

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental dengan analisis deskriptif untuk mengidentifikasi pengaruh waktu pengendapan terhadap stabilitas, mutu fisik, dan aktivitas antioksidan pada serbuk instan jahe merah (*Zingiber officinale* var *rubrum*).

#### **B. Lokasi Penelitian**

Lokasi penelitian dilakukan di beberapa Laboratorium :

1. Determinasi tanaman jahe merah (*Zingiber officinale* var *rubrum*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan serbuk instan jahe merah, pengujian stabilitas mutu fisik dan antioksidan sediaan dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

#### **C. Subjek Penelitian**

Pada penelitian ini menggunakan sampel yaitu jahe merah (*Zingiber officinale* var *rubrum*) yang digunakan dalam pembuatan serbuk instan jahe merah yang diperoleh dari Pasar Bandarjo Ungaran yang terletak di Kabupaten Semarang. Jahe merah (*Zingiber officinale* var *rubrum*) yang digunakan dalam penelitian sebanyak 5 kilogram.

## **D. Variabel Penelitian**

### 1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang menyebabkan adanya variabel terikat dan memberikan perubahan. Variabel bebas pada penelitian ini waktu pengendapan, yaitu 0 jam, 2 jam, 4 jam, dan 6 jam.

### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi akibat dari adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini meliputi :

- a. Hasil uji stabilitas mutu fisik serbuk instan jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) meliputi organoleptis, kadar air, waktu alir, sudut diam, waktu larut, dan ukuran partikel.
- b. Nilai  $IC_{50}$  serbuk instan jahe merah.

### 3. Variabel Terkontrol

Variable terkontrol penelitian ini adalah suhu pemanasan, suhu *climatic chamber*, suhu dan kecepatan *hot plat magnetic stirrer*, waktu alir, kekuatan getaran pengayakan, laju alir serbuk, volume dan jenis pelarut, panjang gelombang maksimum, *operating time*, uji aktivitas antioksidan

## **E. Alat dan Bahan**

### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kompor gas, tabung gas, alat penggorengan, spatula, ayakan mesh no.16, blender, panci, *beaker glass* (iwaki), gelas ukur (pyrex), labu takar (iwaki), tabung reaksi

(iwaki), corong, batang pengaduk, sendok spatel, sendok tanduk, pipet volume (iwaki), panci, *stopwatch*, *flowability powder* (electrolab), neraca digital (fujitsu), *bold* pipet (D&N), *sieve shaker* (electrolab), *aluminium foil*, *magnetic stirrer*, hot plate magnetic stirrer (Cimarec), *moisture balance* (ohaus), mortir, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1900I) dan kuvet.

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, jahe merah (*Zingiber officinale* var *rubrum*), gula, aquadest, DPPH (sigma aldrich), *quercetin*, etanol p.a., dan aquadest.

### A. Prosedur Penelitian

#### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi Jahe Merah (*Zingiber officinale* var *rubrum*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

#### 2. Formulasi Sediaan Serbuk Instan Jahe Merah

Sediaan serbuk instan jahe merah (*Zingiber officinale* var *rubrum*) yang digunakan pada penelitian ini terdapat 1 formula berdasarkan penelitian dari Rini Anisyah (2020), dapat dilihat pada tabel 3.1

**Tabel 3.1 Formula Serbuk Instan Jahe Merah**

| <b>Bahan</b>      | <b>Jumlah bahan (gram)</b> | <b>Fungsi</b> |
|-------------------|----------------------------|---------------|
| <b>Jahe Merah</b> | 200                        | Bahan aktif   |
| <b>Gula</b>       | 300                        | Pemanis       |
| <b>Air</b>        | 400                        | Pelarut       |

### 3. Pembuatan Sampel Serbuk Instan Jahe Merah

Pada proses pembuatan serbuk instan jahe merah (*Zingiber officinale* var *rubrum*) menggunakan prinsip kerja filtrasi dan kristalisasi. Adapun cara pembuatan sebagai berikut:

#### a. Proses filtrasi

Pertama jahe dicuci bersih, kemudian jahe dikupas kulitnya. Selanjutnya menyiapkan alat dan bahan yang digunakan, ditimbang sesuai perhitungan bahan yang akan digunakan. Bahan yang disiapkan untuk pembuatan serbuk instan jahe merah dilakukan satu kali pembuatan untuk 4 perlakuan pengendapan yaitu 0 jam, 2 jam, 4 jam dan 6 jam. Jahe yang sudah ditimbang sebanyak 800 g dimasukkan ke dalam blender dan diberi 1000 mL aquadest agar mempermudah dalam proses penghalusan. Jahe yang sudah dihaluskan disaring dan diperas menggunakan saringan, untuk memisahkan sari dengan filtrat. Sisa aquadest sebesar 600 mL ditambahkan, hingga kandungan jahe tersari semua yang ditandai dengan hasil sari yang jernih. Apabila sudah dilakukan proses filtrasi, selanjutnya dilakukan proses pengendapan atau dekantasi.

Sari jahe hasil penyaringan sebanyak 2 L diaduk dan dibagi ke dalam 4 *beaker glass* yang berukuran 500 mL untuk diamati waktu pengendapan atau dekantasi selama 0 jam, 2 jam, 4 jam, dan 6 jam. *Beaker glass* 1 langsung dilakukan proses kristalisasi karena waktu pengendapannya 0 jam, sedangkan pada *beaker glass* 2 sari jahe

diendapkan selama 2 jam, *beaker glass* 3 diendapkan selama 4 jam, dan *beaker glass* 4 diendapkan selama 6 jam. Apabila sudah dilakukan proses pengendapan maka dilanjut proses kristalisasi. Proses ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali replikasi (Desnita & Luliana, 2021).

b. Proses kristalisasi

Sari jahe pada *beaker glass* 1 dimasukkan ke dalam alat penggorengan, lalu ditambahkan 300 g gula yang sudah ditimbang sesuai formula. Semua bahan dicampur dan dipanaskan dengan api sedang, diaduk perlahan dan terus menerus. Setelah mencapai titik didih, api dikecilkan dan diaduk terus menerus hingga mengental dan berbentuk kristal jahe. Kristal yang sudah mengering kemudian didinginkan pada suhu ruang selama  $\pm 10$  menit. Hasil serbuk jahe diayak menggunakan ayakan no. 16 mesh untuk menghasilkan serbuk dengan ukuran sesuai, serbuk yang berukuran besar dilakukan proses penghalusan menggunakan mortir. Proses kristalisasi juga dilakukan pada sari jahe setelah dilakukan pengendapan atau dekantasi selama 2 jam, 4 jam, dan 6 jam. Serbuk instan jahe merah dapat dilakukan pengujian stabilitas mutu fisik sediaan yang meliputi, organoleptis, kadar air, waktu alir, sudut diam, waktu larut dan ukuran partikel. Pengujian aktivitas antioksidan sediaan serbuk dilakukan untuk mengetahui nilai  $IC_{50}$  (Sari & Abasri, 2019).

#### 4. Uji Mutu Fisik Sediaan Serbuk Instan Jahe Merah

##### a. Uji organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan cara pengamatan menggunakan panca indra, parameter yang diamati meliputi warna, bentuk, rasa dan aroma. (Nurlita & Anwarudin, 2019).

##### b. Uji kadar air

Pengukuran kadar air bertujuan untuk mengetahui kadar air produk yang dihasilkan dengan berbagai perlakuan sehingga dapat diperkirakan daya tahan produk. Kadar air sangat mempengaruhi mutu dari suatu produk sediaan yang dihasilkan. Apabila kadar air suatu sediaan tidak memenuhi syarat maka sediaan tersebut akan mudah mengalami perubahan fisik. Uji kadar air menggunakan alat *moisture balance*. Sebanyak 5 gram serbuk dimasukkan dalam aluminium foil, kemudian ditara dan diukur kadar airnya dengan menekan start, ditunggu sampai keluar hasilnya dan kemudian dicatat (Pambudi *et al.*, 2021). Kadar air dinyatakan memenuhi standar mutu minuman serbuk berdasarkan SNI 01-4320-1996 yaitu dengan persyaratan kadar air tidak lebih dari 3%.

