

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu eksperimental. Pada penelitian ini tidak digunakan kelompok pembanding hanya menggunakan kelompok eksperimen, kemudian dilakukan intervensi atau perlakuan selanjutnya hasil tersebut diobservasi (Notoatmadjo, 2012). Penelitian ini dilakukan dengan merancang, membuat formulasi, determinasi tanaman buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan evaluasi karakteristik fisik sediaan nutrasetikal sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*). Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dibuat menjadi sediaan sirup dengan variasi konsentrasi pada setiap formulasi meliputi uji pH, homogenitas, viskositas, stabilitas dan aktivitas antioksidan (IC_{50}) menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl 1-picrylhydrazyl).

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro (UNDIP) untuk mengetahui kebenaran buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*).

2. Penelitian eksperimen pembuatan sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Penelitian uji karakteristik fisik sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Penelitian uji aktivitas antioksidan sari buah naga merah dan sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daging buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*).

2. Sampel

Sampel buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) diperoleh dari pasar tradisional Babadan jalan Semarang-Surakarta Langensari Barat Kecamatan Ungaran Barat Kabupaten Semarang Jawa Tengah (50511). Sampel buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) selanjutnya diformulasikan menjadi sediaan sirup.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini yaitu:

1. Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yang menjadi sampel diperoleh dari pasar tradisional Babadan jalan Semarang - Surakarta Langensari Barat Kecamatan Ungaran Barat Kabupaten Semarang Jawa Tengah (50511).
2. Konsentrasi untuk sediaan sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yang digunakan adalah 20 %, 25 %, dan 30%.

3. Sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) sebagai kontrol pembanding.
4. Pengujian yang dilakukan pada sediaan sirup meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, bobot jenis, viskositas, stabilitas mekanik.
5. Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) digunakan sebagai metode untuk menguji aktivitas antioksidan sediaan sirup buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*).

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang dapat mempengaruhi dan menjadi sebab timbulnya perubahan pada variabel terikat. Pada penelitian ini variabel bebasnya yaitu konsentrasi sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) sebesar 20%, 25% dan 30%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi akibat dari adanya variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu karakteristik fisik sediaan sirup yang meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, bobot jenis, viskositas, stabilitas mekanik dan aktivitas antioksidan sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

3. Variabel Terkendali

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

F. Alat dan Bahan

1. Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: neraca analitik (Ohaus/PX224 E), pH universal (Merck 1.09535.0001), viscometer (*Brookfield DV2T*), ultra turrax (IKA /T25 D), piknometer (Pyrex 25 mL), gelas beker (Pyrex), alat *pasteurisasi*, *magnetic stirrer* (IKA/C-MAG HS7S00), spektrofotometer *UV-Vis* (Shimadzu *UV-Visible* 1800), labu ukur (Pyrex) 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, kemasan botol sirup 150 mL,

kertas saring, batang pengaduk, kain saring, pipet tetes, pisau *stainless steel*, *blender* (Miyako), Centrifuge (Gemmy/05), *hot plate* (Maspion), baskom plastik, panci *stainless steel*, pengaduk kayu, corong kaca, tisu, alat tulis, kalkulator saintifik (Canon F-788SG), *handphone* (dokumentasi).

2. Bahan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu: buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*), sukrosa (gula putih) (CV. Bani Usaha Mandiri), asam sitrat (CV. Bani Usaha Mandiri), natrium benzoate (CV. Bani Usaha Mandiri), natrium CMC (CV. Bani Usaha Mandiri), aquadest (CV. Bani Usaha Mandiri), vitamin C (CV. Bani Usaha Mandiri), DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Lot WZ4DO) dan etanol p.a (A-1035).

G. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tanaman buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dilakukan determinasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro (UNDIP) untuk mengetahui kebenaran buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan menghindari kesalahan pengumpulan bahan tanaman buah.

