

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode eksperimental guna mengevaluasi efek iritasi sediaan emulgel dengan variasi *Polyacrylate Crosspolymer-6* sebagai *gelling agent*. Sediaan emulgel diformulasikan dengan *Ceramide* dan minyak jagung (*Zea mays L.*) sebagai bahan aktif yang berperan sebagai antioksidan.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dari penelitian ini adalah variasi kadar *Polyacrylate Crosspolymer-6* (0,5%, 0,75% dan 1%) sebagai *gelling agent* dalam sediaan emulgel.

4.2.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah efek iritasi sediaan emulgel yang diukur berdasarkan skoring eritema dan edema menggunakan metode *Draize Test*. Hasil skoring ini kemudian dianalisis untuk menentukan nilai *Primary Dermal Irritation Index* (PDII) yang digunakan untuk mengklasifikasikan tingkat iritasi kulit.

4.2.3 Variabel Luar

a. Variabel Terkendali

Dalam uji iritasi, metode *Draize Test* diterapkan secara konsisten dengan jumlah sampel, durasi aplikasi, dan waktu pengamatan yang seragam. Hewan uji dengan karakteristik serupa, seperti jenis kelamin, usia, dan kondisi fisiologis, digunakan untuk meminimalkan variasi respons biologis.

b. Variabel Tidak Terkendali

Perbedaan kondisi psikologis hewan uji (stres), respons biologis antar hewan uji, dimana tiap individu memiliki sensitivitas kulit yang berbeda terhadap sediaan emulgel.

4.3 Definisi Operasional

1. Eritema merupakan kondisi munculnya bercak kemerahan pada permukaan kulit yang disebabkan oleh pelebaran pembuluh darah, sebagai respon terhadap infeksi atau paparan zat yang bersifat iritan, seperti yang tertera pada *Tabel IV.3*.
2. Edema merupakan pembengkakan pada jaringan kulit yang terjadi akibat akumulasi cairan dibawah permukaan kulit, sebagai reaksi terhadap peradangan, infeksi atau efek samping terhadap bahan iritan, seperti yang tertera pada *Tabel IV.3*.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Sediaan Farmasi Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2025 hingga bulan Agustus 2025.

4.5 Populasi

4.5.1 Populasi Target

Populasi target dalam penelitian ini adalah kelinci albino jantan (*Oryctolagus cuniculus*) yang memiliki karakteristik kulit sehat dan sesuai untuk uji iritasi menggunakan metode *Draize Test*.

4.5.2 Populasi Aktual

Populasi aktual dalam penelitian ini adalah kelinci albino jantan (*Oryctolagus cuniculus*) yang secara langsung diberikan perlakuan berupa aplikasi sediaan emulgel untuk mengevaluasi potensi iritasi kulit.

4.6 Sampel dan Teknik Sampling

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan uji berupa kelinci albino jantan (*Oryctolagus cuniculus*) yang diperlakukan dengan aplikasi sediaan emulgel pada area kulit tertentu untuk mengevaluasi potensi iritasi kulit. Penggunaan hewan uji dalam penelitian ini memerlukan persetujuan etik penelitian hewan dari Komisi Etik Penelitian yang berwenang.

Persetujuan tersebut bukan hanya bersifat administratif, tetapi merupakan bentuk tanggung jawab ilmiah dan moral untuk menjamin bahwa setiap prosedur yang melibatkan hewan telah memenuhi prinsip kesejahteraan hewan (*animal welfare*). Pemilihan sampel dilakukan menggunakan teknik *purposive sampling*, yaitu metode pengambilan sampel secara sengaja berdasarkan pertimbangan tertentu yang telah ditetapkan peneliti. Dalam hal ini, sampel dipilih berdasarkan kriteria inklusi, yaitu kelinci berjenis kelamin jantan untuk menghindari fluktuasi hormonal yang dapat memengaruhi respons kulit terhadap bahan uji, memiliki berat badan sekitar ± 2 kg agar memungkinkan distribusi bahan uji secara merata dan sesuai dengan proporsi tubuh, serta berusia antara 5 hingga 6 bulan karena pada rentang usia tersebut kelinci telah berada dalam fase dewasa muda dengan kondisi kulit yang stabil dan representatif untuk dilakukan uji iritasi topikal. Kriteria tersebut ditetapkan untuk memastikan homogenitas sampel serta meningkatkan validitas hasil pengujian iritasi menggunakan metode *Draize Test*..

