

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan desain eksperimental di laboratorium. Ekstraksi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) menggunakan metode ultrasonik dengan variasi rasio pelarut etanol 70% dan lama ekstraksi. Ekstrak yang didapatkan kemudian ditentukan % rendemennya, kadar total fenolik dan flavonoid. Ekstrak yang paling optimal dilanjutkan dengan menguji daya hambat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi cakram.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Mikrobiologi Prodi Farmasi (S-1) Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta dan dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2023.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi pada penelitian ini adalah seluruh bagian dari bunga telang yang diperoleh dari Desa Glagah, Kecamatan Temon, Kabupaten Kulon Progo dengan titik koordinat -7,9046070, 110,0760730.
2. Pada penelitian ini menggunakan sampel bunga telang sebanyak 7 kg. Bunga telang yang dipakai yaitu bunga telang segar, bunganya dalam keadaan mekar tidak kuncup, berwarna biru cerah, yang dipetik pada pagi hari.
3. Bakteri yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Variasi rasio pelarut dan lama ekstraksi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), variasi konsentrasi ekstrak etanol bunga telang.
2. Variabel terikat : Nilai rendemen, total kadar fenolik, total kadar flavonoid, dan diameter zona hambat bakteri.
3. Variabel terkendali : Suhu, pelarut ekstraksi, sampel bunga telang yang dipanen pagi hari, ekstraksi ultrasonik, waktu panen.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Rasio pelarut adalah rasio yang digunakan pada saat proses ekstraksi untuk mendapatkan ekstrak. Rasio pelarut pada penelitian ini adalah 1:5; 1:10; dan 1:15, dimana 1 untuk jumlah sampel dan 5; 10; 15; untuk jumlah pelarut yang digunakan.
2. Lama ekstraksi adalah waktu yang digunakan pada saat proses ekstraksi untuk mendapatkan ekstrak. Waktu ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 10, 20, dan 30 menit.
3. Metode ultrasonik adalah teknik ekstraksi dengan bantuan gelombang ultrasonik yang digunakan pada penelitian ini.
4. Kadar total fenolik adalah jumlah kadar fenolik yang terdapat dalam ekstrak etanol bunga telang dan dinyatakan dalam mgEAG (Ekuivalen Asam Galat).
5. Kadar total flavonoid adalah jumlah kadar flavonoid yang terdapat dalam ekstrak etanol bunga telang dan dinyatakan dalam mgEK (Ekuivalen Kuersetin).
6. Diameter zona hambat adalah daerah sekitar kertas cakram yang berwarna bening yang sudah ditambahkan sampel kemudian diukur menggunakan jangka sorong pada tiga sisi yang berbeda di daerah zona hambat dengan skala mm.
7. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari sampel yang sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk persiapan sampel meliputi ayakan 40 mesh, grinder (Fomac), timbangan analitik (Ohaus), dan oven. Penentuan kadar air serbuk bunga telang menggunakan *Moisture Balance Analyzer* (Ohaus). Proses ekstraksi menggunakan timbangan analitik (Ohaus), labu erlenmeyer (Iwaki), *ultrasonic bath* (Cole-parmer), *waterbath* (Mammert WNB 10 FC), vakum *buchner* (Roker) dan cawan porselin. Skrining fitokimia menggunakan tabung reaksi, pipet tetes, pipet ukur, dan timbangan analitik (Ohaus). Untuk penentuan total fenolik dan flavonoid meliputi timbangan analitik (Ohaus), labu erlenmeyer (Iwaki), *hot plate*, *magnetic stirrer*, pipet ukur, labu ukur, tabung reaksi, dan spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S). Uji aktivitas antibakteri

menggunakan *Bio Safety Cabinet* (BSC) (Daihan Labtech), batang L, bunsen, labu erlenmeyer (Iwaki), gelas ukur, *hot plate*, inkubator, jarum ose, labu takar, jangka sorong, mikropipet, oven, spektrofotometer UV-Vis Genesys 10S), timbangan analitik (Ohaus), dan autoklaf (B-one).

