

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental. Penelitian meliputi formulasi sediaan, evaluasi sediaan meliputi pemeriksaan organoleptis, waktu alir granul, kadar air, pH, waktu larut yang dilakukan di Laboratorium bahan alam Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini merupakan buah murbei hitam (*Morus nigra* L) yang diperoleh di Perumahan Bumi Mutiara Indah Cikampek Karawang. Selanjutnya buah murbei hitam di cuci terlebih dahulu setelah itu tiriskan, lalu masukkan kedalam kulkas agar tidak busuk. Ketika ingin digunakan maka keluarkan buah murbei dari kulkas cuci kembali hingga bersih tiriskan baru kemudian dilakukan juicer buah.

3.3. Alat dan Bahan

1. Alat

Adapun alat yang digunakan pada saat penelitian ialah, timbangan analitik, Oven, Pengayakan mesh 14 dan 60, Saringan, Juicer, Batang pengaduk, Gelas ukur 100 ml, Labu ukur, Erlenmeyer, alat *freeze dry*, *Stopwach*, *moisture balance*. Kaca arloji, alat spectrometer UV-Vis, Mortir, Stemper, Timbangan, alat pH meter, Tabung reaksi, Rak tabung reaksi.

2. Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini ialah, buah murbei hitam (*Morus nigra* L), Asam sitrat, Asam tartrat, Natrium bikarbonat, Aspartame (600mg/kg), *Polivinylpirolidon* (PVP), dan Akuadest, Larutan induk DPPH, Methanol p.a

3.4. Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium bahan alam, Teknologi, Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.5. Variabel Penelitian

Berikut beberapa variable yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu 3 konsentrasi ekstrak buah murbei hitam (*Morus nigra L*) yang dibuat sebagai minuman instan dalam sediaan granul *effervescent*

2. Variabel Terikat

Variabel terikat meliputi uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan *Freeze Dry* serta evaluasi dari sediaan granul *effervescent*

3.6. Prosedur Penelitian

Adapun prosedur penelitian yang dilakukan dalam pengujian antioksidan ekstrak buah murbei (*Morus nigra L*) dalam sediaan minuman instan granul *effervescent* adalah sebagai berikut:

3.6.1. Determinasi

Buah Murbei Hitam di determinasi di Pusat Penelitian Herballmart UPT Laboraturorium Herbal Materia Medica Batu, Malang. Tujuan determinasi tanaman yaitu untuk mendapatkan kebenaran identitas dengan jelas dari suatu tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian.

3.6.2. Persiapan Sampel

Buah murbei hitam (*Morus nigra L*) yang diperoleh Perum Bumi Mutiara Indah 2, Kecamatan Cikampek, Kabupaten Karawang.

3.6.3. Pembuatan Sari Buah Murbei Hitam (*Morus nigra L*)

Buah murbei hitam di cuci bersih terlebih dahulu agar terhindar dari kotoran dan debu yang menempel pada buah murbei, Di cuci hingga bersih kemudian ditimbang sebanyak 1 kg. Dimasukkan kedalam alat juicer. Setelah di juicer dan mendapatkan sari nya kemudian sari buah murbei di simpan di wadah tertutup (Lisma, 2019)

3.6.4. Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ekstrak sebanyak 1 ml ditambah 2 ml HCl 2N dan dikocok. Campuran selanjutnya dibagi dalam 2 tabung berbeda. Masingmasing tabung ditetesi 1 tetes reagen Dragendorff pada tabung pertama, pada tabung kedua ditetesi 1 tetes reagen Mayer. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan kuning pada penambahan reagen Mayer dan terbentuknya endapan merah pada penambahan reagen Dragendorff (Abriyani Ermi *et al.*, 2022)

b. Uji Flavonoid

Ekstrak sebanyak 1 ml ditambahkan serbuk magnesium secukupnya dan 10 tetes asam klorida pekat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna hitam kemerahan, kuning atau jingga (Abriyani Ermi *et al.*, 2022).

