

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium untuk membuat formula *lip balm* dengan kombinasi minyak alpukat (*Persea americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.). Konsentrasi dari kedua minyak yang digunakan adalah (10%:15%), (12,5%:12,5%) dan (15%:10%). Formula *lip balm* tersebut kemudian diuji secara fisik untuk mengetahui organoleptik, homogenitas, titik leleh, uji stabilitas (*cycling test*), dan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dengan parameter IC<sub>50</sub>.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **1. Lokasi Penelitian**

- a. Pembuatan formulasi sediaan *lipbalm* minyak alpukat (*Persea americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) dilakukan di Laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- b. Pengujian evaluasi sifat fisik sediaan *lipbalm* minyak alpukat (*Persea Americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) dilakukan di Laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

- c. Pengujian aktivitas antioksidan minyak alpukat (*Persea Americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) dilakukan di Laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

## 2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dari Mei hingga Juni 2024 untuk membuat formulasi minyak alpukat (*Persea Americana* Mill.) dan *virgin coconut oil* (*Cocos nucifera* L.) menjadi sediaan *lipbalm* dan menguji aktivitas antioksidannya.

## C. Subjek Penelitian

Minyak alpukat (*Persea Americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) diperoleh dari PT Tamba Sanjiwani, Jl Meliling Km 1 Br. Dinas Meliling Kawan, Meliling, Krumbitan Kab. Tabanan.

## D. Definisi Operational

1. Minyak alpukat (*Persea Americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) diperoleh dari PT Tamba Sanjiwani, Jl Meliling Km 1 Br. Dinas Meliling Kawan, Meliling, Krumbitan Kab. Tabanan.
2. Perbandingan minyak alpukat (*Persea Americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) yang digunakan adalah (10%:15%), (12,5%:12,5%) dan (15%:10%).
3. DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) adalah metode untuk menguji aktivitas antioksidan kombinasi minyak alpukat (*Persea americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.)

4.  $IC_{50}$  merupakan nilai konsentrasi untuk mengukur aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh sampel.

## **E. Variabel Penelitian**

### **1. Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu minyak alpukat (*Persea americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) adalah variasi konsentrasi dengan perbandingan minyak masing – masing (10%:15%), (12,5%:12,5%) dan (15%:10%).

### **2. Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu hasil uji sifat fisik sediaan *lip balm* yang meliputi organoleptik, homogenitas, pH, titik leleh, stabilitas (*cycling test*), dan mengukur efektivitas antioksidan dengan parameter nilai  $IC_{50}$ .

### **3. Variabel Terkendali**

Variabel terkontrol dalam metode ini adalah suhu, baik penyimpanan dan pembuatan sediaan *lip balm* dan lama waktu pengujian stabilitas dipercepat.

## **F. Pengumpulan Data**

### **1. Alat**

Cawan porselin, penangas air, pengaduk kaca, gelas arloji, panci air, kompor listrik, timbangan analitik, sendok porselin, tabung reaksi, penjepit kayu, objek kaca, oven, spektrofotometer Shimadzu UV-1800, *melting point*,

pipa kapiler, kertas saring, corong, gelas ukur, Erlenmeyer, perkamen, *magnetic stirrer* dan labu takar adalah semua alat yang digunakan pada penelitian ini.

## 2. Bahan

Minyak alpukat (*Persea americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) sebagai zat aktif dan fase minyak yang digunakan dalam penelitian ini, bersama dengan bahan tambahan lainnya seperti kuersetin sebagai blanko sampel, methylparaben sebagai pengawet, larutan DPPH, *adepts lanae*, *oleum cacao*, *cera flava*, etanol p.a, gliserin, HCl pekat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, pereaksi dragendroff, besi (III) klorida 10%.

## G. Prosedur Penelitian

### 1. Skrining Fitokimia Minyak

#### a. Uji Flavonoid

Minyak alpukat dan minyak VCO masing masing dimasukkan kedalam tabung reaksi 7 – 10 tetes, selanjutnya ditambahkan beberapa tetes larutan asam sulfat pekat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Diamati perubahan warna yang terjadi, jika larutan berubah warna menjadi merah tua atau kuning menandakan adanya senyawa flavonoid (Ropiqa *et al.*, 2023).