4.7 Estimasi Besar Sampel

Dalam penelitian ini, estimasi besar sampel didasarkan pada pendekatan efisiensi penggunaan hewan uji sesuai dengan prinsip 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*). Penerapan prinsip ini menjadi aspek penting dalam kajian etik dalam penelitian hewan laboratorium guna memperoleh data yang representatif dengan jumlah sampel yang optimal. Jumlah sampel dalam penelitian ini yaitu menggunakan tiga ekor kelinci albino jantan (*Oryctolagus cuniculus*). Setiap kelinci dapat menerima enam perlakuan berbeda (F0, F1, F2, F3 dan K-) pada area punggung yang telah diberi pembatas, sehingga jumlah hewan yang digunakan dapat diminimalkan tanpa mengurangi validitas hasil. Melalui pendekatan ini, total titik aplikasi yang diperoleh yaitu:

$$3 \text{ kelinci} \times 5 \text{ perlakuan per kelinci} = 15 \text{ titik perlakuan}$$

Penggunaan pembatas bertujuan untuk memastikan bahwa setiap perlakuan tidak saling mempengaruhi, sehingga hasil yang diperoleh tetap valid. Metode ini juga memungkinkan analisis respons kulit terhadap setiap formulasi dengan lebih efisien dan mengoptimalkan penggunaan hewan uji dalam penelitian.

4.8 Kriteria Restriksi

4.8.1 Kriteria Inklusi

- a. Spesies kelinci albino (*Oryctolagus cuniculus*).
- b. Usia 5 - 6 bulan.
- c. Berat badan \pm 2 kg.
- d. Sehat, tidak stres dan tanpa ada penyakit kulit atau luka pada area aplikasi uji.
- e. Adaptasi lingkungan (aklimasi di laboratorium selama 5-7 hari sebelum uji dimulai).

4.8.2 Kriteria Eksklusi

- a. Adanya kelainan kulit, seperti luka, infeksi atau peradangan sebelum perlakuan.
- b. Riwayat penyakit sistemik yang dapat memengaruhi respons terhadap uji iritasi.
- c. Ketidaksesuaian berat badan atau usia.
- d. Hewan dalam kondisi stres berat.
- e. Tidak lolos aklimasi (selama periode adaptasi hewan menunjukkan respons yang tidak normal, seperti tidak nafsu makan atau perubahan bahan ekstrem).

4.9 Alat dan Bahan

4.9.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Emulgel

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mortir dan stamper, *beaker glass*, kertas perkamen, sudip, batang pengaduk, pipet tetes, sendok tanduk, cawan porselin, timbangan analitik, *homogenizer*, *magnetic stirrer*. Bahan yang digunakan yaitu *Ceramide*, Minyak jagung (*Zea mays* L.), *Propilen Glikol*, *Polyacrylate Crosspolymer-6*, *Kremofor*, *Na-EDTA*, *Phenoxyethanol*, *Aquadest*.

4.9.2 Alat dan Bahan untuk Pengujian Iritasi dengan Metode *Draize Test*

Alat yang digunakan pada pengujian iritasi ini yaitu alat pencukur, *hypafix*, gunting, kasa steril, kandang kelinci, tempat makan dan minum kelinci, *tissue*, plaster. Bahan dalam pengujian ini yaitu menggunakan hewan uji kelinci albino jantan (*Oryctolagus cuniculus*), *Polyacrylate*

Crosspolymer-6 (*gelling agent*) dan sediaan emulgel yang telah diformulasikan.