2. Penyiapan Bahan

Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yang diperoleh dari pasar tradisional Babadan jalan Semarang - Surakarta Langensari Barat Kecamatan Ungaran Barat Kabupaten Semarang Jawa Tengah (50511). Buah naga merah disortasi terlebih dahulu untuk memisahkan dari buah yang layak digunakan atau tidak. Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dicuci dengan air mengalir. Buah yang sudah dicuci kemudian disimpan suhu ruangan untuk dilakukan pembuatan sari buah naga merah.

3. Pembuatan sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Pembuatan sirup sari buah dilakukan di laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Universitas Ngudi Waluyo. Buah naga merah, dicuci bersih kemudian setiap buah dipisahkan kulit dan daging buahnya, daging buah segar ditimbang seberat 340 g. Mesin *blender* dijalankan kurang lebih 2 menit, setelah didapatkan bentuk bubur dari daging buah, kemudian ditampung gelas beker 500 mL, kemudian dilakukan filtrasi pertama menggunakan penyaring *stainless steel*. Filtrasi dilakukan menggunakan kertas saring, setelah dilakukan filtrasi berulang dan didapatkan sari yang bersih dari bubur daging buah diperoleh filtrat 300 gram. Cara pengolahan sari buah naga merah berikutnya dipanaskan pada suhu 54°C selama 50 menit dengan kecepatan 340 - 350 *rpm* menggunakan alat *magnetic stirrer* (Yanuarto, 2022). Kemudian didinginkan pada suhu ruang, bila telah tercapai suhu ruang sari buah naga merah boleh disimpan pada suhu sejuk (8°C - 15°C). Foto proses pembuatan sari buah naga merah dapat dilihat pada lampiran 6. Hasil perasan kemudian dilakukan perhitungan rendemen menggunakan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Sari Buah}}{\text{Bobot Buah}} \times 100\%$$

Sari buah naga merah yang diperoleh kemudian ditimbang untuk di hitung hasil persentase rendemennya. Persen rendemen ideal adalah 100% (Kemenkes RI, 2017). Pembuatan sari buah naga merah pada tiap formula sama yaitu berasal dari sari buah naga merah segar saat proses filtrasi.

4. Pembuatan dasar sirup

Pembuatan sediaan sirup sari buah naga merah sebelumnya membuat dasar sirup terlebih dahulu dilakukan di laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Universitas Ngudi Waluyo. Formula dasar sirup terdapat pada tabel 3.1

Tabel 3. 1 Formula Dasar Sirup

Bahan	Jumlah Bahan (%)	Jumlah Bahan (g) dalam 1000 mL	Kegunaan
Sukrosa	65	650	Pemanis
Natrium CMC	1	10	Pengental
Natrium benzoate	0,03	0,3	Pengawet
Asam sitrat	2	20	Pengatur pH
Aquadest	Ad 100	319,7	Pelarut

Proses pembuatan dasar sirup sebanyak 1000 mL yaitu dengan cara ditimbang semua bahan meliputi sukrosa (gula pasir), natrium CMC, asam sitrat, natrium benzoate sesuai dengan hasil perhitungan bahan untuk 3 kali replikasi terdapat pada lampiran 5. Aquadest diukur sesuai kebutuhan, untuk kemudian dipanaskan pada *hot plate* hingga mendidih. Membuat larutan sukrosa disiapkan gelas beker 1000 mL, dimasukkan sukrosa, asam sitrat, natrium benzoate dan ditambahkan aquadest panas sesuai kebutuhan perhitungan bahan dan diaduk perlahan hingga menjadi larutan dasar sukrosa (larutan A).

