

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental. Analisis dalam penelitian ini dilakukan secara deskriptif untuk menentukan mutu fisik dan aktivitas antioksidan sediaan emulgel serbuk sari jahe merah. Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

- a. Determinasi tanaman jahe merah dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro.
- b. Pembuatan serbuk sari jahe merah dengan metode *freeze drying* dilakukan di Laboratorium Pangan Universitas Katolik Soegijapranata Semarang.
- c. Pembuatan emulgel dari serbuk sari jahe merah serta uji mutu fisik dan uji aktivitas antioksidan emulgel dari serbuk sari jahe merah dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Instrumen Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu: November 2022 - Desember 2023

C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel serbuk jahe merah dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu 0,5%, 1%, dan 1,5%.

2. Variabel Tergantung

- a. Hasil evaluasi mutu fisik sediaan emulgel meliputi organoleptis, pH, homogenitas, tipe emulsi, daya sebar, daya lekat, dan viskositas.
- b. Nilai IC_{50} dari emulgel serbuk sari jahe merah.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah suhu pada proses pembuatan serbuk ekstrak, bahan dan alat yang digunakan, waktu inkubasi, serta metode pada pengujian aktivitas antioksidan.

D. Definisi Operasional Penelitian

1. Serbuk sari jahe merah merupakan bahan aktif dalam pembuatan sediaan emulgel yang dibuat dari sari jahe merah yang diproses *freeze drying*.
2. Variasi konsentrasi serbuk sari jahe merah dari hasil *freeze drying* adalah perbedaan konsentrasi sari pada setiap formula yang digunakan yaitu sebesar 0,5%, 1%, dan 1,5%.
3. Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan senyawa antioksidan dalam ekstrak tanaman dalam hal ini adalah rimpang jahe merah untuk meredam radikal bebas DPPH yang didasarkan pada reduksi dari larutan radikal bebas DPPH.

4. Evaluasi sediaan emulgel yang dilakukan meliputi organoleptis, pH, homogenitas, tipe emulsi, daya sebar, daya lekat, dan viskositas.

E. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a) Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah baskom, *juicer* (Vaganza), neraca analitik (Ohaus), batang pengaduk, kertas saring, aluminium foil, *Erlenmeyer*, corong kaca, *beaker glass*, gelas ukur, tabung reaksi, labu takar, pipet ukur, mikropipet (BioHit 1000L), *bold pipet*, mortir dan stamper, *stopwatch*, pH meter (Ohaus), ultra turax (IKA T25), viskometer Brookfield (DV2T), *Freeze dryer* (Thermo PowerDry LL1500), dan Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV Mini 1240).

b) Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang jahe merah dari Bandarjo, Kecamatan Ungaran Barat, Kabupaten Semarang. Parafin cair, gliserin, tween 80, span 80, carbomer 940, TEA, aquadest, etanol p.a, HCl pekat, serbuk Magnesium, FeCl₃, pereaksi Dragendroff, metilen *blue*, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Sigma Aldrich).

2. Prosedur Kerja

a) Determinasi Tanaman

Determinasi rimpang jahe merah dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas MIPA Universitas Diponegoro untuk menjamin keaslian spesies dan jenis tanaman yang digunakan.

b) Penyiapan dan Sortasi Bahan Tanaman

Jahe merah yang telah diperoleh selanjutnya disortasi basah untuk memisahkan kotoran dan bahan asing yang terbawa pada bahan, kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir dan diangin-anginkan untuk menghilangkan sisa air. Jahe merah yang telah dikupas kulitnya kemudian dicuci dan dipotong-potong kecil untuk mempermudah dalam proses *juicer*.

c) Pembuatan Serbuk Sari Jahe Merah

Jahe merah yang telah dicuci kemudian dimasukkan ke dalam *juicer* untuk mendapatkan sari jahe. Sari yang diperoleh didiamkan selama 2 jam untuk memisahkan bagian sari dan patinya, karena yang akan diambil adalah bagian air sarinya. Sari dari jahe merah yang telah diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* untuk dibekukan. Sampel yang sudah beku tersebut kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering vakum atau *freeze dryer* dengan suhu -100°C untuk dilakukan proses pengeringan secara sublimasi hingga menjadi serbuk.

d) Skrining Fitokimia Serbuk Sari Jahe Merah

1) Uji Alkaloid

Sampel sebanyak 500 mg ditambahkan dengan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL aquadest, kemudian disaring. Filtrat dipipet sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi dan diuji dengan pereaksi alkaloid yaitu dengan 3 tetes peraksi Dragendroff. Hasil positif jika terbentuk endapan menggumpal berwarna merah (Prasetyorini *et al.*, 2015).

2) Uji Flavonoid

Sampel sebanyak 500 mg dilarutkan dalam 2 mL etanol 96% kemudian ditambahkan 100 mg serbuk Mg dan 10 tetes HCl pekat dari sisi tabung. Warna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid, jika terbentuk warna kuning maka sampel yang diuji positif mengandung flavon, kalkon, dan auron (Zaddana *et al.*, 2021).

