

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Control Group Design*. Pada tahap pertama mengekstraksi senyawa metabolit dengan metode maserasi pada serbuk daging buah labu kuning menggunakan pelarut etanol 96%. Tahap kedua uji bebas etanol pada ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) yang sudah mengental menggunakan larutan asam sulfat pekat dan 1 mL kalium dikromat. Tahap ketiga uji flavonoid dengan mereaksikan sampel menggunakan 1 mL HCl dan 0,5 mg serbuk Mg. Tahap keempat membuat formulasi sediaan *lip balm* ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) dengan konsentrasi 6%, 8%, dan 10%. Tahap kelima evaluasi sifat fisik pada sediaan *lip balm* ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) berdasarkan pada uji organoleptik, homogenitas, nilai pH, daya oles, dan titik lebur. Tahap kelima uji antioksidan pada sediaan *lip balm* ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata* D.).

B. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biostatistik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro

teknologi, laboratorium teknologi, laboratorium fitokimia Prodi Farmasi
Universitas Ngudi Waluyo Ungaran

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini yaitu menggunakan buah labu kuning yang diambil dari daerah Kopeng, Kabupaten Semarang. Buah labu kuning yang dipilih yaitu memiliki kulit hijau kekuningan, daging buah berwarna orange, biji berbentuk pipih dan tekstur daging keras namun sedikit berair.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas yaitu variabel yang mampu mempengaruhi dan menjadi sebab dari timbulnya perubahan terhadap variabel terikat. Konsentrasi ekstrak daging buah labu kuning 6%, 8%, dan 10% adalah variabel yang bebas dalam penelitian ini.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung yaitu variabel yang telah dipengaruhi oleh adanya variabel bebas. Karakteristik fisik sediaan *lip balm* uji organoleptik, homogenitas, nilai pH, daya oles, titik lebur, dan juga nilai aktivitas antioksidan merupakan variabel tergantung dalam penelitian ini.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata* D.).

E. Pengumpulan Data

1. Pengumpulan bahan

Buah labu kuning yang diambil pada penelitian ini berasal dari Kopeng, Kabupaten Semarang. Buah yang dipilih yaitu buah yang memiliki kulit berwarna hijau kekuningan, daging buah berwarna orange, biji berbentuk pipih, tekstur daging keras namun sedikit berair, dipanen saat labu berumur 80 hari dan sebelum matahari terbit.

2. Determinasi tanaman

Determinasi buah labu kuning (*Cucurbita Moschata* D.) dari family *cucurbitaceae* yang dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biostatistik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro.

3. Alat dan Bahan

a. Alat

Penelitian ini menggunakan alat-alat seperti spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-2900), *vaccum rotary evaporator* (Ika), blender, *beaker glas*, gelas ukur (Iwaki), pot 10 gram, *waterbath* (memmert), kertas saring (whatman No. 40), cawan penguap, timbangan analitik (Fujitsu FSR-A), batang pengaduk kaca, spatel, rak tabung, tabung reaksi, labu ukur, *ball pipet*, vial, mortar, stamper, pH universal, kaca transparan, digital *melting point* (Apparatus DMP 800) dan pipet ukur.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu serbuk daging buah labu kuning, cera alba, lanolin, gliserin, minyak zaitun, triethanolamine, oleum cacao, aquadest, etanol 96%, kuersetin, serbuk DPPH, kalium dikromat, asam sulfat pekat, HCl, dan serbuk Mg.

4. Pembuatan ekstrak etanol buah labu kuning (*Cucurbita moschata* D.)

a. Preparasi sampel

Buah labu kuning yang diperoleh dari Koping dikupas terlebih dahulu lalu dicuci, dirajang, dipotong tipis-tipis dan dikeringkan dengan cara di jemur di bawah sinar matahari selama 3 hari hingga kering. Selanjutnya, hasil simplisia kering di blender hingga halus atau menjadi serbuk.

b. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi selama 24 jam. Maserasi dilakukan dengan cara dimasukkan sebanyak 750 gram simplisia buah labu kuning ke dalam maserator ditambahkan pelarut etanol 96%. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk kemudian didiamkan 18 jam. Selanjutnya, dipisahkan maserat dengan cara filtrasi. Kemudian dilakukan remaserasi 1 kali pengulangan menggunakan pelarut etanol 96%. Pelarut etanol 96% digunakan sebanyak 7,5 L. Selanjutnya hasil filtrat remaserasi dikumpulkan jadi 1 dan diuapkan

dengan *vaccum rotary evaporator* pada suhu 50°C. Hasil *vaccum rotary evaporator* berupa ekstrak cair daging buah labu kuning, selanjutnya diuapkan kembali menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata* D.). Ekstrak kental yang telah diperoleh dihitung persen rendemen menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat}}{\text{berat serbuk simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

(Sani dkk, 2014)

5. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara 2 tetes asam sulfat pekat dan 1 mL kalium dikromat ditambahkan ke dalam sampel ekstrak, jika terjadi perubahan warna jingga menjadi hijau kebiruan maka ekstrak mengandung etanol (Kurniawati, 2015).

