

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan metode eksperimental laboratorium yaitu penelitian dari sampel bunga telang menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Hasil kualitatif dinyatakan dengan nilai Rf dimana pada KLT terlihat adanya noda bercak flavonoid dan fenolik total menunjukkan nilai Rf yang sama atau memiliki karakteristik yang mirip dengan pembandingnya. Hasil kuantitatif dinyatakan dalam angka sebagai nilai kadar total fenolik dan flavonoid yang terdapat pada bunga telang sebagai senyawa metabolit sekunder.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Kemudian, dilanjutkan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta untuk dilakukan analisis.

2. Waktu

Penelitian dilaksanakan dari bulan April - Juni 2023.

C. Sampel

Digunakan sampel untuk penelitian yaitu pada bagian bunga telang (*C. ternatea* L.) berwarna ungu yang dipilih kondisi bunganya masih dalam keadaan segar dan mekar. Sampel bunga diperoleh dari Desa Sirat RT 03, Palihan, Sidomulyo, Kecamatan Bambanglipuro, Kabupaten Bantul pada ketinggian 15 Mdpl dengan masa panen 20-30 hari yang dipanen pada bulan Februari 2023.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak bunga telang, komposisi fase gerak.
2. Variabel terikat pada penelitian ini adalah penentuan nilai Rf, kadar flavonoid dan fenolik total.

3. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah waktu panen, suhu pengeringan, usia panen, dan variasi waktu ekstraksi dengan sonikator.

E. Definisi Operasional

1. Bunga telang
Bunga yang akan digunakan yaitu spesies *C. ternatea* L. warna ungu kebiruan dengan diambil seluruh bagian bunga, serta dipilih yang masih segar, mekar, dan tidak ada serangga atau pengotor lain.
2. Uji KLT
Pengujian dilakukan menggunakan lempeng KLT dengan mengukur nilai Rf dari penotolan standar maupun sampel uji. Kemudian, noda hasil penotolan dideteksi dengan sinar tampak.
3. Kadar flavonoid
Kadar flavonoid dinyatakan dalam satuan mg QE (*Quercetin Equivalent*)/gram sampel dengan menggunakan standar baku kuersetin.
4. Kadar fenolik total
Kadar fenolik total dinyatakan dalam satuan mg GAE (*Gallic Acid Equivalent*)/gram sampel dengan menggunakan standar baku asam galat.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Proses ekstraksi: ayakan 40 mesh, botol duran 500 mL, corong buchner, gelas ukur, grinder, penangas air, sonikator (*Cole Parmer Waterbath Sonicator*), timbangan analitik
 - b. Uji KLT: bejana, mikropipet, oven, penggaris, pensil, sinar tampak UV 254 dan 366 nm
 - c. Analisis kadar flavonoid dan fenolik total: flakon, kaca arloji, gelas beaker, labu takar, mikropipet, pipet tetes, spektrofotometer UV-Vis, tabung reaksi, vortex
2. Bahan
 - a. Proses ekstraksi: bunga telang diambil bagian bunga yang utuh, mekar, segar, dan tidak ada pengotor, etanol 70%

- b. Uji KLT: *plate silica gel* GF254, etanol: etil asetat: kloroform (fase gerak flavonoid), n-heksan: etil asetat: etanol (fase gerak fenolik), *white tip*.
- c. Analisis kadar flavonoid dan fenolik total: *blue tip*, kuersetin, AlCl_3 , asam galat, etanol *p.a.*, reagen Folin Ciocalteu.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengumpulan bahan dan determinasi tanaman telang

Bunga telang yang diambil yaitu bagian bunga secara keseluruhan, dari bagian dasar bunga sampai mahkota bunga, dipilih bunga yang segar yang mekar, dengan umur tanaman 20-30 hari. Kemudian, dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Tujuan dari determinasi tanaman bunga telang yaitu untuk mengetahui kebenaran spesies bunga telang yang akan digunakan pada penelitian ini.