4.10 Rancangan Formulasi Sediaan Emulgel

Tabel IV.1 Rancangan Formulasi Sediaan Emulgel

Bahan	Fungsi	Formulasi % b/v		
		F1	F2	F3
<i>Ceramide</i>	Zat Aktif	1 %	1 %	1%
Minyak Jagung (<i>Zea mays L.</i>)	Zat Aktif (Emolien)	10 %	10 %	10 %
<i>Propilen Glikol</i>	<i>Penetration enhancer & humektan</i>	15 %	15 %	15 %
<i>Polyacrylate Crosspolymer-6</i>	<i>Gelling Agent</i>	0,5%	0,75 %	1 %
<i>Kremofor</i>	Emulgator	10 %	10 %	10 %
<i>Na-EDTA</i>	<i>Chelating Agent</i>	0,1 %	0,1 %	0,1 %
<i>Phenoxyethanol</i>	Pengawet	0,5 %	0,5 %	0,5 %
<i>Aquadest</i>	Pelarut	ad 150 mL	ad 150 mL	ad 150 mL

4.11 Prosedur Pembuatan Sediaan Emulgel

- Pembuatan fase air : *Ceramide*, *Propilen Glikol*, *Polyacrylate Crosspolymer-6*, *Na-EDTA*, *Phenoxyethanol*. Pembuatan fase air dimulai dengan menyiapkan *aquadest* dalam *beaker glass*, kemudian menambahkan *Ceramide*, *Propilen Glikol*, *Na-EDTA*, dan *Phenoxyethanol*. Campuran ini diaduk menggunakan *magnetic stirrer* ad semua bahan larut sempurna. Setelah larut, fase air ini dibagi menjadi dua bagian, yaitu untuk pembuatan basis gel dan pembuatan emulsi.

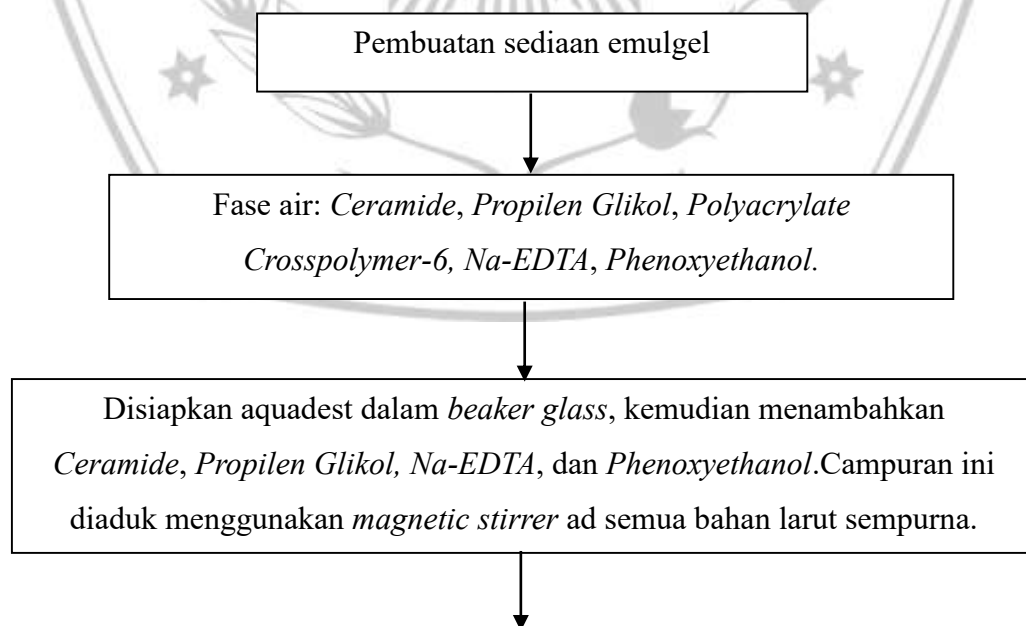
- Pembuatan basis gel:

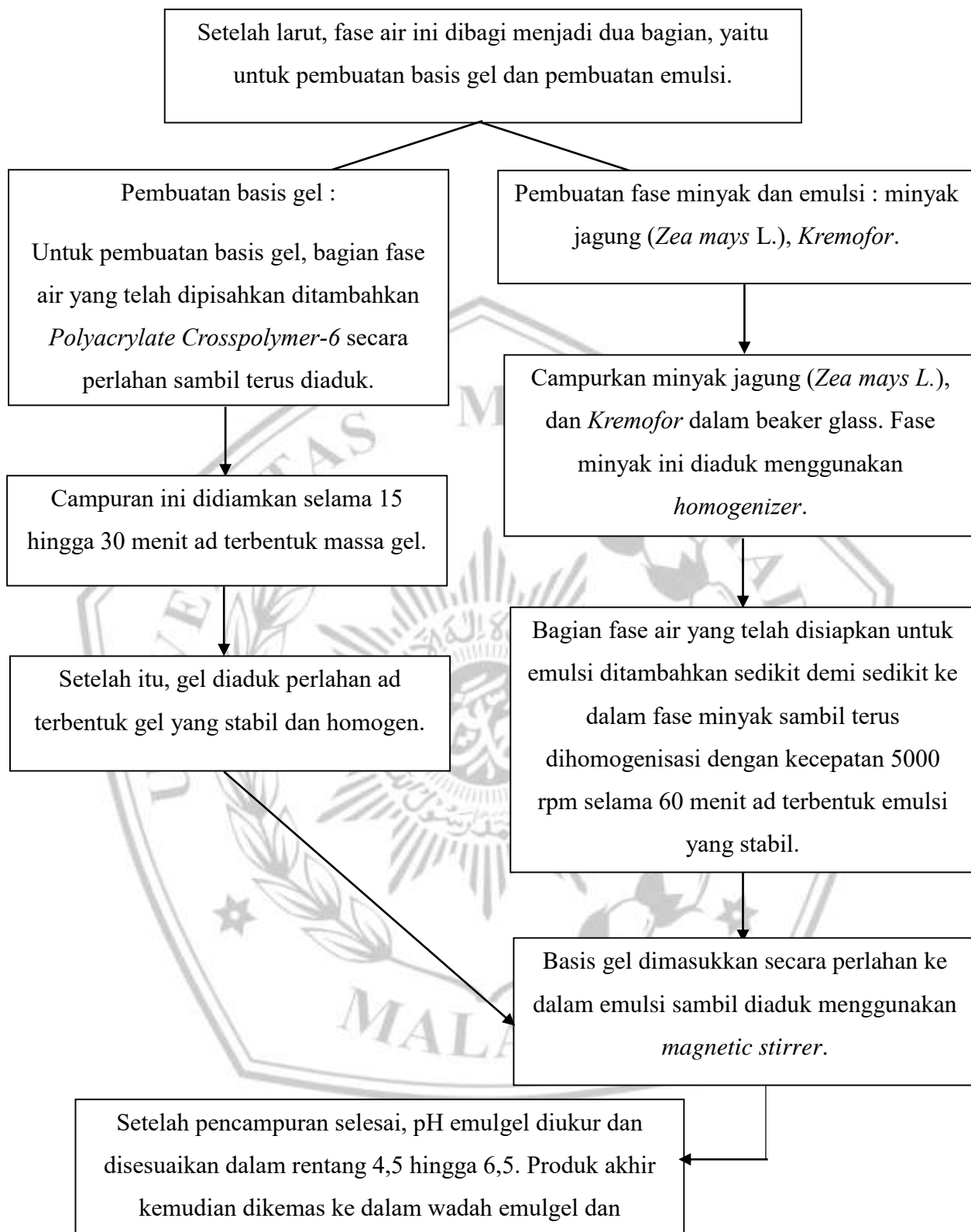
Untuk pembuatan basis gel, bagian fase air yang telah dipisahkan ditambahkan *Polyacrylate Crosspolymer-6* secara perlahan sambil terus diaduk. Campuran ini didiamkan selama 15 hingga 30 menit ad terbentuk massa gel. Setelah itu, gel diaduk perlahan ad terbentuk gel yang stabil dan homogen.

