

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Metode eksperimental di laboratorium adalah metode yang digunakan dalam melakukan penelitian kuantitatif pada penelitian ini yaitu dengan menggunakan sampel bunga telang dan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Nilai kuantitatif dari penelitian ini ditunjukkan dalam bentuk angka sebagai nilai kadar fenolik total pada bunga telang. Desain penelitian dirancang menggunakan program *Design-Expert 13* dengan RSM *Box-Behnken Design*.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

1. Lokasi

Determinasi sampel penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Kemudian, dilanjutkan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta untuk dilakukan analisis.

2. Waktu

Penelitian dilakukan dari bulan Februari-April 2025.

#### **C. Sampel**

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) berwarna ungu yang diambil bagian mahkota dan kelopak dan dipilih yang mekar, segar, tidak ada pengotor dan serangga yang dipanen di pagi hari dari kebun budidaya bunga telang di Desa Kepuh Kulon RT 03, Wirokerten, Banguntapan, Bantul.

#### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel independen pada penelitian ini yaitu rasio bahan-pelarut (X1), rasio etanol-aquadest (X2), dan waktu ekstraksi (X3).
2. Variabel dependen pada penelitian ini adalah kadar total fenolik (Y).

3. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah waktu panen dan suhu pengeringan.

### **E. Definisi Operasional**

1. Kadar fenolik total

Kadar fenolik total diukur dalam satuan mg GAE (*Gallic Acid Equivalent*)/gram sampel dengan menggunakan standar baku asam galat.

2. Kondisi ekstraksi

Kondisi ekstraksi yang dioptimasi adalah perbedaan rasio bahan-pelarut, rasio etanol-aquadest, dan waktu ekstraksi yang nilainya ditentukan berdasarkan RSM melalui program *Design-Expert* 13.

### **F. Alat dan Bahan**

1. Alat

Ayakan 40 mesh, corong kaca, erlenmeyer 250 mL, flakon, gelas beaker, gelas ukur, grinder, labu takar, mikropipet, penangas air, pipet tetes, rak tabung reaksi, sonikator frekuensi 40 kHz (*Cole Parmer Waterbath Sonicator*), Spektrofotometer UV-Vis Genesys, tabung reaksi, timbangan analitik (Ohaus), vortex.

2. Bahan

Aquadest, asam galat *p.a*, blue tip, bunga telang, etanol *p.a* 50%; 100%, FeCl<sub>3</sub> 5% (*Merck p.a*), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 35% (*Merck p.a*), reagen Folin-Ciocalteu (*Merck p.a*).

### **G. Pelaksanaan Penelitian**

1. Pengumpulan bahan dan determinasi tanaman telang

Bunga telang yang telah diambil selanjutnya dilakukan identifikasi tanaman di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan. Tujuan identifikasi ini adalah untuk memastikan spesies bunga telang yang akan digunakan dalam penelitian.

## 2. Persiapan sampel

Bunga telang yang telah diambil kemudian disortasi basah. Setelah itu, bunga dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan, dan disortasi kering. Bunga yang sudah bersih dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C hingga menjadi simplisia kering. Simplisia tersebut kemudian diserbukkan menggunakan grinder dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh.

## 3. Pembuatan ekstrak bunga telang

Pembuatan ekstrak bunga telang berdasarkan kombinasi faktor ekstraksi yang dapat dilihat pada **Tabel 2**. Variasi dari rasio bahan-pelarut, rasio etanol-akuades, dan waktu ekstraksi pada kondisi setiap level mengikuti pemodelan RSM. Faktor-faktor ekstraksi beserta level yang dipilih dalam penelitian ini didasarkan pada pertimbangan bahwa parameter-parameter tersebut memiliki pengaruh signifikan terhadap hasil ekstraksi. Pemilihan ini juga didukung oleh penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Rosidah *et al.*, (2017).

**Tabel 2. Kombinasi Tiga Variabel dan Tiga Tingkat Kombinasi dengan *Box-Behnken Design* (BBD)**

Faktor	Level		
	-1	0	1
Rasio Bahan-Pelarut	5	10	15
Rasio Etanol-Akuades	0	50	100
Waktu Ekstraksi (Menit)	20	40	60

## 4. Identifikasi fenolik

Diambil 1 mL ekstrak bunga telang dari hasil ekstraksi semua *batch* yang tertera pada **Tabel 3**. Direaksikan dengan FeCl<sub>3</sub> 5% 2 tetes. Setelah itu, diamati perubahan warna yang terjadi apabila berubah warna menjadi hijau kehitaman menunjukkan ekstrak bunga telang positif mengandung fenolik (Manongko *et al.*, 2020).

