

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah quasi eksperimental dengan variasi kelompok yang digunakan yaitu dua variasi Tween 20 dan tiga variasi Propilen glikol dalam formula SNEDDS ekstrak rimpang jahe merah. Parameter uji pada penelitian ini meliputi uji stabilitas fisik dan antioksidan sistem SNEDDS ekstrak rimpang jahe merah berdasarkan uji antioksidan DPPH.

3.2 Bahan dan Alat yang digunakan

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini menggunakan ekstrak ethanol rimpang jahe merah (PT. Natrindo), asam oleat (Merck), tween 20 (Merck), Propilen glikol (Merck), DPPH (1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazy) (Smartlab), vitamin C (Emsure), ethanol (J.T Baker).

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan adalah Neraca Analitik (Adam Scientific), gelas ukur (Pyrex), gelas kimia (Pyrex), labu ukur (Pyrex), pipet tetes, water bath (Cecil), tabung reaksi (Pyrex), cawan porselin (Pyrex), vial (Pyrex), Blender (Philips), spektrofotometer UV-Vis (VWR), Cuvet (Quartz), *viscometer brookfield* (Lamy Rheologi Instrumen), pH meter digital (PT. Nanyang Chemical), lemari pendingin (Philips), oven (Gemmyco).

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini mencakup 6 variasi kelompok berdasarkan perbedaan kadar Tween 20 dan Propilen glikol yaitu, Tween 20 40 g dan Propilen glikol 10 g (T40P10), Tween 20 40 g dan Propilen glikol 12,5 g (T40P12,5), Tween 20 40 g dan Propilen glikol 15 g (T40P15), Tween 20 80 g dan Propilen glikol 10 g (T80P10), Tween 20 80 g dan Propilen glikol 12,5 g (T80P12,5), Tween 20 80 g dan Propilen glikol 15 g (T80P15).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variable yang dipengaruhi atau hasil dari keberadaan variable bebas. Variabel terkait dalam penelitian ini, yaitu diuji stabilitas fisik meliputi organoleptik, pH, viskositas, dan sentrifugasi, serta uji antioksidan formula SNEDDS ekstrak rimpang jahe merah berdasarkan uji antioksidan DPPH.

3.3.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas					
1	Variasi kelompok formulasi SNEDDS ekstrak jahe merah	Variasi kelompok berdasarkan 3 variasi Tween 20 dan 2 variasi dan Propilen glikol	-	Nominal	1. T40P10 2. T40P12,5 3. T40P15 4. T80P10 5. T80P12,5 6. T80P15
Variabel Terkait					
1.	Uji Stabilitas Organoleptik Formula SNEDDS	Uji stabilitas organoleptik dengan metode <i>heating-cooling cycle</i> melalui penyimpanan bertahap dilakukan sebanyak 3 siklus.	Panca Indera	Nominal	1. Warna 2. Aroma 3. Tekstur

2	Uji Stabilitas pH Formula SNEDDS	Uji stabilitas pH dengan metode <i>heating-cooling cycle</i> melalui penyimpanan bertahap dilakukan sebanyak 3 siklus.	pH meter digital	Rasio	Angka dalam pH meter
3	Uji Stabilitas viskositas	Uji stabilitas viskositas dengan metode <i>heating-cooling cycle</i> melalui penyimpanan bertahap dilakukan sebanyak 3 siklus.	viscometer brookfield	Rasio	Angka dalam viscometer (Cp)
4.	Uji Stabilitas Sentrifugasi	Uji stabilitas sentrifugasi dengan metode <i>heating-cooling cycle</i> melalui penyimpanan bertahap dilakukan sebanyak 3 siklus.	Centrifuge	Nominal	1.Pemisahan fase 2.Endapan 3.creaming 4.cracking
4.	Uji stabilitas antioksidan SNEDDS ekstrak rimpang jahe merah	Uji stabilitas antioksidan SNEDDS ekstrak rimpang jahe merah dengan metode <i>heating-cooling cycle</i> melalui penyimpanan bertahap dilakukan sebanyak 3 siklus. Uji antioksidan SNEDDS ekstrak rimpang jahe merah menggunakan metode DPPH dilakukan setiap siklus uji stabilitas	Spektrofotometer Uv-Vis	Interval	1.Sangat kuat ($IC_{50} < 50$ ppm) 2.Kuat (IC_{50} 50 - 100 ppm) 3.Sedang (IC_{50} 100-150 ppm) 4.Lemah (IC_{50} 151-200 ppm) 5.Sangat Lemah ($IC_{50} > 200$)