- Pembuatan fase minyak dan emulsi: minyak jagung (*Zea mays L.*), *Kremofor*.

Selanjutnya, fase minyak dan emulsi disiapkan dengan mencampurkan minyak jagung (*Zea mays L.*) dan *Kremofor* dalam *beaker glass*. Fase minyak ini diaduk menggunakan *homogenizer*. Setelah itu, bagian fase air yang telah disiapkan untuk emulsi ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam fase minyak sambil terus dihomogenisasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 60 menit ad terbentuk emulsi yang stabil. Kemudian, basis gel dimasukkan secara perlahan ke dalam emulsi sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah pencampuran selesai, pH emulgel diukur dan disesuaikan dalam rentang 4,5 hingga 6,5. Produk akhir kemudian dikemas ke dalam wadah emulgel dan dievaluasi lebih lanjut.

4.12 Skema Pembuatan Sediaan Emulgel



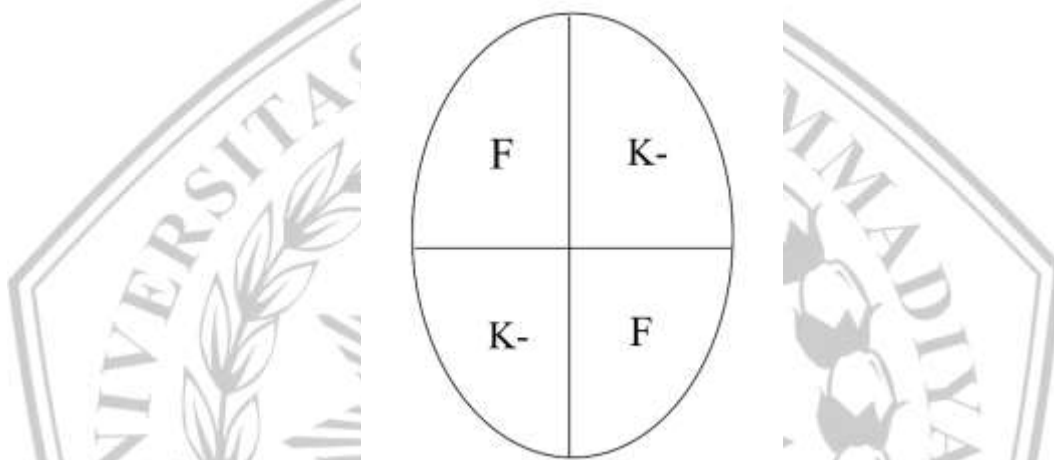


Gambar 4.1 Skema Pembuatan Emulgel.

4.13 Tahapan Uji

4.13.1 Uji Pendahuluan

Sebelum dilakukan uji iritasi utama, terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan untuk mengevaluasi potensi korosif atau iritasi berat dari sediaan emulgel. Pengujian ini dilakukan menggunakan empat ekor kelinci albino jantan, dengan masing-masing kelinci menerima satu formula uji. Pada setiap kelinci dibuat empat area aplikasi pada punggung yang telah dicukur, yaitu dua area untuk kontrol uji dan dua area untuk kontrol negatif (kelinci tanpa diberi perlakuan) yang disusun secara zig-zag (BPOM RI, 2022).



Gambar 4.2 Skema Area Punggung Kelinci (Uji Pendahuluan).

