

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk memformulasikan sari buah lemon (*Citrus limon (L.)*) menjadi *lotion* serta ingin mengetahui mutu fisik dan aktivitas antioksidan sediaan *lotion* sari buah lemon.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro (UNDIP) untuk mengetahui kebenaran buah lemon (*Citrus limon (L.)*).
2. Uji skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pembuatan *lotion* sari buah lemon (*Citrus limon (L.)*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
4. Uji mutu fisik dilakukan di Laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
5. Uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Pada Penelitian ini variabel bebasnya adalah sari buah lemon (*Citrus limon* (L.)) dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15%.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu organoleptik, daya sebar, daya lekat, pH, viskositas, homogenitas, tipe emulsi dan aktivitas antioksidan (IC₅₀).

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu pisau, talenan, baskom plastik, loyang lebar, kain hitam, alat peras, batang pengaduk, kertas saring, corong kaca, gelas ukur, labu ukur (PHYREX), tabung reaksi (IWAKI), cawan penguap RAS), *waterbath* (MEMMERT), mortir, stamper, sudip, *beaker glass* (PHYREX), chamber, neraca analitik (OHAUS Pioner), pipet tetes, pipet volume (IWAKI), Erlenmeyer (IWAKI), kertas perkamen, pot plastik, penjepit kayu, spatula, kaca arloji, pH meter (OHAUS STARTER 3100), *object glass*, *deck glass*, viscometer Brookfield DV2T, mikroskop (BOECO), *tube lotion*, spektrofotometri UV-1900i

2. Bahan

Sari buah lemon (*Citrus limon* (L)), asam stearat (Farmasetika Grade), trietanolamin (Farmasetika Grade), parafin cair (Farmasetika Grade), setil alkohol (Farmasetika Grade), gliserin (Farmasetika Grade), metil paraben

(Farmasetika Grade), aquadest, DPPH dan methanol p.a (PT. Smart Lab Indonesia)

E. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Fakultas Sains dan Matematika Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang. Determinasi tanaman digunakan untuk mengetahui kebenaran tumbuhan buah lemon (*Citrus limon (L.)*).

2. Pengumpulan Bahan

Buah lemon (*Citrus limon (L.)*) diperoleh dari Pasar Projo Ambarawa, Jawa Tengah. Buah lemon yang digunakan dalam penelitian yaitu buah lemon yang berwarna kuning segar.

3. Penyiapan Bahan

Buah lemon yang diperoleh dicuci bersih dengan air mengalir, dipotong menjadi beberapa bagian kemudian buah diperas dengan menggunakan alat pemeras tanpa penambahan air. Disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan dari biji buah lemon hingga mendapatkan sari lemon, kemudian dimasukkan botol.

4. Skrinning Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Sari buah lemon 2,1 g ditambahkan larutan 2 tetes HCl pekat dan magnesium. Jika terdapat flavonoid positif, perubahan warna dari kuning tua ke orange akan terlihat (Lindawati, 2021).

b. Uji Tannin

Sari buah lemon 2,1 g ditambahkan 2 tetes feriklorida 1%, jika terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan positif tannin (Fadilla *et al.*, 2023) .

c. Uji Alkaloid

Sari lemon 2,1 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 2N. Campuran tersebut dikocok hingga merata, kemudian ditetesi dengan Dragendroff. Perubahan warna menjadi jingga atau orange menunjukkan positif alkaloid (Lindawati, 2021).

d. Uji Saponin

Sari lemon 2,1 g ditambahkan 2 tetes aquades, dikocok, setelah dikocok tambahkan HCl 1N. Positif saponin ditandai dengan terbentuk busa yang stabil (Lindawati, 2021).

e. Uji Steroid Triterpenoid

Sari buah lemon 2,1 g pada tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan pereaksi Lieberman Burchard 2 tetes. Terbentuknya warna violet menunjukkan hasil positif untuk terpenoid, sementara terbentuknya warna biru menunjukkan hasil positif untuk steroid (Lindawati, 2021).

f. Uji Senyawa Fenol

Sari buah lemon 2,1 g ditambahkan 2 tetes $FeCl_3$ 1% dalam air atau etanol. Positif senyawa fenol yang kuat ditandai dengan terbentuk merah, hijau, merah ungu, biru atau hitam (Fadilla *et al.*, 2023).

5. Pembuatan *Lotion*

Pada penelitian ini, dibuat tiga formula dengan tipe *lotion* minyak dalam air (M/A). Dibuat formula *lotion* yang digunakan merupakan hasil modifikasi dari penelitian Nurani (2022), reformulasi dilakukan pada sari buah lemon dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15% (Puspitasari *et al.*, 2020). Formula *lotion* ini dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Formula *Lotion* Sari Buah Lemon (*Citrus limon (L)*)

Bahan	Jumlah Bahan (%)			Keterangan
	Formula I	Formula II	Formula III	
Sari Lemon buah (<i>Citrus limon (L)</i>)	5	10	15	Zat aktif
Gliserin	8	8	8	Pelembab
Parafin Cair	8	8	8	Fase minyak
Setil Alkohol	3	3	3	Emulgator
Asam Stearate	2,5	2,5	2,5	Emulgator
Trietanolamin	1	1	1	Emulgator
Metil paraben	0,1	0,1	0,1	Pengawet
<i>Aquadest</i>	ad 100	ad 100	ad 100	Pembawa

6. Pembuatan Sediaan *Lotion* Sari Buah lemon (*Citrus limon (L)*)

Formula I, II dan III dibuat dengan cara memasukkan asam stearat, setil alkohol dan parafin cair (fase minyak) ke dalam cawan penguap lalu dilebur pada suhu 70-75°C kemudian diaduk hingga homogen (massa 1). Penentuan fase minyak dan fase air berdasarkan kelarutan dari bahan obat. Trietanolamin, gliserin, metil paraben dan aquadest (fase air) dimasukkan ke dalam *beaker glass* lalu dipanaskan pada suhu 70-75°C kemudian diaduk hingga homogen (massa 2). Fase air kemudian dimasukkan ke dalam mortir panas. Fase minyak dicampurkan ke dalam fase air sedikit demi sedikit

dalam keadaan sama-sama panas sambil diaduk sampai terbentuk massa *lotion*. Sari buah lemon dalam mortir kemudian ditambahkan massa *lotion* sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga homogen. *Lotion* yang telah homogen kemudian dimasukkan dalam wadah.

7. Evaluasi Sediaan *Lotion* Sari Buah Lemon (*Citrus limon* (L))

a. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptik dilakukan untuk mengetahui karakteristik fisik dari sediaan *lotion*. Pengujian ini melibatkan panca indera manusia untuk mengevaluasi produk berdasarkan aspek-aspek seperti warna, bentuk, aroma, dan rasa. Untuk pengujian rasa, sediaan *lotion* dioleskan pada kulit tangan.

b. Uji Daya Sebar

Pengujian daya sebar dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram *lotion* beraroma sari buah lemon (*Citrus limon* (L)) dan menempatkannya di tengah kaca bundar yang memiliki skala. Di atas sediaan tersebut, diletakkan sebuah kaca bundar lain yang telah ditimbang, lalu dibiarkan selama 1 menit. Selanjutnya, diameter penyebaran dicatat. Selanjutnya, seberat 50 gram beban diletakkan di atas kaca penutup dan dibiarkan selama 1 menit. Diameter penyebaran juga dicatat. Pemberat tersebut kemudian ditambahkan dengan kelipatan 50 gram hingga konstan. Setelah itu, diameter dan luas penyebarannya diukur (Pujiastuti & Kristiani, 2019).

c. Uji pH

Pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan pH meter yang sebelumnya dikalibrasi dengan larutan standar, yaitu pH 4,7 dan 10, untuk menjaga akurasi pengukuran. Elektroda kemudian dicuci dengan air suling dan dikeringkan. Pengukuran pH *lotion* dilakukan dengan menimbang 1 gram dengan 10 mL aquades. Elektroda pH meter dimasukkan ke dalam *lotion* yang sudah diencerkan. pH larutan akan terbaca dan muncul di layar pH meter (Mudhana & Pujiastuti, 2021).

d. Uji Viskositas

Pengujian viskositas sediaan *lotion* dari sari buah lemon (*Citrus limon (L.)*) dilakukan dengan cara mengambil 100 gram sediaan dan menaruhnya ke dalam wadah. Selanjutnya, viskositas akan diukur menggunakan viskometer Brookfield. Proses pengukuran dimulai dengan memasang *spindle* nomor 64 dan memutar pengunci *spindle* searah jarum jam. Kecepatan *spindle* diatur pada 10 rpm. Nilai viskositas akan dicatat dari angka yang paling sering muncul pada layar viskometer (Pujiastuti & Kristiani, 2019).

e. Uji Daya Lekat

Lotion sari buah lemon (*Citrus limon (L.)*) sebanyak 0,1 gram diletakkan di tengah objek kaca dan ditutup dengan kaca objek lainnya. Sebuah beban seberat 50 gram ditempatkan di atas tutup kaca objek selama 5 menit. Ujung tutup objek kaca dan ujung bagian bawah objek kaca dihubungkan dengan penjepit pada alat uji daya lekat, kemudian

penyangga beban dilepaskan. Waktu yang diperlukan hingga kedua objek kaca terlepas dari alat uji dicatat sebagai waktu lekat sediaan (Pujiastuti & Kristiani, 2019).

f. Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan cara menimbang 0,1 g *lotion* sari buah lemon (*Citrus limon (L.)*). *Lotion* ditempatkan di tengah objek kaca, kemudian diratakan dan ditutup dengan objek kaca lainnya. Untuk menilai homogenitas *lotion* dengan memeriksa apakah terdapat partikel kasar atau ketidakteraturan dalam sediaan tersebut (Pujiastuti & Kristiani, 2019).

g. Uji Tipe Emulsi

Pengujian tipe *lotion* dilakukan untuk mengidentifikasi basis *lotion* yang digunakan, karena tipe *lotion* mempengaruhi pelepasan bahan aktif dari basisnya. Pengujian tipe *lotion* menggunakan metode pewarna larut air, yaitu methylen blue. Sediaan *lotion* dilarutkan dengan methylen blue hingga homogen, ditutup dengan *deck glass* dan diamati dibawah mikroskop. Fase eksternal akan terwarnai biru, jika *lotion* bertipe minyak dalam air (M/A) (Ekowati & Hanifah, 2017).

h. Vitamin C Pada Sari Buah Lemon

Vitamin C pada sari buah lemon berperan sebagai bagian dari sistem pertahanan tubuh terhadap senyawa oksigen yang relatif reaktif di dalam sel dan plasma. Dikenal dengan nama latin L-asam askorbat, vitamin ini termasuk dalam kategori antioksidan "aqueous antioxidant" karena

memiliki berat molekul sebesar 176,13 dan dapat larut dalam air. Dengan sifat dan rasa yang asam, serta memiliki rumus molekul $C_6H_8O_6$, vitamin C berbentuk kristal dan tidak memiliki aroma. Sebagai suatu zat gizi, vitamin C diperlukan oleh tubuh dan memiliki karbohidrat sebagai prekursornya.

i. Uji Aktivitas Antioksidan Sari Buah Lemon (*Citrus limon (L)*)

1) Pembuatan Larutan DPPH 40 ppm

Sebanyak 4 mg DPPH ditimbang lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL ditambah metanol p.a hingga tanda batas, labu ukur dikocok hingga homogen diperoleh konsentrasi sebesar 40 ppm (Paat *et al.*, 2022).

2) Penentuan panjang gelombang maksimum

Sampel 4 mL larutan DPPH 40 ppm, diukur panjang gelombang maksimumnya pada spektrometri UV-Vis pada rentang panjang gelombang 510-520 nm (Saputri *et al.*, 2022)

3) Opereting Time Larutan DPPH

Larutan DPPH sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL , ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas. Setiap labu ukur ditutup rapat dengan alumunium foil dan diinkubasi 30 menit. Setelah itu, dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis selama 30 menit (Pramiastuti *et al.*, 2021).

4) Pembuatan dan pengukuran larutan pembanding kuarsetin

Pembuatan larutan kuarsetin 100 ppm dilakukan dengan cara menimbang 10 mg kuarsetin kemudian dilarutkan dalam labu 100 mL dengan metanol p.a sampai tanda batas, lalu dikocok hingga homogen. Dibuat pengenceran larutan seri 2, 4, 6, 8, 10 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet 1 ml, kemudian dimasukkan tabung reaksi dan ditambah larutan DPPH sebanyak 2 ml. Vortex selama 5 detik lalu diamkan 30 menit di suhu kamar. Dilakukan pengamatan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Paat *et al.*, 2022).

5) Penentuan aktivitas antioksidan *lotion* sari buah lemon (*Citrus limon* (L).)

Sari buah lemon ditimbang sebanyak 25 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu takar 25 mL hingga tanda batas didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Dibuat masing-masing konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan ditambah 2 mL larutan DPPH kemudian dikocok hingga homogen. Diukur dengan spektrometri UV-Vis dengan panjang gelombang yang didapatkan (Paat *et al.*, 2022).

6) Penentuan nilai IC₅₀

IC₅₀ diperoleh dari data persen inhibisi hasil pengujian yang dilakukan. Persen inhibisi dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Hasil perhitungan kemudian diubah menjadi persamaan linier

$$y = bx + a.$$

Keterangan :

$$y = 50$$

$$x = IC_{50}$$

a dan b = Regresi linier

Persamaan linier digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} . Untuk

menghitung nilai IC_{50} digunakan rumus berikut :

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Keterangan :

a = intersep (perpotongan garis sumbu y)

b = Slope (kemiringan)

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil evaluasi sediaan *lotion*, kemudian dilakukan analisa statistik menggunakan aplikasi SPSS vs.26. Uji statistik yang dilakukan pada penelitian ini yaitu uji normalitas, uji One-Way ANOVA, uji LSD, *Kruskall-Wallis* dan *Mann-Whitney*.