## 5. Optimasi ekstraksi bunga telang

Ditimbang sampel bunga telang berdasarkan variasi rasio bahan-pelarut, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 150 mL etanol

dengan berbagai variasi rasio etanol-akuades. Setelah itu, campuran dihomogenkan dan diekstraksi menggunakan sonikator sesuai variasi waktu ekstraksi pada suhu 50°C. Filtrat serbuk yang dihasilkan disaring lalu diuapkan menggunakan penangas air bersuhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental bunga telang. Variasi rasio bahan-pelarut, rasio etanol-akuades, dan waktu ekstraksi mengikuti pemodelan RSM dengan *Box-Behnken design* (BBD) ditampilkan pada **Tabel 3**. Hasil ekstraksi masing-masing diuji kadar fenoliknya dan kemudian dianalisis menggunakan RSM.

**Tabel 3. Pemodelan Berdasarkan RSM dengan Desain BBD**

Percobaan ke-	Rasio Bahan-Pelarut	Rasio Etanol-Akuades	Waktu Ekstraksi (Menit)
1	15	50	20
2	15	0	40
3	5	50	20
4	5	50	60
5	10	50	40
6	10	0	60
7	15	100	40
8	10	100	60
9	10	0	20
10	10	50	40
11	5	100	40
12	5	0	40
13	15	50	60
14	10	50	40
15	10	100	20

6. Penentuan kadar fenolik total ekstrak bunga telang

a. Pembuatan larutan pembanding asam galat

Sebanyak 10 mg asam galat dilarutkan menggunakan akuades sampai mencapai volume 10 mL sehingga didapatkan konsentrasi asam galat 1000 ppm. Kemudian dibuat seri kadar dari larutan stok asam galat yaitu 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm, dan ditambahkan pelarut akuades hingga volume 5 mL (Candra *et al.*, 2021).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda$  maks)

Tujuan dari penentuan panjang gelombang maksimum adalah untuk menentukan pada serapan berapa zat yang dapat dibaca dengan optimum menggunakan spektrofotometer UV (Pertiwi *et al.*, 2020). Dilakukan pemindaian  $\lambda$  pada rentang 600-800 nm menggunakan larutan uji dengan konsentrasi 120 ppm. 0,25 mL asam galat 120 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,25 mL reagen Folin-Ciocalteu. Larutan tersebut dihomogenkan kemudian ditambahkan 0,5 mL pelarut  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  35% dan akuades hingga volume mencapai 5 mL.  $\lambda$  maksimum didapatkan apabila absorbansi tertinggi berada pada puncaknya (Kusumaningsih *et al.*, 2015).

c. Penentuan *operating time* (OT)

*Operating time* digunakan untuk mengetahui timer penentuan senyawa saat absorbansi paling stabil. *Time scanning* dilakukan pada larutan uji dengan konsentrasi 120 ppm yang telah direaksikan dalam rentang waktu 0 hingga 120 menit. Dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  maksimum yang telah diperoleh sebelumnya (Candra *et al.*, 2021).

d. Pembuatan kurva baku standar asam galat

Volume larutan yang diukur dibuat dengan diambil sebanyak 0,25 mL asam pada tiap konsentrasi 40, 60, 80, 100, 120 ppm diambil kemudian dicampurkan dengan 0,25 mL reagen Folin-Ciocalteu. Larutan divortex kemudian ditambahkan 0,5 mL pelarut  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  35% dan dicukupkan volume campuran dengan akuades hingga 5 mL. Setelah itu, dibiarkan pada suhu ruangan selama *operating time*. Dilanjutkan pengukuran absorbansi pada  $\lambda$  maksimum dan direplikasi sebanyak 3x (Kusumaningsih *et al.*, 2015).

e. Penentuan kadar total fenolik

Sebanyak 100 mg sampel ekstrak etanol dilarutkan menggunakan etanol *p.a* hingga volume 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 10.000 ppm. Kemudian, diambil 0,25 mL larutan sampel ekstrak dan direaksi

dengan menambahkan 0,25 mL reagen Folin-Ciocalteu lalu 0,5 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  35% dan 4 mL akuades dihomogenkan dan dibiarkan selama *operating time* pada suhu ruangan. Selanjutnya pengukuran serapan dilakukan pada  $\lambda$  maksimum dan uji diulang 3x (Kusumaningsih *et al.*, 2015).