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk persiapan sampel yaitu sampel bunga telang. Untuk penentuan kadar air serbuk bunga telang adalah serbuk bunga telang. Ekstraksi menggunakan serbuk bunga telang, etanol 70%, dan kertas *whatman* no 1. Pada skrining fitokimia menggunakan HCl 1%, Pereaksi Mayer, Wagner, Dragendroff, akuades, magnesium, HCl pekat, FeCl₃ 1%, FeCl₃ 10%, dan HCl 2N. Penentuan total fenolik meliputi ekstrak etanol bunga telang, metanol *p.a.*, asam galat (Sigma Aldrich), Folin-Ciocalteu 5%, dan Na₂CO₃ 1M. Untuk penentuan total flavonoid meliputi ekstrak etanol bunga telang, etanol *p.a.*, kuersetin (Sigma Aldrich), alumunium klorida 10%, Asam asetat 5%, dan akuades. Untuk uji aktivitas antibakteri meliputi ekstrak etanol bunga telang perbandingan 1:10 selama 20 menit, alkohol 70%, *blue tip*, NaCl 0,9%, aquadest, *alumunium foil*, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kapas, kertas cakram, kertas payung, ampisilin 10µg, *Muller Hinton Agar* (Merck), *Nutrient Agar* (Merck), *Mc Farland* 0,5, BaCl 1%, H₂SO₄ 1%, dan etanol 70%.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan

a. Determinasi tumbuhan

Determinasi pada bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilaksanakan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Determinasi tumbuhan ini bertujuan untuk meminimalisir terjadinya kesalahan dalam pengambilan sampel.

b. Persiapan sampel

Sampel bunga telang dipanen pada pagi hari, bunga yang dipanen dalam keadaan mekar, tidak berkuncup, masih segar, dan berwarna biru cerah. Sampel yang digunakan sebanyak 7 kg kemudian disortasi kering

dengan memilih bunga yang tidak rusak, dan menghilangkan hama yang ada seperti siput atau serangga. Bunga telang yang sudah disortasi kering dioven dengan suhu 45°C hingga sampel kering atau rapuh ketika dipegang. Pengeringan ini dilaksanakan bertujuan untuk memperoleh simplisia yang tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Sampel yang kering lalu dihaluskan menggunakan blender. Simplisia yang sudah halus diayak dengan menggunakan ayakan ukuran 40 mesh (Unawahi, *et al.*, 2022). Hasil serbuk yang diperoleh sebanyak 667,19 gram.

c. Penentuan kadar air serbuk bunga telang

Dilaksanakan dengan menggunakan alat *Moisture Balance* yang sudah ditara. Masukkan serbuk bunga telang kedalam alumunium pan sebanyak 0,5 gram kemudian ditutup. Pemanasan sampel mulai berjalan yang ditandai dengan munculnya indikator berwarna orange, kemudian ditunggu hingga alat *Moisture Balance* berbunyi dan indikator berwarna hijau. Hasil yang muncul pada *Moisture Balance* dicatat berupa % MC (*Moisture Content*).

d. Desain faktorial

Pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan dua faktor yaitu rasio pelarut dan lama ekstraksi. Perbandingan sampel dengan rasio pelarut terdiri dari 1:5; 1:10; dan 1:15; sedangkan lama ekstraksi terdiri dari 10; 20; dan 30 menit. Setiap rancangan penelitian yang direplikasi sebanyak 3 kali percobaan sehingga percobaan dilakukan sebanyak 27 kali. Rancangan penelitian disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rancangan Penelitian

Rasio Pelarut	Lama ekstraksi (menit)		
1:5	10	20	30
1:10	10	20	30
1:15	10	20	30

2. Pelaksanaan

a. Pembuatan ekstrak bunga telang

Pembuatan ekstrak bunga telang menggunakan perbandingan 1:5; 1:10; dan 1:15. Setiap perbandingan menggunakan serbuk bunga telang sebanyak 10 gram, sehingga etanol 70% pelarut yang digunakan sejumlah