3) Uji Tanin

Sampel sebanyak 500 mg dilarutkan dengan 2 mL etanol 96% kemudian ditambahkan dengan FeCl_3 , jika terbentuk endapan putih maka sampel positif mengandung tanin (Prasetyorini *et al.*, 2015).

4) Uji Saponin

Sampel sebanyak 500 mg, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 2 mL air kemudian dipanaskan selama 10 detik kemudian didinginkan lalu dikocok kuat selama 10 detik. Adanya saponin ditandai dengan terbentuknya buih setinggi 1-10 cm setelah ditambahkan dengan 1 tetes HCl 2N (Zaddana *et al.*, 2021).

e) Pembuatan Sediaan Emulgel

Formula emulgel serbuk ekstrak jahe merah berdasarkan modifikasi dari penelitian (Rauf *et al.*, 2021). Formula emulgel dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Formula Emulgel Serbuk Sari Jahe Merah

Bahan	Formula (%)			Fungsi
	F1	F2	F3	
Serbuk Ekstrak Jahe Merah	0,5	1	1,5	Zat Aktif
Gliserin	10	10	10	Humektan
Parafin Cair	5	5	5	Emolien
Carbomer 940	2	2	2	Gelling agent
Tween 80	3,6	3,6	3,6	Emulgator
Span 80	1,4	1,4	1,4	Emulgator
Na Benzoat	0,2	0,2	0,2	Pengawet
TEA	3 tetes	3 tetes	3 tetes	Pembasa & Pengemulsi
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	Pelarut

f) Pembuatan Emulgel

Sediaan emulgel dibuat dengan cara membuat basis gel dari carbomer 940. Sebelum membuat basis gel, terlebih dahulu melarutkan serbuk sari jahe merah ke dalam aquadest panas (suhu 70°C) (F1 sebanyak 7 mL, F2 sebanyak 6,5 mL, dan F3 sebanyak 6 mL). Setelah larutan dingin kemudian ditambahkan dengan na benzoat sebanyak 0,2 gram lalu diaduk hingga terlarut.

Basis gel dibuat dengan cara mendispersikan carbomer 940 ke dalam 60 mL aquadest dingin sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga mengembang. Carbomer yang telah mengembang selanjutnya ditambahkan 3 tetes TEA ke dalam basis gel kemudian ditambahkan dengan gliserin lalu diaduk hingga terdispersi dan terbentuk basis gel. Fase minyak dibuat dengan mencampurkan parafin cair dan span 80 sedangkan fase air dibuat dengan mencampurkan tween 80 ke dalam aquadest. Kedua fase tersebut dipanaskan hingga suhu 70°C kemudian

fase minyak ditambahkan ke dalam fase air sambil diaduk hingga homogen.

Basis gel yang sudah terbentuk kemudian ditambahkan pada campuran fase minyak dan air hingga terdispersi dengan sempurna. Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan larutan serbuk sari jahe merah dan pengawet yang sebelumnya sudah dibuat. Sediaan emulgel yang telah dibuat kemudian diaduk kembali menggunakan ultraturax dengan kecepatan 4000 rpm selama 20-30 menit. Sediaan emulgel yang sudah homogen kemudian diuji aktivitas antioksidan dan mutu fisik sediaan meliputi organoleptik, tipe emulsi, pH, daya sebar, daya lekat, dan viskositas.

g) Uji Mutu Fisik Sediaan Emulgel

1) Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan untuk mengetahui sifat fisik sediaan dengan cara mengamati warna, bau dan konsistensi dari basis emulgel yang telah dibuat (Rauf *et al.*, 2021).

2) pH

Uji pH dilakukan untuk mengetahui derajat keasaman sediaan agar tidak mengiritasi kulit. Pengujian pH emulgel dilakukan dengan menggunakan pH meter, dimana sediaan emulgel harus memiliki pH yang sama dengan kulit yaitu 4,5 – 6,5 (Rauf *et al.*, 2021).

3) Homogenitas

Sediaan emulgel dioleskan secara merata dan tipis pada kaca objek kemudian diamati, sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen serta tidak terlihat butiran-butiran kasar (Riski *et al.*, 2016).

4) Uji Tipe Emulsi

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui tipe emulsi dengan cara menggunakan pewarna metilen *blue* yang ditetaskan pada emulgel kemudian dilihat di bawah mikroskop (Nafisa *et al.*, 2021) dengan menggunakan perbesaran 10x.

5) Uji Daya Sebar

Emulgel sebanyak 0,5 g diletakkan di atas kaca lalu ditutup dengan kaca penutup di atasnya dan dibiarkan selama 1 menit. Sediaan emulgel tersebut kemudian diberikan beban dimulai dari tanpa beban lalu beban 50 gram, 100 gram, 150 gram, 200 gram, 250 gram dan seterusnya selama 1 menit hingga luas sediaan yang dihasilkan konstan (Rosari *et al.*, 2021). Daya sebar emulgel yang baik yaitu dengan diameter antara 5 – 7 cm (Rauf *et al.*, 2021).