c. Uji Fenolik

Ekstrak sebanyak 1 ml ditambah 10 tetes FeCl_3 1%. Hasil positif adanya senyawa fenolik adalah terbentuknya warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau (Abriyani Ermi *et al.*, 2022).

d. Uji Kuinon

Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan peraksi NaOH, jika terbentuk larutan warna kuning tua, jingga atau merah maka positif mengandung Kuinon (Abriyani Ermi *et al.*, 2022).

e. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan melarutkan sampel dalam aquadest kemudian dipanaskan selama 15 menit lalu dikocok selama 15 atau 10 detik. Jika terbentuk buih yang stabil selama kurang lebih 10 menit dan tidak hilang saat ditambahkan beberapa tetes asam klorida 2N, maka sampel positif mengandung saponin (Abriyani Ermi *et al.*, 2022).

f. Uji Tanin

Uji fitokimia tanin dilakukan dengan penambahan larutan gelatin dalam ekstrak. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih. Sebanyak 3 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 5 tetes larutan gelatin, jika terbentuk endapan putih maka positif mengandung tanin

g. Uji Steroid dan Triterpenoid

Ambil larutan ekstrak buah murbei 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.

3.6.5. Pengeringan Ekstrak Buah Murbei Hitam Menggunakan *Freeze Dry*

Sebanyak 30gram ekstrak buah murbei kental dimasukkan kedalam chammer lalu masukkan kedalam *freezer* kulkas atau lemari pendingin sampai membeku (menjadi es) yang bertujuan untuk kedalam *freezer* kulkas atau lemari pendingin sampai membeku (menjadi es) yang

bertujuan untuk mempercepat proses penguapan, jika tidak dilakukan hal ini maka dikhawatirkan sampel akan terhisap oleh alat *freezer dry*. Hubungkan chamber pada alat *freezer dry* dengan alat pipa yang sebelumnya telah diatur suhunya hingga -50°C . Alat tersebut akan menyedot solvent yang telah beku menjadi uap oleh vacuum pump. Prinsip kerja alat ini adalah merubah fase padat atau es menjadi fase gas (uap). Ekstrak yang sudah kering ditandai dengan tidak dinginnya wadah yang digunakan apabila disentuh dengan tangan dan nilai vacuum pada alat kurang dari 1 (Suhesti Iin, 2019).

3.6.6. Uji Antioksidan

Uji antioksidan buah murbei terdiri dari larutan DPPH, penentuan panjang gelombang maksimum, pembuatan larutan blanko, pembuatan larutan askorbat (Agustini, 2020):

1. Pembuatan Larutan Blanko DPPH

Sebanyak 2 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam kuvet lalu ditambahkan dengan methanol p.a sebanyak 2 mL (dengan perbandingan 1:1) kemudian di inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C , diukur serapan nya pada panjang gelombang 514 nm. Semua perlakuan di ruangan yang tertutup dan terhindar dari cahaya serta pengerjaan dilakukan replica sebanyak 4x. (Agustini, 2020)

2. Pembuatan Larutan Asam Askorbat

Pembuatan larutan baku asam askorbat pada konsentrasi 10 ppm lalu dibuat variasi konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm masing-masing variasi konsentrasi dilarutkan dalam 25 mL methanol p.a pada labu ukur. (Agustini, 2020)

3. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Sampel ekstrak buah murbei sebanyak 10mg dilarutkan ke dalam etanol 96% 10 ml dan dicukupkan hingga tanda batas. Larutan sampel ekstrak buah murbei dibuat dengan masing-masing konsentrasi 1 ppm,

1,5 ppm, 2 ppm. Masing-masing dipipet dan ditambahkan etanol 96% ke dalam labu ukur 10 ml hingga tanda batas. Dipipet larutan sampel ekstrak buah murbei sebanyak 2 ml dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan DPPH sebanyak 2 ml, kemudian ditutup menggunakan alumunium foil. Selanjutnya di diamkan selama 30 menit, kemudian diukur serapan UV-Vis dengan panjang gelombang 514 nm. (Agustini, 2020).

4. Penentuan IC_{50}

Medianinhibitory concentration (IC_{50}) adalah konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat aktivitas oksidasi radikal sebanyak 50. Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl*). Metode ini merupakan metode yang sering dipilih sebagai metode pengujian aktivitas antioksidan karena sederhana, mudah, cepat, peka dan memerlukan sedikit sampel.

Sebanyak 10 mg vitamin C dilarutkan ke dalam etanol 96% 10 ml dan dicukupkan hingga batas. Larutan vitamin C dibuat dengan masing-masing dipipet masing-masing konsentrasi 10 ppm, 8 ppm, 6 ppm, 4 ppm, dan 2 ppm. Masing-masing dipipet dan ditambahkan etanol 96% ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan DPPH sebanyak 2ml, kemudian ditutup menggunakan alumunium foil. Diamkan selama 30 menit, kemudian absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 514 nm. IC_{50} merupakan besaran konsentrasi inhibisi suatu larutan uji terhadap dalam menurunkan aktivitas radikal bebas sebesar 50%, dimana ketika nilai IC_{50} semakin kecil maka akan semakin besar pula aktivitas antioksidannya (Widyasanti *et al.*, 2016; Wulansari, 2018). Setelah di dapatkan hasil dapat dikategorikan sebagaimana berikut.

Rumus Persamaan Regresi Linear:

$$Y = a + b x$$

Keterangan :

Y : Persen inhibisi

x: Konsentrasi

Tabel 3. 1 Kategori Antioksidan

Kategori Antioksidan	Nilai IC ₅₀ (ppm)
Sangat kuat	>50
Kuat	50-100
Sedang	100-250
Lemah	250-500
Sangat Lemah	>500

3.6.7. Formulasi Granul *Effervescent*

Pembuatan formulasi sediaan minuman granul *effervescent* dari buah murbei hitam (*Morus nigra* L) mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh (Lisma *et al.*, 2019).



Tabel 3. 2 Formula granul *effervescent*

Bahan	Formula %			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak				
Buah Murbei (Zat Aktif)	-	19,36	28,79	86,47
Asam Sitrat (Pengawet)	9.4	9.4	8.6	7.9
Natrium Bikarbonat (Sumber Basa)	23.4	23.4	25.7	27.8
Aspartam (Pemanis)	1.5	1.5	1.5	1.5
PVP (Pengikat)	2	2	2	2

3.6.8. Pembuatan Granul *Effervescent*

Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

Masing-masing bahan yang berbentuk kristal seperti asam sitrat dan asam tartrat diserbukkan terlebih dahulu dengan cara digerus. Selanjutnya diayak dengan pengayakan No 60, kemudian timbang serbuk buah murbei yang telah dikeringkan, lalu campurkan dengan natrium bikarbonat yang telah di ayak (Campuran 1). Aspartam digerus, kemudian tambahkan asam sitrat dan asam tartrat yang telah dihaluskan (Campuran 2). Campuran 1 ditambahkan kedalam campuran 2, gerus sampai homogen. Kemudian tambahkan PVP yang telah dilarutkan dalam alcohol. Keringkan dalam oven pada suhu 50°C sampai benar-benar kering. Setelah campuran kering, kemudian ayak dengan pengayak No 14

untuk membuat granul. Setelah menjadi granul, lakukan pengujian kualitas granul *effervescent* (Lisma *et al.*, 2019)

3.6.9 Evaluasi Pengujian Granul

a. Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis memiliki tujuan yaitu untuk mengetahui bentuk, bau, rasa, dan warna pada granul *effervescent* yang dapat dilihat langsung untuk mengetahui granul sudah sesuai atau belum (Dewi *et al.*, 2014).