50 mL, 100 mL, dan 150 mL. Serbuk bunga telang yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan dalam labu erlenmeyer dan dilarutkan oleh pelarut sesuai perbandingannya. Ekstraksi dilakukan dengan metode ultrasonik menggunakan *ultrasonic bath* berdasarkan rancangan penelitian pada Tabel 3. Suspensi yang telah didapatkan kemudian disaring menggunakan kertas *whatman* nomor 1 lalu dipisahkan menggunakan *waterbath* untuk menguapkan pelarut dalam sampel hingga terbentuk ekstrak kental (Anjani, 2019). Hasil ekstrak yang sudah kental ditimbang dan dihitung rendemennya. Perhitungan rendemen dilakukan menggunakan persamaan (1).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{Bobot awal simplisia (gram)}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

b. Karakteristik ekstrak etanol bunga telang

1) Uji organoleptik, dilakukan dengan mengamati sifat fisik ekstrak etanol bunga telang, meliputi warna, bau, bentuk, dan rasa (Arifah *et al.*, 2022).

2) Identifikasi alkaloid

Diambil ekstrak sebanyak 50 mg lalu ditambahkan 3 tetes HCl 1%, setelah larut kemudian direaksikan dengan larutan uji Mayer, Wagner dan Dragendroff masing-masing 3 tetes. Hasil positif uji Mayer ditandai dengan adanya endapan, uji Dragendroff ditandai dengan endapan merah kecoklatan dan uji Wagner dengan terbentuknya endapan berwarna coklat (Frisca *et al.*, 2021).

3) Identifikasi flavonoid

Diambil ekstrak sebanyak 50 mg lalu ditambahkan air hangat sebanyak 50 mL dan dididihkan 2 menit kemudian disaring. Filtrat yang sudah didapatkan diambil 10 mL dan ditambah 1 mg magnesium dan HCl pekat sebanyak 1 mL lalu larutan digojok kuat. Adanya flavonoid ditandai oleh terbentuknya larutan warna merah, jingga atau kuning (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

4) Identifikasi fenolik

Ditimbang ekstrak sebanyak 50 mg lalu dilarutkan dalam 5 mL air. Ekstrak yang telah larut dipipet sebanyak 1 mL direaksikan dalam tabung reaksi dengan 3-5 tetes FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna hijau hingga biru kehitaman (Aryantini *et al.*, 2020).

5) Identifikasi tanin

Ditimbang ekstrak sebanyak 50 mg lalu dilarutkan dalam 5 mL air. Ekstrak yang telah larut dipipet sebanyak 3 mL dan tambahkan FeCl_3 10% sebanyak 2 mL. Hasil positif ditunjukkan oleh adanya warna hitam kehijauan atau biru tua (Frisca *et al.*, 2021).

6) Identifikasi saponin

Ekstrak ditimbang sebanyak 50 mg, ditambahkan dengan air hangat 5 mL, kemudian dikocok selama 10 detik secara vertikal lalu didiamkan 10 detik. Positif mengandung saponin ditunjukkan oleh adanya busa yang konstan selama ± 10 menit dengan tinggi 1–10 cm, dan busa tidak menghilang setelah ditambahkan HCl 2 N sebanyak 1 tetes, (Frisca *et al.*, 2021).

c. Total fenolik

Penetapan total kandungan fenolik ekstrak etanol bunga telang, mengacu pada Kemenkes RI, (2017); Andriani & Murtisiwi, (2018); Rizki *et al.*, (2022) dengan menggunakan standar asam galat sebagai baku pembanding dan reagen Folin-Ciocalteu yang sudah dimodifikasi.

1) Pembuatan larutan induk asam galat

Dimasukkan 10 mg asam galat dalam labu takar 10 mL lalu *add* metanol *p.a* sampai tanda batas. Larutan induk yang telah dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan untuk membuat variasi konsentrasi dengan mengambil larutan induk sebanyak 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; dan 0,7 mL kemudian di *add* metanol *p.a* dalam labu takar 5 mL hingga tanda batas. Didapatkan variasi konsentrasi 60; 80; 100; 120; dan 140 ppm.

2) Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat

Larutan standar asam galat pada konsentrasi 100 ppm diukur panjang gelombang maksimumnya dengan mengambil 0,2 mL asam galat konsentrasi 100 ppm dan ditambahkan reagen Folin-Ciocalteau sebanyak 0,1 mL, lalu dikocok dan diamkan 5 menit. Tambahkan Na_2CO_3 7% sebanyak 1 mL dan ditambahkan *water for injection* sebanyak 3,7 mL lalu dikocok sampai tercampur sempurna. Larutan yang sudah dibuat absorbansinya diukur pada rentang λ 600-800 nm.

3) Penentuan *Operating Time* (OT) asam galat

Diambil 0,2 mL larutan standar asam galat konsentrasi 100 ppm lalu tambahkan reagen Folin-Ciocalteau sebanyak 0,1 mL digojok hingga tercampur sempurna kemudian dibiarkan selama 5 menit. Tambahkan Na_2CO_3 7% sebanyak 1 mL dan kemudian ditambahkan *water for injection* sebanyak 3,7 mL. Absorbansinya diukur dengan panjang gelombang maksimum yang sudah didapatkan yaitu 739 nm pada rentang waktu 0-120 menit dan interval waktu 1 menit. Hasil OT yang didapatkan selama 1 jam 30 menit.

4) Pembuatan kurva baku asam galat

Dimasukkan 0,2 mL larutan standar kedalam tabung reaksi dari masing-masing variasi konsentrasi, lalu dicampur dengan reagen Folin-Ciocalteau sebanyak 0,1 mL. Kocok hingga tercampur merata dan dibiarkan selama 5 menit. Tambahkan Na_2CO_3 7% sebanyak 1 mL pada setiap tabung reaksi, kemudian ditambahkan *water for injection* sebanyak 3,7 mL lalu digojok hingga tercampur sempurna dan diamkan pada waktu *Operating Time* yang sudah ditentukan yaitu selama 1 jam 30 menit. Ukur absorbansinya pada λ maksimum yang telah ditetapkan yaitu 739 nm menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Nilai absorbansi yang sudah diperoleh ditentukan regresi linier antara konsentrasi dengan absorbansi, sehingga didapatkan hasil kurva baku dengan persamaan garis $y = bx+a$.

5) Penetapan kadar total fenolik

Ditimbang 0,02 g ekstrak bunga telang dari setiap variasi rasio pelarut dan lama ekstraksi, lalu dilarutkan dengan metanol hingga 5 mL dalam labu takar dan divortex hingga larut sempurna. Saring larutan yang sudah dibuat untuk mendapatkan filtrat menggunakan kertas saring. Larutan uji yang sudah dibuat diambil sebanyak 0,2 mL dan ditambahkan reagen *Folin Ciocalteu* sebanyak 0,1 mL, setelah itu digojok dan diamkan 5 menit. Tambahkan larutan Na_2CO_3 7% sebanyak 1 mL, digojok sampai tercampur sempurna dan diamkan pada waktu *Operating Time* selama 1 jam 30 menit. Ukur absorbansinya dengan λ 739 nm dan diulang sebanyak 3 kali pengulangan dengan konsentrasi fenolik dilihat dari substitusi pada persamaan regresi linear dan dinyatakan sebagai kadar total fenolik ekstrak dalam mgEAG ekstrak.

d. Total flavonoid

Penetapan total kandungan fenolik ekstrak etanol bunga telang, mengacu pada Kemenkes RI, (2017); Aryantini *et al.*, (2020) dengan menggunakan standar kuersetin sebagai baku pembanding dan pereaksi AlCl_3 yang telah dimodifikasi.

1) Pembuatan larutan induk kuersetin

Dimasukkan kuersetin 10 mg ke labu ukur 10 mL lalu *add* etanol *p.a* sampai tanda batas. Larutan induk yang telah dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan untuk membuat variasi konsentrasi dengan mengambil larutan induk sebanyak 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; dan 0,6 mL kemudian di *add* etanol *p.a* dalam labu takar 5 mL hingga tanda batas. Didapatkan variasi konsentrasi 40; 60; 80; 100; dan 120 ppm.

2) Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Larutan standar kuersetin yang sudah dibuat pada konsentrasi 100 ppm diukur panjang gelombang maksimumnya dengan mengambil 0,5 mL standar kuersetin 100 ppm, ditambahkan AlCl_3 10% sebanyak 0,5 mL dan CH_3COOH 5% sebesar 4 mL digojog hingga tercampur

sempurna. Absorbansinya dibaca pada rentang panjang gelombang 400-475 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3) Penentuan *Operating Time* (OT) kuersetin

Diambil 0,5 mL standar kuersetin 100 ppm, ditambahkan AlCl_3 10% sebanyak 0,5 mL dan CH_3COOH 5% sebesar 4 mL digojog hingga tercampur sempurna. Absorbansinya dibaca pada panjang gelombang maksimum yang sudah ditentukan yaitu 415 nm pada rentang waktu 0-60 menit dengan interval waktu 1 menit. Hasil OT kuersetin didapatkan selama 45 menit.

4) Pembuatan kurva baku kuersetin

Diambil 0,5 mL larutan standar dari setiap variasi konsentrasi lalu masukkan dalam tabung reaksi, tambahkan AlCl_3 10% sebanyak 0,5 mL dan CH_3COOH 5% sebesar 4 mL digojog hingga tercampur sempurna. Didiamkan selama *operating time* yang telah ditentukan yaitu 45 menit. Dibaca absorbansi masing-masing konsentrasi dengan panjang gelombang yang sudah ditentukan yaitu 415 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai absorbansi yang sudah diperoleh ditentukan regresi linier antara konsentrasi dengan absorbansi, sehingga didapatkan hasil kurva baku dengan persamaan garis $y = bx+a$.

5) Penetapan kadar total flavonoid

Ditimbang 0,04 g ekstrak bunga telang dari setiap variasi rasio pelarut dan lama ekstraksi dalam labu takar 5 mL lalu ditambahkan etanol *p.a* hingga tanda batas. Vortex sampel hingga melarut sempurna kemudian disaring larutan yang sudah dibuat untuk mendapatkan filtrat menggunakan kertas saring. Diambil larutan uji yang sudah dibuat sejumlah 0,5 mL ditambahkan AlCl_3 10% dan CH_3COOH 5% sebanyak 4 mL digojog hingga tercampur sempurna. Diamkan selama waktu *operating time* yang telah ditetapkan yaitu 45 menit, lalu dibaca absorbansinya pada λ maksimal 415 nm yang sudah ditetapkan dengan spektrofotometer UV-Vis dan percobaan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan dengan konsentrasi flavonoid dilihat dari substitusi pada

persamaan regresi linear dan dinyatakan sebagai kadar total flavonoid ekstrak dalam mgEK ekstrak.

e. Uji Aktivitas Antibakteri

1) Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi ini bertujuan untuk mencegah adanya pencemaran mikroba atau kontaminasi. Sterilisasi alat-alat gelas seperti batang L, *beaker glass*, cawan petri, dan tabung reaksi disterilkan menggunakan oven selama 1 jam pada suhu 171°C. Sebelum alat-alat gelas disterilkan dicuci terlebih dahulu menggunakan air mengalir lalu dikeringkan menggunakan tisu. Alat-alat gelas dibungkus menggunakan kertas payung dan ditutup lubang pada tabung reaksi menggunakan kapas agar terhindar dari kontaminasi setelah keluar dari dalam oven (Aprilia, 2021).

Sterilisasi bahan dilaksanakan pada suhu 121°C menggunakan autoklaf selama 15 menit. Bahan-bahan yang akan disterilkan yaitu media pertumbuhan bakteri, *blue tip*, media uji, NaCl 0,9%, dan aquades. Sterilisasi media bertujuan untuk menjaga media tempat inokulasi bakteri terhindar dari mikroorganisme lain yang dapat mengganggu pertumbuhan bakteri (Aprilia, 2021).

