

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium dengan sampel ekstrak belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). Tahapan penelitian ini diantaranya skrining fitokimia ekstrak belimbing wuluh, formulasi face mist berbasis ekstrak belimbing wuluh, uji karakteristik fisik face mist berbasis ekstrak belimbing wuluh, dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

B. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

1. Identifikasi tanaman belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang.
2. Skrining fitokimia ekstrak belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pembuatan sediaan face mist ekstrak belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Pengujian karakteristik fisik sediaan face mist ekstrak belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
5. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

A. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel yaitu belimbing wuluh yang diperoleh dari wilayah Ungaran. Belimbing wuluh digunakan untuk bahan dasar dalam formulasi sediaan face mist sebagai antioksidan. Belimbing wuluh yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 10 kg.

B. Definisi Operasional

Definisi operasional digunakan untuk menjelaskan setiap variabel penelitian secara jelas dan terukur, sehingga tidak menimbulkan perbedaan penafsiran dalam pelaksanaan penelitian. Definisi ini memuat batasan mengenai variabel yang diteliti, indikator yang diamati, skala pengukuran, serta alat ukur yang digunakan. Penyusunan definisi operasional bertujuan untuk memudahkan proses pengumpulan data dan memastikan konsistensi pengukuran sesuai dengan tujuan penelitian.

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Indikator	Skala Pengukuran	Alat Ukur
Variasi konsentrasi ekstrak belimbing wuluh	Perbedaan konsentrasi ekstrak belimbing wuluh dalam formulasi sediaan face mist pada tiga formula yaitu F1 (1%), F2 (2%), dan F3 (3%)	Konsentrasi ekstrak (%) pada masing-masing formula (F1, F2, F3)	Ordinal	Timbangan analitik, cawan porselen, spatula
Karakteristik fisik sediaan face mist	Sifat fisik sediaan face mist yang diamati melalui pengujian organoleptis, homogenitas, ph, bobot jenis, viskositas, dan stabilitas untuk menilai mutu sediaan.	• Organoleptis (warna, bau, bentuk) • Homogenitas • Ph • Bobot jenis • Viskositas • Stabilitas	• Organoleptis dan homogenitas → Nominal • Ph, viskositas, bobot jenis → Rasio • Stabilitas → ordinal	Pengamatan visual, ph meter, piknometer, timbangan analitik, viskometer

Aktivitas antioksidan sediaan face mist	Kemampuan sediaan face mist dalam menangkal radikal bebas yang diukur menggunakan metode DPPH berdasarkan nilai IC ₅₀ atau % inhibisi	Nilai IC ₅₀ atau % inhibisi antioksidan	Rasio	Spektrofotometer UV-Vis
---	--	--	-------	-------------------------

C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak belimbing wuluh dalam sediaan face mist yaitu F1 (1%), F2 (2%), dan F3 (3%).

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah karakteristik fisik sediaan face mist dan aktivitas antioksidan sediaan face mist.

3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kelengkapan alat, suhu, waktu dan kondisi laboratorium.

D. Pengumpulan Data

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini mencakup neraca analitik (Ohaus), moisture analyzer (Ohaus), ayakan mesh 40, blender, bejana maserasi, batang pengaduk, cawan porselin, gelas ukur (Iwaki), gelas kimia (Iwaki), piknometer (pyrex), muffle furnace (Thermolyne), kaca 10×8 cm, mortir dan stamper, pipet tetes, rotary evaporator (RE 2000 E), waterbath (Mettler), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), pH meter (hanna), dan viscometer (Brookfield) yang mendukung persiapan sampel, pengukuran, analisis, dan eksperimen kimia atau farmasi.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak buah belimbing wuluh, etanol 96% (Merck), gliserin, PVP (Jerman), natrium benzoat, TEA, PEG40 (Singapore), aquadest (Indonesia), vitamin C (Merck), etanol 96% p.a, (Merck) dan DPPH (TCI).

E. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang.

2. Simplisia

a. Pembuatan simplisia

Pembuatan simplisia dimulai dari pengumpulan buah belimbing wuluh yang segar dengan kriteria warna hijau segar hingga hijau kekuningan, tekstur masih keras, tidak terlalu matang, dan tidak mengalami kerusakan fisik. Bahan tanaman dibersihkan dari kotoran kontaminan lain melalui sortasi basah, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bebas dari tanah atau debu yang melekat. Bahan tanaman yang telah bersih selanjutnya dipotong untuk mempercepat proses pengeringan. Tahap berikutnya adalah pengeringan bahan tanaman sampai mencapai kondisi kering yang stabil. Pengeringan dilakukan dengan cara dianginkan dengan sinar matahari dan menggunakan oven pada suhu 60° C untuk mempertahankan senyawa aktif, sehingga simplisia yang dihasilkan memiliki kadar air yang rendah. Hasil pengeringan kemudian dihaluskan dan diayak menjadi serbuk simplisia. Proses pengeringan bertujuan untuk mendapatkan bahan kering yang homogen dan siap untuk diekstraksi serta dilakukan uji lebih lanjut secara optimal dan menyeluruh (Efrilia et al., 2024).

b. Uji standarisasi non spesifik simplisia

1) Uji Kadar Air

Penentuan kadar kelembaban serbuk dilakukan menggunakan alat *Moisture Analyzer Balance (MAB)* dengan

mengambil sebanyak 5 gram serbuk. Catat kadar air yang terukur, dengan syarat kadar air untuk simplisia umumnya adalah tidak lebih dari 10%, sebagaimana ditetapkan oleh Departemen Kesehatan RI pada tahun 2017 (Lestari et al., 2023).

2) Uji Kadar Abu

Abu yang diperoleh dari pemijaran sejumlah simplisia dalam tanur mencerminkan abu fisiologis (yang berasal dari jaringan tumbuhan) serta abu nonfisiologis. Proses pemijaran dilakukan dalam tanur pada suhu 600°C hingga menghasilkan abu, yang kemudian ditentukan secara gravimetri sampai bobotnya stabil. Sebanyak 5 gram simplisia ditimbang dan dimasukkan ke dalam krus porselen yang sudah dipijarkan dan ditara terlebih dahulu. Krus dipijarkan hingga arangnya habis, lalu dinginkan dan timbang. Jika arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas kemudian saring menggunakan kertas saring bebas abu. Sisa penyaringan beserta kertas saring dipijarkan kembali ke dalam krus yang sama. Filtratnya dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Berdasarkan standar dalam Buku Material Medika Indonesia, kadar abu total sebaiknya maksimal 8% (Devitria et al., 2023).

3. Ekstrak

a. Pembuatan Ekstrak

Simplisia buah belimbing wuluh sebanyak 400 gram serbuk simplisia direndam dalam 4 liter etanol 96% sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10. Pengadukan dilakukan setiap 4 jam sekali untuk mempercepat difusi senyawa keluar dari jaringan tanaman. Proses perendaman dilakukan selama 5 hari pada suhu ruang, kemudian filtrat dikumpulkan dan disiapkan untuk analisis lanjutan. Filtrat kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 60 rpm dan dilanjutkan dengan waterbath sampai diperoleh ekstrak kental (Nofita et al., 2024). Persentase rendemen dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\% \text{ (Depkes RI. 2000)}$$

b. Uji Standarisasi Spesifik Ekstrak

Uji organoleptik pada ekstrak belimbing wuluh meliputi pemeriksaan bau, warna, dan tekstur.

c. Uji Standarisasi Non Spesifik Ekstrak

1) Uji Kadar Air

Penentuan kadar air ekstrak dilakukan menggunakan alat *Moisture Analyzer Balance (MAB)* dengan mengambil sebanyak 5 gram ekstrak. Catat kadar air yang terukur, dengan syarat kadar air untuk ekstrak umumnya adalah tidak lebih dari 10%, sebagaimana ditetapkan oleh Departemen Kesehatan RI pada tahun 2017 (Lestari et al., 2023).