Berikutnya proses diukur aquadest panas sejumlah 200 mL untuk mengembangkan natrium CMC, dimasukkan ke dalam gelas beker 500 mL lalu ditaburkan natrium CMC ke dalam air panas 200 mL yang telah disiapkan ditutup menggunakan kaca arloji/ penutup lainnya dan dibiarkan natrium CMC mengembang sekitar 15 – 20 menit. Setelah natrium CMC mengembang, kemudian diaduk bila perlu menggunakan stemper dan mortir hingga homogen menjadi seperti basis gel kemudian ditambahkan (larutan A). Proses pengadukan dibantu dengan alat *ultra turrax* dengan kecepatan 2000 – 3000 *rpm* dalam waktu 15 – 20 menit hingga terbentuk dasar sirup homogen. Proses berikutnya yaitu formulasi sediaan sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terdapat pada tabel 3.2 sebagai berikut,

Tabel 3. 2 Formula Sediaan Sirup Sari Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Bahan	Jumlah Bahan (%)		
	F1	F2	F3
Sari buah naga merah (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	20	25	30

Dasar sirup	80	75	70
-------------	----	----	----

Keterangan:

F1: Formula sediaan sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan konsentrasi 20 %.

F2: Formula sediaan sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan konsentrasi 25 %.

F3: Formula sediaan sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan konsentrasi 30 %.

Pada penelitian ini menggunakan botol *opac* (dasar botol gelap) ukuran 150 mL untuk kemasan sediaan sirup sari buah dan tutup botol ini harus disterilisasi terlebih dahulu. Caranya botol dicuci dengan cairan pembersih, kemudian dibilas menggunakan air bersih dan terakhir dilakukan perebusan dalam air sampai mendidih 30 menit. Proses *filling* yaitu pengisian sirup sari buah naga merah isi bersih 120 mL ke dalam botol ukuran 150 mL disertakan tanda pada botol dan tutup botol pada tiap formulasi. Langkah berikutnya yaitu proses pengisian sirup sari buah naga merah ke dalam botol dilakukan dengan cara *hot filling* yaitu pada waktu sirup masih hangat. Ruang antara (*head space*) diberikan sebesar 4 cm. Penutup botol dikondisi tidak ditutup rapat. Setelah dilakukan pengisian dilanjutkan pasteurisasi. *Pasteurisasi* dilakukan dengan suhu 70°C selama 30 menit. Saat *pasteurisasi* tutup botol agak sedikit dilonggarkan agar proses *deaerasi*.

Proses pendinginan dilakukan setelah proses pasteurisasi, perlu dilakukan penirisan dan pendinginan untuk membersihkan sisa-sisa air yang menempel pada botol. Pendinginan dilakukan dengan cara dibiarkan selama beberapa saat di suhu ruang sebelum dilakukan penyimpanan. Penyimpanan dilakukan pada suhu ruang di tempat yang kering dan bersih, kemudian sirup dapat dipindahkan dalam suhu sejuk (8°C - 15°C) agar sirup mempunyai daya simpan optimal.

5. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan pada sediaan sirup sari buah naga merah yang telah jadi, untuk kemudian diperiksa dengan cara dituangkan pada kaca transparan seperti tabung reaksi. Dilakukan pengamatan dan dianalisis meliputi warna, bau dan rasa

perubahan bentuk yang terjadi. Pengujian uji organoleptis dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Yanuarto dkk, 2022).

6. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan pada sirup sari buah naga merah yang telah jadi, untuk kemudian diperiksa dibantu indra pengelihatannya dengan cara dituangkan pada kaca transparan seperti tabung reaksi. Dilakukan pengamatan dan dianalisis bagian yang tidak tercampurkan dengan baik. Pengujian homogenitas dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Sirup yang baik yaitu stabil, homogen, tidak keruh (Ermawati dkk, 2021).

7. Uji pH menggunakan alat pH universal

Uji pH yaitu dengan cara memindahkan sedikit dari tiap formula ke dalam gelas beker. Dimasukkan kertas pH universal ke dalam gelas beker yang telah berisi sampel uji, ditunggu beberapa saat sampai terjadi perubahan warna pada pH universal, diambil, diamati, dan terakhir dicocokkan dengan indikator pH universal dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Herdaningsih dkk, 2022).