2) Pembuatan media pertumbuhan bakteri

Media pertumbuhan bakteri pada penelitian ini menggunakan media Nutrient agar (NA). Masukkan nutrient agar sebanyak 1,2 g ke dalam labu erlenmeyer. Tambahkan 60 mL akuades untuk melarutkan nutrient agar. Nutrien agar dihomogenkan di atas *hot plate* menggunakan *magnetic stirrer* hingga terlarut sempurna. Media yang sudah dibuat kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Agustin, 2022).

Media untuk uji aktivitas antibakteri menggunakan media *Muller Hinton Agar* (MHA). Media MHA dibuat dengan cara melarutkan 13,94 g MHA dalam 410 mL akuades dalam labu erlenmeyer, kemudian dilarutkan dengan menggunakan *hot plate* dan

magnetic stirrer sampai terlarut sempurna. Sterilkan dengan suhu 121°C menggunakan autoklaf selama 15 menit. Tutup lubang labu erlenmeyer dengan kapas terlebih dahulu dan dibungkus oleh *aluminium foil* sebelum disterilkan.

3) Peremajaan bakteri pada media Nutrient Agar miring

Peremajaan bakteri menggunakan nutrient agar miring. Media nutrien agar yang sudah dibuat dan disterilkan dituang pada tabung reaksi ± sebanyak 5 mL kemudian dimiringkan dan ditunggu hingga memadat. Diambil bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan jarum ose yang sudah disterilkan dengan metode pemijaran api bunsen. Goreskan satu ose bakteri dari biakan murni bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kedalam masing-masing media agar NA yang sudah memadat dengan metode zig-zag, lalu inkubasi bakteri selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C (Agustin, 2022).

4) Pembuatan standar *Mc Farland* 0,5

Campurkan BaCl 1% sejumlah 0,05 mL dengan 9,95 mL H₂SO₄ 1%. Larutan dihomegenkan hingga tercampur sempurna dan didapatkan larutan keruh (Agustin, 2022). Diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada λ 625 nm. Syarat absorbansi standar *Mc Farland* memiliki absorbansi 0,08-0,1. Standar *Mc Farland* yang belum memenuhi syarat, maka diencerkan menggunakan aquades hingga didapatkan absorbansi 0,08-0,1 (Simpson *et al.*, 2014).

5) Penyiapan bakteri uji

Diambil bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari kultur bakteri yang murni sebanyak 1 ose menggunakan jarum ose yang steril lalu ditambahkan NaCl 0,9% sampai didapatkan kekeruhan yang sesuai dengan standar *Mc Farland* 0,5. Larutan standar *Mc Farland* 0,5 sesuai dengan jumlah

bakteri $1,5 \times 10^8$ (CFU)/mL. Jumlah bakteri yang sudah memenuhi syarat untuk uji kepekaan adalah 10^5 - 10^8 CFU/mL (Nor *et al.*, 2018).

6) Pembuatan larutan uji

Larutan uji ekstrak etanol bunga telang dibuat variasi konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%. Variasi konsentrasi tersebut dibuat dengan melarutkan 15 gram ekstrak etanol bunga telang dengan 15 mL aquades steril sebagai larutan stok 100%. Larutan stok 100% yang telah dibuat diencerkan dengan mengambil 1; 2; 3; 4; dan 5 mL dan di add etanol 70% dalam labu takar 5 mL, sehingga didapatkan variasi konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%.

7) Uji aktivitas antibakteri

Media yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah Meller Hinton Agar. Dimasukkan 0,1 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam cawan petri menggunakan mikropipet dan ratakan menggunakan batang L yang sudah disterilkan. Kertas cakram yang akan digunakan direndam di dalam larutan uji ekstrak etanol bunga telang yang telah dibuat dengan variasi konsentrasi selama 10 menit (Nor *et al.*, 2018). Kertas cakram yang sudah direndam diletakkan di atas media MHA yang sudah diinokulasi bakteri. Sebagai kontrol positif menggunakan antibiotik ampisilin 10 μ g dan untuk kontrol negatifnya menggunakan aquadest. Diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C. Zona hambat yang terbentuk berupa area bening pada media kertas cakram diamati dan diukur menggunakan jangka sorong dalam skala mm. Hasil yang diperoleh dihitung rata-ratanya dan ditentukan klasifikasinya.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Nilai absorbansi yang didapatkan dari penentuan total fenolik dan flavonoid dihitung menggunakan rumus persamaan garis linier $y = bx + a$. Hasil yang akan didapatkan berupa nilai x (Kadar/C)