##### c. Uji waktu alir dan sudut diam

Serbuk instan jahe merah diambil sebanyak 100 gram dimasukkan ke dalam corong alat *flowability powder* dengan kondisi bagian bawah tertutup. Laju alir dihitung menggunakan *stopwatch*. Tutup bagian bawah dibuka hingga seluruh serbuk mengalir dan

dicatat waktu alirnya serta dihitung diameter dan tinggi tumpukan serbuk (Yuliasuti, 2022).

d. Uji waktu larut

Sebanyak 20 gram serbuk instan jahe merah dilarutkan ke dalam 200 mL aquadest, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 500 rpm dan waktu kelarutan dari serbuk dihitung menggunakan *stopwatch*. Serbuk instan jahe merah dikatakan memenuhi persyaratan apabila waktu larutnya kurang dari 5 menit (Zuniarto *et al.*, 2021).

e. Uji ukuran partikel

Sampel serbuk instan jahe merah ditimbang sebanyak 100 gram, kemudian diayak dengan ayakan bersusun dengan ukuran 2,36 mm, 1,18 mm, 850  $\mu\text{m}$ , 425  $\mu\text{m}$ , dan 250  $\mu\text{m}$  selama 5 menit dengan kekuatan 20 serta getarannya secara *continuous*. Serbuk kemudian ditimbang dari masing-masing nomor mesh pada ayakan dari yang ukurannya terkecil hingga terbesar (Ismail *et al.*, 2014).

## 5. Uji Stabilitas Serbuk Instan Jahe Merah

Uji stabilitas fisik serbuk instan jahe merah dilakukan dengan memasukkan 100 g serbuk instan jahe merah ke dalam kemasan *standing pouch*. Metode yang digunakan pada uji stabilitas adalah metode dipercepat atau *cycling test*. Pengujian dilakukan selama 6 siklus (12 hari) pada suhu 40°C, dan suhu 4°C. Serbuk instan yang sudah berada di dalam wadah dimasukkan ke dalam *climatic chamber* dengan suhu 40°C selama 24 jam, kemudian dimasukkan pada lemari es suhu 4°C selama 24 jam

dilakukan selama 6 siklus atau 12 hari dan diamati perubahan yang terjadi pada masing-masing sediaan. Evaluasi pengujian stabilitas serbuk instan jahe merah meliputi organoleptis, kadar air, waktu alir, sudut diam, waktu larut, ukuran partikel, dan aktivitas antioksidan serbuk. Evaluasi tersebut dilakukan sebelum dan sesudah pengujian stabilitas (Nurfita *et al.*, 2021).

## **6. Uji Aktivitas Antioksidan**

### **a. Uji Aktivitas Antioksidan Serbuk Jahe Merah**

#### **1) Pembuatan larutan DPPH 1000 ppm.**

Larutan stok DPPH ditimbang menggunakan neraca analitik sebanyak 10 mg DPPH dilarutkan menggunakan etanol p.a ke dalam labu ukur 10 mL diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm.

#### **2) Pembuatan Larutan Baku DPPH 40 ppm**

Larutan baku DPPH 1000 ppm dipipet sebanyak 4 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambah etanol p.a sampai tanda batas, sehingga didapatkan konsentrasi 40 ppm. Larutan ditutup menggunakan aluminium foil dan disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya.