## H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

### 1. Penentuan kadar fenolik total

Data yang diperoleh yaitu nilai absorbansi larutan standar asam galat, kurva kalibrasi, dan persamaan regresi linear. Data ini dianggap sebagai informasi primer. Data tersebut dikumpulkan dari setiap kurva kalibrasi larutan standar dan dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear, yang menunjukkan bahwa  $y = bx + a$  untuk menghitung jumlah total senyawa kimia. Nilai  $y$  dalam persamaan regresi linier menunjukkan serapan, sedangkan nilai  $x$  menunjukkan kadar senyawa atau konsentrasi. Perhitungan persamaan regresi linear dapat menggunakan *Microsoft Excel*, yang akan menghasilkan persamaan linear khusus pada kurva serapan vs konsentrasi. Persamaan linear standar digunakan untuk menghitung larutan sampel, yang kemudian menghasilkan data konsentrasi senyawa fenolik. Rumus berikut digunakan untuk menghitung kadar total senyawa fenolik:

$$\text{TPC} = \frac{\text{C. V. fp}}{\text{g}}$$

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)

## 2. Analisis dengan RSM

Terdapat beberapa tahapan dalam analisis dengan RSM yaitu tahap perancangan dan perlakuan eksperimen untuk mendapatkan data respon, tahap menganalisis respon, tahap optimasi, dan tahap verifikasi. Percobaan dirancang menggunakan *software statistic Design-Expert 13* dimulai dengan menentukan komponen yang mempengaruhi respon kadar total fenolik dalam ekstrak bunga telang. Faktor yang digunakan dalam penelitian meliputi rasio bahan-pelarut (X1), konsentrasi pelarut (X2), dan waktu ekstraksi (X3). Desain percobaan dilakukan dengan metode RSM menggunakan BBD dengan total 15 percobaan. Penjelasan tentang faktor dan level yang diuji ditampilkan pada **Tabel 2**. Setiap level diberi kode yaitu level rendah (-1), level menengah (0), dan level tinggi (+1). Berdasarkan faktor dan level tersebut, didapatkan hasil rancangan percobaan dari *software Design-Expert 13* yang disajikan pada **Tabel 3**.

Tahapan analisis respon dilakukan yaitu dengan menyesuaikan data dalam berbagai model polinomial menggunakan regresi. Model yang dipakai adalah *response surface* sesuai dengan persamaan berikut:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

Respon Y mewakili kadar fenolik total.  $\beta_0$  adalah koefisien intersep,  $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$  adalah koefisien regresi. Variabel independen yang diuji dalam percobaan adalah  $X_1, X_2, \dots, X_k$ . Berdasarkan persamaan model regresi, dilakukan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk menganalisis interaksi antara variabel bebas dan respon yang dihasilkan. Model ANOVA yang digunakan dipilih berdasarkan rekomendasi program, yaitu model dengan level tertinggi yang memperoleh nilai ANOVA yang signifikan. Dalam perancangan ini, model ANOVA yang direkomendasikan adalah *Linear*. Uji ANOVA juga digunakan untuk mengevaluasi kesesuaian model, yaitu memastikan apakah model dapat memprediksi respon dengan benar. Kesesuaian model menunjukkan kemampuan analisis RSM dalam

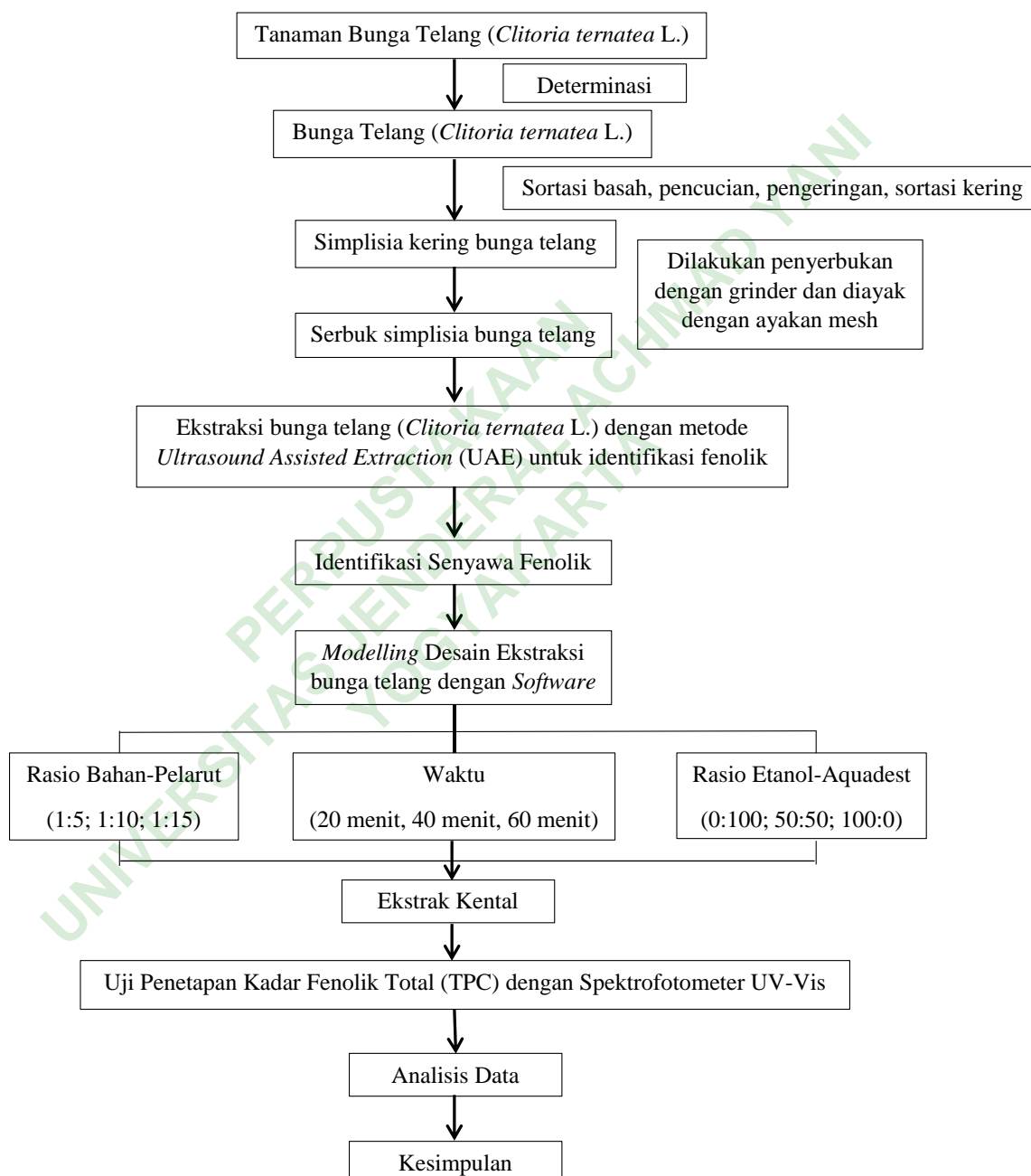
memprediksi respon dari data. Kesesuaian ini dapat dinilai melalui tiga analisis berikut:

- a. Model yang digunakan dalam analisis RSM: Nilai *P-value* adalah  $<0,05$  (*significant*) yang artinya faktor-faktor yang dimasukkan dalam model (rasio bahan-pelarut, konsentrasi pelarut, dan waktu ekstraksi) secara signifikan mempengaruhi respon (kadar total fenolik).
- b. *Lack of fit*: Nilai *P-value* adalah  $>0,05$  (*not significant*) yang menunjukkan data sesuai dengan model.
- c. *Adeq precision*: Nilai adalah  $>4$  menunjukkan bahwa model memiliki kemampuan yang baik untuk menghasilkan hasil optimasi yang akurat.

Ketiga analisis tersebut perlu dipenuhi agar model dianggap sesuai dengan data respon (Gumilar *et al.*, 2024).

Tahap optimasi dalam penelitian ini dilakukan dengan menentukan respon (kadar total fenolik) sesuai tujuan optimasi menggunakan program *Design-Expert* 13. Program tersebut akan mengukur respon dan memproses data variabel yang dimasukkan untuk mencapai hasil yang optimal. Hasil dari optimasi ini berupa saran formula baru yang optimum. Formula yang paling optimum yaitu formula yang memiliki nilai *desirability* tertinggi. Nilai *desirability* adalah fungsi tujuan optimasi yang menunjukkan seberapa baik program dapat memenuhi keinginan berdasarkan kriteria yang ditetapkan untuk produk akhir. Nilai *desirability* berkisar 0 hingga 1 semakin mendekati 1 maka semakin baik kemampuan program dalam memperoleh produk yang diinginkan. Tujuan optimasi bukan untuk mencapai nilai *desirability* 1 tetapi untuk menemukan kondisi terbaik. Setelah tahap optimasi, langkah berikutnya adalah verifikasi untuk memastikan kebenaran prediksi nilai respon dari formula yang optimal (Rahmawati *et al.*, 2022).

## I. Skema Pelaksanaan Penelitian



Gambar 5. Skema Pelaksanaan Penelitian