

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratorium, yang bertujuan untuk menganalisis kandungan senyawa metabolit ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* Duchesne), memformulasikan ekstrak biji labu kuning dalam sediaan *gummy* dan menganalisis aktivitas antioksidan

B. Lokasi Penelitian

Ekstraksi biji labu kuning dan identifikasi senyawa metabolit dilakukan di laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo. Uji karakteristik fisik *gummy* dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Biji labu kuning yang diperoleh dari hasil pertanian di Desa Getasan Kabupaten Semarang.

D. Variabel penelitian

Variabel dalam penelitian ini :

1. Variabel bebas dari penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* Duchesne) F1(1%),F2(2%), F3(4%) pada formula *gummy*
2. Variabel terikat dari penelitian ini adalah kandungan senyawa metabolit, karakteristik fisik ekstrak biji labu kuning meliputi organoleptis, pH,

keseragaman bobot, *swelling ratio*, waktu dispersi, sineresis dan aktivitas antioksidan.

3. Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu alat, bahan, suhu dan kondisi laboratorium.

E. Definisi operasional

1. Biji labu kuning (*Cucurbita moschata* Duchesne) merupakan biji dari labu kuning yang berbentuk pipih dan bulat memanjang diperoleh dari petani labu kuning di Desa Getasan Kabupaten Semarang.
2. Ekstrak biji labu kuning adalah ekstrak yang diperoleh dari hasil maserasi biji labu kuning menggunakan n-heksan.
3. Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan menggunakan pelarut n-heksan yang digunakan pada temperatur ruangan 3 hari
4. *Gummy* merupakan jenis permen yang berbentuk seperti jeli yang berisi ekstrak biji labu kuning dengan penambahan bahan pembentuk gel.
5. Karakteristik fisik *gummy* adalah pengujian mutu fisik *gummy* sesuai dengan persyaratan yang ditentukan meliputi organoleptis, pH, keseragaman bobot, *swelling ratio*, sineresis dan waktu dispersi.
6. Aktivitas antioksidan *gummy* adalah pengujian antioksidan *gummy* ekstrak biji labu kuning konsentrasi 1%, 2% dan 4% menggunakan metode peredaman DPPH

F. Alat dan bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kompor listrik, timbangan (Ohaus), cetakan permen, *waterbath*(Faithful), spatula, labu ukur 100ml (Iwaki), labu ukur 50mL, labu ukur 10mL, labu ukur 5mL, pengaduk kaca, ayakan B 40, cawan porselen, pipet tetes, *rotary evaporator*(RE 2000E), bejana maserasi, hot plate, botol timbang, aluminium foil, thermometer, spektro U-vis(Shimizu), pH meter(Ohaus), oven (Memmert), *magnetic stirrer*(Cimarec), kertas saring.

2. Bahan

Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*), n-heksan (teknis), magnesium, HCl pekat, HCl 2N, kloroform, H₂SO₄, FeCl₃, serbuk magnesium, gelatin (farmasetik) , mannitol (farmasetika), *corn syrup*, sukrosa (farmasetika), aquadest, asam sitrat (farmasetika), sodium benzoate (farmasetika), propilen glikol (farmasetika), perasa melon, pewarna makanan (*food grade*), asam asetat.

G. Prosedur kerja

1. Penyiapan Simplisia

Biji labu kuning yang digunakan adalah biji yang telah dipisahkan dari daging buahnya, lalu dicuci bersih setelah itu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 1 hari.

2. Pembuatan Ekstrak Kental Biji Labu Kuning

Sampel ditimbang sebanyak 500 gram simplisia di ekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut n-heksan. Sampel dimasukkan ke dalam bejana maserasi dengan ditambah 3750 mL pelarut n-heksan (1:7,5) dimaserasi selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah itu hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring, ampas diremaserasi dengan pelarut sebanyak 1250 mL (1:2,5) selama 1 x 24 jam. Ekstrak yang didapatkan diuapkan menggunakan rotavapor pada suhu 50°C dan di uapkan diatas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Wulandari, 2020). Ekstrak yang didapatkan ditimbang, dan ditentukan rendemennya. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus :

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

3. Identifikasi Senyawa Eekstrak Biji Labu Kuning

a. Flavonoid

Ekstrak biji labu kuning ditimbang sebanyak 0,5 g ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 2 mg dan ditambahkan 3 tetes HCl pekat, di diamkan beberapa menit, jika larutan berubah warna menjadi kuning menunjukkan adanya flavonoid (Shabur Julianto, 2019).

b. Terpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak biji labu kuning, ditambahkan 2 mL kloroform dan 3 mL H₂SO₄, jika larutan berubah warna menjadi

coklat kemerahan menunjukkan adanya terpenoid (Shabur Julianto, 2019).

c. Saponin

Ekstrak biji labu kuning sebanyak 0,5 gram, ditambahkan 5mL aquadest, dikocok lalu di diamkan selama 10 menit, lalu ditambahkan HCl 2 N, jika terdapat buih yang stabil, maka menandakan ekstrak mengandung saponin (Shabur Julianto, 2019).

d. Tannin

Ekstrak biji labu kuning sebanyak 0,5 gram, ditambahkan FeCl₃ 1%, jika terdapat warna hijau kecoklatan, menunjukkan adanya senyawa tannin dalam ekstrak (Shabur Julianto, 2019).

4. Uji bebas n-heksan

Uji bebas n-heksan dilakukan untuk mengetahui ekstrak biji labu kuning masih mengandung n-heksan atau tidak. Cara menguji ekstrak biji labu kuning dengan memasukkan 1mL ekstrak ke dalam tabung reaksi, setelah itu ditambahkan dengan K₂Cr₂O₇ dan H₂SO₄, masing-masing 2 tetes. Bila terbentuk warna jingga maka ekstrak tidak mengandung N-heksan (Ikhsanudin, 2017).

5. Uji kadar air ekstrak

Sebanyak 1-2 gram ekstrak ditimbang menggunakan botol timbang yang telah ditara, setelah itu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam, kemudian didinginkan menggunakan eksikator,

ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar air pada ekstrak tidak boleh melebihi 10% (Nurhaini *et al.* 2020).

6. Formulasi sediaan *gummy*

Tabel 3. 1 Formulasi *gummy* ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* Duchesne).

Bahan	F1 (g)	F2 (g)	F3(g)	FK	Fungsi
Ekstrak Biji Labu	1	2	4	-	Zat aktif
Vitamin C	-	-	-	100 (mg)	Zat aktif
Gelatin	10	10	10	10	Pengental
Sorbitol	10	10	10	10	Pemanis
<i>Corn sirup</i>	4	4	4	4	Pemanis
Sukrosa	35	35	35	35	Pemanis
Asam sitrat	1	1	1	1	Zat tambahan
Sodium Benzoat	0,5	0,5	0,5	0,5	Pengawet
Propylenglikol	4	4	4	4	Humektan
Perasa Melon	4	4	4	4	Perasa
Pewarna (makanan)	Qs	Qs	Qs	Qs	Pewarna
Air ad	100	100	100	100	Pelarut

Keterangan: FK: formula kontrol

Pada tabel 3.1, formulasi *gummy* ekstrak biji labu kuning mengacu pada penelitian (Rani *et al.* 2021). Penentuan konsentrasi ekstrak biji labu kuning berdasarkan penelitian (Rani *et al.* 2021) yang divariasikan menjadi 3 konsentrasi 1%,2%,4%.

7. Pembuatan *gummy*

Semua bahan ditimbang sesuai dengan ukurannya, sukrosa dilarutkan ke dalam air murni dengan suhu 80°C. Sorbitol dicampur dengan *corn sirup*, kemudian dimasukkan ke dalam larutan sukrosa diaduk hingga merata. Zat pembentuk gel (gelatin) ditambahkan kedalam campuran secara bertahap, diaduk hingga dispersi homogen. Propilen glikol ditambahkan ke dalam campuran diaduk hingga merata. Asam

sitrat, perasa melon, pewarna dan natrium benzoat dilarutkan terpisah menggunakan air panas, sebelum ditambahkan ke dalam larutan sebelumnya, hasil larutan dicampurkan terlebih dahulu. Setelah semua larutan dicampur diaduk hingga merata pada suhu 80°C. ketika suhu 60°C, ekstrak biji labu kuning ditambahkan secara perlahan & diaduk hingga merata selama 10 menit. Pencampuran bahan dilakukan dalam beaker glas. Setelah campuran diperoleh, dituang ke dalam cetakan, didinginkan pada suhu ruang (25-30°C) hingga terbentuk sediaan yang diinginkan. *Gummy* dikemas dengan menggunakan aluminium foil dan dimasukkan ke dalam wadah kedap udara untuk dilakukan analisis lebih lanjut, termasuk karakteristik fisik sediaan (Rani *et al.* 2021).

8. Pemeriksaan Karakteristik Fisik

a. Uji organoleptis

Gummy diamati secara visual mengenai rasa, aroma dan warna, bentuk dan tekstur, homogenitas sediaan, kecacatan sediaan dan harus terhindar dari noda.

b. Uji pH

Pengujian pH dilakukan dengan mengambil 1 sediaan *gummy* dengan formulasi yang berbeda, dilarutkan dalam 100ml aquades diatas *waterbath* menggunakan cawan porselen. Setelah larut sediaan diukur menggunakan pH meter. Rentang pH yang baik pada sediaan *gummy* adalah 3,8-5,5 (M. Ananas *et al.* 2023).

c. Uji Keseragaman bobot

Gummy disiapkan sebanyak 20 *gummy* masing-masing formula, ditimbang satu persatu, dihitung rata-rata bobot *gummy*. Bobot *gummy* dikatakan memenuhi syarat jika berat *gummy* tidak melebihi 5% (Rashati, 2019)

d. Uji *swelling ratio*

Gummy masing-masing formula diambil 1 dan direplikasi, bobot *gummy* ditimbang terlebih dahulu, setelah itu *gummy* direndam ke dalam 100mL aquadest selama 10 detik pada suhu 25-30°C. *Gummy* dikeringkan menggunakan kertas saring, setelah itu ditimbang dan dihitung *swelling ratio* sesudah dan sebelum perendaman (Rani *et al.* 2021).

$$\text{Swelling ratio} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100\%$$

W_d: berat *gummy* sebelum perendaman

W_s: berat *gummy* setelah perendaman

e. Uji sineresis

Gummy dengan masing-masing formula diambil 1, ditimbang sebelum ditempelkan ke kertas saring. Permukaan *gummy* ditempel ke kertas saring, setelah itu *gummy* ditimbang, dihitung berat awal dan berat akhir *gummy*. Semakin tinggi nilai persentase sediaan *gummy* maka semakin cepat melunak dan mengurangi kualitas *gummy* (Rani *et al.* 2021).

$$\text{Persen sineresis} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

A: bobot awal sediaan

B: bobot akhir sediaan

f. Uji waktu dispersi

Pengujian waktu dispersi menggunakan beaker glass yang berisi 100 mL air pada suhu 37°C, masing-masing sediaan *gummy* diambil 1 dengan formulasi berbeda, dimasukkan ke dalam beaker glas, lalu diaduk secara merata menggunakan *magnetic stirrer* hingga sediaan *gummy* larut, diamati berapa lama waktu larut sediaan *gummy*. Standar *gummy* dapat larut selama 10-30 menit (Rani *et al.* 2021)

9. Uji aktivitas antioksidan metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 10 mg DPPH ditimbang dan ditambahkan etanol p.a ad 100mL lalu dikocok ad homogen sehingga didapat konsentrasi 100 ppm (Suharyani *et al.* 2022).

b. Pembuatan Larutan pembanding vitamin C

Sebanyak 10 mg vitamin C ditimbang, dilarutkan menggunakan aquades hingga 100 mL, sehingga didapat konsentrasi larutan 100 ppm. (Gayatri, 2021).

