

BAB III

METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Pada penelitian ini memiliki jenis penelitian eksperimental yang mana akan dilaksanakan dilaboratorium dan tujuannya untuk membuat formulasi sediaan serta melakukan uji karakteristik yang meliputi uji fitokimia, uji stabilitas fisik, uji ALT (angka lempeng total) untuk menghitung koloni serta pengujian panjang gelombang untuk mencari aktivitas antioksidan penangkal radikal bebas dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan dalam metode DPPH pada formulasi sediaan tanaman bawang putih, kedawung, cabe jawa dan kencur sebagai peningkat imunitas.

B. SUBJEK DAN OBJEK PENELITIAN

Pada penelitian ini menggunakan subjek daya terima dari para panelis terhadap formulasi sediaan serbuk dari kombinasi sediaan tanaman bawang putih, kedawung, cabe jawa dan kencur sebagai peningkat imunitas. Penelitian ini mengambil beberapa panelis untuk mencoba sediaan serbuk jamu dengan formulasi kombinasi serbuk tanaman sebagai peningkat imunitas.

Sedangkan pada objek penelitian ini yang digunakan adalah serbuk dari kombinasi tanaman bawang putih, cabe jawa, kedawung dan kencur untuk mengetahui apakah dalam kombinasi dari 4 bahan alam tersebut memiliki kandungan senyawa fitokimia dan kandungan senyawa antioksidan sebagai penangkal radikal bebas serta apakah sediaan tanaman dari kombinasi 4 bahan alam tersebut bisa menjadi peningkat imun bagi tubuh.

C. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Pada waktu dan tempat yang akan dilaksanakannya suatu penelitian ini di selenggarakan saat bulan Desember pada tahun 2021 sampai dengan Maret pada tahun 2022 yang akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Kimia di Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

D. DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

Pada definisi operasional penelitian ini menggunakan variabel adalah suatu penelitian yang menjelaskan secara singkat tentang variabel penelitian yang digunakan. Berikut ini adalah variabel penelitian yang digunakan pada penelitian ini :

1. Senyawa oksigen yang memiliki sifat reaktif dan berbahaya kemudian memiliki suatu elektron yang tidak mempunyai pasangan yaitu radikal bebas.
2. Antioksidan adalah suatu senyawa yang mendonorkan elektron ke radikal bebas dan mencegah akan terjadinya kerusakan pada sel. Senyawa dari antioksidan sangat mampu megembangkan reaksi terhadap oksidasi dengan cara menahan suatu elektron yang merebut elektron lain dan diberikan elektron tambahan dari antioksidan agar elektron tersebut tidak menyerap dan merusak sel sel yang lain.
3. Kemampuan suatu tubuh yang mana kuat untuk melawan suatu organisme atau toksin yang berada di dalam tubuh dan organ dan memiliki reaksi imunitas yang terjadi antara antigen dengan antibodi disebut imunitas.
4. Serbuk adalah suatu campuran bahan obat yang terbuat dari kimia atau bahan lainnya yang bentuknya halus dan terbagi-bagi dalam bentuk yang kering.

E. INSTRUMEN PENELITIAN

1. Alat dan Bahan-bahan

a. Alat yang diperlukan

Oven sekai, blender philips, timbangan analitik Fujitsu FSR B1200, *wrapping plastic*, *aluminium foil*, kertas saring, kertas perkamen, mortir dan stamper, *water bath* Faithful, pH meter ionix, rak tabung reaksi, tabung reaksi iwaki, gelas beaker iwaki, gelas ukur iwaki, pipet tetes Onelab, batang pengaduk Onelab, cawan porselen, corong kaca iwaki, erlenmeyer pyrex, labu ukur iwaki, spektrofotometer UV-Vis Thermo scientific genesis 10S UV-VIS, kuvet kuarsa, jangka sorong, coloni counter, pipet mikro 100-1000 μL scilogex.

b. Bahan yang digunakan

Bahan Sampel bawang putih, kedawung, cabe jawa dan kencur, Etanol 96%, Alkohol 70%, Methanol pa, HCL 2N, Air hangat, HCL pekat, Serbuk magnesium, Aquadest, NaCl, NaCl Fisiologis 0,85%, FeCl_3 , kloroform, wagner, dragendorff, mayer, serbuk DPPH, vitamin C.

2. Prosedur Penelitian

Determinasi Sediaan Serbuk Bawang Putih, Kedawung, Cabe Jawa dan Kencur. Dilakukan determinasi tanaman bawang putih, cabe jawa, kencur dan kedawung pada tanaman ini untuk melihat apakah suatu simplisia tersebut benar simplisia yang hendak digunakan dalam suatu penelitian ini. Identifikasi dilakukan di Laboratorium Dentologi Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur.

3. Pengolahan Sediaan Serbuk Bawang Putih, Kedawung, Cabe Jawa dan Kencur

Simplisia dari bawang putih, cabe jawa, kedawung dan kencur dilakukan sortasi basah dengan mencuci bersih suatu simplisia menggunakan air mengalir, selanjutnya pada perajangan dengan memotong simplisia berbentuk kecil-kecil, setelah itu

dilakukan pengeringan dengan menggunakan sinar matahari langsung atau bisa menggunakan alat pemanas seperti oven dengan suhu 40-45°C, jika simplisia sudah kering maka simplisia dimasukkan kedalam blender atau di haluskan dengan cara digerus hingga menjadi serbuk.

4. Pembuatan Simplisia Sediaan Serbuk Bawang Putih, Kedawung, Cabe Jawa dan Kencur

Simplisia bawang putih dimasukkan ke dalam lumpang ditambahkan simplisia cabe jawa, simplisia kedawung, dan simplisia kencur yang sudah dikeringkan, lalu digerus sampai homogen lalu di masukkan kedalam botol atau wadah untuk penyimpanan serbuk. Bisa kita lihat formulasi sediaan serbuk terlihat pada Tabel 3.2.

5. Pemeriksaan Sediaan Serbuk Bawang Putih, Kedawung, Cabe Jawa dan Kencur

a. Pengujian Fitokimia

Serbuk bawang putih, cabe jawa, kedawung dan kencur dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian pengujian ini dilihat untuk mengetahui apakah simplisia tersebut memiliki golongan senyawa kimia yang terdapat dari simplisia bawang putih, cabe jawa, kedawung dan kencur. Pengujian fitokimia ini menggunakan metode uji tabung dan juga menggunakan beberapa pereaksi atau reagen kimia.

Tabel 3.1 Pengujian Fitokimia menggunakan Metode Uji Tabung

Uji	Reagen	Hasil
Uji Flavonoid	HCL pekat 3 tetes + Serbuk magnesium 0,5 mg	Menunjukkan warna kuning, hijau, hitam dan orange, adalah termasuk positif flavonoid
Uji Saponin	HCL 2 N + Air hangat 10 ml	Apabila masih menunjukkan busa secara konstan maka hasil termasuk menunjukkan positif.
Uji Tannin	Air hangat 10 ml + FeCL ₃ 3 tetes + Nacl 5 tetes	Ketika menunjukkan warna hijau kehitaman atau menunjukan tanin katekol dan biru kehitaman menunjukkan tanin pirogalol berate termasuk positif.
Uji Alkaloid	Kloroform 2 ml + ammonia 2 ml + HCL 2 N + pereaksi Dragendorff, Wagner dan Mayer.	<ul style="list-style-type: none"> - Untuk pereaksi Dragendorf menampakkan endapan merah/jingga dan hasil ini menunjukan positif memiliki senyawa alkaloid - pereaksi Mayer menampakkan endapan putih dan hasil ini menunjukan positif memiliki senyawa alkaloid - pereaksi Wagner menampakkan endapan coklat dan hasil ini menunjukan hasil yang positif.

6. Formulasi Siplisia Sediaan Serbuk Bawang Putih, Kedawung, Cabe Jawa dan Kencur

Tabel 3.2 Rancangan Formulasi Sediaan Serbuk Peningkat Imunitas

Nama Bahan	Berat
Bawang putih	1500mg
Cabe jawa	250mg
Kedawung	250mg
Kencur	1000mg

7. Evaluasi Karakteristik Simplisia Serbuk Bawang Putih, Kedawung, Cabe Jawa dan Kencur

Pada evaluasi sampel ini dilihat pada sifat fisik yang mana dilakukan pengamatan pada minggu ke-0 (pada saat sediaan selesai) dan pada saat evaluasi sampel dilakukan stabilitas fisik dengan cara penyimpanan selama 7 hari dengan suhu ruang 25-27°C dengan melihat bau, warna, rasa, organoleptik dan pH.

a. Pemeriksaan Organoleptik

Dalam uji organoleptik dilakukan secara cermat. Uji organoleptik merupakan suatu cangkupan yang mana suatu formulasi diamati dengan melihat warna kemudian bau dari aroma setelah itu tekstur dan yang terakhir adalah rasa pada sampel tersebut. Uji organoleptik juga dapat penilaian dengan melalui panca indera atau bahkan penilaian sensorik yaitu dengan menggunakan cara yang sangat umum atau cara yang sudah lama untuk digunakan (Zulistina, M. 2019).

b. Pemeriksaan Homogenitas

Pada saat pemeriksaan yang dinamakan homogenitas pengujian ini dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan pada kaca preparate. Kemudian diamati kaca preparat yang sudah ada sediaan dan dilihat pada bawah sinar apa ada tidaknya suatu partikel atau zat yang mana belum tercampur dengan homogen atau tidak menampakkan butiran yang kasar. Pemeriksaan ini diamati tiap minggu selama 6 minggu (Depkes, 1995).

c. Pemeriksaan pH

Pengujian pH dengan cara sediaan sebanyak 0,5 gram, lalu dilarutkan dengan menggunakan 50 mililiter aquadest, kemudian pada pH dilakukan pengukuran dengan menggunakan pH meter. Pada alat pH dilakukan kalibrasi terlebih dahulu agar larutan yang di ukur menunjukkan hasil yang sesuai, dan alat pH meter dikalibrasi menggunakan pH 4

dan pH 7. Elektroda kemudian dicuci dengan menggunakan air suling dan lalu dikeringkan. Pengukuran pada pH serbuk menggunakan cara elektroda dengan dilakukannya dengan cara dicelupkan dalam wadah tersebut, kemudian amati angka yang terlihat pada alat pH meter merupakan nilai pH serbuk tersebut. Pemeriksaan dilakukan setiap minggu selama 6 minggu (Depkes, 1995).

d. Perhitungan Koloni

Pada perhitungan untuk jumlah koloni bakteri pada suatu sampel menggunakan metode yaitu TPC (*Total Plate Count*). Metode TPC adalah metode yang menumbuhkan suatu sel-sel mikroba hidup pada suatu bahan yang bernama media agar dengan cara menubuhkan suatu mikroba dalam berbentuk suatu *colony* dapat diamati oleh kasat mata tanpa harus menggunakan alat *microscope*. Pada perhitungan koloni dapat menggunakan *hand counter*. kemudian perhitungan koloni bisa dengan cara menggunakan cawan petri dibagi menjadi 4 dan ditandai dengan menggunakan spidol hitam yang tidak permanen agar bisa dihapus jika terjadi kesalahan saat proses perhitungan. Ketika mencoret. Adapun rumus yang bisa digunakan Ketika hasil dari perhitungan dengan menggunakan ala tangka lempeng total. Berikut rumus ALT (angka lempeng total):

$$A = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

Keterangan A = Kelimpahan bakteri (CFU/gr) (Hartanti, 2013).

e. Pengujian Aktivitas Antioksidan Sediaan Serbuk Bawang Putih, Kedawung, Cabe Jawa dan Kencur

1) Pembuatan Larutan DPPH 20 ppm

Ditimbang serbuk 2 miligram DPPH kemudian dilarutkan dengan menggunakan larutan methanol p.a dan

dimasukan kedalam labu ukur 100 mililiter lalu dihomogenkan sehingga di peroleh lalu larutan DPPH (Prasiwati, R., *et al.* 2010).

2) Pada Saat Penentuan *Operating Time* DPPH

Masukan larutan DPPH 2 mililiter ditambah larutan methanol p.a 2 mililiter, lalu dihomogenkan. Kemudian diamati ditempat gelap dan dilihat pada serapannya dimenit ke 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60. Setelah itu ditetapkan daya serapan larutan dan waktu *operating timenya* lalu larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Prasiwati, R., *et al.* 2010).

3) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Pada larutan DPPH 2 mililiter ditambahkan dengan larutan methanol p.a 2 mililiter. Setelah itu diamati homogenitasnya dan dilihat pada daya serapannya pada suatu panjang gelombang 400-800 nanometer (Prasiwati, R., *et al.* 2010).

4) Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH 2 mililiter digabungkan dengan larutan methanol p.a 2 mililiter kemudian di homogenkan (Prasiwati, R., *et al.* 2010).

5) Pembuatan Seri Konsentrasi Serbuk

Formula Sediaan Serbuk bawang putih, kedawung, cabe jawa dan kencur yang menggunakan uji aktivitas antioksidan untuk dibuat menjadi 5 seri konsentrasi yang berbagai macam yaitu: 10, 15, 20, 25 dan 30 ppm. Pada setiap seri dilakukan konsentrasi dipipet 2 mililiter kemudian ditambahkan larutan DPPH sebanyak 2 mililiter, lalu larutan tersebut dihomogen selama 2 menit (Prasiwati, R., *et al.* 2010).

6) Pembuatan Kontrol Positif

Untuk control positif yaitu dengan menggunakan larutan uji Vitamin C sebagai kontrol positif dibuat dengan menggunakan beberapa konsentrasi, yaitu 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm. Setiap larutan seri konsentrasi dipipet 2 mililiter, lalu ditambahkan larutan 2 mililiter DPPH (Prasiwati, R., *et al.* 2010).

