BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Pada penelitian ini, metode yang digunakan adalah eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk memformulasikan sari kulit putih semangka *(Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) dalam sediaan *gummy*, kemudian menganalisis karakteristik fisik dan aktivitas antioksidan berdasarkan parameter nilai IC_{50}.

B. Lokasi Penelitian

Lokasi pembuatan sari kulit putih semangka, identifikasi senyawa metabolit, dan pengujian karakteristik fisik pada *gummy* dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo. Laboratorium Instrumen, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo, digunakan untuk melakukan analisis aktivitas antioksidan sari kulit putih semangka. Penelitian dilakukan mulai tanggal 20 Mei – 2 Agustus 2024.

C. Subjek Penelitian

Kulit putih semangka *(Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) yang diperoleh dari hasil pertanian di Kecamatan Bandungan, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

D. Definisi Operasional

1. Kulit putih semangka *(Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) merupakan kulit semangka yang paling tebal, berwarna putih, dan memiliki tekstur yang keras yang dapat diperoleh dari hasil pertanian di Kecamatan Bandungan, Kabupaten Semarang.

2. Semangka yang digunakan merupakan semangka dengan daging buah berwarna merah, memiliki biji, dan berbentuk bulat.
3. Sari kulit putih semangka diperoleh dari kulit putih semangka yang telah di blender dengan penambahan air 10 mL.
4. Identifikasi senyawa metabolit dalam sari kulit putih semangka meliputi flavonoid, saponin, tanin, terpenoid, dan alkaloid.
5. *Gummy* merupakan sediaan permen yang terbuat dari sari kulit putih semangka dan bahan pembentuk gel yang memiliki tekstur lunak, kenyal, dan mudah dipotong.
6. Karakteristik fisik pada *gummy* sari kulit putih semangka meliputi uji organoleptis, pH, keseragaman bobot, *swelling ratio*, sineresis, dan waktu dispersi berdasarkan persyaratan yang telah ditentukan.
7. Uji aktivitas antioksidan sari kulit putih semangka konsentrasi 1% dan 5% menggunakan metode peredaman DPPH dengan parameter nilai $IC_{50.}$

E. Alat dan Bahan

1. Alat

   Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, timbangan (Ohaus), panci, kompor, termometer, pengaduk kaca, cawan porselin, spatula, *stopwatch*, gelas ukur 100 mL (Iwaki), gelas ukur 50 mL, labu ukur 10 mL, labu ukur 5 mL, labu ukur 100 mL, *waterbath* (Memmert), *hot plate*, cetakan, spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu), pH meter (Ohaus), *magnetic stirrer* (Cimarec), kertas saring, pipet tetes.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit putih semangka *(Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), HCl pekat, kloroform, ammonia, H_2SO_4, $FeCl_3$, serbuk magnesium, HCl 2N, fruktosa, sukrosa (farmasetika), metil paraben (farmasetika), gelatin (farmasetika), aquadest, asam sitrat (farmasetika), dan etanol p.a (smartlab).

F. Prosedur Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman semangka *(Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) dilakukan terlebih dahulu sebelum penelitian untuk memastikan jenis dan kebenaran tanaman. Determinasi semangka dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik, Fakultas Sains dan Matematika, Departemen Biologi, Universitas Negeri Diponegoro, Kota Semarang.

2. Penyiapan Bahan

Kulit putih semangka yang digunakan adalah kulit putih yang telah dipisahkan dari daging buah dan kulit hijau semangka. Kulit putih semangka yang telah dipisahkan, kemudian dipotong dengan ukuran ± 2 cm dan dicuci dengan air bersih.

3. Pembuatan Sari Kulit Putih Semangka

Kulit putih semangka ditimbang 200 gram dan dihaluskan menggunakan blender dengan penambahan air 10 mL, kemudian disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh sari kulit putih semangka. Sari semangka yang dihasilkan, ditentukan rendemennya. Rendemen sari

dihitung menggunakan rumus:

% Rendemen = $\frac{berat\ sari}{berat\ kulit\ putih\ semangka}$ x 100%

4. Identifikasi Senyawa Metabolit

   a. Flavonoid

      Sebanyak 0,5 gram sari kulit putih semangka ditambahkan serbuk magnesium 2 mg dan HCl pekat sebanyak 2 tetes, kemudian dikocok. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi kuning, merah, atau jingga (Hernanda *et al.*, 2022).

   b. Saponin

      Sebanyak 0,5 gram sari kulit putih semangka ditambahkan 5 mL aquadest panas. Larutan tersebut dikocok selama 10 detik, kemudian didiamkan. Setelah itu, ditambahkan HCl 2N dan diamati perubahan yang terjadi. Jika di dalam larutan terbentuk busa yang stabil, larutan tersebut mengandung saponin (Hernanda *et al.*, 2022).

   c. Tanin

      Sebanyak 0,5 gram sari kulit putih semangka ditambahkan reagen $FeCl_3$ sebanyak 1%. Hasil positif jika terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman (Hernanda *et al.*, 2022).

   d. Terpenoid

      Sebanyak 0,5 gram sari kulit putih semangka ditambahkan 2 mL kloroform dan 3 mL H_2SO_4. Perubahan larutan menjadi coklat kemerahan menunjukkan adanya senyawa terpenoid (Hernanda *et al.*, 2022).

e. Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram sari kulit putih semangka ditambahkan kloroform 2 mL, ammonia 10 mL, dan 10 tetes H_2SO_4. Larutan tersebut dikocok dan didiamkan hingga membentuk lapisan, kemudian dipindahkan dalam dua tabung reaksi masing-masing 2,5 mL. Tabung pertama ditetesi reagen mayer sebanyak 1 – 2 tetes, dimana hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Tabung kedua ditetesi reagen dragendorff dan hasil positif jika larutan berwarna merah atau jingga (Hernanda *et al.*, 2022).