Sediaan uji diaplikasikan pada titik kontrol uji dan ditutup menggunakan kasa dan plaster semi-oklusif. Selanjutnya dilakukan pengamatan reaksi kulit secara bertahap pada menit ke-3, jam ke-1 dan jam ke-4 setelah aplikasi. Setelah setiap pengamatan, plaster ditutup kembali hingga waktu observasi berikutnya. Desain uji pendahuluan ini dipilih dengan mempertimbangkan prinsip *Refinement*, *Reduction* dan *Replacement* dalam etika penggunaan hewan uji, yaitu meminimalkan ketidaknyamanan hewan serta jumlah hewan yang digunakan tanpa mengurangi validitas data. Pendekatan pengamatan ini memungkinkan efisiensi dalam pemantauan reaksi kulit. Selain itu, penggunaan satu kelinci per formula juga dimaksudkan untuk mendeteksi potensi iritasi spesifik dari masing-masing sediaan secara lebih jelas, sehingga kelayakan untuk dilanjutkan ke tahap uji utama dapat dipastikan secara individual. (BPOM RI, 2022).

4.13.2 Uji Iritasi

Pada pengujian iritasi ini terdapat 5 kelompok perlakuan, yang terdiri dari:

1. Kontrol negatif adalah kelinci yang tidak diberi perlakuan.
2. Kelompok perlakuan adalah kelinci yang dioleskan:
 - a. Sediaan tanpa *gelling agent*.
 - b. Sediaan emulgel dengan variasi *Polyacrylate Crosspolymeer-6* sebagai *gelling agent* yang diformulasikan dengan *Ceramide* dan minyak jagung sebagai antioksidan (konsentrasi *gelling agent* 0,5%).
 - c. Sediaan emulgel dengan variasi *Polyacrylate Crosspolymeer-6* sebagai *gelling agent* yang diformulasikan dengan *Ceramide* dan minyak jagung sebagai antioksidan (konsentrasi *gelling agent* 0,75%).
 - d. Sediaan emulgel dengan variasi *Polyacrylate Crosspolymeer-6* sebagai *gelling agent* yang diformulasikan dengan *Ceramide* dan minyak jagung sebagai antioksidan (konsentrasi *gelling agent* 1%).

Kelinci albino jantan dipilih sebagai hewan uji, hal ini dikarenakan kelinci albino jantan memiliki kondisi biologis yang lebih stabil dibandingkan kelinci albino betina, yang kondisi fisiologisnya dapat mengalami perubahan akibat siklus reproduksi, kehamilan serta laktasi. Selain itu, dengan luas punggung yang cukup besar dapat digunakan untuk enam perlakuan yang berbeda.

Dalam penelitian ini, jika digunakan tiga ekor kelinci, maka setiap kelinci akan menerima enam perlakuan yang terdiri dari kontrol negatif (kelinci yang tidak diberi perlakuan), sediaan tanpa *gelling agent* serta tiga formula uji. Kriteria kelinci yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan berat badan ± 2 kg dengan usia 5 – 6 bulan. Sebelum digunakan dalam penelitian, kelinci terlebih dahulu dikondisikan selama satu minggu dengan kandang individual untuk memastikan kondisinya dalam keadaan sehat. Sebelum dilakukan uji iritasi, bulu pada bagian punggung kelinci dicukur untuk mencegah kemungkinan hewan menjilat atau menelan sediaan yang diuji, sehingga reaksi toksik yang diamati dipastikan berasal dari aplikasi secara dermal. Proses pencukuran dilakukan dalam dua tahap.

Tahap pertama, bulu dipotong menggunakan gunting untuk memudahkan pencukuran lanjutan. Kedua, pencukuran dilakukan dengan alat pencukur silet tajam untuk memastikan area benar-benar bersih dari sisa bulu, sehingga dapat diaplikasikan langsung ke kulit tanpa hambatan.

