

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah secara laboratorium yang bertujuan untuk menganalisis aktivitas antioksidan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) terhadap penghambatan radikal DPPH kemudian memformulasikan dalam sediaan serum yang memiliki mutu fisik dan kestabilan sesuai persyaratan literatur.

#### **B. Lokasi Penelitian**

Ekstraksi biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) menjadi minyak dan skrining fitokimia pada minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam. Formulasi dan evaluasi mutu fisik serum minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Universitas Ngudi Waluyo.

#### **C. Subjek Penelitian**

Minyak biji labu kuning diperoleh dari proses soxletasi biji labu kuning (*Cucurbita moschata*). Populasi dari biji labu kuning pada penelitian ini yang berasal dari Desa Getasan, Kabupaten Semarang. Sampel penelitian ini adalah biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) yang digunakan sebanyak 500 gram.

#### **D. Variabel Penelitian**

##### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dalam sediaan serum yaitu 1% dan 3%

##### 2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mutu fisik serum yang meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, uji iritasi, dan uji viskositas dan kestabilan.

##### 3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah suhu dan cahaya, panjang gelombang, suhu pengujian aktivitas antioksidan.

#### **E. Alat dan Bahan**

##### 1. Alat

Alat Soxhletasi, blender, *rotary evaporator* (Biobase RE-2000E), ayakan ukuran 60 mesh, botol gelap, (Iwaki), beerglass (Iwaki), pipet tetes, gelas ukur (Iwaki), stirrer magnetik (Cimarec), gelas objek, pH meter (Ohaus), kaca bulat, Viskometer Brookfield DV2T, labu takar, tabung reaksi (Iwaki), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), pipet volume, timbangan digital (Ohaus)

##### 2. Bahan

Biji labu kuning (*Cucurbita moschata*), n-heksana (PT. Brataco, teknis), larutan asam sulfat pekat, larutan feriklorida 1%,

asam klorida 2N, tween 80 (Farmasetika) , aloe vera gel (Farmasetika), gliserin (Farmasetika) ,metil paraben (Farmasetika), niacinamide (Farmasetika), aquadest, etanol pro analisa , vitamin C (Farmasetika)

## **F. Prosedur Kerja**

### **1. Pembuatan Minyak Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)**

#### **a. Persiapan Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)**

Biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) yang sudah disortasi basah dari kulit biji yang tidak dipakai dikeringkan dengan cara dianginkan pada suhu kamar di tempat yang tidak terpapar sinar matahari selama  $\pm$  3 hari kemudian biji labu dihaluskan ukurannya menggunakan blender dan diayak dengan ayakan 60 mesh untuk mendapatkan serbuk biji (Julianty, 2021)

#### **b. Pembuatan Ekstrak Minyak Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)**

Sebanyak 40 gram bubuk biji labu kuning ditimbang dan dibungkus dengan kertas saring dan masukkan ke dalam alat ekstraksi Soxhlet untuk diekstraksi. Pelarut n-heksana dimasukkan ke dalam labu leher tiga sebanyak 300 ml. Perangkat kemudian diekstraksi selama 1 jam dengan suhu 50°C. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 50°C (Julianty, 2021)

## 2. Uji Kadar Air

Sebanyak 3 gram minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) ditimbang dan dimasukkan kedalam cawan porselen bertutup yang sebelumnya sudah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Minyak yang sudah dimasukkan dalam kurs, lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 jam. Kadar air yang baik menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) adalah maksimal 0,15% b/b .

Rumus untuk menghitung kadar air yang digunakan adalah :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{(a-b)}{c} \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat sampel dalam cawan sebelum pemanasan

b = berat sampel dalam cawan setelah pemanasan

c = berat sampel yang dilakukan sebelum pemanasan

## 3. Uji Bebas N-Heksana

Uji bebas n-heksan dilakukan dengan cara 5 ml minyak biji labu kuning dan dibakar diatas api bunsen dan amati bau n-heksan. Jika bau n-heksan masih menyengat maka perlu dilakukan penguapan kembali (Zahra *et al.*,2020).

## 4. Identifikasi senyawa metabolit

### a. Flavonoid

Sebanyak 1 ml ekstrak ditambahkan beberapa tetes pereaksi NaOH 10%, jika terjadi perubahan warna orange maka reaksi positif (Ikalinus *et al.*, 2015).

b. Tanin

Sampel dididihkan dengan 20 ml air lalu disaring. FeCl 1% ditambahkan beberapa tetes, jika terbentuknya warna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tannin (Ikalinus *et al.*, 2015)

c. Saponin

Sampel dididihkan dengan 20 ml air dalam penangas air. Filtrat dikocok dan didiamkan selama 15 menit . Jika terbentuk busa yang stabil maka positif terdapat saponin (Ikalinus *et al.*, 2015)

5. Uji aktivitas antioksidan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*)

a. Pembuatan larutan baku DPPH 50 ppm dalam 100 ml

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 5 mg lalu dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml, dilarutkan dengan etanol pa sampai tepat 100 ml lalu digojog.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Untuk penentuan panjang gelombang, menggunakan larutan DPPH dengan konsentrasi 30 ppm. Sebanyak 6 ml larutan DPPH 50 ppm, ditambahkan etanol pa sampai volumenya 10 ml. Setelah itu , dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap, absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450-550 nm untuk memperoleh absorbansi  $\pm$  0,2 – 0,8 (Rahmatullah *et al.*, 2019).

c. Pembuatan larutan blanko

Larutan DPPH 50 ppm dipipet sebanyak 1 ml dan dihomogenkan dengan etanol pa sampai 5 ml dalam labu terukur. Larutan ini kemudian dibiarkan selama 30 menit, selanjutnya serapan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal.

d. Penentuan *operating time* DPPH

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara 1 ml larutan pembanding vitamin C 100 ppm ditambahkan 4 ml larutan DPPH 50 ppm, diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal yang sudah didapatkan dengan interval pada waktu 0-30 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

f. Penentuan aktivitas antioksidan larutan vitamin C

Sebanyak 10 mg vitamin C ditimbang dengan saksama, kemudian dilarutkan dengan etanol pa, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan etanol pa sampai 100 mL, dihomogenkan sehingga diperoleh larutan baku vit C dengan konsentrasi 100 ppm.

Selanjutnya dibuat larutan seri dengan 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan 12 ppm. Sebanyak 1 mL larutan baku DPPH ditambahkan larutan baku vitamin C sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL, kemudian diinkubasikan selama *operating time* yang sudah ditentukan ditempat gelap dan absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh.

- g. Penentuan aktivitas antioksidan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*)

Sebanyak 10 mg minyak biji labu kuning dilarutkan dengan etanol pa dan dimasukkan ke labu ukur 100ml sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian dibuat dalam seri konsentrasi 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm dan 90 ppm. Sebanyak 1 ml larutan baku DPPH ditambahkan pada tiap-tiap konsentrasi larutan sampel sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL. Selanjutnya larutan didiamkan di tempat gelap . Masing – masing larutan diukur absorbansinya.

6. Pembuatan serum minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*)

- a. Formulasi Serum Minyak Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)

Serum minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dibuat dengan seri konsentrasi 1% dan 3% dengan komponen sebagai berikut:

**Tabel 3. 1 Formula serum minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata D seed oil*)**

<b>Nama Bahan</b>	<b>F1 (%)</b>	<b>F2 (%)</b>	<b>Kegunaan</b>
Minyak biji labu kuning	1	3	Antioksidan
Niacinamide	3	3	<i>Antiaging</i>
Gliserin	15	15	Humektan
Metil paraben	0,01	0,01	Pengawet
Tween 80	3	3	Emulsifier
Gel aloe vera	50	50	Gelling
Aquadest ad	100	100	Pelarut

Pembuatan serum dilakukan dengan cara aloe vera dan gliserin dihomogenkan dengan cara distirrer terlebih dahulu (campuran A). Minyak biji labu kuning dan tween 80 dicampurkan (campuran B). Niasinamid dan metil paraben dilarutkan dengan aquadest sebanyak 10

ml lalu dicampur hingga homogen (campuran C). Campuran A,B, dan C distirrer jadi satu hingga terbentuk serum.

7. Uji Karakteristik Serum Minyak Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)

a. Organoleptis

Uji organoleptis sediaan serum pemeriksaan sediaan secara visual meliputi bentuk, warna, bau, homogenitas dari formula

b. Uji pH

Sebanyak 1 gram serum ditimbang, lalu tambahkan aquadest 100 ml lalu pH diukur menggunakan pH meter. pH yang baik untuk kulit adal 4,5-6,5. Nilai pH yang tertera dicatat dan diulangi sebanyak 3 kali (Erwiyani *et.al.*, 2021)

c. Uji homogenitas

Serum ditimbang 0,5 gram kemudian dioleskan pada kaca objek dan diamati adanya butiran kasar (Cahyani & Erwiyani, 2022)

d. Uji daya sebar

Serum ditimbang 500 mg lalu diletakkan ditengah kaca bulat kemudian ditutup dengan kaca bulat yang sebelumnya sudah di timbang. Beban ditambah seberat 50 gram selama 1 menit lalu dicatat diameter penyebarannya. Beban terus ditambah hingga 200 gram dan dicatat diameter penyebarannya. Ulangi sampai 3 kali. Daya sebar yang baik untuk sediaan topikal adalah memiliki diameter sebesar 50 – 70 cm (Arbie *et al.*,2021)

e. Uji viskositas

Alat yang digunakan dalam uji viskositas adalah Viskometer Brookfield KU. Sebanyak 50 ml serum dimasukkan ke dalam spindle 64 yang sudah dipasang, diturunkan sampai spindle tercelup dalam sediaan. Tombol power on dinyalakan, kecepatan spindle diputar dalam 50 rpm selama 1 menit. Viskositas diperoleh dari angka yang muncul dalam di monitor viskometer. Sediaan serum memiliki nilai viskositas sesuai dengan standar sebesar 800. Jika presentase dibawah nilai cP 10% maka kecepatan dinaikkan atau ganti spindle dengan ukuran kecil. Jika nilai cP lebih dari 100% maka kurangi kecepatan atau ganti spindle dengan ukuran yang besar (Cahyani & Erwiyani, 2022) . Sediaan serum memiliki nilai viskositas sesuai dengan standar sebesar 800 – 3.000 cps.

8. *Cycling test*

*Cycling test* merupakan pengujian yang dipercepat dengan menyimpan sampel pada suhu 4°C selama 24 jam lalu dipindahkan ke dalam oven yang bersuhu 40° C selama 24 jam. Perlakuan ini adalah 1 siklus. Perlakuan diulangi sebanyak 6 siklus dan dilakukan pengamatan dengan parameter organoleptik, homogenitas, pH, daya sebar dan viskositas . (Mardikasari *et al.*, 2017).

## **G. Analisis Data**

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan analisis deskriptif untuk organoleptis uji mutu fisik meliputi homogenitas,

pH, uji daya sebar dan uji viskositas, uji *cycling test* dianalisis menggunakan *Anova One Way*. Data hasil uji DPPH dibuat grafik untuk menentukan panjang gelombang. Data hasil absorbansi digunakan untuk mencari % inhibisinya. Rumus untuk mencari nilai %inhibisinya sebagai berikut:

$$\% \text{inhibisi} = \frac{a \text{ blanko} - a \text{ sampel}}{a \text{ blanko}} \times 100\%$$

Keterangan :

a blanko = absorbansi pada DPPH tanpa sampel

b sampel = absorbansi pada DPPH setelah di tambahkan sampel

Hasil dapat dimasukkan ke dalam persamaan linear sebagai berikut:

$$Y = bX + a$$

Dimana :

Y = % inhibisi

a = gradien

x = konsentrasi

b = konstanta

Persamaan linear diatas digunakan untuk mencari nilai  $IC_{50}$ . Untuk mencari nilai

$IC_{50}$  dapat dimasukkan ke persamaan berikut ini:

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