5. Formulasi *Gummy*

Formulasi *gummy* sari kulit putih semangka mengacu pada penelitian (Sangka Pratama & Nurzamzam, 2020). Formula *gummy* sari kulit putih semangka dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Formula *Gummy* Sari Kulit Putih Semangka

Bahan	F1 (% b/v)	F2 (% b/v)	FK (% b/v)	Fungsi
Sari Kulit Putih Semangka	1	5	-	Zat aktif
Vitamin C	-	-	1	Zat aktif
Gelatin	15	15	15	*Gelling agent*
Glukosa cair	10	10	10	Pemanis
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	Pengawet
Asam sitrat	0,2	0,2	0,2	Penambah rasa asam
Sukrosa	10	10	10	Pemanis
Aquadest ad	100	100	100	Pelarut

Keterangan:
F1 : Sari kulit putih semangka 1% b/v
F2 : Sari kulit putih semangka 5% b/v
FK: Vitamin C 1% b/v

Sari kulit putih semangka divariasikan menjadi 2 konsentrasi yaitu 1%, dan 5%. Konsentrasi 1% didapatkan dari penelitian sebelumnya (Josika, 2023) kemudian dilakukan uji karakteristik fisik dan aktivitas antioksidan. Hasil yang didapatkan kemudian digunakan untuk menentukan seri konsentrasi pada formula 2 *gummy* sari kulit putih semangka. Setiap formula dibuat sebanyak 100 mL.

6. Pembuatan *Gummy* Sari Kulit Putih Semangka

   Semua bahan ditimbang, metil paraben dilarutkan ke dalam aquadest dengan suhu 125°C, kemudian diaduk hingga larut. Gelatin dimasukkan dalam larutan metil paraben secara bertahap, diaduk hingga mengembang. Pada wadah terpisah, sukrosa, glukosa cair, dan asam sitrat dilarutkan dalam 30 mL aquadest secara bergantian, kemudian diaduk hingga homogen. Larutan sukrosa dimasukkan ke dalam larutan gelatin, lalu ditambahkan sari kulit putih semangka dan diaduk kembali hingga larut. Setelah larut, larutan tersebut kemudian dituang ke dalam cetakan dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama 24 jam (Sangka Pratama & Nurzamzam, 2020).

7. Pemeriksaan Karakteristik Fisik

   a. Uji Organoleptis

      Uji organoleptis dilakukan secara visual menggunakan panca indera. Uji ini meliputi rasa, bau, warna, dan tekstur pada *gummy*. *Gummy* yang baik memiliki tekstur yang kenyal dan lunak. Uji dilakukan replikasi 3 kali.

b. Uji pH

pH meter digunakan untuk mengukur derajat keasaman pada *gummy* sari kulit putih semangka. Uji pH dilakukan dengan melarutkan 1 butir *gummy* ke dalam 100 mL aquadest di atas *waterbath*. pH *gummy* yang baik berkisar antara 3,5 – 6 (Asdini *et al.*, 2021). Uji dilakukan replikasi 3 kali.

c. Uji Keseragaman Bobot

Sebanyak 20 *gummy* ditimbang, kemudian dihitung rata-rata bobot dari masing-masing formula. Keseragaman bobot yang baik jika koefisien variasi *gummy* kurang dari 5% (Amaria & Luliana, 2016). Uji dilakukan replikasi 3 kali.

CV = $\frac{SD}{X}$ x 100%

CV: Koefisien variasi
SD: Standar deviasi
X : Rata-rata

d. Uji Sineresis

Gummy masing-masing formula diambil 1 butir dan ditimbang, kemudian dicatat bobotnya sebagai bobot awal. Uji sineresis dilakukan dengan menempelkan kertas saring pada seluruh permukaan *gummy* pada suhu kamar (25 ± 5°C). Setelah ditempelkan kertas saring, *gummy* ditimbang kembali untuk mendapatkan bobot awal dan bobot akhir sediaan. Semakin tinggi persentase sineresis, tekstur *gummy* semakin cepat melunak sehingga kualitas *gummy* mengalami penurunan (Rani et al., 2022). Uji dilakukan replikasi 3 kali.

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

A: Bobot awal sediaan
B: Bobot akhir sediaan

e. Uji *Swelling Ratio*

Gummy masing-masing formula diambil 1 butir dan ditimbang, kemudian direndam ke dalam 100 mL aquadest selama 10 detik pada suhu 25 – 30˚C. Setelah itu, dikeringkan dengan kertas saring, ditimbang kembali dan dihitung nilai *swelling ratio*. (Rani *et al.,* 2022). Uji dilakukan replikasi 3 kali.