2. Persiapan sampel

Bunga telang yang diambil secara keseluruhan kemudian dilakukan sortasi basah. Selanjutnya, dilakukan pencucian sampel hingga bersih dengan menggunakan air mengalir, kemudian ditiriskan dan di sortasi kering. Selanjutnya, dilakukan pengeringan sampel dengan cara di oven pada suhu 50°C selama 48 jam hingga diperoleh simplisia kering bunga telang. Setelah itu, dibuat serbuk dari simplisia kering bunga telang dengan menggunakan grinder dan diayak dengan ayakan 40 mesh hingga halus.

3. Pembuatan ekstrak dari bunga telang

Serbuk bunga telang ditimbang sebanyak 15 gram, lalu dimasukkan ke dalam botol duran dengan ditambahkan etanol 70% sebanyak 150 mL. Kemudian, serbuk dihomogenkan dan dimasukkan dalam sonikator untuk diradiasi dengan variasi waktu ekstraksi pada suhu 45°C . Filtrat serbuk bunga telang tersebut kemudian disaring lalu diuapkan dengan penangas air pada suhu 45°C dan hasilnya berupa ekstrak kental bunga telang (Ananingsih et al., 2020).

Tabel 2. Variasi Lama Waktu Ekstraksi

No.	Waktu
1.	15 menit
2.	30 menit
3.	45 menit
4.	60 menit
5.	75 menit
6.	90 menit

7. Uji KLT

a. Preparasi sampel

Dilakukan preparasi sampel dengan melarutkan ekstrak kental tiap variasi waktu sebanyak 250 mg dalam 5 ml etanol *p.a.* (50.000 ppm) lalu disaring dengan kertas saring untuk didapatkan filtrat jernih agar tidak mempengaruhi penotolan pada plat KLT.

b. Preparasi fase gerak

Fasa gerak tiap kelompok senyawa dibedakan berdasarkan golongannya, pada golongan flavonoid digunakan optimasi fase gerak pada **Tabel 3**. Sedangkan, pada uji fenolik dilakukan optimasi fase gerak seperti pada tabel 4. Setiap campuran fase gerak dimasukkan dalam bejana hingga jenuh.

Tabel 3. Optimasi Fase Gerak pada KLT Uji Senyawa Flavonoid

Percobaan	Fase gerak	Volume (mL)	Literatur
1.	n-butanol: asam asetat: air	4: 1: 5	Apriani & Pratiwi, 2021
2.	n-heksan: etil asetat	3: 7	Kinam <i>et al.</i> , 2021
3.	n-heksan: etil asetat: metanol: air	6,5: 2,5: 1: 0,5	Ramlah <i>et al.</i> , 2019
4.	etanol: etil asetat: kloroform	1,5: 2: 8,5	Asma <i>et al.</i> , 2022
5.	n-heksan: etil asetat: metanol	1: 8: 1	Asma <i>et al.</i> , 2022

Tabel 4. Optimasi Fase Gerak pada KLT Uji Senyawa Fenolik

Percobaan	Fase gerak	Volume (mL)	Literatur
1.	n-heksan: etil asetat: metanol	1: 8: 1	Asma <i>et al.</i> , 2022
2.	n-heksan: etil asetat: etanol	1: 8: 1 2: 7: 2	Asma <i>et al.</i> , 2022 dengan modifikasi
3.	n-heksan: etil asetat	7: 3	Kinam <i>et al.</i> , 2021
4.	n-butanol: asam asetat: air	4: 1: 5 3: 1: 1	Apriani & Pratiwi, 2021 dengan modifikasi

Percobaan	Fase gerak	Volume (mL)	Literatur
5.	kloroform: etil asetat	7: 3	Kinam <i>et al.</i> , 2021

c. Preparasi fase diam

Disiapkan lempeng KLT *silica gel* GF254 dengan diberi garis batas dan jarak 1 cm pada bagian dasar lempeng dan 1 cm dari sisi atas lempeng KLT dengan pensil. Lempeng KLT diaktifkan dengan dimasukkan ke oven di suhu 100°C selama 45 menit agar terhindar dari kontaminasi, kadar air maupun pengotor lain (Asma *et al.*, 2022).

