BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dengan judul "Aktivitas Antioksidan *Lip Balm Stick* kombinasi Ekstrak Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L.) dan Kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)" akan dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Kimia yang bertempat di Universitas Bhamada Slawi Kabupaten Tegal. Penelitian akan dilakukan pada bulan Januari-Februari, 2025.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya pisau, blender Cosmos, wadah kaca, *water bath*, kertas saring, pipet tetes, sendok tanduk, timbangan analitik, gelas ukur Pyrex, *beaker glass* Pyrex, kompor listrik, cawan petri, batang pengaduk, kaca arloji, pencetak *lip balm stick*, wadah *lip balm stick*, kertas pH meter, lempengan kaca, oven, pemberat timbangan, corong pisah Pyrex.

Bahan yang digunakan adalah ubi jalar ungu, kulit jeruk nipis, etanol 96%, HCl, *cera alba*, lanolin, gliserin, nipagin, *virgin coconut oil*, aquadest, $HgCl_2$, KI, NaOH, Pb, kloroform, $FeCl_3$, methanol 96%, n-heksan, DPPH, kertas saring, dan stik pH.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara ekperimental dengan uji antioksidan metode DPPH pada beberapa formulasi *lip balm* dengan variasi kombinasi ekstrak ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dan kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang memiliki aktivitas antioksidan dan dapat melembapkan serta melindungi bibir dari kerusakan.

3.3.2 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah formulasi *lip balm stick* dengan variasi konsentrasi ekstrak ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dan kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

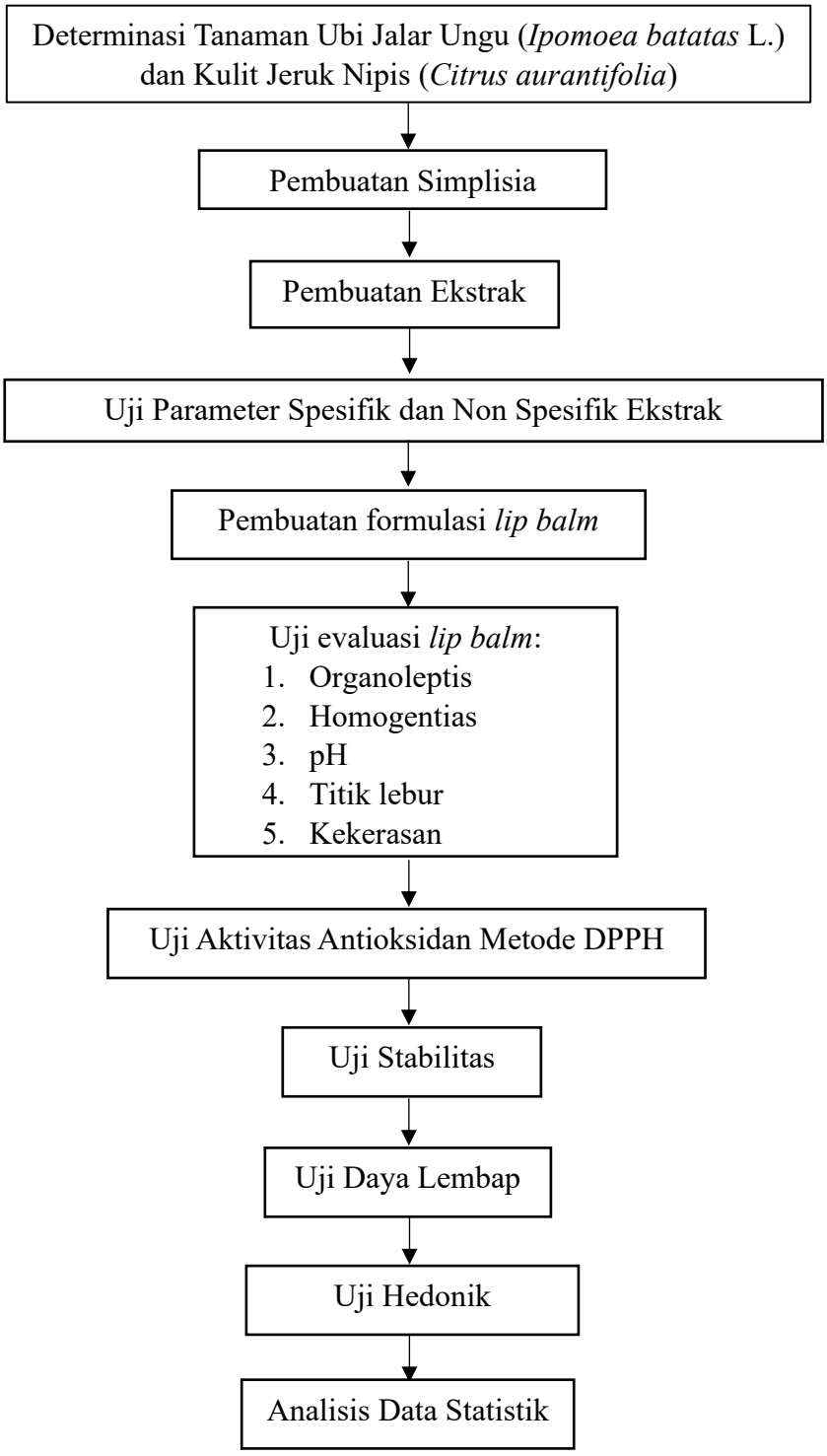
2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu organoleptis, homogenitas, pH, titik lebur, kekerasan, hedonik, nilai IC_{50}, stabilitas, dan daya lembap.