c. Pembuatan Larutan Ekstrak Biji Labu Kuning

Ekstrak biji labu kuning ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a menggunakan labu takar 100 mL hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan stok sebanyak 1000 ppm (Lismawati, 2021).

d. Penentuan aktivitas antioksidan larutan pembanding

Larutan pembanding vitamin C dibuat dalam seri konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm. Larutan DPPH 30 ppm dipipet sebanyak 1ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Larutan sebanyak 2ml ditambahkan dan dihomogekan kemudian didiamkan selama waktu *operating time* yaitu 30 menit (Gayatri, 2021).

e. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Labu Kuning

Larutan stok 1000ppm dibuat seri konsentrasi sebesar 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm, 600ppm (Setiawan, 2018). Larutan DPPH 30 ppm dipipet sebanyak 1ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 ml larutan sampel berbagai konsentrasi didiamkan sesuai dengan *operating time* yang diperoleh (5 menit) dan dibaca absorbansinya

f. Penentuan Panjang Gelombang

Larutan DPPH yang telah dibuat dalam konsentrasi 100 ppm, dibuat konsentrasi 30 ppm. Pipet larutan DPPH sebanyak 1 mL dan etanol 2mL dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan telah diatur panjang gelombangnya hingga didapat panjang gelombang maksimum (Rahayu *et al*, 2021).

g. Penentuan *operating time*

Panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan selanjutnya diuji *operating time* untuk menentukan waktu reaksi yang paling stabil lalu dibaca absorbansinya pada menit ke 1 hingga menit ke 30 (Rahayu, 2021).

h. Pembuatan larutan dan penentuan aktivitas antioksidan *gummy* biji labu kuning (*Cucurbita moschata*)

Sediaan *gummy* sebanyak 100mg dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml dilarutkan dengan etanol p.a sampai batas labu takar 100 ml hingga konsentrasinya 1000 ppm (Suharyani et al. 2022). Larutan stok dibuat seri konsentrasi 200ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, dan 600 ppm. Larutan dipipet sebanyak 2 ml, dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml DPPH 30ppm . Campuran tersebut dikocok dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar. Masing-masing larutan tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang 515 nm, direplikasi sebanyak 3 kali (Elisa, 2017)

i. Perhitungan % inhibisi dan nilai IC₅₀

Penentuan aktivitas antioksidan dihitung menggunakan DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhidrazyl) dengan persamaan % inhibisi berikut:

$$\% \text{ inhibisi: } \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

Setelah masing-masing konsentrasi % inhibisi didapatkan, kemudian dihitung dengan persamaan regresi linier sederhana dengan persamaan $y=bx+a$.

X: konsentrasi (ppm)

Y: persentase inhibisi (%)

Nilai IC_{50} dihasilkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50. Nilai IC_{50} dihitung menggunakan hasil dari nilai % inhibisi, data IC_{50} pada pengujian aktivitas antioksidan dihitung rata-ratanya (Suharyani *et al.* 2022).

10. Uji Hedonik

Uji kesukaan merupakan pengujian yang menggunakan respon suka atau tidak suka terhadap bahan yang diuji. Pada penelitian ini menggunakan 30 responden dari mahasiswa farmasi Universitas Ngudi Waluyo, penilaiannya menggunakan *google form* yang dibagikan menggunakan aplikasi *whatsapp*, aspek yang dinilai meliputi bentuk, rasa, aroma, dan warna (Azzahra, 2022).

Tabel 3. 2 Skala Numerik Dalam Uji Hedonik

Skala numerik	Keterangan verbal
3	Sangat suka
2	Suka
1	Tidak suka

H. Analisis data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan analisis deskriptif untuk organoleptis dan hedonik. Uji karakteristik fisik meliputi uji *swelling ratio*, sineresis dan keseragaman bobot dianalisis menggunakan *Anova oneway* dengan taraf kepercayaan 95%. Data dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan *Significancy test homogeneity of variences* dan uji distribusi menggunakan *one sample Kolmogorov smirnov*, apabila data homogen dan terdistribusi normal maka dilanjutkan uji parametik anova satu arah.