b. Uji kadar air

Pemeriksaan dilakukan dengan alat *moisture balance* yaitu alat pengukuran kelembaban. Dengan cara ambil 100gram granul kemudian masukkan kedalam oven selama 4 jam dan lakukan 3 kali percobaan. Granul *effervescent* yang memenuhi syarat kadar air antara 0,4%- 0,7% (Lucia, 2017).

c. Uji waktu alir

Pengujian waktu alir bertujuan untuk mengetahui kecepatan alir granul dari sejumlah granul melalui lubang corong yang diukur adalah sejumlah zat yang mengalir dalam suatu waktu tertentu. Granul kering sebanyak 100gram kemudian masukkan kedalam corong dengan lubang bawah ditutup. Lalu hitung waktu alir dimulai pada saat lubang dibuka sampai serbuk seluruhnya keluar dari corong. Aliran granul dikatakan baik jika waktu mengalir 100gram kurang dari 10 detik. Dilakukan pengujian sebanyak 3 kali menggunakan *stopwatch* (Lestari, 2014).

d. Pemeriksaan pH

Tujuan dilakukannya pemeriksaan pH berfungsi untuk menentukan keasaman dari sediaan minuman granul *effervescent*. Granul ditimbang sebanyak 4gram dan dilarutkan dalam 150 ml air

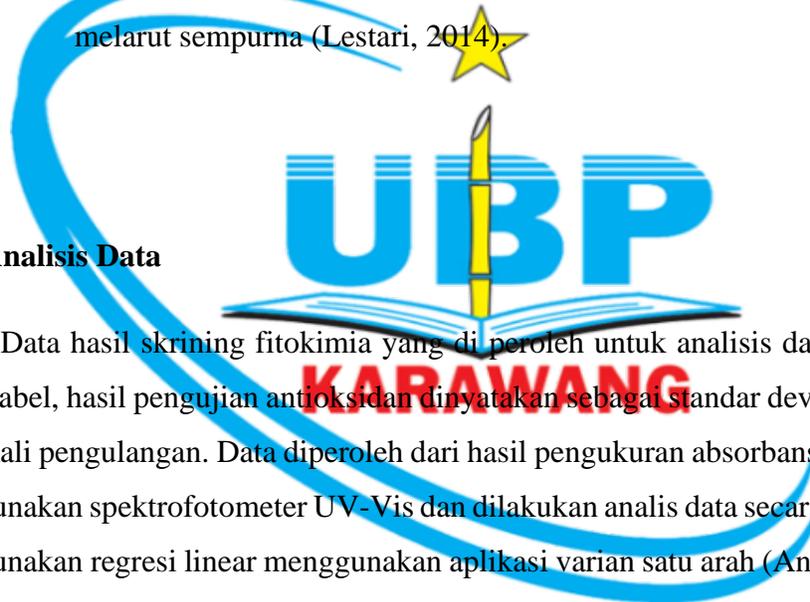
kemudian diukur pH dengan menggunakan pH meter. pH yang dikatakan baik jika pH mendekati 4-5 (Elfiyani, 2014).

e. Uji waktu larut granul

Uji waktu larut bertujuan untuk mengetahui apakah sediaan mampu larut di dalam air atau tidak. Granul *effervescent* dicampur dengan 100 ml air dengan suhu 25°C kemudian masukkan granul *effervescent* kedalam air tersebut. Setelah itu, dihitung waktu yang diperkukan untuk melarutkan seluruh serbuk menggunakan *stopwatch*. Waktu larut yang baik yaitu kurang dari 1 menit di lakukan pengujian sebanyak 3 kali kemudian dicatat waktu granul melarut sempurna (Lestari, 2014).

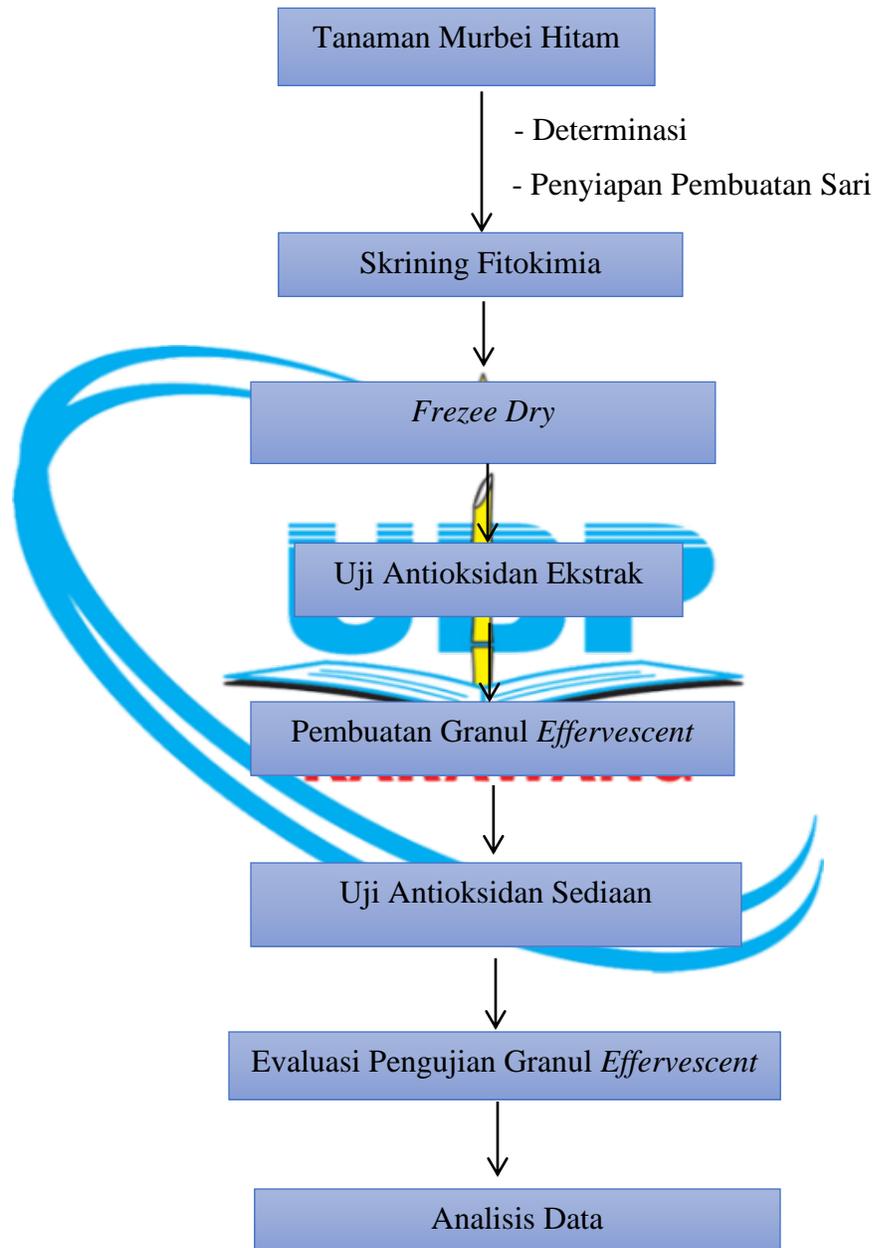
3.7. Analisis Data

Data hasil skrining fitokimia yang di peroleh untuk analisis dan dimuat dalam tabel, hasil pengujian antioksidan dinyatakan sebagai standar deviasi (SD) dari 3 kali pengulangan. Data diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan dilakukan analisis data secara statistik menggunakan regresi linear menggunakan aplikasi varian satu arah (Anova one way)



3.8. Diagram Alir

Berikut merupakan alur penelitian dalam bentuk diagram alir:



Gambar 3.1 Diagram Alir