#### b. Uji Alkoloid

Minyak alpukat dan VCO masing masing diambil sebanyak kurang 3 – 7 tetes dan ditambahkan dengan beberapa tetes asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pekat lalu dipanaskan selama 30 menit. Didiamkan sampai larutan

memisah, lalu larutan ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendroff, hasil positif ditandakan dengan adanya endapan jingga (Puspa *et al.*, 2017).

c. Uji Tannin

Pada pengujian tanin, dilakukan dengan tahapan beberapa tetes minyak alpukat dan VCO masing masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, larutan besi (III) klorida 10% ditambahkan ke dalam minyak. Jika terbentuk warna hijau kecoklatan atau hitam kebiru, minyak tersebut positif mengandung tannin (Jubaidah *et al.*, 2023).

d. Uji Saponin

Minyak sebanyak 3-7 tetes dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 mL air (H<sub>2</sub>O) panas. Larutan dikocok selama 30 detik, busa yang terbentuk menunjukkan adanya saponin. Larutan didiamkan beberapa menit, jika busa masih stabil antara 1-10 cm menandakan adanya senyawa saponin (Puspa *et al.*, 2017).

## 2. Pembuatan Sediaan *Lip Balm*

Untuk membuat *lip balm* ini, formula *lip balm* yang dimodifikasi dari penelitian Puspita, *et al* pada tahun 2023. Mengacu pada rancangan formula pada tabel 3.1 sebagai berikut:

**Tabel 3. 1 Formula *Lip Balm* Minyak Alpukat dan VCO**

Komposisi	Formula (%)			Fungsi
	FI	FII	FIII	
Minyak Alpukat	10	12,5	15	Zat Aktif
<i>Virgin Coconut Oil</i>	15	12,5	10	Fase Minyak
<i>Cera Flava</i>	7	7	7	Pengeras
<i>Adeps Lanae</i>	15	15	15	Basis
<i>Glycerin</i>	5	5	5	Humektan
Nipagin	0,18	0,18	0,18	Pengawet
<i>Oleum Cacao</i>	47,82	47,82	47,82	Basis

Prosedur tahapan pembuatan *lip balm* diawali dengan menyiapkan semua alat dan bahan, lalu menimbang bahan sesuai formula yang telah ditentukan, *cera flava* dilebur dalam cawan porselin pada temperatur sekitar 62–64°C. *Oleum cacao* dihancurkan dalam cawan porselin lain di atas kompor listrik dan dibiarkan sejenak sampai sedikit meleleh, kemudian diaduk hingga melebur sempurna. kemudian leburan *oleum cacao* dituangkan ke dalam leburan *cera flava* dan diaduk hingga tercampur dengan baik. Nipagin dilarutkan dengan gliserin lalu ditambahkan *adepts lanae* sedikit demi sedikit, selanjutnya dimasukkan ke dalam leburan dasar sambil terus diaduk. Setelah suhu sedikit menurun, kedua jenis minyak dimasukkan ke dalam campuran sambil diaduk hingga campuran menjadi homogen. Setelah sediaan teraduk rata, sediaan *lip balm* yang masih cair dituangkan ke dalam media *lip balm* dan dibiarkan pada temperatur ruang hingga memadat.

### 3. Uji Karakteristik Fisik Sediaan *Lip Balm*

Uji organoleptik, homogenitas, titik leleh, pH, dan stabilitas adalah beberapa parameter yang digunakan untuk menguji sifat fisik sediaan *lip balm*.

a. Uji Organoleptik

Tes ini dilakukan dengan menggunakan indra manusia sebagai alat utama untuk menilai daya terima suatu sediaan. Proses ini melibatkan pengamatan terhadap warna, tekstur, bau, dan bentuk sediaan. Hasil yang diinginkan pada uji organoleptis ini adalah sediaan ini adalah tidak ada perubahan warna atau bentuk, tidak memiliki bau yang tidak sedap, dan memiliki tekstur yang lembut saat disimpan. (Ambari *et al.*, 2020; Sarwanda *et al.*, 2021).

b. Uji Homogenitas

Tes dilakukan untuk memastikan formulasi sudah homogen secara keseluruhan, sediaan ditempatkan antara dua lembar kaca. Hasilnya kemudian diperiksa untuk memastikan ada tidaknya butiran kasar. Tiap uji dilakukan replikasi sebanyak tiga kali (Sholihah *et al.*, 2022).

c. Uji Titik Leleh

Prosedur yang digunakan untuk mengamati titik leleh adalah dengan memasukkan sediaan *lip balm* ke dalam pipa kapiler. Setelah itu, suhu pada *melting point* akan secara otomatis naik  $0,1^{\circ}\text{C}$  setiap beberapa detik dan diamati pada suhu berapa sediaan mulai meleleh. *Lip balm* yang baik adalah yang memiliki titik leleh antara  $50^{\circ}\text{C}$  hingga  $70^{\circ}\text{C}$ . Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali untuk pengujian ini (Sarwanda *et al.*, 2021).

d. Uji pH

Pengujian pH dilakukan untuk memastikan *lip balm* tidak menyebabkan iritasi pada kulit. Prosedur ini dilakukan dengan menggunakan pH meter semi padat yang telah dikalibrasi dengan larutan penyangga netral dan asam, yaitu pH 7 dan pH 4. Sediaan disiapkan dan elektroda dimasukkan kedalam wadah sediaan tersebut. Sediaan dianggap memenuhi syarat jika pH-nya berada dalam rentang 4,5–7,0, yang sesuai dengan pH bibir. Nilai rata-rata dihitung setelah tiga kali replikasi pengukuran (Sarwanda *et al.*, 2021).

e. Uji Stabilitas (*Cycling Test*)

Pengujian stabilitas fisik pada sediaan *lip balm* yang mengandung bahan aktif kombinasi minyak alpukat dan *Virgin Coconut Oil* (VCO) dilakukan dengan menggunakan metode *cycling test*. Metode ini bertujuan untuk mengevaluasi kestabilan sediaan dengan mempertimbangkan pengaruh variasi suhu selama periode penyimpanan. Prosedur pengujian melibatkan penyimpanan sediaan dalam dua kondisi suhu yang berbeda secara bergantian yaitu suhu 40°C pada *climatic chamber* selama 24 jam dan suhu 4 °C didalam kulkas selama 24 jam.

Selama pengujian, dilakukan observasi terhadap perubahan fisik sediaan pada awal dan akhir setiap siklus. Parameter yang diamati meliputi



karakteristik organoleptik, homogenitas, titik lebur, dan pH (Ambari *et al.*, 2020).

#### **4. Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Lip Balm dengan Metode DPPH**

##### a. Pembuatan Larutan Uji *Lip Balm* Minyak Alpukat dan VCO

###### 1) Pembuatan Larutan Induk *Lip Balm*

Diperlukan larutan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm dengan cara, ditimbang 25 mg tiap sampel uji sediaan *lip balm* FI, FII, dan FIII dan dilarutkan etanol p.a dalam labu ukur 25 mL dengan bantuan *magnetic stirrer* (Amalia *et al.*, 2023).

###### 2) Pembuatan Larutan Seri *Lip balm*

Diperlukan larutan sampel dengan seri konsentrasi 50, 75, 100, 125, dan 150 ppm dengan cara dipipet larutan induk sediaan *lip balm* 1000 ppm yang telah dibuat sebanyak 0,5 mL, 0,75 mL, 1 mL, 1,25 mL, 1,5 mL. Kemudian, dimasukkan larutan seri induk ini ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan etanol p.a. sampai tanda batas (Amalia *et al.*, 2023).

##### b. Pembuatan Larutan DPPH dan Penentuan Panjang Gelombang serta Penentuan *Operational Time*

###### 1) Pembuatan Larutan Induk DPPH

Diperlukan larutan induk DPPH dengan konsentrasi 40 ppm, dibuat dengan cara menimbang 4 mg serbuk DPPH dan mencampurnya dengan etanol p.a dalam labu ukur 100 mL hingga

mencapai tanda batas 100 mL. Setelah itu, digojok a.d homogen. Selanjutnya, diukur waktu operasional dan panjang gelombang maksimum dari larutan DPPH yang telah dibuat (Damanis *et al.*, 2020).

2) Pengukuran Panjang Gelombang Maksimal larutan DPPH

Diukur serapan larutan DPPH pada panjang gelombang 400–800 menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Dengan cara memasukkan 4 mL larutan DPPH 40 ppm yang telah dibuat ke dalam kuvet. Untuk membuat larutan blanko, pipet 1 mL larutan DPPH dan menambahkan 4 mL etanol p.a. biarkan selama waktu operasi di tempat yang gelap (Kase *et al.*, 2023; Susiloningrum *et al.*, 2021).

3) Pengukuran *Operational Time* Larutan DPPH

Dipipet 1 mL larutan DPPH dan ditambahkan dengan 4 mL etanol, lalu dikocok a.d homogen. Selanjutnya, dengan interval waktu 1 – 30 menit, diukur serapan larutan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditetapkan hingga didapatkan absorbansi yang stabil (Susiloningrum *et al.*, 2021).

c. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin dan Pembuatan Larutan Seri Konsentrasi Kuersetin

1) Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Ditimbang 1 mg serbuk kuersetin, lalu dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 10 mL. Didapatkan larutan induk kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm (Susiloningrum *et al.*, 2021).

2) Pembuatan Larutan Seri Konsentrasi Kuersetin

Dipipet larutan induk kuersetin 100 ppm yang telah dibuat sebanyak 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, dan 0,6 mL, sehingga didapat larutan kuersetin dengan konsentrasi 2, 3, 4, 5 dan 6 ppm. Kemudian, dimasukkan masing-masing larutan seri kuersetin ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas (Kusuma *et al.*, 2023).

d. Penetapan Absorbansi

1) Penetapan Absorbansi Larutan DPPH

Dimasukkan 1 mL larutan induk DPPH 40 ppm ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 3 mL etanol pa. dikocok a.d homogen. Kemudian, selama waktu operasional yang telah didapatkan, diinkubasi larutan DPPH di tempat yang aman dari cahaya ataupun tempat yang gelap. Selanjutnya, dihitung absorbansi DPPH dengan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang yang telah didapatkan (Amalia *et al.*, 2023).

2) Penetapan Absorbansi Larutan Kuersetin

Dipipet masing-masing dari seri konsentrasi kuersetin sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 3 mL

larutan induk DPPH 40 ppm, kocok a.d homogen. Selama 30 menit (selama waktu operasional), diinkubasi larutan kuersetin ini di tempat yang aman dari cahaya ataupun tempat yang gelap. Kemudian, dihitung absorbansi Kuersetin dengan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimal yang telah didapatkan (Amalia *et al.*, 2023).

### 3) Penetapan Absorbansi Larutan Seri *Lip Balm*

Dipipet semua seri konsentrasi dalam 1 mL, lalu menambahkan 3 mL DPPH. Menggabungkan larutan dan menginkubasinya selama waktu operasional yang telah didapatkan dalam ruangan gelap. Panjang gelombang yang telah didapatkan digunakan untuk mengukur larutan (Amalia *et al.*, 2023).

## H. Analisis Data

Analisis data dari uji karakteristik fisik, termasuk uji organoleptik dan homogenitas telah dilakukan dan telah didapatkan hasilnya. Selain itu, *lip balm* yang diformulasikan dengan kombinasi minyak alpukat (*Persea americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) yang telah diuji untuk mengetahui nilai pH, titik leleh, dan aktivitas antioksidan dengan pengujian yang dilakukan menggunakan program SPSS.

Sebagai langkah awal, uji normalitas dilakukan untuk memverifikasi apakah data yang dikumpulkan berdistribusi normal. Uji *Shapiro Wilk* digunakan dalam proses ini karena jumlah data kurang dari 50; data dianggap normal jika nilai

signifikannya lebih dari 0,05. Selanjutnya, uji homogenitas dilakukan dengan *Levene Test* untuk memastikan bahwa data yang diperoleh adalah homogen (Damanis *et al.*, 2020). Jika data terdistribusi normal, maka digunakan uji parametrik *Oneway Anova*. Namun, jika data tidak terdistribusi normal, maka digunakan uji non-parametrik *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney* (Douw & Wardani, 2023).

Pengujian stabilitas juga dilakukan uji normalitas data terhadap nilai setelah mendapat perlakuan. Apabila data terdistribusi normal maka akan dilanjut dengan uji *Paired T – Test*. Jika data tidak terdistribusi dengan normal, maka akan dilakukan uji alternative non – parametrik yaitu Wilcoxon (Oktaviasari & Zulkarnain, 2017).

Selanjutnya, untuk pengukuran aktivitas antioksidan yang dimiliki dari formulasi kedua minyak tersebut diperlukan nilai absorbansi *lip balm* kombinasi dari minyak alpukat (*Persea americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) serta pembanding kuersetin digunakan untuk mengumpulkan data. Selanjutnya, persentase aktivitas antioksidannya dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

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

Keterangan:

Absorbansi blanko : Absorbansi DPPH

Absorbansi sampel : *Lip balm* kombinasi minyak alpukat (*Persea americana* Mill.) dan VCO (*Cocos nucifera* L.) serta pembanding kuersetin

Setelah memperoleh persentase dari masing-masing konsentrasi, dilakukan perhitungan dengan regresi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub>. Di sini, x adalah konsentrasi (ppm) dan y adalah persentase inhibisi (%). Nilai IC<sub>50</sub> sampel dan pembanding diperoleh dengan menggunakan rumus berikut:

$$Y = a + bx$$

Pengujian antioksidan dilakukan sebanyak tiga kali replikasi. Kemudian, data hasil diolah dengan menggunakan Microsoft Excel untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub> (Douw & Wardani, 2023).