest gerus sampai homogen sampai terbentuk massa krim, setelah itu tambahkan tokoferol kedalam massa krim gerus hingga homogen dan masukan kitosan cangkang kerang hijau kedalam massa krim gerus sampai homogen.

Tabel 3. 1 Formulasi Krim Anti Jerawat Dengan Bahan Aktif Kitosan Cangkang Kerang Hijau

No	Bahan	Jumlah (%)					Fungsi
		F1	F2	F3	F4	Blangko	
1	Kitosan Cangkang Kerang Hijau	0,25	0,5	0,75	1	-	Zat aktif
2	Asam Stearat	13	13	13	13	13	Basis minyak
3	Gliserin	12	12	12	12	12	Humektan
4	Metil paraben	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	Pengawet
5	Propil paraben	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	Pengawet
6	Triethanolamin	3	3	3	3	3	Emulgator
7	Setil alkohol	3	3	3	3	3	Emulgator
8	Tokoferol	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	Antioksidan
9	Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Pelarut

3.3.5 Evaluasi sediaan krim anti jerawat

1. Uji Organoleptis

Uji organoleptik dilakukan dengan melihat perubahan warna, bau tengik dan adanya pemisahan fase (Meyla *et al*, 2019). Pengujian organoleptis dapat dilakukan secara kasat mata dengan melihat warna, bau dan bentuk krim yang sudah dibuat.

2. Uji Homogenitas

Menurut Ditjen POM RI (1979) pengamatan homogenitas dapat dilakukan dengan mengoleskan sediaan pada sekeping kaca atau bahan transparan lain, lalu diratakan jika tidak ada butiran-butiran maka sediaan dapat dikatakan homogen.

3. Uji pH

Uji pH merupakan parameter fisikokimia yang harus diuji pada sediaan topikal, karena pH mempengaruhi efektivitas, stabilitas dan kenyamanan pengguna sediaan (Nuralifah *et al*, 2018). Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan pH meter atau kertas pH universal. Uji pH dengan kertas pH universal dilakukan dengan mencelupkan ke dalam sediaan krim yang sudah di encerkan terlebih dahulu. Perubahan warna yang terjadi dicocokkan dengan standar pH universal (Maulina. L & Nining. S., 2015). Sedangkan dengan pH meter, elektroda pengukur dicelupkan sehingga ujung elektroda tercelup semua, pH yang diperoleh dicatat. pH krim harus sesuai dengan pH kulit yaitu 4,2-6,5 (Meyla *et al*, 2019).

4. Uji Viskositas

Uji viskositas dilakukan untuk mengetahui tingkat kekentalan dari sediaan yang dihasilkan. Viskositas merupakan pernyataan dari suatu cairan untuk mengalir, semakin tinggi viskositasnya maka semakin sulit untuk mengalir / semakin besar tahanannya (Zulfa *et al*, 2017). Viskositas yang disyaratkan oleh SNI 16-4399-1996 adalah 2.000 cP – 50.000 cP.

5. Uji Daya Sebar

Uji daya sebar krim dilakukan untuk mengetahui luasnya penyebaran krim pada saat dioleskan dikulit, sehingga dapat dilihat kemudahan pengolesan sediaan ke kulit (Zulfa *et al*, 2017). Permukaan penyebaran yang dihasilkan dengan menaiknya pembebanan di tunjukkan untuk menggambarkan karakteristik daya sebar (Voigt, 1994). Syarat uji daya sebar untuk sediaan topikal sekitar 5-7 cm (delia *et al.*, 2012).

6. Uji Daya Lekat

Uji daya lekat bertujuan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan oleh sediaan untuk melekat pada kulit, semakin lama waktu yang dibutuhkan maka semakin lama daya lekat kerja obat (Zulfa et al, 2017). Daya lekat krim di pengaruhi oleh viskositas semakin tinggi viskositas maka semakin lama waktu melekat krim pada kulit (Zulfa et al, 2017). Tidak ada persyaratan khusus mengenai daya lekat sediaan semipadat, namun sebaiknya daya lekat sediaan semipadat adalah lebih dari 1 detik (Zats & Gregory, 1996).

3.3.6 Penyiapan Media Agar

Timbang *Tryptone Soya Agar (TSA)* sejumlah tertentu dan dilarutkan dalam aquadest. Lalu dilarutkan dan dipanaskan sampai berwarna kuning jernih, Lalu disterilisasi dalam autoklaf 121⁰C selama 15 menit. Setelah itu, dimasukkan ke dalam cawan petri dan didinginkan pada suhu ruang.

3.3.7 Sterilisasi Alat

Cawan petri, tabung reaksi, corong, gelas ukur, serta larutan *Tryptone Soya Agar (TSA)* yang telah dibuat dibungkus dalam kertas coklat. Setelah itu, dimasukkan ke dalam autoklaf. Metode sterilisasi yang digunakan adalah metode panas basah, dimana alat-alat yang disterilisasi tahan terhadap pemanasan serta kelembapan. Disterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Alat yang sudah disterilisasi dibungkus kembali dengan kertas coklat kering, lalu diletakkan di lemari *laminar air flow (LAF)* yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70%.