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Ekstrak Rimpang Jahe Merah

Bahan utama dalam penelitian ini adalah ekstrak jahe merah yang diperoleh dari PT. Natrindo, yang telah dilengkapi dengan *Certificate of Analysis* (COA) untuk memastikan kualitas dan kemurnian bahan sesuai dengan standar yang berlaku. COA ini disertakan sebagai bukti otentikasi bahan yang digunakan dalam penelitian.

3.4.2 Uji Antioksidan Ekstrak Rimpang Jahe Merah

Pengujian antioksidan pada ekstrak rimpang jahe merah dan pembanding Vitamin C. Dimana pada pengujian meliputi:

1. Pembuatan Larutan Stok DPPH

Larutan stok DPPH disiapkan dengan konsentrasi 50 ppm dengan melarutkan 2,5 mg DPPH dalam 50 ml etanol p.a, dan kemudian dicampur hingga homogen. Larutan disimpan pada suhu ruangan terlindung dari cahaya (Handayani, *et al.*, 2012).

2. Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum DPPH

1 mL larutan penyimpanan DPPH diambil dan dimasukkan ke dalam vial, kemudian etanol ditambahkan hingga volume total mencapai 5 mL. Campuran diaduk dan disimpan pada suhu 37° selama 30 menit. (Handayani, *et al.*, 2012). Setelah inkubasi, pengukuran absorpsi dilakukan menggunakan spektrometer UV, dan diamati dalam rentang panjang gelombang 400 hingga 800 nanometer (Anton, *et al.*, 2021), dengan puncak serapan maksimum DPPH 50 ppm terdeteksi pada panjang gelombang 516 nm.

3. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Konsentrasi 1000 ppm

Sebanyak 50 mg ekstrak rimpang jahe merah ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 50 mL etanol p.a dan dihomogenisasi hingga larut (Munadi, 2020).

4. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rimpang Jahe Merah dengan DPPH

Larutan uji ekstrak rimpang jahe merah disiapkan dengan konsentrasi, yaitu 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm. Di ambil sebanyak 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 mL, dan 0,8 mL dari larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm ke dalam labu ukur

10 mL, dan kemudian diencerkan sampai tanda. Untuk pengujian, 2 mL larutan sampel dicampur dengan 2 mL larutan DPPH, kemudian dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi selama 30 menit. Setelah inkubasi, perubahan warna akibat aktivitas DPPH diamati dan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Nifa, *et al.*, 2023).

5. Pembuatan Larutan Induk Asam Askorbat Konsentrasi 1000 ppm

Sebanyak 10 mg asam askorbat (vitamin C) ditimbang, kemudian dilarutkan dalam etanol murni sampai volumenya mencapai 10 mL di labu ukur, dan kemudian dikocok sampai larut dan homogen (Munadi, 2020).

6. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Vitamin C

Larutan uji disiapkan dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm menggunakan pipet 0,02 mL, 0,04 mL, 0,06 mL, 0,08 mL, dan 0,1 mL dari larutan stok ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian diencerkan hingga tanda (Kiromah, *et al.*, 2021). Untuk pengujian, 2 mL larutan sampel dicampur dengan 2 mL larutan DPPH, dibungkus dengan aluminium foil, dan kemudian diinkubasi selama 30 menit. Setelah inkubasi, perubahan warna akibat aktivitas DPPH diamati, dan absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Nifa, *et al.*, 2023).

7. Penentuan nilai IC₅₀

Parameter yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan adalah nilai Konsentrasi Inhibisi 50% (IC₅₀), yang merupakan konsentrasi senyawa antioksidan yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas sebesar 50%.

Semakin rendah nilai IC_{50} yang diperoleh, semakin tinggi kapasitas antioksidan dari suatu senyawa. Nilai IC_{50} diperoleh melalui perhitungan berdasarkan persamaan regresi linier dari kurva yang menghubungkan konsentrasi sampel dengan nilai absorbansi (Indirani, *et al.*, 2018). Presentase 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 penghambat yang diperoleh kemudian dinuat kurva terhadap konsentrasi larutan uji dan pembanding, selanjutnya dari kurva dilihat regresi linear sehingga diperoleh persamaan:

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y: Variabel terikat (Persen penangkap radikal (50%))

x: Variabel bebas (nilai IC_{50})

a: Konstanta regresi

b: Koefisien regresi

3.4.3 Formulasi SNEDDS

Pemilihan formulasi SNEDDS dimulai secara acak untuk menemukan formula yang sesuai, dilanjutkan dengan merancang formula menggunakan ekstrak jahe sebanyak 50 mg. Ekstrak dicampur dengan fase minyak, surfaktan, dan kosurfaktan, kemudian diproses menggunakan vortex selama 2 menit, sonifikasi, waterbath, dan diaduk kembali menggunakan magnetic stirrer sebanyak dua kali (Khoerunnisa, 2023). Variasi lebih lanjut mencakup surfaktan (Tween 20) dan kosurfaktan (Propilen glikol):

Tabel 3. 2 Pemilihan Formulasi SNEDDS

No	Bahan	T40P10	T40P12,5	T40P15	T80P10	T80P12,5	T80P15
1.	Zat Aktif (Ekstrak Rimpang Jahe Merah)	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg
2.	Surfaktan (Tween 40)	40 g	40 g	40 g	80 g	80 g	80 g
3.	Kosurfaktan (Propilen glikol)	10 g	12,5 g	15 g	10 g	12,5 g	15 g
4.	Fase minyak (asam oleat)	Add 100 g	Add 100 g	Add 100 g	Add 100 g	Add 100 g	Add 100 g

Penelitian ini menggunakan 2 variasi surfaktan (Tween 20) dan 3 variasi kosurfaktan (Propilen glikol), dengan fase minyak berupa asam oleat dan zat aktif ekstrak jahe merah sebanyak 50 mg. Formula 1 terdiri dari Tween 20 40 g dan Propilen glikol 10 g (T40P10), formula 2 terdiri dari Tween 20 40 g dan Propilen glikol 12,5 g (T40P12,5), formula 3 terdiri dari Tween 20 40 g dan Propilen glikol 15 g (T40P15), formula 4 terdiri dari Tween 20 80 g dan Propilen glikol 10 g (T80P10), formula 5 terdiri dari Tween 20 80 g dan Propilen glikol 12,5 g (T80P12,5), dan formula 6 terdiri dari Tween 20 80 g dan Propilen glikol 15 g (T80P15).

3.4.4 Uji Stabilitas Termodinamik

Uji stabilitas menggunakan dengan metode *heating-cooling cycle* pada pengujian dilakukan dalam 3 siklus dengan penyimpanan pada suhu 4°C dan 45°C masing-masing selama 48 jam. Formula yang tetap stabil tanpa menunjukkan pemisahan fase, pengendapan, creaming, atau cracking (Syukri, *et al.*, 2018). Parameter yang dilakukan pada uji ini, yaitu:

1. Uji Stabilitas Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk mengidentifikasi penampilan fisik SNEDDS, seperti bau, warna, dan pemisahan fase (Tungadi, *et al.*, 2021).

2. Uji Stabilitas pH

Sebanyak 10 mL SNEDDS dimasukan ke dalam gelas ukur untuk pengukuran pH. Pengukuran dilakukan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi sebelumnya, dan nilai pH yang ditunjukkan dicatat sebagai hasil evaluasi karakterisasi formula (Husni, *et al.*, 2019).

3. Uji stabilitas Viskositas

Viskositas diukur menggunakan *viscometer Brookfield* dengan wadah berisi 50 mL SNEDDS. Spindle No. 4 dipasang dan dijalankan pada kecepatan 100 rpm selama 1 menit (Eid *et al.*, 2014), dengan nilai viskositas berkisar 30-40 cP (Abdullah *et al.*, 2010).

4. Uji Sentrifugasi

Stabilitas sediaan diuji dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Setelah itu, diamati kemungkinan terjadinya pemisahan fase, pengendapan, creaming, atau cracking. Jika sediaan tetap stabil tanpa tanda-tanda

ketidakstabilan, maka dilanjutkan dengan uji pemanasan dan pendinginan untuk menguji ketahanan lebih lanjut (Senapati, *et al.*, 2016).