8. Uji bobot jenis menggunakan alat piknometer

Cara melakukan uji bobot jenis pada sediaan sirup sari buah naga merah yaitu piknometer dibersihkan kemudian dikeringkan menggunakan *hair dryer* kemudian ditimbang. Dimasukkan air suling ke dalam piknometer sampai luber, dikeringkan sisi bagian yang masih basah menggunakan tisu kering, ditimbang dan dicatat. Aquadest dibuang kemudian dikeringkan lagi menggunakan *hair dryer*. Piknometer yang sudah kering ditambahkan sediaan sampai luber, dikeringkan sisi bagian yang masih basah menggunakan tisu kering dan ditimbang kemudian dicatat hasil penimbangan.

Piknometer dibilas dengan aquadest, dikondisikan piknometer pada suhu 15°C - 20°C. Dengan cara sebelumnya sampel dimasukkan didalam lemari pendingin, kemudian di cek suhu menggunakan thermometer sampai suhu mencapai 20°C - 25°C, lalu dikeringkan. Piknometer diambil, kemudian dikeringkan dengan tisu kering. Piknometer kering lengkap dengan tutupnya di timbang saat suhu mencapai 25°C, kemudian dimasukan aquadest hingga penuh dan ditutup. Suhu piknometer dikondisikan hingga suhu 20°C, apabila terjadi penyusutan aquades maka ditambahkan aquades hingga penuh. Dikeringkan bagian luar piknometer dengan tisu kering, kemudian ditimbang saat suhu mencapai 25°C. Syarat untuk uji bobot jenis sirup yaitu lebih dari 1,2 (Kemenkes RI, 2020).

9. Uji viskositas menggunakan alat *viskometer Brookfield DV2T*

Alat yang digunakan untuk mengukur uji viskositas pada karakteristik fisik sediaan sirup sari buah naga merah yaitu *viskometer Brookfield DV2T*. Melakukan uji viskositas sebanyak 100 mL sediaan sirup buah naga merah menggunakan *spindle* nomor 61. Pengaturan spindle pada kecepatan 50 *rpm* dalam waktu 5 – 10 menit (Herdaningsih dkk, 2022). Pada penelitian formulasi sediaan sirup sari buah senggani (*Melastoma malabathricum L*) hasil rata-rata nilai viskositas sirup berkisar antara 30 – 51,33 cP (Yanuarto dkk, 2022).

10. Uji stabilitas mekanik menggunakan alat sentrifugator

Uji stabilitas mekanik dengan sentrifugasi pada semua sediaan sirup dengan 3 kali replikasi. Uji stabilitas dengan cara sebanyak 10 mL sirup sari buah naga merah dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi yang berjumlah 12 tabung, kemudian dimasukkan ke dalam alat sentrifugator. Alat sentrifugator kemudian diatur kecepatan 3600 *rpm* selama 9 siklus (1 siklus 30 menit). Diamati perubahan fisik fisik pada sirup

sari buah naga merah yaitu dengan terjadinya pemisahan antar pemisahan antar komponen (Nurani, 2019).

H. Uji Aktivitas Antioksidan Sari Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

1. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH 0,1 mM (Widyowati, 2018) dibuat dengan diambil serbuk DPPH 0,1 mM ditimbang 3,943 mg (perhitungan pada lampiran 16) dengan neraca analitik lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas labu ukur. Kemudian larutan DPPH dilakukan pengocokkan hingga homogen (Suharyani dkk, 2022).

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH 20 ppm

Penentuan Panjang gelombang maksimum DPPH 20 ppm, yaitu dengan cara dipipet larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 20 mL dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas 100 mL, kemudian kocok perlahan. Penentuan panjang gelombang DPPH 20 ppm dengan diambil larutan DPPH 20 ppm sebanyak 4 mL dimasukkan kedalam *kuvet* (Widyowati, 2018). Dilakukan pembacaan absorbansi larutan DPPH 20 ppm, pada panjang gelombang 400-600 nm (Widyowati, 2018) dengan alat spektrofotometer *UV-Vis* (Munarsih, 2019).