2) Uji Susut Pengerinan

Uji susut pengeringan dilakukan dengan menimbang ekstrak dalam cawan porsselen yang telah ditara dan dipanaskan pada suhu 105°C sampai berat konstan. Perubahan berat ini dinyatakan dalam persentase untuk menentukan kadar zat mudah menguap dalam ekstrak sesuai dengan metode *Loss on Drying* yang umum digunakan dalam standarisasi ekstrak bahan alam (Kusriadi, 2025).

4. Skrining Fitokimia

a. Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 10 mL aquadest, 5 mL larutan amonia, dan 1 mL asam sulfat. Perubahan warna menjadi kuning menandakan keberadaan flavonoid (Handayani et al., 2020).

b. Fenolik

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan 3-4 tetes FeCl_3 1% terjadinya perubahan warna hitam kebiruan hingga hitam pekat menunjukkan adanya kandungan fenol (D. S. Ningsih et al., 2020).

c. Alkaloid

1) Sebanyak 0,5 mg ekstrak diberi tetesan 3–5 tetes reagen mayer. Hasil positif ditandai oleh pembentukan endapan putih.

- 2) Sebanyak 0,5 mg ekstrak diberi tetesan 3–5 tetes reagen wagner. Hasil positif ditandai oleh pembentukan endapan coklat.
- 3) Sebanyak 0,5 mg ekstrak diberi tetesan 3–5 tetes reagen dragendorff. Hasil positif ditandai oleh pembentukan endapan jingga (S. Harahap, 2023).

d. Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 10 mL air panas dan dikocok kuat selama 10 detik. Saponin ditunjukkan jika terbentuk buih yang stabil setinggi minimal 10 cm selama tidak kurang dari 1 menit dan pada saat buih tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2N (Handayani et al., 2020).

e. Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan sebanyak 2-3 tetes larutan FeCl_3 5%. Larutan menjadi hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Fatmawati S et al., 2023).

f. Triterpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan asam asetat glasial hingga simplisia terendam sepenuhnya, lalu biarkan selama kurang lebih 15 menit. Pipet enam tetes larutan ke dalam tabung reaksi baru tambahkan 2-3 tetes asam sulfat (H_2SO_4). Triterpenoid ditunjukkan oleh munculnya warna coklat atau ungu, sedangkan kehadiran steroid ditandai oleh warna biru kehijauan (Khafid et al., 2023).

5. Formula Sediaan Face Mist Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Formula sediaan face mist ekstrak belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) disusun berdasarkan penelitian sebelumnya oleh (Nofita et al., 2024) dengan beberapa modifikasi pada konsentrasi zat aktif. Perbedaan konsentrasi ekstrak belimbing wuluh pada masing-masing formula bertujuan untuk mengevaluasi pengaruhnya terhadap karakteristik fisik dan aktivitas antioksidan sediaan. Formula sediaan face mist ekstrak belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Formulasi Face Mist Ekstrak Belimbing Wuluh

Bahan	Konsentrasi %				Ket
	F0	F1	F2	F3	
Ekstrak belimbing wuluh	0	1	2	3	Zat aktif
Gliserin	20	20	20	20	Pelembab
PVP	4	4	4	4	Stabilisator
Natrium Benzoat	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengawet
TEA	1	1	1	1	pH adjuster
PEG ₄₀	1	1	1	1	solubilizer
Aquadest	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	Pelarut

Keterangan:

F0 = Basis Face Mist

F1 = Ekstrak belimbing wuluh 1%

F2 = Ekstrak belimbing wuluh 2%

F3 = Ekstrak belimbing wuluh 3%

6. Pembuatan Sediaan Face Mist Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Ekstrak belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) ditimbang sesuai dengan formula yang terdapat dalam Tabel 3.2. Proses pembuatan sediaan face mist diawali dengan melarutkan PVP ke dalam mortir dengan sebagian aquadest dan diaduk hingga homogen. Penambahan natrium benzoat juga dilakukan dengan penambahan aquadest hingga larut sempurna. Gliserin dengan PEG40 dicampurkan terlebih dahulu pada cawan porselen dan diaduk hingga homogen kemudian dimasukkan ke dalam mortir. Aduk hingga homogen dan tambahkan TEA untuk menyesuaikan pH sediaan. Ekstrak belimbing wuluh dimasukkan pada tahap akhir dan ad aquadest yang tersisa aduk hingga diperoleh sediaan face mist yang homogen lalu masukkan ke dalam botol spray.

