

BAB III METODE PENELITIAN

1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan alam dan Teknologi sediaan Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang menggunakan metode eksperimental. Pengujian antioksidan yang dilakukan dengan menggunakan metode DPPH dan pengujian mutu fisik yang meliputi uji pH, uji organoleptik, uji kelembaban, uji waktu alir dan uji waktu larut.

1.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah naga merah yang diperoleh dari tempat pembudidayaan buah naga merah di Desa Ciranjang, kabupaten Purwakarta. Buah naga yang digunakan yaitu buah naga merah yang sudah matang yang berciri-ciri buah dapat dipanen pada saat buah mencapai umur 50-55 hari.

1.3 Alat dan Bahan penelitian

1.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan, blender, saringan, batang pengaduk, gelas ukur, alat *freeze dryer*, spektrofotometer UV-Vis, mortir dan stemper, Oven, stopwatch, mouister balance, pH meter, tabung reaksi.

1.3.2 Bahan

Bahan menggunakan sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*), aspartam, asam sitrat, PVP, larutan induk DPPH, metil p.a

1.4 Variabel penelitian

1.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang bisa diubah-ubah yang dapat mempengaruhi variabel terikat. Penelitian ini yaitu tiga konsentrasi ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yang dibuat sebagai minuman serbuk instan yang menjadi variabel bebas.

1.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang bisa berubah yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Penelitian uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH dan *Freeze dry* serta evaluasi sediaan minuman serbuk instan yang menjadi variabel terikat.

1.5 Prosedur penelitian

1.5.1 Determinasi Tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini yaitu determinasi tanaman yang dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri pada morfologi yang terdapat di tanaman buah naga merah sesuai kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur.

1.5.2 Pembuatan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Kulit buah naga yang sudah dicuci dan dibersihkan terlebih dahulu kemudian ditimbang sebanyak 1 kg, lalu dimasukkan ke dalam alat blender, kulit buah naga diblender hingga menjadi cair atau halus, kemudian disaring dan simpan kedalam wadah yang tertutup (Lisma,2019). Kemudian dipekatkan menggunakan alat *freeze dryer* hingga memperoleh sampel yang berbentuk seperti serbuk.

1.5.3 Skrining Fitokimia

(a) Alkaloid

Ambil 1 ml larutan ekstrak kental kulit buah naga merah lalu tambahkan 2 ml HCl 2N kemudian kocok perlahan lalu pisahkan dalam 2 tabung yang berbeda masing-masing tabung 1 ml. Tabung 1, tambahkan 1 tetes reagen dragondroff, keberadaan alkaloid ditandai dengan terjadinya endapan merah atau jingga dan lapisan bawah cairan HCl. Tabung 2, tambahkan 1 tetes mayer, keberadaan alkaloid akan ditandai dengan adanya 2 lapisan yang terbentuk, lapisan bawah berwarna hijau dan lapisan bawah endapan putih (Agustina *et al*, 2016).

(b) Flavonoid

Ambil 1 ml ekstrak kental kulit buah naga merah masukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan serbuk Mg q.s lalu masukkan 10 tetes HCl pekat maka apabila hasil positif akan terbentuk endapan putih (Agustina *et al*, 2016).

(c) Fenolik

Ambil 1 ml ekstrak kental kulit buah naga merah masukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 10 tetes FeCl₃ 1% lalu amati, keberadaan fenolik ditandai dengan adanya perubahan warna hitam pada sampel (Agustina *et al*, 2016).

(d) Kuinon

Ambil 1 ml ekstrak kental kulit buah naga merah masukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan NaOH 5 tetes lalu amati, keberadaan kuinon ditandai dengan perubahan warna jingga pada sampel (Agustina *et al*, 2016).

(e) Saponin

Ambil 1 gram ekstrak kental kulit buah naga merah larutkan dengan aquadest yang sudah dipanaskan sebanyak 10ml, diamkan sampai tidak terlalu panas kocok selama 10-15 detik lalu amati, keberadaan saponin ditandai dengan adanya busa atau buih pada sampel (Agustina *et al*, 2016).

(f) Tanin

Ambil ekstrak kulit buah naga merah sebanyak 3 ml masukkan kedalam tabung reaksi, lalu tambahkan 5 tetes gelatin lalu amati perubahan yang terjadi, keberadaan tanin ditandai dengan endapan putih pada sampel (Agustina *et al*, 2016).

(g) Steroid dan titerpenoid

Ambil larutan ekstrak kulit buah naga merah 2 ml, lalu diuapkan, tambahkan 5 tetes liberman bouchard kemudian amati perubahan yang terjadi, adanya steroid dan terpenoid ditandai dengan adanya cincin biru kehijauan pada sampel (Agustina *et al*, 2016).

1.5.4 Uji Antioksidan

1) Pembuatan larutan DPPH

Timbang DPPH secara seksama dengan berat 2,5 mg kemudian dilarutkan dengan metanol proanalisis hingga mencapai volume 100 ml. kemudian larutan DPPH ditempatkan kedalam botol gelap untuk menghindari kerusakan karena cahaya (Tambunan *et al*, 2012).

2) Pembuatan larutan blanko dan penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan blanko dibuat dengan 2 ml larutan DPPH ditambahkan dengan metanol proanalisis sebanyak 2 ml, sehingga volume larutan sebanyak 5 ml. kemudian larutan dikocok hingga homogen dan pindahkan kedalam tabung reaksi, seluruh permukaan tabung reaksi ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* agar tabung reaksi tidak tembus cahaya dikarenakan DPPH sensitif terhadap cahaya. Kemudian larutan diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit (Hamzah *et al*, 2014). Selanjutnya ukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan diperoleh panjang gelombang maksimum DPPH 516 nm.

3) Pembuatan larutan vitamin C sebagai kontrol positif

Vitamin C merupakan pembanding yang digunakan sebagai positif kontrol dalam penelitian ini karena vitamin C sering digunakan sebagai pembanding dalam analisis aktivitas antioksidan. Vitamin C diketahui sebagai senyawa yang bersifat antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai (Nugroho, 2021). Penggunaan pembanding dalam penelitian ini yaitu untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan dalam ekstrak kulit buah naga merah apabila dibandingkan dengan vitamin C.

Standar larutan vitamin C dibuat dari larutan induk vitamin C 100 ppm dengan cara melarutkan 10 mg sebruk vitamin C dengan 100 ml metanol proanalisis dalam labu ukur (Tambunan et al, 2012). Larutan induk 100 ppm diencerkan menjadi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm sebanyak 10 ml pada setiap konsentrasi dengan menggunakan labu ukur, kemudian pindahkan kedalam tabung reaksi.

Masing-masing konsentrasi larutan vitamin C 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan larutan DPPH sebanyak 1 ml dan ditambahkan methanol proanalisis sebanyak 3 ml, sehingga masing-masing volume larutan sebanyak 5 ml. larutan kemudian dikocok hingga homogen, seluruh permukaan tabung reaksi ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* dan diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit untuk menunggu waktu reaksi (reaction time) (Nugroho, 2021).

4) Pembuatan larutan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Larutan induk dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm dengan cara melarutkan 25 mg ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan 25 ml metanol proanalisis dalam labu ukur. Standar larutan ekstrak dibuat dari larutan induk 1000 ppm yang diencerkan menjadi 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm sebanyak 10 ml pada setiap konsentrasi dengan menggunakan labu ukur yang kemudian dipindahkan kedalam tabung reaksi. Masing-masing konsentrasi larutan ekstrak 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian tambahkan larutan DPPH sebanyak 1 ml dan tambahkan methanol proanalisis sebanyak 3 ml, sehingga masing-masing volume larutan sebanyak 5 ml. Larutan kemudian dikocok hingga homogen, seluruh permukaan

tabung reaksi ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* dan diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit untuk menunggu waktu reaksi (*reaction time*) (Nugroho, 2021).

5) Pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Semua larutan yang sudah diinkubasi selama 30 menit (larutan blanko, vitamin C dan ekstrak kulit buah naga merah) diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 514 nm.

6) Penentuan nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Persentase yang menunjukkan aktivitas radikal yaitu persentase penghambatan. Persentase penghambatan terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi sampel dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100$$

Keterangan :

Absorbansi Blanko : nilai absorbansi larutan blanko

Absorbansi Sampel : nilai absorbansi larutan uji atau larutan pembanding

Nilai persen penghambatan yang diperoleh kemudian dibuat kurva terhadap konsentrasi larutan uji atau pembanding, selanjutnya dari kurva dibuat regresi linear sehingga diperoleh persamaan :

$$y = a + bx$$

keterangan :

y : variabel terikat (persen penangkapan radikal (50%))

x : variabel bebas (nilai IC₅₀ (yang dicari))

a : konstanta regresi

b : koefisien regresi

Nilai IC_{50} sebagai parameter antioksidan dihitung dari persamaan regresi untuk mencari nilai x dengan memasukkan 50 pada nilai y , sehingga akan diketahui konsentrasi efektifnya (Kartin dan Bendra, 2015).

7) Penggolongan antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*)

Antioksidan dapat digolongkan menjadi beberapa jenis setelah mendapatkan nilai IC_{50} , suatu senyawa dapat dikatakan memiliki antioksidan sangat aktif apabila nilai IC_{50} bernilai < 50 ppm, aktif apabila nilai IC_{50} bernilai 50-100 ppm, sedang apabila nilai IC_{50} bernilai 101-250 ppm, lemah apabila nilai IC_{50} bernilai 250-500 ppm dan tidak aktif apabila nilai IC_{50} bernilai > 500 ppm.

1.6 Pembuatan minuman serbuk instan

Tabel 3.1 Formulasi minuman serbuk instan

| No | Bahan yang digunakan | Konsentrasi bahan yang digunakan | | |
|----|-------------------------------|----------------------------------|----------|----------|
| | | F1 | F2 | F3 |
| 1 | Ekstrak kulit buah naga merah | 5 gram | 10 gram | 15 gram |
| 2 | Aspartam | 10 gram | 15 gram | 15 gram |
| 3 | PVP | 2 gram | 2 gram | 2 gram |
| 4 | Asam Sitrat | 0,5 gram | 0,5 gram | 0,5 gram |

Menimbang bahan-bahan diatas, selanjutnya dilakukan pencampuran ekstrak kulit buah naga merah, aspartam, PVP dan asam sitrat ke dalam mortir lalu digerus hingga bahan tercampur semua. Proses selanjutnya pindahkan bahan-bahan yang sudah digerus ke dalam nampan lalu masukkan kedalam oven dengan suhu $80^{\circ}C$ dalam 10 menit, sesudah dioven serbuk dipindahkan kedalam loyang.

1.7 Evaluasi Sediaan minuman serbuk instan

3.7.1 Pengujian Organoleptik

Pengujian organoleptik pada sediaan minuman serbuk instan yaitu pemeriksaan perubahan pada warna, konsistensi dan bau. Dilakukan dipercepat sebelum dan sesudah penyimpanan.

1.7.1 Pengujian pH

Pengujian pH pada sediaan minuman serbuk instan yaitu untuk mengetahui hasil pengukuran tingkat keasaman suatu serbuk dengan menggunakan alat pH meter.

1.7.2 Pengujian Waktu alir

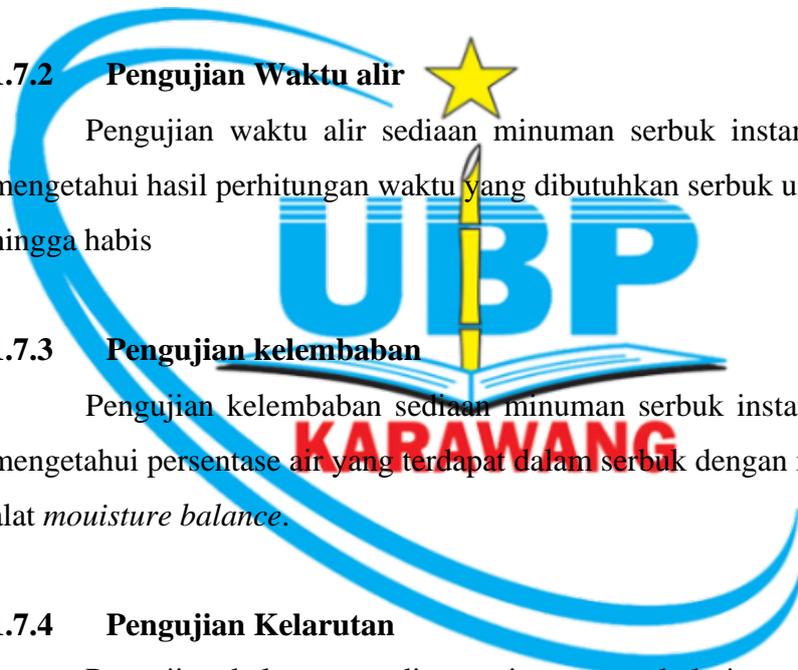
Pengujian waktu alir sediaan minuman serbuk instan yaitu untuk mengetahui hasil perhitungan waktu yang dibutuhkan serbuk untuk mengalir hingga habis

1.7.3 Pengujian kelembaban

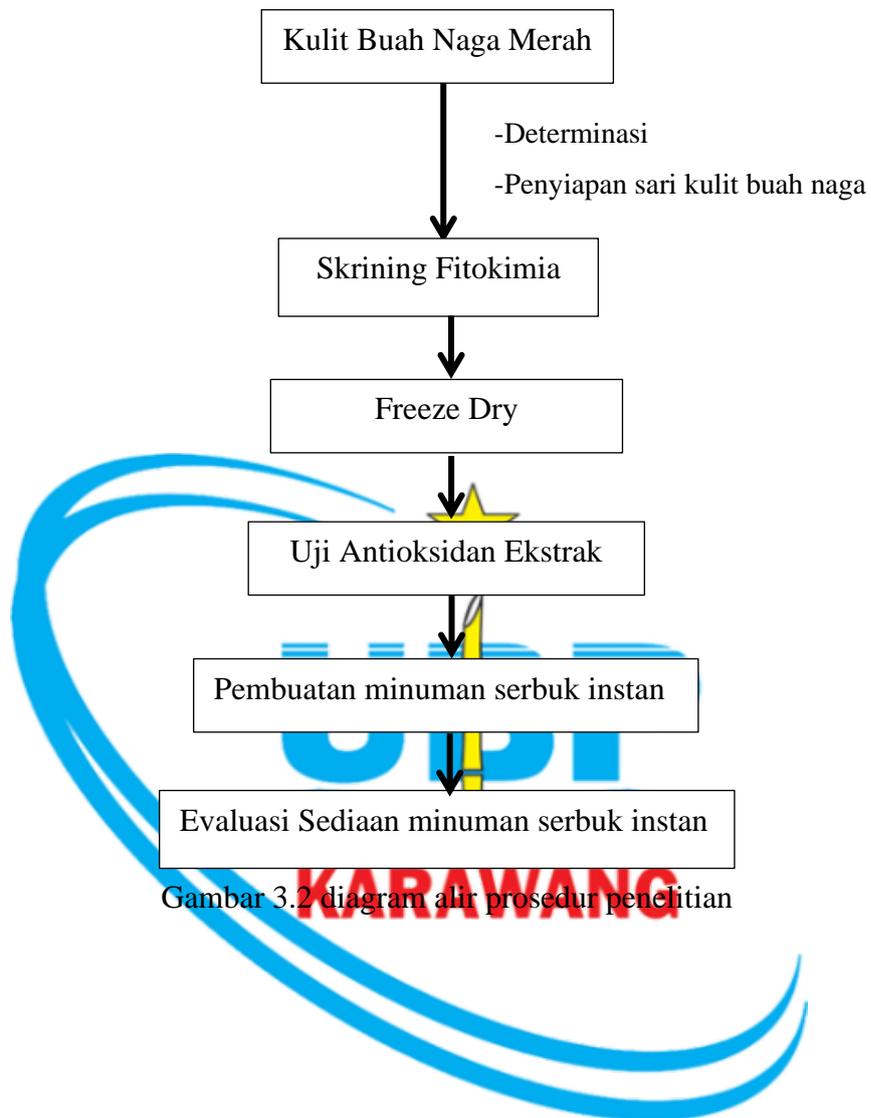
Pengujian kelembaban sediaan minuman serbuk instan yaitu untuk mengetahui persentase air yang terdapat dalam serbuk dengan menggunakan alat *mouisture balance*.

1.7.4 Pengujian Kelarutan

Pengujian kelarutan sediaan minuman serbuk instan yaitu untuk mengukur tingkat kelarutan serbuk instan yang dihasilkan.



1.8 Diagram alir prosedur penelitian



Gambar 3.2 diagram alir prosedur penelitian