

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini merupakan desain penelitian eksperimental dengan metode kualitatif dan kuantitatif. Metode uji kualitatif menggunakan uji tabung fenolik, flavonoid, saponin, tannin, alkaloid, steroid serta terpenoid. Uji Kualitatif digunakan untuk melihat ada atau tidaknya kandungan fenolik dan flavonoid, saponin, tannin, alkaloid, steroid serta terpenoid. Uji tabung dilakukan dengan menambahkan pereaksi dan melihat hasilnya dari warna yang ditimbulkan setelah pemberian reagen.

Metode uji kuantitatif yang digunakan adalah metode uji antioksidan dengan metode DPPH dengan standar vitamin C, uji fenolik dengan standar asam galat dan uji flavonoid dengan standar *quercetin*. Uji kuantitatif antioksidan digunakan untuk melihat aktivitas antioksidan. Data yang didapatkan dari uji antioksidan berupa nilai IC_{50} . Uji kuantitatif fenolik dan flavonoid digunakan untuk melihat berapakah kandungan asam galat dan *quercetin* yang ada dalam sampel. Data yang didapatkan berupa berapa mg/ml kandungan asam galat dan *quercetin*.

Uji kualitatif dan kuantitatif tersebut dilanjutkan dengan pengolahan data. Data akhir yang didapatkan dari uji kualitatif dapat ditarik kesimpulan apakah senyawa tersebut terkandung dalam sampel. Data yang diperoleh dari uji kuantitatif dianalisis nilai distribusi normal dan homogenitasnya menggunakan aplikasi SPSS.

B. Lokasi dan Waktu

Lokasi penelitian bertempat di laboratorium Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2022.

C. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah

1. Teh bunga krisantemum seduh merk D dengan tanggal produksi Januari 2022 dan tanggal kadaluwarsa Januari 2023, teh ini berbentuk bunga krisantemum yang dikeringkan dan disajikan dengan cara diseduh menggunakan air hangat.
2. Minuman serbuk granul bunga krisantemum merk S dengan kode produksi FA 062104 dan tanggal kadaluwarsa Juni 2025.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah variasi sampel yang digunakan dan variasi konsentrasi dalam uji DPPH.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan adalah nilai aktivitas antioksidan berupa nilai IC_{50} dalam sampel dan kadar fenolik dan flavonoid.

3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah minuman yang berbahan utama bunga krisantemum.

E. Definisi Operasional

1. Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan adalah kemampuan antioksidan yang dimiliki sampel untuk mengikat radikal bebas dari DPPH yang dilihat dengan parameter IC_{50} .

2. Parameter uji kuantitatif flavonoid dinyatakan dalam *Quercetin Equivalent* (QE)/g.
3. Parameter uji kuantitatif fenolik dinyatakan dalam *Gallic Acid Equivalent* (GAE)/g.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat gelas merk Iwaki, Timbangan analitik merk Ohaus, Spektrofotometri UV-Vis merk Thermo Scientific Genesys, Kuvet, Penangas Air, propipet merk eppendorf, *blue tip*.

2. Bahan

Aquadest, Metanol (p.a), etanol (p.a), etanol 70% (teknis), teh bunga krisantemum seduh merk D dan minuman serbuk granul bunga krisantemum merk S, DPPH, *Quercetin*, Vitamin C, Asam Galat, FeCl_3 , H_2SO_4 , Pereaksi Wagner, AlCl_3 , pereaksi Follin-Ciocalteu, Na_2CO_3 , pereaksi Lieberman Burchard, *water for injection*, asam asetat.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan bahan

Mencari sampel minuman teh seduh bunga krisantemum merk D (bunga yang dikeringkan disajikan dengan cara diseduh dengan air hangat) dan minuman serbuk granul bunga krisantemum merk S di toko obat dan *online shop* yang ada di Indonesia.

2. Ekstraksi bunga krisan kering

Ekstraksi yang digunakan menggunakan metode maserasi dengan menghaluskan sampel teh bunga krisantemum, maserasi menggunakan pelarut etanol. Kemudian sampel direndam ke dalam bejana maserasi menggunakan pelarut dengan perbandingan 1:10. Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam di dalam tempat gelap sambil diaduk sesekali. Berikutnya dilakukan remaserasi 2 kali dan diambil filtrat. Untuk memperoleh ekstrak kental dilakukan penguapan dengan suhu $50^\circ - 70^\circ\text{C}$.

3. Preparasi sampel

a. Teh seduh Bunga Krisantemum

5 mg ekstrak bunga krisantemum dengan 50 ml air hangat 1000 ppm. (Ramadan-hassanien, 2008).

b. Minuman serbuk granul Bunga Krisantemum

2,22 g minuman serbuk granul bunga krisantemum dilarutkan dalam 10 ml air hangat sehingga diperoleh konsentrasi 10.000 ppm.

4. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Tabung Flavonoid

Ditambahkan 1-2 tetes H_2SO_4 pada 5ml sampel. Jika terjadi perubahan warna pada larutan ekstrak warna merah setelah penambahan H_2SO_4 , maka ekstrak positif flavonoid (Alviana, 2016).

b. Uji Tabung Fenolik

Ditambahkan beberapa tetes $FeCl_3$ 1% ke dalam sampel hingga berubah warna. Jika warna kehitaman maka positif mengandung fenolik (Widyowati *et al.*, 2014).

c. Uji Tabung Saponin

Didihkan 2 ml sampel dengan 10 ml air dalam penangas air. Digojok hingga berbusa, didiamkan 15 menit jika busa tetap maka positif mengandung saponin (Widyowati *et al.*, 2014).

d. Uji Tabung Alkaloid

Ditambahkan 1 ml sampel dengan 2 tetes pereaksi wagner, hasil positif mengandung alkaloid jika terdapat endapan berwarna coklat dan negatif jika terjadi perubahan warna (Widyowati *et al.*, 2014).

e. Uji Tabung Terpenoid dan Steroid

Ditambahkan pereaksi Lieberman Burchard (3 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat). Dalam 2 ml sampel. Jika timbul warna merah atau ungu artinya positif terpenoid. Tetapi apabila terbentuk warna hijau artinya positif steroid (Alviana, 2016).

f. Uji Tabung Tanin

Ditambahkan 2 ml sampel dengan 2 tetes FeCl 1%. Hasil positif jika menimbulkan warna hijau kebiruan (Alviana, 2016).

5. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan DPPH

Dibuat larutan DPPH dengan konsentrasi 10^{-4} M menggunakan metanol. Disimpan dalam ruangan gelap (Ramadan-hassanien, 2008).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Dimasukkan 2 ml larutan DPPH ditambahkan dengan 400 μ l larutan vitamin C ke dalam kuvet, dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 400-600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis Single beam (Dua *et al.*, 2015) (Nurhasanah *et al.*, 2021).

c. Penentuan *Operating Time*

Diamati larutan DPPH sampai mencapai panjang gelombang maksimal yaitu 515 nm selama 0-40 menit (Dua *et al.*, 2015)(Nurhasanah *et al.*, 2021).

d. Pembuatan kurva baku

Dilartukan vitamin C 0,5 mg dalam 50 ml metanol, diperoleh hasil 100 ppm. Berikutnya dibuat seri konsentrasi dengan cara dipipet masing – masing 0,5; 1; 1,5; 2 dan 2,5 ml larutan induk ke dalam 5 ml metanol sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 10, 20, 30,40 dan 50 ppm dan didiamkan selama *operating time* (Widyowati *et al.*, 2014).

Dibuat kurva baku dengan standar vitamin C menggunakan seri konsentrasi kemudian dibaca nilai absorbansinya dengan panjang gelombang maksimal nm. Berikutnya dibuat persamaan $Y = bx + a$, dengan $y =$ nilai absorbansi dan $x =$ kadar terukur.

e. Pembuatan sampel larutan uji

1) Pembuatan larutan seri

a) Teh seduh bunga Krisantemum

Dipipet 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 ml larutan induk ke dalam 10 ml metanol sehingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250 ppm.

b) Minuman serbuk granul bunga krisantemum

Dipipet 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 ml ke dalam 5 ml metanol sehingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ppm.

f. Pembacaan absorbansi sampel dan vitamin C

Dicampurkan 400 μ l sampel dengan 2000 μ l larutan DPPH setelah itu di inkubasi dalam ruangan gelap dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang yang telah didapatkan. (Ramadan-hassanien, 2008) (Aritonang, 2019).

6. Uji kuantitatif flavonoid.

a. Penentuan panjang gelombang maksimal

Ditentukan *operating time* menggunakan 1 ml larutan *quercetin* yang ditambahkan dengan 1 ml larutan $AlCl_3$ 10% dan 8 ml asam asetat 5%, berikutnya dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV- Vis single beam dengan panjang gelombang antara 500-800 nm.

b. Penentuan *operating time*

Dibaca 1 ml larutan *quercetin* yang ditambahkan dengan 1 ml larutan $AlCl_3$ 10% dan 8 ml asam asetat 5%, dengan panjang gelombang maksimal nm selama 0-60 menit.

c. Pembuatan larutan standar

Ditambahkan 10 mg *quercetin* dalam 10 ml etanol p.a. dibuat seri konsentrasi 40, 60, 80, 100, 120, 140 ppm.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA
PERPUSTAKAAN

d. Pembuatan kurva baku

Dibuat kurva baku dengan standar *quercetin* menggunakan seri konsentrasi kemudian dibaca nilai absorbansinya dengan panjang gelombang maksimal. Berikutnya dibuat persamaan $Y = bx + a$, dengan y = nilai absorbansi dan x = kadar terukur.

e. Pembuatan sampel

Dicampurkan Dibaca 1 ml larutan sampel yang ditambahkan dengan 1 ml larutan $AlCl_3$ 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Dilakukan inkubasi sesuai dengan *operating time* dan dibaca absorbansinya (Chen et al., 2021).

f. Penetapan total flavonoid

Dibaca absorbansi sampel pada panjang gelombang maksimal. Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai mg ekivalen *quercetin* mg/mL sampel (Mondong et al., 2015).

7. Uji Kuantitatif Fenolik

a. Panjang gelombang maksimal

Ditentukan *operating time* menggunakan 0,1 ml larutan asam galat, 0,1 ml reagen Folin-Ciocalteu dan 1 ml larutan Na_2CO_3 7% kemudian ditambahkan *water for injection* hingga 5 ml, berikutnya dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV - Vis dengan panjang gelombang antara 400 – 800 nm (Djuleng, 2021).

b. Penentuan *operating time*

Diamati 0,1 ml larutan asam galat, 0,1 ml reagen Folin-Ciocalteu dan 1 ml larutan Na_2CO_3 7% kemudian ditambahkan *water for injection* hingga 5 ml dengan panjang gelombang maksimal selama 0-120 menit.

c. Pembuatan larutan standar

Dilartukan 10 mg Asam galat dalam 10 ml metanol p.a Dibuat seri konsentrasi menjadi 100, 150, 200, 250, 300, 350 ppm.

d. Pembuatan kurva baku

Dibuat kurva baku dengan standar *quercetin* menggunakan seri konsentrasi kemudian dibaca nilai absorbansinya dengan panjang gelombang maksimal. Berikutnya dibuat persamaan $Y = bx + a$, dengan y = nilai absorbansi dan x = kadar terukur.

e. Pembuatan sampel

Dilartukan 0,1 ml larutan sampel dengan 0,1 ml reagen Folin-Ciocalteu dan 1 ml larutan Na_2CO_3 7% kemudian ditambahkan *water for injection* hingga 5 ml. Dilakukan inkubasi sesuai *operating time*.

f. Penetapan total fenolik.

Dibaca absorbansi sampel pada panjang gelombang maksimal. Kandungan total fenolik dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat mg/mL sampel. (Mondong et al., 2015)

H. Metode Pengolahan dan Hasil Data

1. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Data yang telah dikumpulkan dan diperoleh dianalisis aktivitas antioksidannya dengan menghitung % inhibisi menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

kemudian dimasukkan dalam persamaan regresi liniernya dan dihitung nilai % IC_{50} . Dihitung nilai IC_{50} dengan persamaan regresi linier dengan $y = 50$ dan $x = \text{nilai } \text{IC}_{50}$. Kekuatan antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} dengan kategori seperti dalam tabel 2. Berikutnya dibuat kesimpulan sampel yang memiliki nilai aktivitas antioksidan terbaik.

Tabel 1. Kategori Aktivitas Antioksidan

Intensitas Antioksidan	Nilai IC₅₀ (µg/ml)
Sangat Kuat	<50
Kuat	50 – 100
Sedang	100 – 250
Lemah	250 – 500
Sangat lemah	>500

(Sumber : Molyneux, 2018)

2. Penentuan Kandungan Flavonoid

Data yang telah dikumpulkan kemudian dihitung kandungan flavonoidnya menggunakan kurva baku *quercetin* yang telah dibuat menggunakan rumus $Y = bx + a$, dengan y = nilai absorbansi dan x = kadar terukur. Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai mg ekivalen *quercetin* sampel.

3. Penentuan Kandungan Fenolik

Data yang telah dikumpulkan kemudian dihitung kandungan fenoliknya menggunakan kurva baku asam galat yang telah dibuat menggunakan rumus $Y = bx + a$, dengan y = nilai absorbansi dan x = kadar terukur. Kandungan total fenolik dinyatakan sebagai mg ekivalen asam galat sampel

4. Analisis SPSS

Berikutnya diuji normalitasnya menggunakan SPSS meliputi nilai distribusi normal dengan metode Shapiro Wilk karena sampel hanya sedikit (>50), uji ini digunakan untuk melihat sebaran data acak dari data. Jika nilainya >0,5 maka nilai terdistribusi normal. Uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan uji Levene's. Jika data terdistribusi normal dan homogen kemudian dilanjutkan dengan menggunakan uji independent T test untuk fenolik dan flavonoid karena hanya 2 kelompok data. Uji Mann-Whitney untuk antioksidan dilakukan karena data tidak homogen.