7. Uji Karakteristik Face Mist Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

a. Organoleptis

Pengujian ini dilakukan untuk menilai karakteristik fisik sediaan melalui indera manusia terhadap aspek seperti bentuk, tekstur, warna, dan aroma secara visual. Pengamatan dilakukan secara langsung pada setiap formula dan dicatat hasilnya (Aspia et al., 2024).

b. Homogenitas

Pengujian homogenitas bertujuan untuk mendeteksi keberadaan partikel atau bahan yang belum tercampur secara merata. Uji ini dilakukan dengan menyemprotkan sediaan ke atas lembaran kaca preparate, kemudian diamati secara visual apakah terdapat partikel kasar, gumpalan, atau ketidakseragaman pada sediaan yang diproduksi (Aspia et al., 2024).

c. pH

Uji pH dilakukan menggunakan pH meter untuk mengetahui tingkat keasaman sediaan face mist. Sediaan face mist harus sesuai dengan kriteria pH kulit, yaitu dengan derajat keasaman (pH) kulit manusia normal berada pada rentang 4-7. Nilai derajat keasaman (pH) sediaan untuk penggunaan luar atau topikal berada pada kisaran 4,5-8 (Hutahaen & Saputri, 2022). Cara kerja pengujian dilakukan dengan memasukkan sediaan face mist ke dalam beaker glass, kemudian elektroda pH meter dicelupkan hingga diperoleh nilai pH yang stabil dan dicatat hasil pengukurannya.

d. Bobot jenis

Bobot jenis adalah ukuran yang menunjukkan hubungan antara massa (dalam gram) dan volume (dalam mililiter), sehingga satuannya adalah g/mL. Prosedur pengukurannya meliputi penimbangan piknometer kosong (W1), piknometer yang berisi aquadest (W2), dan piknometer yang berisi sampel face mist (W3), kemudian hasilnya dicatat dan digunakan untuk menghitung bobot jenis (Nofita et al., 2024).

Rumus bobot jenis :

$$\frac{W3 - W1}{W2 - W1}$$

Keterangan :

W1: bobot piknometer kosong (g)

W2: bobot piknometer berisi aquades (g)

W3: bobot piknometer berisi sediaan face mist (g)

e. Viskositas

Sediaan face mist ditempatkan ke dalam beaker gelas, lalu viskositasnya diukur menggunakan viscometer. Menggunakan spindle

no 1 dengan kecepatan 200 rpm. Sediaan face mist memenuhi syarat apabila viskositasnya < 150 cP (Asjur et al., 2023).

8. Uji Stabilitas Sediaan Face Mist Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Uji stabilitas dipercepat dilakukan melalui metode *cycling test* selama 3 siklus berturut-turut. Sediaan face mist dipaparkan pada dua kondisi suhu ekstrem secara bergantian, yaitu 4°C dan 40°C masing-masing selama 24 jam. Perubahan parameter fisik yang terjadi selama pengujian kemudian dibandingkan dengan karakteristik fisik sediaan sebelum perlakuan (Asjur et al., 2023).

9. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam etanol p.a. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, dan volume dicukupkan hingga tanda batas dengan menambahkan etanol. Larutan dihomogenkan dan disimpan pada suhu rendah serta terlindung dari cahaya (Asjur et al., 2023).

b. Pembuatan Larutan Blanko Dan Optimasi Panjang Gelombang

Ambil 4 mL larutan DPPH 1000 ppm, kemudian ditambahkan etanol p.a 100 mL pada labu ukur dan dikocok hingga tercampur homogen. Ukur serapan larutan pada panjang gelombang 510-520 nm (Fatmawati S et al., 2023).

c. Pembuatan larutan (kontrol positif) Vitamin C

Timbang 10 mg vitamin C sebagai kontrol positif. Larutkan dengan etanol p.a yang cukup, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan tambahkan etanol p.a hingga mencapai tanda batas untuk menghasilkan larutan induk. Pengenceran dibuat dengan seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm dengan labu ukur 10 mL (Nofita et al., 2024).

d. Pembuatan dan Pengukuran Aktivitas Antioksidan Sampel Face mist Ekstrak Belimbing Wuluh

Larutan stok dibuat dengan konsentrasi 100 ppm menggunakan 10 mg ekstrak belimbing wuluh. Larutkan dengan etanol p.a. sampai homogen dan

tambahkan etanol hingga volume mencapai 100 mL. Larutan sampel dibuat pengenceran dengan variasi konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Pengujian diambil larutan sampel sebanyak 2, 4, 6, 8, 10 mL dari berbagai konsentrasi menggunakan pipet volume dan masukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Tambahkan etanol p.a pada tiap labu ukur. Ukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Hasil uji sediaan face mist ekstrak belimbing wuluh secara DPPH dilakukan dengan perhitungan % penangkapan radikal dengan rumus:

$$\% \text{ aktivitas antiradikal} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}}$$

Keterangan:

Absorbansi kontrol: Absorbansi yang tidak mengandung sampel

Absorbansi sampel: Absorbansi yang mengandung sampel

Tahap selanjutnya, pembuatan kurva berdasarkan nilai persentase penghambatan yang diperoleh terhadap konsentrasi larutan uji. Dari kurva dibuat persamaan regresi linear untuk menghitung nilai IC₅₀ dengan rumus.

$$y = bx + a$$

Keterangan:

y: 50

x: menunjukkan nilai IC₅₀

a dan b: nilai regresi linear

Untuk menentukan nilai IC₅₀ menggunakan rumus :

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

F. Analisis Data

1. Data hasil penelitian yang diperoleh dari pengujian karakteristik fisik dan aktivitas antioksidan pada sediaan face mist ekstrak belimbing wuluh diolah secara deskriptif dan statistik untuk memperoleh hasil yang akurat dan terukur. Data dari setiap formula (F1, F2, dan F3) dihitung nilai rata-rata dan standar deviasinya, kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik untuk memberikan gambaran umum mengenai kestabilan fisik sediaan.

Nilai aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan persen inhibisi yang diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan rumus % inhibisi = $((A_k - A_s)/A_k) \times 100\%$, di mana A_k adalah absorbansi kontrol dan A_s adalah absorbansi sampel. Hasil persen inhibisi dari beberapa konsentrasi kemudian diplot pada grafik antara konsentrasi (x) dan persen inhibisi (y) untuk memperoleh persamaan regresi linear. Dari persamaan tersebut, nilai IC_{50} ditentukan dengan mensubstitusi nilai $y = 50$, yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat radikal bebas sebesar 50%.

2. Data karakteristik fisik dan aktivitas antioksidan (IC_{50}) dengan variasi konsentrasi di uji menggunakan uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) untuk memastikan distribusi data normal, dan uji homogenitas (*Levene Test*) untuk mengetahui keseragaman varians antar formula. Jika data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan antar formula, serta uji lanjut *Post Hoc* untuk melihat formula mana yang memiliki perbedaan nyata. Apabila data tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji nonparametric Kruskal-Wallis dan apabila terdapat perbedaan yang signifikan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Jika terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji LSD (Least Significant Difference) untuk menentukan formula mana yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi. Formula dengan nilai IC_{50} paling rendah dianggap memiliki kemampuan antioksidan paling kuat serta menjadi kandidat terbaik dalam pengembangan sediaan face mist berbasis ekstrak belimbing wuluh. Semua hasil pengolahan data disajikan dalam bentuk tabel, grafik, dan interpretasi naratif sebagai dasar pembahasan pada bab selanjutnya.