3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu sampel ubi jalar ungu dan kulit buah jeruk, metode pembuatan simplisia, metode ekstraksi, metode uji parameter, metode pembuatan sediaan *lip balm stick*, formulasi basis sediaan *lip balm stick*, metode uji evaluasi dan stabilitas, metode uji hedonik, metode uji daya lembap, dan metode analisis statistik.

3.3.3 Kerangka Penelitian



Gambar 3. 1 Bagan Kerangka Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengidentifikasi suatu tanaman. Tanaman ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) diidentifikasi di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S-1, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Pembuatan Simplisia

Dipilih ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) yang matang. Ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dicuci sampai bersih, dikupas, dan dipotong iris tipis. Sampel kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari dan dihancurkan dengan blender hingga menjadi serbuk.

Dipilih buah-buah jeruk nipis, dikupas satu persatu dan dikumpulkan kulitnya. Kulit jeruk nipis dikeringkan di bawah sinar matahari kemudian diblender hingga menjadi serbuk.

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Ubi jalar ungu disortasi, kemudian dicuci bersih dan dipotong menjadi bagian-bagian kecil. Potongan-potongan ubi jalar ungu kemudian diblender kasar dan dikeringkan. Setelah itu, ubi jalar ungu diblender lagi hingga menjadi serbuk yang halus. Serbuk ubi jalar ungu kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:4 dan HCl 0,01% selama 30 jam. Proses maserasi dilakukan dalam keadaan asam (pH 2-5) untuk menjaga kestabilan zat

antosianin. Hasil maserasi disaring dengan kertas saring, kemudian diuapkan untu didapatkan ekstrak kental.

Selanjutnya, disiapkan kulit jeruk nipis, dicuci, kemudian dikeringkan dan dihaluskan dengan blender. Serbuk kulit jeruk nipis dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan ekstrak:etanol yaitu 1:3,7 selama 4x24 jam. Kemudian hasil maserasi disaring dengan kertas maserasi dan diuapkan hingga menjadi ekstrak kental.

3.4.4 Uji Parameter Spesifik

1. Penetapan Organoleptik

Identifikasi organoleptis adalah pengamatan secara fisik melalui *panca* indera dan mendeskripsikan dalam bentuk bau, warna, rasa, dan ukuran (Depkes RI, 2000).

2. Skrining Fitokimia Ekstrak Ubi Jalar Ungu dan Kulit Jeruk Nipis

a. Identifikasi Alkaloid

Dibuat reagen Mayer dengan cara melarutkan 1,36 gram $HgCl_2$ dalam 60 mL aquades dan 5 g KI dengan 10 mL aquades. Kemudian, kedua larutan tersebut dicampurkan. Sejumlah ekstrak dilarutkan dan ditambah setetes atau dua tetes reagen Mayer yang telah dibuat. Apabila terdapat warna putih atau kuning keruh, maka ekstrak mengandung alkaloid.

b. Identifikasi Flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menggunakan sejumlah sampel di dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan

beberapa tetes larutan NaOH. Adanya flavonoid ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning pekat.

c. Identifikasi Fenol

Diambil 50 mg ekstrak dan dilarutkan dalam aquades. Kemudian ditambahkan 3 mL Pb asetat 10%. Apabila larutan berubah menjadi putih keruh, maka ekstrak mengandung fenol.

d. Identifikasi Triterpenoid

Ekstrak ditambah kloroform dan disaring. Filtrat dipisah dan ditambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat. Kemudian dikocok dan didiamkan dengan posisi berdiri. Apabila muncul warna kuning emas, maka ekstrak mengandung triterpenoid.

e. Identifikasi Tanin

Ekstrak sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 5 mL aquadest, kemudian ditambahkan beberapa tetes $FeCl_3$. Apabila larutan menjadi hijau pekat, maka ekstrak mengandung senyawa tanin (Julianto, 2019).

f. Identifikasi Antosianin (Ubi Ungu)

Ekstrak ditambahkan NaOH tetes demi tetes. Apabila warna larutan berubah menjadi biru kehijauan, artinya ekstrak mengandung senyawa antosianin (Harborne, 1987).

3.4.5 Uji Parameter Non Spesifik

1. Uji Susut Pengeringan

Uji susut pengeringan dilakukan bertujuan untuk mengetahui persentase hilangnya bobot dari berat basah hingga menjadi berat kering. Nilai susut pengeringan yang baik adalah kurang dari 10%.

Berikut rumus susut pengeringan:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{berat basah - berat kering}}{\text{berat basah}} \text{ x } 100\%$$

2. Rendemen

Hasil ekstrak kental, kemudian dihitung persentase randemen. Berikut merupakan perhitungan randemen:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \text{ x } 100\%$$

3. Uji Kadar Abu

Ekstrak kental dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara lalu diratakan. Dipijarkan perlahan dalam tanur dengan suhu 600°C hingga arang habis, didinginkan lalu ditimbang.

Berikut perhitungan kadar abu:

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{W1 - W2}}{\text{W}} \text{ x } 100\%$$

Keterangan:

W = Berat sampel sebelum diabukan (g)

W1= Berat sampel + cawan sesudah diabukan (g)

W2= Berat cawan kosong (g)

4. Uji Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri. Ekstrak kental dimasukkan ke dalam cawan porselen dan

dioven pada suhu 105°C, selama 10 menit, hingga berat berturut-turut konstan. Kadar air yang baik pada ekstrak adalah kurang dari 10%.

Perhitungan kadar air:

$$\text{Kadar air} = \frac{W}{W1} \text{ x } 100\%$$

W = Berat sampel sebelum dioven (g)

W1= Berat sampel sesudah dioven (g)

5. Pengujian Bebas Etanol

Ekstrak ditambahkan asam asetat (CH_3COOH) dan asam sulfat pekat (H_2SO_4), kemudian dipanaskan. Hasil negatif jika tidak tercium bau ester yang khas etanol (Depkes RI, 2000).

3.4.6 Formulasi *Lip Balm* Ekstrak Ubi Jalar Ungu dan Kulit Jeruk Nipis

Proses pembuatan *lip balm* dilakukan dengan cara membagi bahan-bahan menjadi dua campuran. Campuran pertama adalah *cera alba*, minyak kelapa dan lanolin yang dileburkan dalam gelas *beaker* di atas kompor listrik. Kemudian, campuran kedua berisi nipagin dan gliserin. Selanjutnya, kedua campuran tersebut disatukan dan dihomogenkan. Pada Formulasi 0, campuran langsung dimasukkan ke dalam wadah cetakan, sedangkan pada formulasi 1, 2, dan 3 campuran ditambahkan ekstrak ubi jalar ungu dan kulit jeruk nipis terlebih dahulu. Setelah campuran mengeras, sediaan dimasukkan ke dalam wadah *lip balm* dan siap menuju langkah selanjutnya yaitu evaluasi sediaan fisik *lip balm*.

Berikut adalah formulasi sediaan *lip balm* yang akan digunakan:

Tabel 3. 1 Formulasi Lip Balm Kombinasi Ekstrak Ubi Jalar Ungu dan Kulit Jeruk Nipis

Bahan	Konsentrasi (%)				Fungsi	Literatur
	F0	F1	F2	F3		
Ekstrak ubi jalar ungu	-	9	8	7	Zat aktif dan pewarna	3-9% (Supartiningsih et al., 2017)
Ekstrak kulit jeruk nipis	-	1	2	3	Zat aktif	1-3% (Hanifa et al., 2024)
Cera alba	10	10	10	10	Basis	10% (Rahmadini, 2022)
Lanolin	10	10	10	10	Fase minyak	10% (Rahmadini, 2022)
Gliserin	5	5	5	5	Humektan	≤30% (Rowe et al., 2009)
Nipagin	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet	0,02-0,3% (Rowe et al., 2009)
Virgin coconut oil	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Fase minyak	(Rowe et al., 2009)

3.4.7 Evaluasi Sediaan *Lip Balm*

1. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan dengan memperhatikan sifat fisik sediaan seperti warna, bau, bentuk, dan tekstur. (Depkes RI, 2000).

2. Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan membelah *lip balm stick* dan mengamati tekstur dan warnanya. Sediaan dinyatakan homogen jika

menunjukkan susunan yang merata dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Kemenkes, 1979).

3. Uji pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan kertas *stick* pH. Sebelum dicek pH sediaan *lip balm stick* diambil sebanyak 1 gram, kemudian dilarutkan dalam 10 mL aquades dan kertas *stick* pH dicelupkan ke dalam sampel dan diamati pH-nya. Nilai pH yang baik untuk sediaan *lip product* adalah mendekati pH kulit bibir yaitu ± 4 (Barel et al., 2001).

4. Uji Titik Lebur

Lip balm dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50°C. Kemudian suhu dinaikkan perlahan dan dilihat pada suhu berapa *lip balm* meleleh. Titik leleh *lip balm* yang baik adalah 60°C (Sandipan & L.D., 2022).

3.4.8 Uji Antioksidan Metode DPPH

Lip balm sebanyak 1 gram ditimbang, kemudian dilarutkan dengan metanol 96% (v/v) dan ditambahkan dengan n-heksan di dalam corong pisah, kemudian diekstraksi. Fase n-heksan dipisahkan dari larutan, fase metanol diuapkan hingga menghasilkan ekstrak kental.

Selanjutnya, dibuat larutan blanko DPPH dengan mencampurkan 2 mL metanol bersama 2 mL larutan DPPH 0,004% (b/v) dalam tabung reaksi kemudian divortex dan dihomogenkan. Larutan sampel *lip balm* dibuat dengan konsentrasi 2,5; 5; 10; 20; 40

dan 80 ppm, kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,004% (b/v) dan divortex serta dihomogenkan. Selanjutnya, larutan blanko diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit. Setelah diinkubasi, seluruh larutan diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persentase inhibisi dengan rumus:

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

Penentuan IC_{50} dilakukan dengan persamaan regresi linear sebagai berikut:

$$y = a + bx$$

x = konsentrasi sampel

y = % inhibisi

Hasil IC_{50} sampel *lip balm* kemudian dibandingkan dengan IC_{50} standar asam askorbat. Penentuan IC_{50} asam askorbat dilakukan dengan cara yang sama dengan penentuan IC_{50} sampel *lip balm*. Larutan standar asam askorbat dibuat dengan konsentrasi seri 0,5; 1; 2; 4; dan 8 ppm (Kamoda et al., 2021).

3.4.9 Uji Stabilitas

Uji stabilitas pada sediaan *lip balm* kombinasi ekstrak ubi jalar ungu dan kulit jeruk nipis dilakukan pada suhu ruang (15-30°C) dengan mengamati perubahannya dari minggu ke-0 sampai minggu ke-4. Pada uji stabilitas, dilakukan pengamatan pada fisik sediaan *lip*

balm selama masa pengujian seperti organoleptis, homogenitas, pH, titik lebur, dan kekerasan dari sediaan *lip balm* (Prasetiyo et al., 2023).

3.4.10 Uji Daya Lembap

Penelitian ini melibatkan 5 panelis. Setiap panelis menggunakan formula F0, F1, F2, dan F3 pada posisi tangan yang berbeda. Panelis yang dipilih memenuhi kriteria inklusi, yaitu wanita berusia 18-35 tahun, dalam kondisi sehat, tidak memiliki riwayat penyakit kulit terkait alergi, serta bersedia menjadi panelis dengan menandatangani formulir persetujuan. Uji kelembapan *lip balm* dilakukan dengan mengoleskan produk pada tangan panelis dua kali sehari, pagi dan malam. Pengujian berlangsung selama 4 minggu dengan pengukuran kelembapan pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28 pada siang hari. Hasil diamati melalui perubahan fisik secara langsung dan pengukuran kelembapan kulit menggunakan alat *skin analyzer* (Nazliniwaty et al., 2019).

3.4.11 Uji Hedonik

Uji ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kesukaan panelis terhadap 4 formula *lip balm stick* ekstrak ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dan kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Uji dilakukan dengan meminta panelis untuk mengoleskan 4 formula *lip balm* pada bibir dan memilih formula yang paling disukai. Panelis terdiri dari 20 orang dengan kriteria wanita berusia 18-25 tahun, tidak cacat, tidak buta warna, tidak memiliki riwayat alergi (Susiwi, 2009).

Parameter yang akan diuji pada uji hedonik adalah tekstur, warna, aroma, kelembapan, dan kesukaan umum. Panelis akan diminta memberikan penilaian berdasarkan skala hedonik dengan tingkat kesukaan yang bervariasi mulai dari sangat tidak suka hingga sangat suka dengan skala 1-5.

3.5 Analisis Data

Data dianalisa dengan uji statistika One Way ANOVA (*Analysis of Variant*) dilanjutkan ke uji Post Hoc Tukey dengan aplikasi SPSS. Data yang dianalisa adalah hasil uji evaluasi yang termasuk pH, titik lebur, kekerasan, antioksidan, daya lembap, dan hedonik. One Way ANOVA digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara formula *lip balm* pada parameter yang diuji. Analisis ini dilakukan dengan asumsi bahwa data berdistribusi normal dan memiliki variansi yang homogen. Jika hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tukey untuk menentukan kelompok formula mana yang memiliki perbedaan tersebut.