#### **3) Pembuatan Larutan Stok Serbuk Instan Jahe Merah**

Sebanyak 25 mg serbuk instan jahe merah dilarutkan dengan 2 mL aquadest kemudian dicukupkan menggunakan etanol p.a, dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 25 mL, sehingga kadarnya 1000 ppm sebagai larutan stok.

b. Pengukuran panjang gelombang serapan maksimum larutan DPPH

Larutan DPPH 40 ppm diambil lalu dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis hingga diperoleh panjang gelombang maksimum DPPH (Susiloningrum dan Erliani, 2021).

c. *Operating time* Larutan DPPH

Larutan DPPH 40 ppm dimasukan ke dalam kuvet. Larutan dibaca pada panjang gelombang yang telah didapatkan sebelumnya selama 30 menit.

d. Pengukuran Absorbansi Larutan Kontrol DPPH

Sebanyak 3 mL larutan DPPH 40 ppm ditambahkan etanol p.a 1 ml kemudian larutan dihomogenkan dan dipindahkan ke tabung reaksi. Permukaan tabung reaksi ditutup menggunakan aluminium foil. Larutan diinkubasi selama 17 sampai 20 menit, dan selanjutnya diukur absorbansi larutan kontrol panjang pada gelombang maksimum DPPH 516 nm.

e. Pembuatan Larutan Pembanding *Quercetin* konsentrasi 1000 ppm

*Quercetin* ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan ke dalam labu takar hingga volume 10 mL menggunakan etanol p.a lalu di gojog sampai homogen. Larutan *quercetin* 1000 ppm diencerkan menjadi 100 ppm.

f. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding *Quercetin*

Larutan pembanding *quercetin* konsentrasi 100 ppm diencerkan menjadi seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Larutan seri dipipet 1 mL dengan masing-masing konsentrasi ditambahkan 3 mL DPPH, selanjutnya kurva baku dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan dilakukan pengecekan absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm.

g. Pengukuran Absorbansi Serbuk Instan Jahe Merah

Larutan stok serbuk instan jahe merah 1000 ppm diencerkan lagi dengan membuat 5 seri konsentrasi larutan (30, 40, 50, 60, dan 70 ppm). Pengukuran absorbansi, masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL larutan sampel dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 3 mL larutan DPPH 40 ppm. Campuran dihomogenkan dan permukaan tabung reaksi ditutup menggunakan aluminium foil diinkubasi selama 17 sampai 20 menit ditempat gelap pada suhu 37°C. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 516 nm. Pengujian dilakukan sesuai dengan formula jahe merah.

## **B. Analisis Data**

### **1. Analisis Nilai IC<sub>50</sub>**

Perhitungan yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan yaitu nilai IC<sub>50</sub> (*Inhibitory Concentration*). Data hasil

pengujian antioksidan dinyatakan sebagai rata-rata  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration*). Hasil tersebut dapat menentukan jumlah senyawa uji yang diperlukan untuk menghambat radikal bebas sebesar 50%. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi sampel (ppm) sebagai absis (sumbu x) dan nilai % inhibisi sebagai ordinatnya (sumbu y). Nilai  $IC_{50}$  dapat dihitung dengan mengetahui persen penghambatan dari pengujian yang dilakukan. Persen penghambatan dapat dihitung dengan rumus berikut:

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

Kemudian, dilakukan pembuatan kurva berdasarkan nilai persentase penghambatan yang diperoleh terhadap konsentrasi larutan uji. Selanjutnya dari kurva tersebut dibuat regresi linear untuk mendapatkan persamaan yang sesuai:

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y = 50

x = menunjukkan nilai  $IC_{50}$

a dan b = nilai regresi linier

Untuk penentuan nilai  $IC_{50}$  dapat dihitung menggunakan rumus :

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Keterangan :

a = intersep

b = slope

## **2. Analisis Data Hasil Evaluasi Mutu Fisik Sebelum dan Sesudah Pengujian Stabilitas.**

Hasil evaluasi mutu fisik serbuk instan jahe merah dengan perlakuan pengendapan selama 0 jam, 2 jam, 4 jam dan 6 jam sebelum pengujian dan sesudah pengujian stabilitas di analisis statistika dengan *software* SPSS menggunakan *One Way ANOVA* dan *Sample Paired T-Test*.