2. Penentuan total fenolik

Total fenolik dihitung menggunakan persamaan (2).

$$TPC = \frac{C.V.Fp}{g} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan :

TPC = *Total Phenolic Content*

C = Konsentrasi fenolik (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

Fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

3. Penentuan total flavonoid

Total flavonoid dihitung menggunakan persamaan (3).

$$TFC = \frac{C.V.Fp}{g} \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan:

TFC = *Total Flavonoid Content*

C = Konsentrasi flavonoid (nilai x)

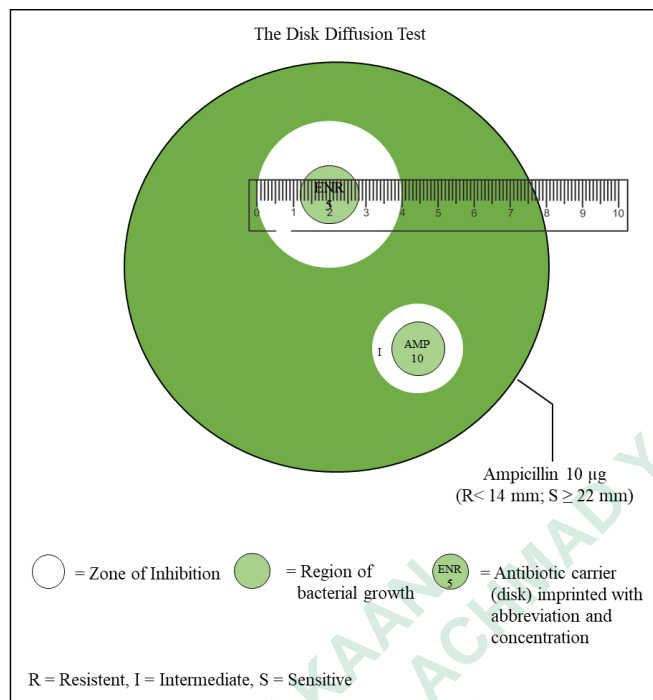
V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

Fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

4. Penentuan aktivitas antibakteri

Aktivitas antibakteri dihitung zona hambatnya menggunakan jangka sorong sesuai pada Gambar 5 pada tiga sisi yaitu horizontal, vertikal dan diagonal. Zona hambat yang didapatkan dihitung rata-ratanya kemudian ditentukan klasifikasinya. Dilanjutkan dengan penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat menghambat bakteri.



Gambar 5. Penentuan Diameter Zona Hambat
(Sumber: Talaro, 2005)

5. Analisis Data

a. Pendekatan teoritis

Data hasil karakteristik ekstrak etanol bunga telang dibandingkan dengan penelitian terdahulu.

b. Analisis kuantitatif

Data hasil penelitian ini dilakukan analisis statistik menggunakan perangkat lunak SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versi 29. Analisis statistik pada kadar total fenolik dan flavonoid dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh variasi rasio pelarut dan lama ekstraksi. Pada analisis statistik diameter zona hambat dilakukan untuk menentukan data dari setiap variasi konsentrasi ekstrak berbeda signifikan atau tidak. Data yang akan dianalisis dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan uji Levene's. Data yang diperoleh kurang dari 50, sehingga digunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas data. Data yang normal apabila nilai signifikan >0,05. Uji homogenitas menggunakan uji Levene's untuk menguji homogenitas varian data dari semua kelompok. Data yang homogen apabila

nilai signifikan $>0,05$. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *one-way* ANOVA. Apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi dengan normal atau tidak terdistribusi homogen maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis*. Adanya perbedaan yang signifikan pada setiap data dilihat dari nilai $\text{sig} < 0,05$.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA