

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian bersifat eksperimental laboratorium, menggunakan sampel minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) yang diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazil*), aktivitas antioksidannya dinyatakan dalam nilai IC₅₀. Minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) diformulasikan dalam sediaan krim dengan konsentrasi 2,5%, 5% dan 10% tiap formula selanjutnya diuji sifat fisiknya.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Pembuatan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, sedangkan formulasi krim uji karakteristik fisik dan uji aktivitas antioksidan krim dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu penelitian

Bulan Juni – Agustus 2023.

C. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) yang diambil dari hasil pertanian Desa Getasan Kabupaten Semarang, yang dibuat dalam minyak menggunakan proses soxhletasi.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel yang tercakup dalam hipotesis penelitian dan berpengaruh atau mempengaruhi variabel tergantung. Pada penelitian ini variabel bebasnya adalah konsentrasi minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dalam sediaan krim (2,5%, 5%, 10%).

2. Variabel tergantung

Variabel yang ada di dalam hipotesis penelitian dan keragamannya dipengaruhi oleh variabel lain. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Pengujian aktivitas antioksidan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazil*) yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} .
- b. Pengujian evaluasi mutu fisik sediaan krim yang meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, viskositas dan *cycling test*.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah waktu, reagen, suhu dan panjang gelombang absorbansi.

E. Instrumen penelitian

1. Alat

- a. Alat untuk membuat minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) :
Alat soxhletasi, *Rotary evaporator* (Biobase RE-2000E), waterbath (DHH 8/XMT-204), gelas ukur (Iwaki), corong kaca (Pyrex), kertas saring, batang pengaduk, cawan penguap, oven (Memert), ayakan ukuran 60 mesh, botol kaca gelap.
- b. Alat untuk formulasi krim dan pengujian mutu fisik : *Ultra turax* (IKA/T25 D), *Viscometer Brookfield* DVT2, timbangan analitik (Ohaus), pH meter (Ohaus/ST3 100), plat kaca, alat daya lekat, jangka sorong, *climatic chamber* (Mettler/ICH 110), lemari es, lumpang dan alu.
- c. Alat untuk uji kandungan senyawa metabolit sekunder : Rak tabung reaksi, tabung reaksi, (Iwaki), pipet tetes, bunsen, penjepit kayu.
- d. Alat untuk uji aktivitas antioksidan : Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), pipet ukur 1 mL (Iwaki), pipet ukur 2 mL (Iwaki), pipet ukur 5 mL (Iwaki) timbangan analitik (Ohaus), labu takar 50 mL (Iwaki), labu takar 10 mL (Iwaki), labu takar 5 mL (Iwaki), tabung reaksi (Iwaki), rak tabung reaksi, aluminium foil dan mikropipet (Socorex).

2. Bahan

- a. Bahan untuk minyak : serbuk biji labu kuning, n-hexan (Farmasetis).

- b. Bahan untuk formulasi krim : Minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) tokoferol (Farmasetis), niasinamid (Farmasetis), asam stearat (Farmasetis), gliserin (Farmasetis), setil alkohol (Farmasetis), propilenglikol (Farmasetis), TEA (Farmasetis), fenoksietanol (Farmasetis), pewangi apel (Farmasetis), aquadest.
- c. Bahan untuk uji kandungan senyawa metabolit sekunder : Asam klorida (HCl), magnesium (Mg), FeCl₃ 1%, asam sulfat (H₂SO₄), aquadest.
- d. Bahan untuk uji aktivitas antioksidan : DPPH (*1,1-difenil-2-2-pikrilhidrazil*), etanol (p.a), ekstrak minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*), tokoferol.

F. Prosedur penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi biji labu kuning dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Hasil determinasi ini dilakukan untuk menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan untuk menjamin kebenaran jenis atau spesies tanaman.

2. Pembuatan Simplisia Biji Labu Kuning

Biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dikeringkan dengan cara dioven menggunakan suhu 50°C selama 4 hari untuk menghilangkan kadar air biji labu kuning. Biji labu kuning yang sudah kering dikupas

dan dihaluskan menggunakan blender, setelah diblender diperoleh serbuk dan diayak menggunakan ayakan ukuran 60 mesh kemudian diekstraksi dengan metode soxhletasi (Julianty *et al.*, 2021).

3. Pembuatan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*)

Sebanyak 35 gram serbuk biji labu kuning dimasukkan kedalam kantung yang terbuat dari kertas saring dan kemudian dimasukkan kedalam alat soxhlet. Biji labu kuning diekstraksi menggunakan pelarut n-hexan sebanyak 350 ml. Ekstraksi dilakukan hingga pelarut yang merendam sampel terlihat jernih. Hasil ekstrak yang berwarna hijau kekuningan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C. Setelah itu dilakukan penguapan di atas waterbath dengan suhu 50°C selama ± 4 hari, minyak yang sudah diuapkan ditutup dan disimpan pada tempat yang dingin dalam botol berwarna gelap (Rohani *et al.*, 2015).

4. Uji bebas pelarut n-hexan

Uji bebas n-hexan dilakukan dengan cara 2 mL minyak dimasukkan dalam tabung reaksi lalu dibakar di atas api bunsen. Api dan asap yang terbentuk diamati jika tidak menghasilkan api dan asap maka minyak sudah terbebas dari n-hexan. Jika menghasilkan api dan asap maka minyak masih mengandung n-hexan dan perlu dilakukan penguapan kembali (Rifqi, 2019).

5. Uji Kandungan Senyawa Metabolit

a. Flavonoid

Sampel diambil sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan serbuk magnesium 2 Mg dan diberikan 3 tetes HCl pekat, kemudian dibiarkan beberapa menit dan terjadi perubahan warna yaitu warna kuning pada larutan dan menunjukkan adanya flavonoid (Debby *et al.*, 2020).

b. Saponin

Sampel diambil sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan aquadest 5 mL kemudian dikocok dan diamkan selama 10 menit, ditambahkan HCl 2 N menandakan adanya buih yang stabil hal tersebut menunjukkan adanya senyawa bioaktif saponin (Debby *et al.*, 2020).

c. Tanin

Sampel diambil sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl₃ klorida 1% . Apabila terjadi suatu perubahan warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin (Hasibuan *et al.*, 2022).

d. Terpenoid

Sampel diambil sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL kloroform dan H₂SO₄ sebanyak 3 ml dan terjadi perubahan warna yakni warna coklat

kemerahan. Adanya perubahan warna menunjukkan bahwa minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) menunjukkan adanya terpenoid (Debby *et al.*, 2020).

6. Uji Aktivitas Antioksidan Minyak Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)

a. Pembuatan Larutan Induk DPPH

DPPH ditimbang sebanyak 2 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a dalam beaker glass sampai larut kemudian dimasukkan ke labu ukur 50 mL diad ditambahkan sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 40 ppm. Setelah itu, labu ukur yang berisi larutan DPPH dibungkus dengan aluminium foil dan disimpan ditempat gelap.

b. Pembuatan Larutan Tokoferol sebagai Pembanding

Tokoferol ditimbang sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dengan etanol p.a sampai volume 50 mL (konsentrasi 1000 ppm). Larutan stok tersebut dibuat dalam seri konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm.

c. Penentuan Panjang Gelombang dan *Operating time*

Larutan DPPH pada konsentrasi 40 ppm setelah didiamkan selama 30 menit dibaca serapannya pada panjang gelombang antara 500-550 nm. Panjang gelombang diperoleh dari panjang gelombang maksimal yang muncul pada rentang panjang gelombang 500-550 nm. *Operating time* diperoleh dari nilai absorbansi paling stabil pada menit ke 0-30. Penentuan *operating time* dilakukan dengan melihat grafik

absorbansi pada menit yang menunjukkan pengukuran yang stabil. Ciri-ciri secara visual adanya perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning.

d. Uji Aktivitas Antioksidan Tokoferol

Larutan tokoferol 1000 ppm dibuat dalam seri konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm. Masing-masing larutan tersebut dipipet 4 mL dan 1 mL larutan DPPH 40 ppm, didiamkan pada ruang gelap selama *operating time*, absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang (λ maks).

e. Uji Aktivitas Antioksidan Minyak Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)

Larutan minyak biji labu kuning 100 ppm dibuat dalam seri konsentrasi 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm dan 80 ppm. Masing-masing larutan tersebut dipipet 4 mL dan 1 mL larutan DPPH 40 ppm, didiamkan pada ruang gelap selama *operating time*, absorbansi dibaca pada panjang gelombang (λ maks).

7. Formulasi Krim Minyak Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)

Sediaan krim dibuat dalam 3 formulasi dengan masing-masing konsentrasi minyak biji labu kuning yaitu F1 2,5%, F2 4,5% dan F3 10%. Pembuatan krim diawali dengan penimbangan bahan terlebih dahulu, yaitu fase minyak (asam stearat, setil alkohol, alfa tokoferol, minyak biji labu kuning), fase air (propilenglikol, gliserin, TEA, fenoksietanol, aquadest), dan niasinamid. Niasinamid yang sudah ditimbang digerus terlebih dahulu

kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 5 mL untuk melarutkan niasinamid. Masing-masing fase minyak dan fase air dipanaskan di atas *waterbath* pada suhu 70°C sampai melebur. Fase minyak yang telah melebur ditambahkan minyak biji labu kuning sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai tercampur merata dan fase air ditambahkan niasinamid dan sisa air aquadest. Fase minyak dan fase air dipisah dan dipindahkan kedalam *beaker glass* dalam kondisi masih hangat dan dihomogenkan dengan *ultra turax* dengan kecepatan 10.000 rpm sampai sediaan homogen dan terbentuk basis krim, kemudian ditambahkan pewangi apel sebanyak 2 tetes dalam sediaan krim dan dihomogenkan kembali dengan *ultra turax* sampai sediaan krim tercampur merata. Formula krim minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dibuat berdasarkan modifikasi dari penelitian (Hasniar, 2015) yang terdapat pada tabel 3.1.

**Tabel 3. 1 Formula Krim Minyak Biji Labu Kuning
(*Cucurbita moschata*)**

		Σ Bahan (%)			
Komposisi	Fungsi	F1	F2	F3	Kontrol
Minyak Biji labu kuning	Zat aktif (antioksidan)	2,5	5	10	0
Tokoferol	Zat aktif (antioksidan)	0,04	0,04	0,04	3,79
Niasinamid	<i>Antiaging</i>	2,4	2,4	2,4	2,4
Asam stearat	Emulgator	9,6	9,6	9,6	9,6
Gliserin	Humektan	2,4	2,4	2,4	2,4
Setil alkohol	Emmolien	1,6	1,6	1,6	1,6
Propilenglikol	Humektan	1,2	1,21	1,2	1,2
TEA	Emulgator	0,5	0,5	0,5	0,5
Fenoksietanol	Preservatif	0,4	0,4	0,4	0,4
Pewangi Apel	Parfum	2 tetes	2 tetes	2 tetes	2 tetes
Aquadest	Pelarut	ad 80	ad 80	ad 80	ad 80

8. Evaluasi Fisik Sediaan Krim

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis sediaan krim dilakukan dengan mengamati warna, aroma, bentuk dan tekstur krim. Sediaan krim yang baik memiliki tekstur atau bentuk yang lunak, bau yang menyenangkan dan warna yang menarik (Pogaga *et al.*, 2020).

b. Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan cara, yaitu dengan mengoleskan sediaan pada plat kaca dan diratakan, sediaan krim yang baik harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Pogaga *et al.*, 2020).

c. Uji pH

Sebanyak 1 gram sediaan krim dilarutkan dengan aquadest 10 ml sampai homogen, kemudian diukur pH menggunakan pH meter dan dibaca pH pada bagian monitor. pH sediaan yang memenuhi kriteria pH kulit yaitu sekitar 4,5-8,0 (Wulandari *et al.*, 2022).

d. Uji Daya Sebar

Masing-masing krim ditimbang sebanyak 1 g, lalu diletakan diatas alat uji daya sebar dan diletakkan beban sebesar 50 gram biarkan selama 1 menit, lalu diukur diameter sebarnya. Tiap 1 menit, beban ditambah sebanyak 50 gram sampai 350 gram (Pogaga *et al.*, 2020).

e. Uji Daya Lekat

Sebanyak 0,5 gram krim ditimbang krim dan dioleskan pada plat kaca. Kedua plat kaca ditempelkan hingga plat menyatu, diberikan beban seberat 1000 gram selama 5 menit setelah itu dilepaskan, lalu diberi beban pelepasan. Waktu dicatat sampai kedua plat saling lepas. Berdasarkan persyaratan daya lekat krim yang baik yaitu >4 detik (Pogaga *et al.*, 2020).

f. Uji Viskositas

Pengukuran viskositas krim dilakukan dengan menggunakan alat viskosimeter *Brookfield* DVT2 dan menggunakan spindle 64 dengan kecepatan 15 rpm selama 1 menit. Krim dimasukkan ke dalam wadah pot krim kemudian spindle yang telah dipasang diturunkan sehingga batas spindle tercelup ke dalam krim. Nilai viskositas akan muncul dimonitor viscometer *Brookfield* kemudian baca dan catat skalanya ketika jarum merah yang bergerak telah stabil (Nailufa & Najih, 2020).

g. *Cycling Test*

Sediaan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam dilemari es dan dilanjutkan dengan menyimpan sediaan pada suhu 40°C selama 24 jam di *climatic chamber*. Kedua perlakuan tersebut merupakan siklus pertama. Pengujian dilakukan sebanyak 6 siklus dan diamati terjadinya perubahan fisik dari sediaan krim pada awal dan akhir pengujian yang

meliputi organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat dan viskositas (Pogaga *et al.*, 2020).

G. Analisis data

1. Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) ditentukan dengan menggunakan nilai IC₅₀ (*Inhibitor Concentration 50%*). IC₅₀ adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas suatu radikal sebesar 50%. Nilai IC₅₀ masing-masing konsentrasi sampel dihitung dengan menggunakan konsentrasi fraksi antioksidan yang dinyatakan sebagai sumbu x dengan % inhibisi yang dinyatakan sebagai sumbu y dari seri replikasi pengukuran (Baslani *et al.*, 2023).

Nilai IC₅₀ pada masing – masing dengan pelarut n-hexan ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva hubungan konsentrasi sampel terhadap persen inhibisi dengan persamaan $Y = bx + a$, konsentrasi sampel (ppm) sebagai sumbu (X) dan nilai persentase inhibisi sebagai sumbu (Y) (Purwanto *et al.*, 2017).

Perhitungan %inhibisi diperoleh dengan rumus berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Uji}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

2. Evaluasi Mutu Fisik Krim Minyak Biji Labu Kuning

Data penelitian mutu fisik sediaan dianalisis secara deskriptif meliputi uji organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji daya sebar, uji daya

lekat, uji viskositas dan uji *cyling test*. Data dianalisa dengan perangkat lunak SPSS 20. Untuk mengetahui normalitas data menggunakan uji *Shapiro – wilk* karena jumlah sampel kecil (<50). Data dikatakan terdistribusi normal jika $p > 0,05$ dan data dikatakan tidak terdistribusi normal jika $p < 0,05$. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Levene's test* yaitu untuk mengetahui homogenitas data. Data dikatakan homogen jika $p > 0,05$ dan data dikatakan tidak homogen jika $p < 0,05$.

One Way Anova (Analysis Of Varians) dengan taraf kepercayaan 95%. Data yang tidak memenuhi syarat tersebut maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Walls*. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Different*). Data yang terdistribusi normal dan varietasnya homogen dianalisis menggunakan uji T atau uji statistik. Jika pada hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan bahwa data yang diuji terdistribusi normal dan tidak homogenitasnya atau tidak terdistribusi normal dan homogenitas maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu dengan uji *Kruskal Wails* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.