6) Uji Daya Lekat

Emulgel seberat 0,5 g diletakkan di atas gelas obyektif dan ditutup dengan gelas obyektif yang lain lalu diletakkan sebuah beban 1 kg serta didiamkan selama 5 menit. Gelas obyektif tersebut kemudian dipasang pada alat uji yang diberi beban seberat 80 gram

dan catat waktu hingga kedua gelas obyek tersebut terpisah (Azkiya *et al.*, 2017). Daya lekat emulgel yang baik yaitu lebih dari 1 detik (Rauf *et al.*, 2021).

7) Uji Viskositas

Pengujian viskositas sediaan emulgel dilakukan menggunakan alat viscometer Brookfield DV2T dengan nomor spindle LV-04 (64) dan kecepatan 100 rpm selama 1 menit. Nilai viskositas untuk sediaan semisolid yaitu 2.000 – 4.000 cps (Rauf *et al.*, 2021).

h) Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

1) Pembuatan Larutan Baku Induk DPPH

Sebanyak 4 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan stok DPPH dengan konsentrasi 40 ppm.

2) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan baku induk 40 ppm dipipet sebanyak 5 mL kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur serapannya. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 400-800 nm serta panjang gelombang yang digunakan dengan nilai absorbansi 0,2-0,8. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang dengan nilai absorbansi tertinggi yang dihasilkan dari

pengukuran serapan. Larutan etanol p.a 5 mL digunakan sebagai blanko.

3) Penentuan *Operating Time*

Sebelum menentukan *operating time* dilakukan pembacaan blanko untuk menolak atau menetralkan spektrofotometri. Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mengambil larutan DPPH 40 ppm sebanyak 5 mL kemudian diukur absorbansinya menggunakan panjang gelombang maksimum dengan interval waktu 0 sampai 30 menit. *Operating time* yang diambil dari hasil absorbansi yang paling stabil.

4) Pembuatan Larutan Standar Induk Serbuk Sari Jahe Merah

Serbuk sari jahe merah ditimbang sebanyak 100 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian dilarutkan dengan 2 mL air panas (suhu 70°C) lalu ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan induk 1000 ppm.

5) Pembuatan Larutan Baku Serbuk Sari Jahe Merah

Larutan baku serbuk sari jahe merah dibuat menjadi beberapa konsentrasi yaitu 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, dan 50 ppm dengan mengambil 0,3 mL, 0,35 mL, 0,4 mL, 0,45 mL, dan 0,4 mL dari larutan induk 1000 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Larutan baku tersebut diambil 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah dilapisi dengan aluminium foil kemudian ditambahkan dengan 3 mL larutan DPPH 40 ppm. Larutan

tersebut diinkubasi sesuai dengan waktu yang diperoleh pada *operating time*.

6) Pembuatan Larutan Sampel Induk Emulgel Jahe merah

Larutan sampel induk 1000 ppm dibuat dengan menimbang 100 mg sediaan emulgel serbuk jahe merah pada masing-masing formula sebanyak 3 kali untuk pengujian sebanyak 3 kali replikasi. Emulgel dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi larutan 1000 ppm.

7) Pembuatan Larutan Sampel Uji Emulgel Jahe Merah

Larutan sampel uji dibuat menjadi beberapa konsentrasi yaitu 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, dan 50 ppm dengan mengambil sebanyak 0,3 mL, 0,35 mL, 0,4 mL, 0,45 mL, dan 0,5 mL larutan induk 1000 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan sampel uji tersebut masing-masing diambil sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah dilapisi dengan aluminium foil kemudian ditambahkan dengan larutan DPPH 40 ppm sebanyak 3 mL. Larutan tersebut diinkubasi sesuai dengan waktu yang diperoleh pada *operating time*.

F. Analisis Data

Nilai absorbansi yang diperoleh dari setiap formula emulgel serbuk sari jahe merah dengan metode DPPH dapat digunakan untuk mencari %inhibisi. Persen inhibisi digunakan untuk mencari nilai IC_{50} , dimana nilai IC_{50} dapat menyatakan aktivitas antioksidan dari sediaan emulgel. Persen inhibisi dapat dihitung dengan cara sebagai berikut.

Rumus %Inhibisi:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

Absorbansi kontrol: Absorbansi DPPH

Absorbansi sampel: Absorbansi sampel (emulgel dari berbagai formula).

Persen inhibisi dari masing-masing formula tersebut kemudian dihitung secara regresi linier (x,y) untuk memperoleh nilai IC_{50} . Pada regresi linier x diartikan sebagai konsentrasi (ppm) dan y diartikan sebagai persentase aktivitas antioksidan (%). Nilai IC_{50} diperoleh dengan mengganti y dengan 50.

Rumus regresi linier:

$$Y = Bx + A$$

Data hasil evaluasi mutu fisik sediaan emulgel pada penelitian ini dianalisis dengan menggunakan uji statistik. Data hasil evaluasi mutu fisik sediaan emulgel yang terdistribusi normal akan diuji menggunakan uji *One Way Anova* sedangkan data yang tidak terdistribusi normal akan diuji dengan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.