

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan memformulasikan minyak biji anggur (*Vitis vinifera* L.) dan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) dalam bentuk sediaan *lip balm*. Konsentrasi minyak biji anggur dan minyak biji labu kuning dalam formulasi *lip balm* perbandingan (15%:10%), (12,5%:12,5%) dan (10%:15%). Penelitian ini dilakukan pembuatan formulasi *lip balm*, pengujian karakteristik fisik yang meliputi organoleptis, homogenitas, pH, titik lebur, stabilitas sediaan dan uji antioksidan.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian ini dilakukan di laboratorium Universitas Ngudi Waluyo. Laboratorium yang digunakan yaitu laboratorium teknologi farmasi dan laboratorium instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2024.

C. Subjek Penelitian

Minyak biji anggur (*Vitis vinifera* L.) dan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) yang diperoleh dari PT Tamba Sanjiwani, Jl. Raya Timpag, Meliling, Kec. Kerambitan, Kabupaten Tabanan, Bali.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi minyak biji anggur (*Vitis vinifera* L.) dan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) dengan variasi konsentrasi dengan perbandingan (10%:15%), (12,5%:12,5%) dan (15%:10%).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil uji sifat fisik sediaan *lip balm* yang meliputi organoleptis, homogenitas, pH, titik leleh, stabilitas sediaan dan uji antioksidan.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali merupakan faktor yang dikendalikan oleh peneliti karena diduga dapat mempengaruhi hubungan variabel bebas dan variabel terikat. Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu kualitas bahan, suhu, metode pembuatan dan pengujian antioksidan.

E. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spatula, cawan porselen, pipet tetes, *aluminium foil*, kaca arloji, penangas air, kertas saring, corong, oven, penjepit kayu, pH meter digital (Lutron), *object glass*, cetakan *lip balm*, tabung reaksi (Iwaki), neraca analitik (OHAUS), pipet ukur (Mettler Toledo), *Erlenmeyer* (Iwaki), labu ukur (Iwaki), *beakerglass* (Iwaki),

batang pengaduk (Iwaki), curvet, alat *melting point* Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1900).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu minyak biji anggur (*Vitis vinifera* L.) dan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) dari PT Tamba Sanjiwani, Jl. Raya Timpag, Meliling, Kec. Kerambitan, Kabupaten Tabanan, Bali, *cera flava*, *adeps lanae*, gliserin, nipagin, *oleoum caccao*, kuarsetin, etanol p.a, aquades, larutan DPPH.

F. Prosedur Penelitian

1. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Pengujian flavonoid dilakukan dengan sebanyak 1 mL sampel ditambahkan dengan AlCl_3 1%. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning atau jingga menunjukkan hasil positif flavonoid (Marpaung & Wahyuni, 2018).

b. Uji Tanin

Ditambahkan 1 mL larutan FeCl_3 10% pada sampel. Jika mengandung tanin akan menunjukkan terbentuknya warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan (Syaputri *et al.*, 2023).

c. Uji Saponin

Sampel diambil sebanyak 3-7 tetes ditambahkan 5 mL air dalam tabung reaksi. Lalu dilakukan pengocokan dengan kuat selama 30 detik akan terbentuk busa stabil (Syaputri *et al.*, 2023).

2. Pembuatan Sediaan *Lip balm*

Formula dan cara pembuatan sediaan *lip balm* dalam penelitian ini menggunakan formula *lip balm* dari penelitian (Puspita, *et al.*, 2023) yang kemudian dimodifikasi seperti pada tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Formula Sediaan *Lip Balm* Minyak Biji Anggur dan Minyak Biji Labu Kuning

Komposisi	Formula			Fungsi
	F1	F2	F3	
MBA	10%	12,5%	15%	Zat aktif
MBLK	15%	12,5%	10%	
<i>Cera Flava</i>	7%	7%	7%	Pengeras
<i>Adeps Lanae</i>	15%	15%	15%	Basis Lemak
Gliserin	5%	5%	5%	Humektan
Nipagin	0,18%	0,18%	0,18%	Pengawet
<i>Oleum Cacao</i>	Ad 7 gram	Ad 7 gram	Ad 7 gram	Basis Lemak

Keterangan:

MBA : Minyak Biji Anggur

MBLK: Minyak Biji Labu Kuning

Langkah pertama yang dilakukan ialah dimasukkan *oleum cacao* ke dalam cawan porselin, dan dipanaskan di atas penangas air dengan temperatur suhu 31°C-34°C (Massa 1). Kemudian dilebur *cera flava* dalam cawan porselin lain dengan temperatur 62°C-64°C, setelah itu dituangkan pada leburan *oleum cacao*, dan dicampurkan hingga homogen. Dimasukkan nipagin dan gliserin dicampurkan terlebih dahulu di kaca arloji hingga homogen. Dimasukkan pada leburan massa 1 dan ditambahkan *adeps lanae* sambil diaduk. Lalu terakhir ditambahkan fase minyak yaitu minyak biji anggur dan minyak biji labu diaduk hingga homogen. Setelah semua bahan tercampur, kemudian dimasukkan kedalam cetakan *lip balm* dan didiamkan pada suhu kamar hingga mengeras (Puspita *et al.*, 2023).