3.4.5 Uji Antioksidan SNEDDS

1. Pembuatan Larutan Stok DPPH

Larutan stok DPPH 50 ppm dibuat dengan melarutkan 2,5 mg DPPH dalam 50 mL etanol p.a, kemudian dicampur hingga homogen. Larutan disimpan pada suhu ruangan dalam kondisi terlindung dari cahaya untuk mempertahankan stabilitasnya (Handayani, *et al.*, 2012).

2. Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum DPPH

Sebanyak 1 mL larutan stok DPPH dipipet ke dalam vial, kemudian etanol p.a ditambahkan hingga volume total mencapai 5 mL. Larutan tersebut dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit (Handayani, *et al.*, 2012). Setelah inkubasi, pengukuran absorpsi dilakukan menggunakan spektrometer UV, dan diamati dalam rentang panjang gelombang 400 hingga 800 nanometer (Anton, *et al.*, 2021). Hasil pengukuran menunjukkan bahwa puncak maksimum absorbansi larutan DPPH 50 ppm terdapat pada panjang gelombang 516 nm

3. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Konsentrasi 1000 ppm

Ekstrak rimpang jahe merah ditimbang sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dalam 50 mL etanol p.a dan selanjutnya dihomogenkan (Munadi, 2020).

4. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rimpang Jahe Merah dengan DPPH

Dibuat larutan seri uji ekstrak rimpang jahe merah dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm dan 80 ppm dengan memipet larutan induk 1000 ppm masing-masing sebanyak 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 dan 0,8 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Untuk sampel uji, disiapkan masing-masing 2 mL larutan sampel dan 2 mL larutan DPPH yang dibungkus aluminium foil dan di inkubasi selama 30 menit sehingga akan terjadi perubahan warna dari aktivitas DPPH, kemudian diukur absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Nifa, *et al.*, 2023).

5. Pembuatan Larutan Induk Vitamin C Konsentrasi 1000 ppm

10 mg asam askorbat (vitamin C) ditimbang, kemudian dilarutkan dalam etanol p.a sampai volumenya mencapai 10 mL di labu ukur, dan kemudian dikocok sampai larut dan homogen (Munadi, 2020).

6. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Vitamin C

Larutan uji disiapkan dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm menggunakan pipet 0,02 mL, 0,04 mL, 0,06 mL, 0,08 mL, dan 0,1 mL dari larutan stok ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian diencerkan hingga tanda. (Kiromah, *et al.*, 2021). Untuk pengujian, 2 mL larutan sampel dicampur dengan 2 mL larutan DPPH, dibungkus dengan aluminium foil, dan kemudian diinkubasi selama 30 menit. Setelah inkubasi, perubahan warna akibat aktivitas DPPH diamati, dan absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Nifa, *et al.*, 2023).

7. Penentuan nilai IC₅₀

Parameter yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan adalah nilai Konsentrasi Inhibisi 50% (IC₅₀), yang merupakan konsentrasi senyawa antioksidan yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas sebesar 50%. Semakin rendah nilai IC₅₀ yang diperoleh, semakin tinggi kapasitas antioksidan dari suatu senyawa. Nilai IC₅₀ diperoleh melalui perhitungan berdasarkan persamaan regresi linier dari kurva yang menghubungkan konsentrasi sampel dengan nilai absorbansi (Indirani, *et al.*, 2018).

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 penghambat yang diperoleh kemudian dinuat kurva terhadap konsentrasi larutan uji dan pembanding, selanjutnya dari kurva dilihat regresi linear sehingga diperoleh persamaan:

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y: Variabel terikat (Persen penangkap radikal (50%))

x: Variabel bebas (nilai IC₅₀)

a: Konstanta regresi

b: Koefisien regresi

Ditentukan stabilitas aktivitas antioksidan dari formula SNEDDS selama 3 siklus.

3.5 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan ANOVA Satu Arah dengan tingkat kepercayaan 95% untuk menganalisis stabilitas aktivitas antioksidan di antara kelompok perlakuan. Jika nilai signifikansi (α) < 0,05 diperoleh, maka H_0 ditolak, menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan di antara konsentrasi ekstrak. Sebaliknya, jika $\alpha \geq 0,05$, maka H_0 diterima, menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan. Jika terdapat perbedaan yang signifikan, analisis dilanjutkan dengan uji post-hoc HSD Tukey untuk menentukan kelompok mana yang menunjukkan perbedaan tertentu.