d. Perlakuan pada KLT

Ditotolkan sampel di lempeng KLT yang telah diaktifkan sebanyak 5 kali pada uji flavonoid dan 10 kali pada uji fenolik sedangkan standar ditotolkan hanya 1 kali menggunakan *white tip* dengan 1 penotolan setara dengan 3 μ L. Kemudian dielusi dalam bejana yang telah dijenuhkan sebelumnya dengan fase geraknya selama \pm 20 menit hingga plat KLT terelusi sampai tanda batas atas. Selanjutnya, lempeng KLT dikeluarkan dari bejana dan dikeringkan pada suhu ruang (Asma *et al.*, 2022).

e. Pengamatan

Sampel yang telah ditotolkan pada plat KLT dielusi dengan fase gerak yang telah dipreparasi. Setelah lempeng KLT kering, deteksi noda dilakukan dengan sinar tampak, UV 254 dan 365 nm. Hasil positif senyawa flavonoid apabila terdapat noda kuning/oranye dan dibandingkan jarak elusi antara standar dengan sampelnya. Hasil positif fenolik jika terdapat bercak hitam dan dibandingkan hasilnya dengan standarnya yaitu asam galat (Khoirunnisa *et al.*, 2019).

8. Uji penentuan kadar flavonoid

a. Pembuatan kurva baku

Kurva baku dibuat menggunakan standar kuersetin 1000 ppm sebagai induk standar dengan ditimbang sebanyak 10 mg kuersetin dalam 10 ml etanol *p.a.* kemudian diencerkan menjadi seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm (Candra *et al.*, 2021).

b. Penentuan λ maksimum

Dilakukan *skrining* pada rentang 375-450 nm dengan larutan uji konsentrasi 60 ppm. Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan 60 ppm lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambah dengan 0,5 mL AlCl_3 2% dan 4 mL asam asetat 5%. Didapatkan λ maksimum jika absorbansi tertinggi berada pada puncaknya sehingga panjang gelombang tersebut dikatakan λ_{maks} (Khoirunnisa *et al.*, 2019).

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Dilakukan *time scanning* pada konsentrasi 60 ppm yang sudah direaksikan dalam rentang waktu 0 hingga 60 menit yang diukur pada λ maksimum yang telah didapatkan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Candra *et al.*, 2021).

d. Penentuan regresi linear

Data absorbansi dimasukkan dalam persamaan regresi linear yang diperoleh dari kurva baku dengan linearitas ditentukan dengan persamaan regresi konsentrasi vs absorbansi yaitu $y = bx + a$. Persamaan regresi ini dapat digunakan jika faktor korelasinya 0,99 dan $r \leq 1$. Dikarenakan hubungan linear dikatakan ideal jika memiliki nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung arah garis (Haresmita & Pradani, 2022).

e. Penentuan kadar flavonoid

Masing-masing sampel variasi waktu ekstraksi ditimbang sebanyak 0,1 gram ad 10 mL etanol. Dari induk sampel tersebut disaring hingga didapatkan filtrat jernih. Dilakukan pengenceran menjadi 5000 ppm lalu dipipet sebanyak 0,5 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambah dengan 0,5 mL AlCl_3 2% dan 4 mL asam asetat 5%. Dihomogenkan lalu didiamkan selama *operating time* pada suhu kamar. Diukur serapannya pada λ maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Dilakukan pengulangan uji sebanyak 2 kali (triplo) (Ipandi *et al.*, 2016).

9. Uji penentuan kadar fenolik total

a. Pembuatan kurva baku

Dibuat kurva baku dengan variasi konsentrasi 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm pada standar asam galat. Pembuatan dilakukan dengan cara membuat induk baku yang ditimbang sebanyak 10 mg asam galat. Kemudian diencerkan dengan akuades dalam labu takar 10 mL dan dibuat seri kadar konsentrasi 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm (Candra *et al.*, 2021).

b. Penentuan λ maksimum

Dilakukan *skrining* pada rentang 600-800 nm dengan larutan uji konsentrasi 60 ppm. Pada seri kadar 60 ppm dipipet sebanyak 0,25 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambah 0,25 mL reagen Folin Ciocalteu. Larutan divortex lalu ditambah 0,5 mL pelarut Na_2CO_3 35 % dan di ad 5 ml akuades. Didapatkan λ maksimum jika absorbansi tertinggi berada pada puncaknya sehingga panjang gelombang tersebut dikatakan λ_{maks} (Kusumaningsih *et al.*, 2015).