3. Uji Karakteristik Fisik Sediaan *Lip balm*

Parameter yang dilakukan pada uji sifat fisik sediaan *lip balm* diantaranya seperti organoleptis, homogenitas, pH, titik leleh dan stabilitas sediaan.

a) Uji Organoleptis

Uji organoleptis bertujuan untuk mengevaluasi berbagai aspek yang dapat dirasakan oleh indera manusia, seperti penampilan, tekstur, aroma, serta sensasi rasa lembab yang dihasilkan ketika produk digunakan (Kase *et al.*, 2023).

b) Uji Homogenitas

Pengujian ini dilakukan dengan cara menguji homogenitas sediaan pada masing-masing sediaan *lip balm* dengan cara mengambil sediaan *lip balm* sebanyak 0,1 gram dan meletakkannya pada kaca objek kemudian diamati secara visual terdapat butiran kasar atau tidak. Pengukuran homogenitas dilakukan 3x pengulangan (Kase *et al.*, 2023).

c) Uji pH

Pengujian ini bertujuan untuk melihat tingkat keasaman sediaan *lip balm* untuk menjamin sediaan *lip balm* tidak menyebabkan iritasi pada bibir. Pengujian ini menggunakan alat yaitu pH meter semi solid. Langkah pertama alat pH dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan dapar netral pada pH 7,01 dan larutan dapar pH asam pada pH 4,01. Setelah itu, elektroda dicuci dengan aquades dan dikeringkan dengan tisu. Kemudian dicelupkan probe ke dalam sediaan *lip balm*.

Pastikan ujung probe terendam cukup dalam untuk mendapatkan pembacaan yang akurat. Tunggu beberapa detik hingga pembacaan pH stabil. Catat nilai pH yang terbaca pada pH meter (Sarwanda *et al.*, 2021). Kategori pH sediaan memenuhi syarat pada rentang pH bibir yaitu 4,5 sampai 6,5 (Limanda *et al.*, 2019). Pengukuran pH dilakukan 3x pengulangan, lalu dihitung nilai rata-ratanya.

d) Uji Titik Leleh

Uji titik leleh dilakukan dengan alat *melting point* dengan cara dimasukkan sejumlah kecil sampel *lip balm* ke dalam tabung kapiler hingga tingginya sekitar 1-2 mm. Kemudian dietakkan tabung kapiler yang telah diisi sampel ke dalam alat *melting point*. Lalu diamati sampel dengan seksama saat suhu meningkat, apabila sampel *lip balm* mulai melunak dan seluruh sampel telah berubah menjadi cair. Pengukuran titik leleh dilakukan 3x pengulangan, lalu dihitung nilai rata-ratanya (Sarwanda *et al.*, 2021). Titik leleh sediaan *lip balm* yang baik berada pada rentang 50°C-70°C (Desnita *et al.*, 2022).

e) Uji Stabilitas Sediaan *Lip Balm*

Uji kestabilan mutu fisik sediaan *lip balm* dilakukan untuk memastikan kestabilan mutu fisik *lip balm* dengan metode *cycling test* dengan menentukan dan membandingkan mutu fisik sediaan setelah perlakuan. Prinsip pengujian adalah dilakukan dengan penyimpanan dalam temperatur 4°C±2°C sepanjang 24 jam setelah itu dipindahkan ke

dalam oven yang bersuhu $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ sepanjang 24 jam (satu daur), uji stabilitas dilakukan selama 14 hari penyimpanan.

4. Uji Aktivitas Antioksidan *Lip balm*

a) Pembuatan Larutan DPPH

DPPH ditimbang sebanyak 4 mg. Kemudian dilarutkan dengan etanol p.a di labu ukur 100 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas, larutan digojok sampai homogen dan didapatkan konsentrasi larutan 40 ppm. Larutan DPPH ditentukan panjang gelombang serapan maksimumnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 400- 800 nm (Hartaman *et al.*, 2023).

b) Pembuatan Larutan Sampel

Masing-masing sampel (F1, F2 dan F3) ditimbang sebanyak 25 mg dan dilarutkan dalam 25 mL etanol p.a dalam labu ukur 25 mL sehingga didapatkan konsentrasi larutan sampel 1.000 ppm. Kemudian dibuat larutan sampel berbagai konsentrasi yaitu 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm dengan cara memipet larutan induk sediaan *lip balm* 1000 ppm sebanyak 0,5 mL, 0,75 mL, 1 mL, 1,25 mL dan 1,5 mL masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas (Husain *et al.*, 2020).

c) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan baku DPPH 40 ppm yang telah dihomogenkan diambil sebanyak 4 mL kemudian dimasukkan kedalam kuvet. Tahap selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum

larutan DPPH dengan rentang panjang gelombang 400-800 nm. Pada penelitian sebelumnya panjang gelombang maksimal DPPH yaitu 517 nm (Rante *et al.*, 2020).

d) Penentuan *Operating Time*

Setelah larutan DPPH 40 ppm dihomogenisasi, sebanyak 3 mL larutan DPPH 40 ppm dan 1 mL etanol p.a. dicampurkan. Serapan larutan diukur pada panjang gelombang maksimal yang telah ditentukan dengan durasi waktu dari menit ke 0 hingga 30 menit, kemudian dilakukan pengamatan sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Sirait *et al.*, 2023).

e) Pengukuran Absorbansi Blanko DPPH

Sebanyak 3 mL larutan DPPH 40 ppm dan 1 mL etanol p.a. dicampurkan, lalu didiamkan sesuai *operating time* hingga homogen dan simpan ditempat yang gelap. Baca absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimal yang telah ditentukan (Jumawardi *et al.*, 2021).

f) Pengukuran Aktivitas Antioksidan Kuersetin

Larutan kuersetin 100 ppm dibuat dengan menimbang 1 mg kuersetin lalu dilarutkan ke dalam 10 mL etanol p.a. dan dihomogenkan (Wahyudi & Minarsih, 2023). Dari larutan induk tersebut, dibuat beberapa variasi konsentrasi yaitu 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm dan 6 ppm dengan dipipet sebesar 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL dan 0,6 mL, selanjutnya masing-masing larutan seri kuersetin dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan di ad kan dengan etanol p.a sampai tanda

batas. Masing-masing seri larutan kuersetin diukur sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam vial. Kemudian masing-masing vial ditambahkan 3 mL larutan DPPH. Lalu, dihomogenkan dan diinkubasi dalam ruangan gelap selama *operating time*. Kemudian diukur serapan pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan dengan spektrofotometer UV-Vis (Hartaman *et al.*, 2023).

g) Pengujian Aktivitas Antioksidan Sampel

Pengujian aktivitas antioksidan sampel, masing-masing konsentrasi larutan uji dipipet sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam vial. Ditambahkan larutan DPPH sebanyak 3 mL, dihomogenkan. Selanjutnya diinkubasi dalam ruangan gelap selama *operating time*. Lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Hartaman *et al.*, 2023).

h) Perhitungan Persentase Inhibisi Serapan DPPH

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH, kemudian dihitung IC_{50} dengan menggunakan persamaan linier yang didapatkan dari perbandingan garis lurus antara konsentrasi dan persen inhibisi. Aktivitas antioksidan didapatkan dengan menggunakan persamaan linier dan nilai IC_{50} yang merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50% diperoleh dengan cara dibuat kurva linear antara konsentrasi larutan uji (sumbu x) dan % aktivitas antioksidan (sumbu y).

Rumus Aktivitas antioksidan didapatkan dengan menggunakan persamaan di bawah ini: (Utami *et al.*, 2022).

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{A. \text{ blanko} - A. \text{ sampel}}{A. \text{ blanko}} \times 100\%$$

Kemudian Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan persamaan regresi ($y = bx + a$), dimana y adalah % inhibisi 50 dan x adalah nilai IC₅₀. Semakin kecil nilai IC₅₀ menunjukkan semakin kuat aktivitas antioksidan yang terkandung pada suatu sampel.

G. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan data karakteristik fisik yaitu uji organoleptis, uji homogenitas uji pH, uji titik leleh, uji stabilitas dan aktivitas antioksidan dalam nilai IC₅₀ dari sediaan *lip balm* minyak biji anggur (*Vitis Vinifera* L.) dan minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) yang diolah menggunakan software Statistical Product and Service solutions (SPSS) versi 26. Dari pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis diperoleh data absorbansi kontrol (Abs.kontrol) dan absorbansi sampel (Abs.sampel) dari sediaan *lip balm*. Berdasarkan data tersebut dapat dihitung aktivitas antioksidannya dengan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{A. \text{ blanko} - A. \text{ sampel}}{A. \text{ blanko}} \times 100\%$$

Setelah itu dilakukan pembuatan kurva linear antara konsentrasi larutan uji dan % inhibisi DPPH, sehingga dapat diperoleh harga Inhibition Concentration 50% (IC₅₀), yaitu konsentrasi larutan uji yang dapat meredam radikal DPPH sebesar 50%. Data yang diperoleh dinyatakan dengan rata-rata ± standar deviasi dari tiga kali replikasi pengujian. Uji One Way Analysis of Variance (ANOVA

satu arah) dengan metode *Post Hoc Least Significance Different* (LSD) ($\alpha=0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan diantara sampel yang diuji.