6. Uji Senyawa Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan menggunakan metode kualitatif melalui reaksi warna, dengan cara 1 mL HCl dan 0,5 mg serbuk Mg ditambahkan ke dalam sampel ekstrak. Flavonoid dikatakan positif jika hasil menunjukkan perubahan warna merah atau jingga (Puji Astutik dkk, 2021).

7. Formula *lip balm*

Formula *lip balm* ekstrak etanol buah labu kuning dibuat dengan tiga varian konsentrasi ekstrak masing-masing 6%, 8%, dan 10% o/w. Formula sediaan *lip balm* dapat dilihat pada **Tabel 3.1**

Tabel 3. 1 Formula Sediaan *Lip Balm* Ekstrak Etanol Buah Labu Kuning (*Cucurbita moschata* D.) (Sheila dkk, 2021)

Nama bahan	Formula (%)			Kegunaan
	FI	FII	FIII	
Ekstrak daging buah labu kuning	6	8	10	Zat aktif
Cera alba	15	15	15	pengeras
Lanolin	10	10	10	basis
Gliserin	30	30	30	pelembab
Minyak Zaitun	5	5	5	pelembut
Triethanolamine	2	2	2	emulgator
Natrium Benzoat	0,1	0,1	0,1	pengawet
Oleum Cacao	25,9	23,9	21,9	pengeras

Keterangan :

Formula I : konsentrasi ekstrak daging buah labu kuning 6 %

Formula II : konsentrasi ekstrak daging buah labu kuning 8 %

Formula III : konsentrasi ekstrak daging buah labu kuning 10 %

8. Formulasi sediaan *lip balm* ekstrak etanol buah labu kuning

Formulasi sediaan *lip balm* untuk pengujian stabilitas fisik terdiri dari tiga formulasi dengan variasi konsentrasi ekstrak daging buah labu kuning yang digunakan yaitu 6%, 8%, dan 10% (o/w). Semua bahan ditimbang, lalu cera alba, lanolin, minyak zaitun, triethanolamine dan oleum cacao dilebur, di atas *waterbath* dengan cawan penguap, dan diaduk hingga meleleh sempurna (A1). Ekstrak buah labu kuning dilarutkan dengan air panas, lalu ditambah natrium benzoate dan gliserin (A2). Hasil leburan A1 dicampur ke dalam mortir dan digerus hingga berbentuk basis, lalu A2 dicampur ke dalam basis,

dan digerus hingga bercampur sempurna. Selanjutnya, sediaan *lip balm* dimasukkan ke dalam wadah atau pot, lalu dibiarkan hingga memadat pada suhu ruang (Sheila dkk, 2022).

9. Evaluasi stabilitas fisik *lip balm*

a. Uji Organoleptik

Pengamatan sediaan *lip balm* secara visual mulai dari bau, rasa, dan warna yang dilakukan pada setiap sampel (Khullar dkk, 2012).

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan pada kaca transparan. Sediaan harus menunjukkan homogen dan tidak ada butir-butir kasar yang terlihat (Jessica, 2018).

c. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan cara menggunakan pH universal. Sediaan *lip balm* dioleskan pada kertas pH universal dan dilakukan pengamatan terjadinya perubahan warna pada kertas pH. Warna yang muncul pada kertas pH dicocokkan dengan warna pada indikator pH yang terdapat pada kemasan pH universal (Pujiastuti & Kristiani, 2019).

d. Uji Daya Oles

Uji daya oles dilakukan secara visual dengan cara mengoleskan sediaan pada kulit tangan dengan 5 kali pengolesan lalu diamati banyaknya sediaan yang menempel (Adliani, 2012).

e. Uji titik lebur

Uji titik lebur dilakukan menggunakan alat *melting point SMPI*. *Lip balm* dimasukkan dalam pipa kapiler dengan kedalaman 10 mm. kemudian pipa kapiler tersebut diletakkan dalam alat *melting point SMPI* dengan posisi yang sesuai, saat suhu pada *lip balm* mulai meleleh adalah titik lebur *lip balm* (*Farmakope Indonesia Edisi V*, 2014). Persyaratan dari titik lebur lip balm yaitu 50-75°C (Fernandes dkk, 2013).

10. Uji antioksidan *lip balm* dengan metode DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH

Larutan DPPH 0,04 mM dibuat dengan cara yaitu timbang standar DPPH sebanyak 0,01577 g serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu terukur 100 mL dan dilarutkan dalam 100 mL etanol p.a. Selanjutnya labu ditutup rapat dengan penutupnya, lalu dikocok hingga larutan berwarna violet. Setelah itu, disimpan pada tempat yang terlindungi dari cahaya matahari (Dwi dkk, 2021).

b. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Kuersetin ditimbang sebanyak 50 mg lalu dilarutkan dengan etanol p.a hingga 50 mL sehingga mendapatkan konsentrasi larutan sampel 1000 ppm, selanjutnya larutan induk 1000 ppm dipipet 1 mL dilarutkan dengan etanol p.a hingga 10 mL untuk 100 ppm.

c. Penentuan aktivitas antioksidan larutan pembanding kuersetin

Larutan seri kadar dibuat dengan kadar 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Selanjutnya, larutan DPPH 0,4 mM dipipet sebanyak 1 mL ditambahkan larutan pembanding kuersetin sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL lalu didiamkan selama 30 menit (Dwi dkk, 2021).

d. Penentuan panjang gelombang maksimum

Pengukuran pada larutan DPPH yang telah dibuat dalam konsentrasi 100 ppm ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya (Pramono, 2012).

e. Penentuan *Operating Time*

Hasil dari panjang gelombang maksimum dilanjutkan dengan pengujian *operating time* yang bertujuan untuk menentukan waktu reaksi yang stabil dan dibaca absorbansinya pada menit ke 1 sampai menit ke 30 (Supiani Rahayu dkk, 2021).

f. Pembuatan larutan ekstrak daging buah labu kuning

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 50 mg ekstrak daging buah labu kuning dengan etanol p.a sampai 50 mL dalam Erlenmeyer hingga larut sempurna. Masing-masing dipipet sebanyak 100, 200, 300, 400, dan 500 μL dan dicukupkan volumenya hingga 5 mL, sehingga didapatkan konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm (Salampe dkk, 2019).

g. Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak buah labu kuning

Ekstrak buah labu kuning (20, 40, 60, 80, dan 100 ppm) sebanyak 4 mL ditambah 1 mL larutan DPPH dicampur hingga larut sempurna, disimpan selama 30 menit. Kemudian serapannya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Salampe dkk, 2019)

h. Uji aktivitas antioksidan terhadap sediaan *lip balm* ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata* D.)

Sampel uji yang telah dibuat seri konsentrasi diambil 10 mg, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dicukupkan etanol p.a untuk membuat konsentrasi induk 100 ppm (Yahdian dkk, 2022). Setelah itu, dimasukkan ke dalam vial lalu ditambahkan 1 mL larutan DPPH. Campuran larutan dihomogenkan lalu dibiarkan selama 30 menit di tempat yang terlindungi dari cahaya. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum DPPH yakni 518 nm. Aktivitas antioksidan ditentukan dari besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH, selanjutnya dihitung IC₅₀ menggunakan persamaan linier yang diperoleh dari perbandingan antara konsentrasi dan persen inhibisi harus lurus. Aktivitas antioksidan diperoleh menggunakan persamaan di bawah dan Nilai IC₅₀ merupakan bilangan yang dapat menunjukkan konsentrasi sampel uji yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar

50% yang diperoleh dengan cara dibuat kurva linear antara konsentrasi larutan uji (sumbu X) dan % aktivitas antioksidan (sumbu Y) (Pramono, 2012).

Persamaan untuk menghitung aktivitas antioksidan :

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = serapan blanko

B = serapan bahan uji

F. Analisis Data

Data dalam penelitian yang diolah dan dianalisis terdiri dari data hasil pengujian karakteristik fisik sediaan lip balm yang meliputi uji flavonoid (KLT), organoleptis, nilai pH, daya oles, titik leleh, stabilitas sediaan, dan uji aktivitas antioksidan (DPPH). Data tersebut dianalisis secara deskriptif dan statistik, dimana data statistik meliputi data dari hasil uji titik lebur dan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode SPSS.