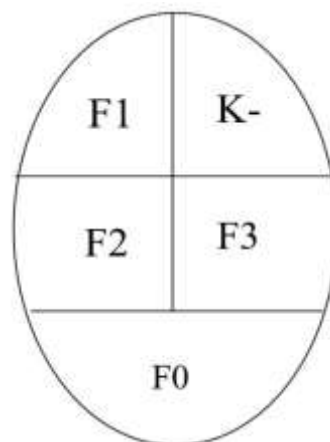
Pengujian iritasi dilakukan dengan mengaplikasikan sediaan uji sebanyak 0,5 mL (untuk sediaan cair) dan 0,5 g (untuk sediaan semi padat) per area kontrol, dengan area kulit punggung kelinci seluas ± 6 (2 x 3) cm² dengan jarak 1 cm antar area perlakuan untuk mencegah kontaminasi. Setelah aplikasi, area perlakuan ditutup dengan kain kasa dan diperkuat menggunakan plaster non-iritan yang dipasang secara longgar untuk menghindari tekanan berlebih pada kulit. (BPOM RI, 2022).

Tabel IV.2 Distribusi Perlakuan Pada Kelinci.

Kelinci	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5
Kelinci 1	Formula 1 (F1)	Kontrol Negatif	Formula 2 (F2)	Formula 3 (F3)	Formula Tanpa <i>Gelling Agent</i> (F0)
	Formula 1 (F1)	Kontrol Negatif	Formula 2 (F2)	Formula 3 (F3)	Formula Tanpa <i>Gelling Agent</i> (F0)
Kelinci 2	Formula 1 (F1)	Kontrol Negatif	Formula 2 (F2)	Formula 3 (F3)	Formula Tanpa <i>Gelling Agent</i> (F0)
	Formula 1 (F1)	Kontrol Negatif	Formula 2 (F2)	Formula 3 (F3)	Formula Tanpa <i>Gelling Agent</i> (F0)
Kelinci 3	Formula 1 (F1)	Kontrol Negatif	Formula 2 (F2)	Formula 3 (F3)	Formula Tanpa <i>Gelling Agent</i> (F0)
	Formula 1 (F1)	Kontrol Negatif	Formula 2 (F2)	Formula 3 (F3)	Formula Tanpa <i>Gelling Agent</i> (F0)

Pada aplikasi uji iritasi, dilakukan paparan bertahap. Paparan pertama dilakukan selama 1 jam setelah pengaplikasian, kemudian plaster dibuka untuk mengevaluasi apakah terjadi reaksi kulit yang serius. Dilanjutkan paparan 24 jam, kemudian paparan 48 jam dan paparan 72 jam. Semua perlakuan dalam uji ini diamati dengan prosedur yang sama. Setelah paparan

terakhir, evaluasi lanjutan dilakukan setelah 2 minggu (14 hari) untuk menilai reaksi tertunda atau pemulihan kulit (BPOM RI, 2022)



Gambar 4.3 Skema Area Punggung Kelinci (Uji Iritasi).

Observasi terhadap respons iritasi kulit dilakukan menggunakan metode *Draize Test* dengan mengevaluasi kemunculan eritema dan edema pada area paparan dalam rentang waktu 1 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam setelah aplikasi.

4.14 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini diawali dengan tahapan penilaian terhadap reaksi iritasi yang muncul pada permukaan kulit hewan uji yaitu kelinci albino jantan (*Oryctolagus cuniculus*), yang dilaksanakan berdasarkan prosedur metode *Draize Test*. Penilaian dilakukan melalui pemberian skor yang disesuaikan dengan derajat keparahan reaksi yang teramati, skor yang diperoleh selanjutnya dianalisis untuk menentukan tingkat iritasi yang ditimbulkan oleh masing-masing formulasi emulgel yang diuji.

Tabel IV.3 Skoring Eritema dan Edema (Puji Lestari & Andriantoro, 2018).