Swelling ratio = $\frac{ws-wd}{wd}$ x 100%

Ws: Berat sediaan setelah perendaman
Wd: Berat sediaan sebelum perendaman

f. Uji Waktu Dispersi

Gummy masing-masing formula diambil 1 butir kemudian dimasukkan dalam *beaker glass* yang berisi 100 mL aquadest dengan suhu 37°C. Sediaan tersebut diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga sediaan menjadi larut, kemudian diamati waktu yang dibutuhkan *gummy* untuk terdispersi semua. Uji dilakukan replikasi 3 kali. *Gummy* memenuhi persyaratan waktu dispersi kurang dari 30 menit (Rani *et al.*, 2022).

8. Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode Peredaman DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH

DPPH ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian ditambahkan etanol p.a ad 100 mL. Larutan tersebut dikocok hingga diperoleh larutan DPPH 100 ppm (Suharyani *et al*. 2022).

b. Pembuatan Larutan Pembanding Vitamin C

Vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian ditambahkan aquadest ad 100 mL. Larutan tersebut dikocok hingga diperoleh konsentrasi larutan vitamin C 100 ppm (Gayatri, 2021).

c. Pembuatan Larutan Sari Kulit Putih Semangka

Sari kulit putih semangka ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas menggunakan labu ukur 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan stok 100 ppm (Lismawati, 2021).

d. Penentuan Panjang Gelombang

Larutan DPPH 100 ppm dibuat menjadi konsentrasi 30 ppm. Larutan DPPH dipipet sebanyak 3 mL, kemudian ditambahkan etanol 1 mL. Serapan panjang gelombang diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga didapatkan panjang gelombang maksimum (Rahayu *et al*, 2021).

e. Penentuan *Operating Time*

Operating time ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang maksimal. *Operating time* digunakan untuk

mengetahui waktu reaksi suatu senyawa yang didapatkan ketika absorbansi paling stabil, dimana absorbansinya dibaca pada menit ke-1 hingga ke-30 (Rahayu, 2021).

f. Penentuan Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Vitamin C

Vitamin C dibuat seri konsentrasi menjadi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Larutan DPPH 30 ppm dipipet sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan larutan pembanding sebanyak 3 mL, diaduk hingga homogen. Larutan tersebut didiamkan selama 15 menit dan dibaca absorbansinya (Gayatri, 2021).

g. Penentuan Aktivitas Antioksidan Sari Kulit Putih Semangka

Larutan stok 100 ppm dari sari kulit putih semangka dibuat seri konsentrasi menjadi 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, dan 600 ppm. Larutan DPPH 30 ppm dipipet sebanyak 3 mL, kemudian ditambahkan 1 mL larutan sampel dari berbagai konsentrasi. Larutan tersebut didiamkan selama 15 menit dan dibaca absorbansinya.

h. Pembuatan Larutan dan Penentuan Aktivitas Antioksidan *Gummy* Sari Kulit Putih Semangka

Gummy sebanyak 1 gram dilarutkan dengan etanol p.a menggunakan labu ukur 100 mL sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 10000 ppm (Suharyani et al., 2022). Larutan stok tersebut kemudian dibuat seri konsentrasi menjadi 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, dan 600 ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 1 mL, lalu ditambahkan larutan blangko DPPH 30 ppm

sebanyak 3 mL. Larutan tersebut kemudian dikocok, dibiarkan selama 15 menit pada suhu kamar, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 516,5 nm dan direplikasi sebanyak 3 kali (Elisa, 2017).

i. Perhitungan Nilai IC_{50}

Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode peredaman DPPH dapat dihitung menggunakan persamaan % inhibisi. Parameter untuk mengetahui besar atau tidaknya senyawa antioksidan dapat menggunakan nilai IC_{50}. IC_{50} dapat diperoleh dari persamaan regresi linier yang menyatakan antara konsentrasi larutan (x) dengan % inhibisi (y). Penentuan aktivitas antioksidan dinyatakan dengan % inhibisi.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{Absorbansi\ blangko - Absorbansi\ sampel}{Absorbansi\ blangko} \text{ x } 100\%$$

Nilai x diperoleh dengan cara memasukkan angka 50 sebagai y dalam persamaan regresi linier yang didapatkan dari grafik konsentrasi dengan % inhibisi. Persamaan regresi linier berupa y = a + bx (Pratiwi *et al.*, 2023).

Keterangan:

x : Konsentrasi (ppm)
y : Persentase inhibisi (%)

G. Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini berupa karakteristik fisik masing-masing formula yang meliputi organoleptis, pH, sineresis, keseragaman bobot, *swelling ratio,* dan waktu dispersi. Uji normalitas dan homogenitas data menggunakan *Levene test* dan *Kolmogorov Smirnov.* Jika data homogen dan

normal maka dilanjutkan dengan analisis data menggunakan *One way Annova* dengan taraf kepercayaan sebesar 95%.