3. Penentuan *operating time* larutan DPPH 20 ppm

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mereaksikan 1 mL larutan baku pembanding vitamin C ditambah 4,0 mL larutan DPPH 0,1 mM, dikocok sampai homogen. Absorbansi diukur pada menit ke 0 hingga 60 pada λ maksimal yang sudah diperoleh (Widyowati, 2018).

4. Pembuatan dan Pengukuran Larutan Pembanding Vitamin C

Dilakukan pembuatan larutan vitamin C 100 ppm dengan cara menimbang sebanyak 10 mg vitamin C dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan aquadest dikocok hingga homogen, kemudian diinkubasi selama 30 menit. Pengenceran larutan vitamin C dari larutan stok dengan deret konsentrasi 2, 4, 6, 8 10 ppm (Suharyani dkk, 2022). Tiap-tiap larutan yang sudah diencerkan dipipet kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 4 mL larutan DPPH 20 ppm dikocok hingga homogen (Widyowati, 2018). Dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* (Rahmatullah dkk, 2019).

Pengujian aktivitas antioksidan sari dan sediaan sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan larutan vitamin C 100 ppm dengan variasi konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi untuk larutan pembanding vitamin C yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Perhitungan deret larutan pembanding terdapat pada Lampiran 16 perhitungan larutan uji aktivitas antioksidan.

5. Perhitungan Persentase Inhibisi dan nilai IC_{50}

Analisis data aktivitas antioksidan dihitung menggunakan metode regresi linieritas dengan perbandingan konsentrasi dan % inhibisi pada tiap konsentrasi, kemudian diperoleh nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}). Pengukuran absorbansi pembanding dan sampel sirup buah naga merah digunakan dengan alat spektrofotometri *UV-Vis* dengan etanol p.a sebagai larutan blangko. Persen inhibisi dengan persamaan berikut:

% inhibisi dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \left(\frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$$

Berikutnya dihitung persentase inhibisi dari tiap konsentrasi, selanjutnya dihitung dengan persamaan regresi linier (regresi linier sederhana) dengan persamaan $y = bx + a$, dengan x adalah konsentrasi (ppm), y adalah persentase inhibisi (%) dan x

adalah nilai IC_{50} . Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai *Inhibition Concentration* 50% (IC_{50}) yaitu konsentrasi sampel yang bisa meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} dihasilkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50. Nilai % inhibisi yang dihasilkan digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} . Data IC_{50} pada pengujian aktivitas antioksidan dihitung rata-rata \pm SD dan dibandingkan perbedaannya secara statistik (Suharyani dkk, 2022). Hasil perhitungan nilai IC_{50} dapat dilihat pada Lampiran 21. Perhitungan % inhibisi dan IC_{50} vitamin C dan sampel uji.

I. Analisis data

Hasil dari formulasi sediaan sirup sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dilakukan pengujian sifat fisik sediaan berupa data yang diperoleh dengan replikasi tiga kali yang disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Analisis data dilakukan juga secara statistik dengan pengujian *analysis of variance* menggunakan *software Statistical Product and Service Solutions (SPSS) versi 26* dengan taraf kepercayaan 95% (sig 0,005) (Lestari dkk, 2020). Uji normalitas dengan data ($n < 50$ sampel atau *Shapiro-Wilk* jika jumlah data ($n > 50$ sampel atau *Kolmogrov-Smirnov*). Bila hasil menunjukkan data terdistribusi normal dan menggunakan uji (*One way ANOVA*) post hoc *LSD*, jika data tidak terdistribusi normal menggunakan uji *Kurskal Wallis* dan menggunakan uji *Man Whitney* yang bertujuan untuk melihat perbedaan karakteristik fisik meliputi uji viskositas, bobot jenis dan aktivitas antioksidan dari tiap formula sediaan sirup. Hasil uji dibandingkan dengan uji karakteristik fisik yang dipersyaratkan. Formula dengan hasil memenuhi persyaratan dipilih sebagai sediaan karakteristik sirup terbaik (Lestari dkk, 2020).