Pembentukan Eritema	Nilai Skor
Tidak ada eritema	Skor 0
Eritema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	Skor 1
Eritema terlihat jelas	Skor 2
Eritema sedang sampai parah	Skor 3
Eritema parah (merah daging) sampai pembentukan <i>eschar</i> yang menghambat penilaian	Skor 4

Pembentukan Edema	Nilai Skor
Tidak ada edema	Skor 0
Edema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	Skor 1
Edema kecil (batas area terlihat jelas)	Skor 2
Edema tingkat menengah (luasnya bertambah sekitar 1 mm)	Skor 3
Edema parah (luas bertambah lebih dari 1 mm dan melebar area pemaparan oleh sampel uji)	Skor 4

Skoring dilakukan untuk menilai tingkat keparahan reaksi iritasi yang terjadi dan hasilnya digunakan untuk menghitung Indeks Iritasi Primer (*Primary Irritation Index*, PII). Setelah dilakukan observasi terhadap reaksi kulit, selanjutnya adalah menghitung Indeks Iritasi Primer (*Primary Irritation Index*, PII). Penilaian ini didasarkan pada skoring eritema dan edema yang muncul setelah aplikasi produk. Nilai yang didapatkan selanjutnya dianalisis dengan menggunakan rumus perhitungan :

$$\text{Nilai PDII} = \frac{\text{Jumlah nilai eritema (jam ke 1, 24, 48 dan 72)} + \text{Jumlah nilai edema (jam ke 1, 24, 48 dan 72) pada waktu pengamatan}}{\text{Jumlah kelinci}}$$

Nilai *Primary Dermal Irritation Index* (PDII) yang diperoleh dari hasil pengamatan kemudian digunakan sebagai dasar dalam menentukan kategori respons iritasi kulit. Kategori ini ditetapkan berdasarkan tingkat keparahan reaksi yang diamati, seperti eritema (kemerahan), edema (pembengkakan).

Tabel IV.4 Nilai Derajat Iritasi (Hilmi et al., 2018).

Evaluasi	Skor
Tidak mengiritasi	0,0
Sangat sedikit iritasi	0,1 – 0,4
Sedikit iritasi	0,41 – 1,9
Iritasi sedang	2,0 – 4,9
Iritasi parah	5,0 – 8,0

Berdasarkan hasil pengujian iritasi menggunakan metode *Draize Test*, nilai *Primary Dermal Irritation Index* (PDII) yang diperoleh dibandingkan

dengan kategori derajat iritasi pada *Tabel IV.3*. Hasil skoring eritema dan edema yang diamati pada interval waktu 24, 48, dan 72 jam menunjukkan tingkat respons kulit terhadap sediaan yang diuji. Nilai PDII rendah menunjukkan sediaan dalam kategori tidak iritan atau hanya menyebabkan iritasi ringan, sebaliknya, semakin tinggi nilai PDII, semakin besar kemungkinan sediaan tersebut menyebabkan iritasi sedang hingga berat (Hilmi *et al.*, 2018).

Dari analisis data, dapat menentukan kategori iritasi sediaan, yaitu tidak iritan, ringan, sedang, atau berat, sebagai dasar evaluasi keamanan produk sebelum diaplikasikan pada manusia. Jika nilai PDII menunjukkan tingkat iritasi yang tinggi, maka formulasi perlu ditinjau ulang untuk mengurangi potensi efek sampingnya. Sebaliknya, jika PDII rendah, produk dapat dianggap aman untuk penggunaan lebih lanjut. Oleh karena itu, dari hasil ini dapat menjawab rumusan masalah yang telah dirumuskan “Bagaimana efek iritasi formulasi sediaan emulgel dengan variasi *Polyacrylate crosspolymer-6* sebagai *gelling agent* (bahan aktif *Ceramide* dan minyak jagung (*Zea mays L.*) sebagai antioksidan) terhadap kulit berdasarkan hasil uji iritasi menggunakan metode *Draize Test*?