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Dilakukan *time scanning* pada konsentrasi 60 ppm yang sudah direaksikan dalam rentang waktu 0 hingga 60 menit yang diukur pada λ maksimum yang telah didapatkan dengan instrumen spektrofotometer UV-Vis (Candra *et al.*, 2021).

d. Penentuan regresi linear

Data absorbansi dimasukkan dalam persamaan regresi linear yang diperoleh dari kurva baku dengan linearitas ditentukan dengan persamaan regresi konsentrasi vs absorbansi yaitu $y = a + bx$. Persamaan regresi ini dapat digunakan jika faktor korelasinya 0,99 dan $r \leq 1$. Hubungan linear dikatakan ideal jika memiliki nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung arah garis (Haresmita & Pradani, 2022).

e. Penentuan kadar fenolik total

Masing-masing sampel variasi waktu ekstraksi ditimbang sebanyak 0,025 g dipipet sebanyak 0,25 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambah 0,25 mL reagen Folin Ciocalteu. Larutan divortex lalu ditambah 0,5 mL pelarut Na_2CO_3 35 % dan di ad 5 ml akuades. Kemudian, diinkubasi selama

operating time pada suhu kamar. Serapannya diukur pada λ maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Dilakukan pengulangan uji sebanyak 2 kali (triplo) (Kusumaningsih *et al.*, 2015).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan nilai Rf pada plat KLT

Kromatografi lapis tipis dilakukan pembacaan pada noda yang muncul, dilakukan pembacaan pada UV 254 dan 366 nm, dilakukan perhitungan nilai *Rf* pada masing-masing noda sampel dan standar. Kemudian, dibandingkan nilai *Rf* antara sampel dan standar. Nilai *Rf* sampel dan standar saling mendekati atau sejajar mengindikasikan adanya senyawa serupa ataupun mirip.

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh analit}}{\text{jarak yang ditempuh eluen}}$$

Keterangan:

Rf = *Retention Factor* atau Faktor Retensi

2. Penentuan kadar flavonoid

Absorbansi larutan uji diukur pada λ maksimum. Penentuan senyawa flavonoid ditentukan dengan rumus sebagai berikut (Candra *et al.*, 2021).

$$TFC = \frac{C \cdot V \cdot fp}{g}$$

Keterangan:

TFC = *Total Flavonoid Content* (mg QE/gram)

C = konsentrasi fenolik (nilai x)

V = volume ekstrak yang digunakan (mL)

Fp = faktor pengenceran

g = berat sampel yang digunakan (g)

3. Penentuan kadar fenolik total

Absorbansi larutan uji diukur pada λ maksimum. Penentuan senyawa fenolik total menggunakan rumus berikut (Candra *et al.*, 2021).

$$TPC = \frac{C \cdot V \cdot fp}{g}$$

Keterangan:

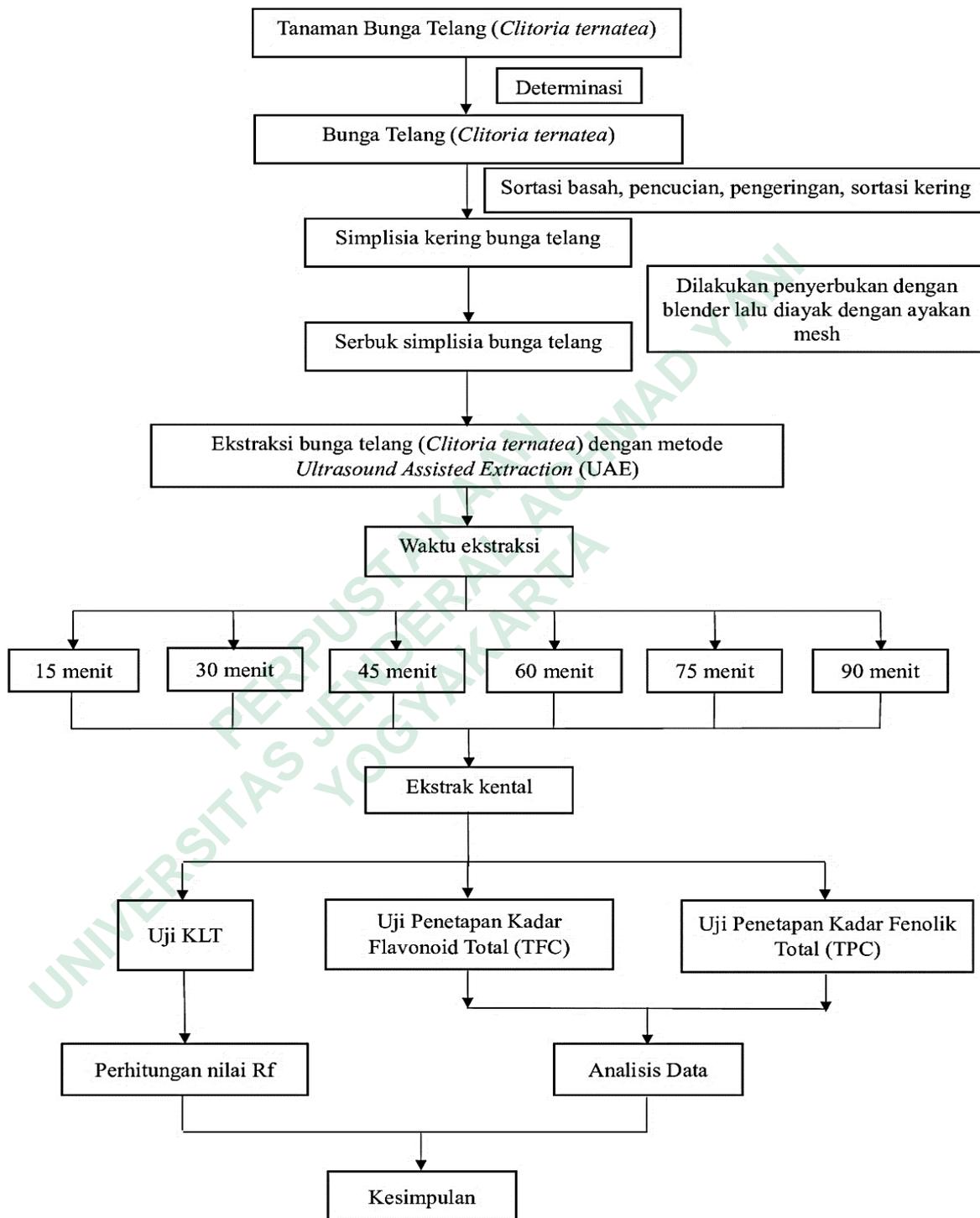
TPC = *Total Phenolic Content* (mg GAE/g)

- C = konsentrasi fenolik (nilai x)
V = volume ekstrak yang digunakan (mL)
Fp = faktor pengenceran
g = berat sampel yang digunakan (g)

4. Analisis statistika

Dilakukan analisis statistika pada hasil data kadar flavonoid dan fenolik total menggunakan *software* SPSS untuk mengetahui apakah data telah homogen dan terdistribusi normal atau tidak. Data kadar flavonoid dan fenolik total diuji homogenitasnya menggunakan *Levene test* sedangkan untuk uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk*. Kedua uji tersebut dapat dilihat kesignifikannya yaitu $p > 0,05$ dan dilanjutkan dengan uji non parametrik. Uji non parametrik yang digunakan adalah uji Kruskal Wallis yang merupakan langkah alternatif untuk uji *One-Way ANOVA* setelah diketahui data yang didapatkan tidak homogen dan atau terdistribusi normal. Syarat uji Kruskal Wallis agar signifikan terdapat perbedaan yaitu $< 0,05$. Dilanjutkan dengan uji *Pairwise Comparison* dengan mengetahui ada tidaknya pengaruh atau perbedaan dari variasi data.

I. Skema Pelaksanaan Penelitian



Gambar 7. Skema Pelaksanaan Kerja