7) Uji Aktivitas Antioksidan

Pada larutan sampel dipipet 2 mililiter dan dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dimasukkan larutan DPPH 2 mililiter kemudian digabungkan untuk melihat homogen dengan menggunakan alat vortex dengan waktu 5 menit lalu dibiarkan selama 30 menit dan di simpan di tempat yang tidak terkena sinar matahari atau cerah. Kemudian daya serapan dihitung pada panjang gelombang yang maksimum. Hasil daya serapan dilakukan dengan mencari berapa persen daya hambatan aktivitas radikal bebas dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{Ak - As}{Ak} \times 100\%$$

Keterangan :

Ak: Absorbansi kontrol

As: Absorbansi sampel

Hasil nilai IC50 inhibisi masing-masing konsentrasi dihitung IC50 nya dengan memakai rumus persamaan regresi linier, kemudian dianalisis menggunakan korelasi regresi (Prasiwati, R., dkk. 2010).

F. METODE PENGUMPULAN DATA

Adapun metode pengumpulan data dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Studi literatur

Pada studi literatur yang saya dapatkan sebagai dasar panduan penelitian untuk mendapatkan formulasi dengan berbagai sumber kepustakaan yang penulis dapat diantaranya buku atau artikel bisa juga dengan jurnal maupun skripsi penelitian dan bahkan karya ilmiah.

2. Metode Eksperimen

Metode yang digunakan dengan tujuan untuk mengetahui proses dan tahapan dalam berbagai simplisia tanaman dan tahapan pembuatan formulasi sediaan serbuk bawang putih, kedawung, cabe jawa dan kencur yang akan dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

3. Metode Dokumentasi

Metode ini akan di proses pada pembuatan tahapan-tahapan produksi dari awal persiapan hingga pengujian aktivitas antioksidan dan cemaran bakteri serta bukti pada penelitian ini agar menunjukkan bahwa penelitian tersebut benar dilakukan oleh penulis dan dengan bukti yang akan tertera di suatu lampiran.

G. TEKNIK ANALISIS DATA

Pada data yang diambil adalah hasil analisis antioksidan untuk mengetahui terjadinya peningkatan imunitas dalam tubuh dengan menganalisis dan menghitung nilai *Inhibition Concentration* 50 (IC50), serta melakukan evaluasi sifat fisik dengan persamaan regresi dan juga menggunakan cemaran bakteri untuk menghitung koloni pada sediaan formulasi serbuk. Untuk data evaluasi stabilitas fisik sediaan dilakukan dengan 2 pemeriksaan suhu ruangan 25-27°C dan suhu dingin dengan melihat suatu warna, kemudian bau, setelah itu rasa dan pH dalam minggu ke 0, 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 yang meliputi pemeriksaan organoleptik, homogenetik, uji fitokimia dan uji ALT (angka lempeng total) untuk menghitung koloni yang berada pada formulasi sediaan tanaman bawang putih, kedawung, cabe jawa dan kencur sebagai peningkat imunitas.

H. ETIKA PENELITIAN

Penelitian etika diperlukan untuk mendapatkan suatu persetujuan dengan komite etik dan ijin pada penelitian ini dengan mempertimbangkan suatu prinsip-prinsip pada etika penelitian yaitu dengan *The five right of human subject in research* Adapun 4 hak tersebut adalah :

1. *Respect For Autonomy*

Partisipan memiliki hak untuk memberi keputusan secara sadar untuk menerima bahkan menolak sebagai partisipan. Peneliti menjelaskan kepada partisipan tentang bagaimana saja suatu proses jalannya penelitian yang meliputi berbagai wawancara dan partisipan diberikan hak atas kebebasan untuk menentukan bersedia apa tidak bersedia menjadi seorang partisipan dalam penelitian ini.

2. *Privacy* atau *Dignity*

Partisipan memiliki suatu hak agar dihargai tentang apa saja yang mereka inginkan terhadap apapun yang dilakukan dan pada penelitian ini hanya melakukan suatu wawancara dalam waktu yang partisipan inginkan. Dalam waktu mewawancarai harus dalam kondisi tenang, kemudian santai dan bahkan harus kondusif serta tidak dilihat oleh orang banyak.

3. *Anonymity* dan *Confidentiality*

Peneliti menjelaskan identitas terjaminnya khasiat suatu formulasi kepada partisipan. Kemudian itu peneliti juga memiliki semua hasil dari dokumen yang diisi oleh partisipan atas setujunya dalam berpartisipasi dalam penelitian ini.

4. *Beneficence and Nonmaleficence.*

Pada penelitian ini bahwa tidak membahayakan para partisipan, ketika peneliti telah melindungi para partisipan dalam bahaya dan ketidaknyamanan. Penelitian ini juga memberikan suatu tujuan, manfaat dan kegunaan data dan bersedia menandatangani surat ketersediaan menjadi partisipan. Apabila dalam wawancara

tersebut partisipan merasa tidak nyaman maka wawancara tersebut dapat dihentikan dan dilakukan lagi saat partisipan sudah merasa nyaman atau partisipan siap untuk melakukan wawancara ulang lagi (Amalia, R. 2016)

I. ALUR JALANNYA PENELITIAN