3.3.8 Peremajaan Bakteri Uji

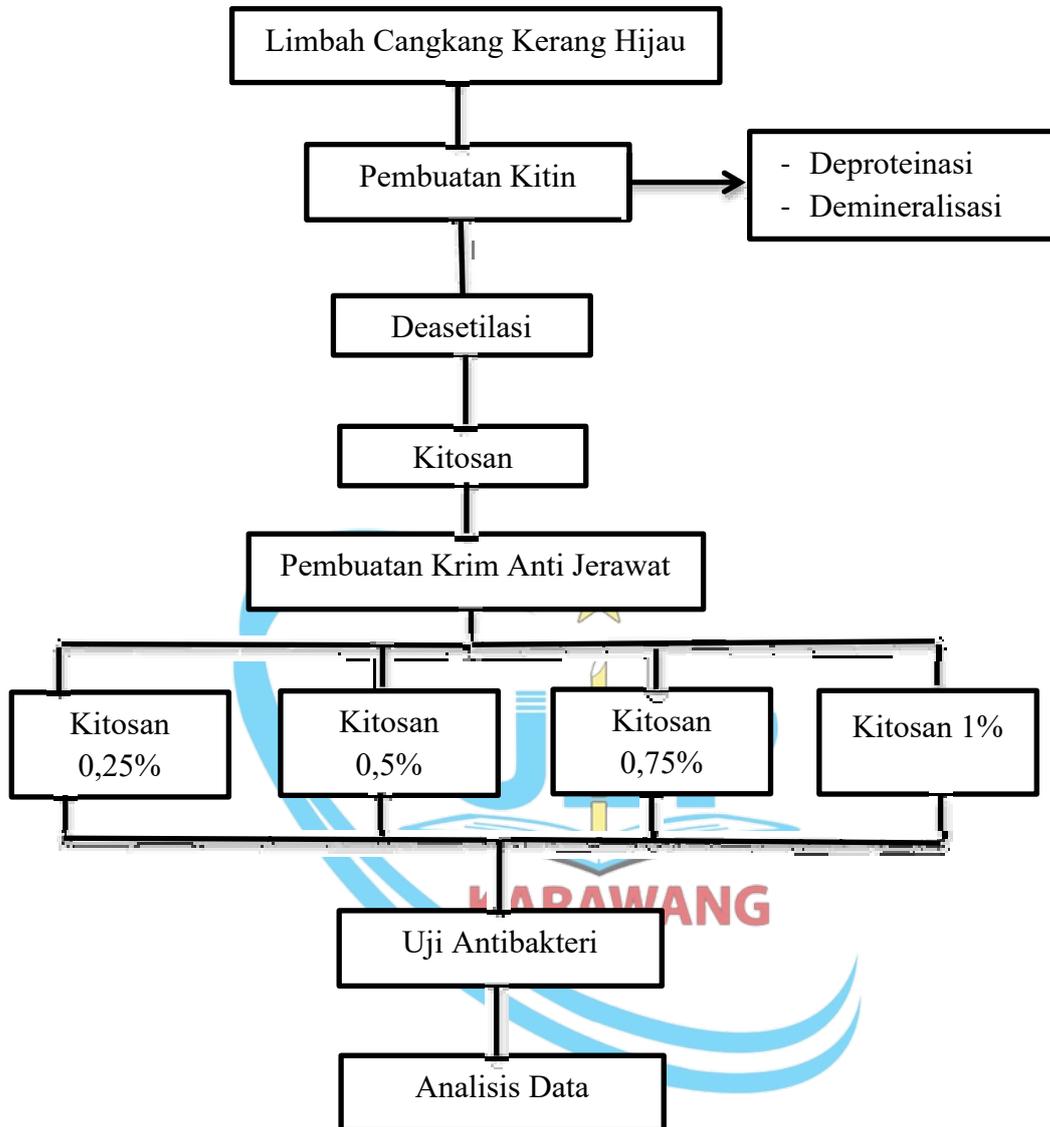
Bakteri uji berupa *Propionibacterium acnes* yang berasal dari biakan murni, diambil satu ose kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada media *Tryptone Soya Agar (TSA)* selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Kemudian dibuat suspensi bakteri dengan menggunakan NaCl sebagai media pertumbuhannya.

3.3.9 Uji Aktivitas Antiakteri

Pengujian daya hambat ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran. Disiapkan media *Tryptone Soya Agar (TSA)* steril dengan suhu 45 -50°C sebanyak 15 ml, selanjutnya dituang secara aseptik kedalam cawan petri steril dan dibiarkan hingga memadat. Selanjutnya suspensi bakteri yang telah disiapkan, di goreskan ke media agar. Setelah itu lubangi media agar dengan pelubang sumuran dan ditetesi dengan krim pada konsentrasi 0,25%, 0,5%, 0,75 % , 1% b/v dan blanko.



3.4 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian