

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan eksperimental dengan membuat masker gel *peel off* menggunakan tiga variasi konsentrasi ekstrak dari bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dan melakukan pengujian aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH serta evaluasi sifat fisik gel *peel off*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Prodi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Waktu pelaksanaan penelitian akan dilaksanakan dari bulan April 2024 sampai dengan Juni 2024.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : variasi konsentrasi ekstrak bunga telang
2. Variabel terikat : nilai IC_{50} dan sifat fisik sediaan gel *peel off* (viskositas, daya sebar, daya lekat, waktu mengering, dan pH)
3. Variabel terkontrol : suhu pengeringan bunga telang, kecepatan pengadukan gel, dan waktu pengadukan gel.

D. Definisi Operasional Variabel

1. Bunga telang diekstraksi dengan etanol 70% dengan metode maserasi.
2. Masker gel *peel off* ekstrak bunga telang merupakan sediaan gel dengan bunga telang sebagai zat aktif yang akan membentuk film transparan dan elastis serta dapat dikelupas dalam waktu tertentu setelah mengering.
3. Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH ekstrak bunga telang dan sediaan masker gel *peel off* diukur berdasarkan nilai IC_{50} .

E. Alat dan Bahan

1. Alat-alat yang digunakan:

Spektrofotometer UV-Vis *single beam* (Thermo Scientific Genesys 10S), viskometer Brookfield tipe DV1, kuvet, lemari es (LG), sonikator (Cole-Parmer), grinder (Fomac), hot plate (IKA C-MAG HS7 digital), magnetic stirrer 4cm, moisturizer balance *type* MB90, pH meter (Hanna HI198190), alat uji daya sebar, jangka sorong, alat uji daya lekat, bejana maserasi, pengaduk kayu, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (DLAB), termometer, dan alat – alat gelas kaca laboratorium (iwaki).

2. Bahan-bahan yang digunakan:

Bunga telang, akuades, etanol 70% (teknis), etanol (p.a), propilenglikol (teknis), HCl pekat (p.a), metil paraben (teknis), FeCl₃ (p.a), propil paraben (teknis), PVP (teknis), PVA (teknis), DPPH (p.a), kuersetin standar (p.a), magnesium (farmasetis), pereaksi mayer, pereaksi dragendrof, pereaksi wagner, blue tip (biologic), kertas saring, dan alumunium foil.

F. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan bahan dan determinasi tanaman

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) diambil dari petani bunga telang yang berada di Jl. Dawetan Paker, Kaloran, Sidomulyo, Kecamatan Bambanglipuro, Kabupaten Bantul, Yogyakarta (titik kordinat -7.956451,110.309002). Selanjutnya, tanaman dideterminasi di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan. Bagian tanaman yang dideterminasi foto bagian bunga, daun, batang dan akarnya.

2. Persiapan sampel

Bunga telang segar diambil pagi hari pukul 07.00-08.00 WIB kemudian disortasi untuk memisahkan benda – benda asing seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan. Selanjutnya, bunga telang dipisahkan antara bunga dan sepal (bagian hijau pada bunga telang) (Netravati et al., 2022). Pengeringan dilanjutkan menggunakan lemari pengering untuk mempersingkat waktu dan

suhu yang digunakan dapat dikontrol. Lama waktu pengeringan bunga telang dengan suhu 40-50°C selama 24 jam hingga bunga kering ditandai dengan hancurnya bunga telang saat diremas (Netravati *et al.*, 2022; Syahirah *et al.*, 2018). Kemudian sortasi kering dilakukan untuk memisahkan sepal yang belum dipisahkan dari bagian bunga, ranting atau daun yang masih tertinggal di simplisia kering. Simplisia yang sudah kering kemudian diperkecil ukurannya menggunakan grinder. Serbuk yang diperoleh diayak menggunakan ayakan mesh 60 supaya ukuran partikel seragam (Setyadi & Saryanti, 2022).

3. Ekstraksi bunga telang

Serbuk bunga telang sebanyak 300 g dimaserasi dengan perbandingan 1:10. Serbuk bunga telang direndam selama 48 jam dalam 3 L etanol 70%. Lalu pengadukan dilakukan setiap 6 jam selama 30 detik. Setelah itu, ampasnya diremaseasi selama 24 jam dengan perbandingan 1:5. Maserat yang dihasilkan kemudian dipanaskan pada temperatur 40-50 °C sampai didapatkan ekstrak kental. Rendemen ekstrak kental dihitung dari hasil ekstraksi tersebut (Andriani & Murtisiwi, 2018). Rendemen dihitung menggunakan persamaan 1.

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Jumlah berat ekstrak kental}}{\text{Jumlah berat serbuk simplisia}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

4. Karakterisasi ekstrak bunga telang

a. Uji organoleptik ekstrak

Pemeriksaan organoleptik ekstrak bunga telang dilakukan secara visual meliputi bentuk, bau, dan warna

b. Uji pH ekstrak

Sampel disiapkan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak dalam 50 ml akuades untuk memperoleh konsentrasi 1%. Pengukuran larutan pH menggunakan pH meter yang telah disesuaikan. Alat tersebut dibiarkan

hingga nilai pH stabil. Nilai yang ditunjukkan oleh pH meter adalah pH ekstrak (Andini *et al.*, 2017).

c. Uji kadar air ekstrak

Sebanyak 1 g ekstrak ditimbang pada cawan *moisturizer balance*. *Moisturizer balance* dinyalakan pada suhu 105°C. Kadar air dicatat sampai indikator berwarna oranye berubah berwarna hijau (Angelina *et al.*, 2015).

d. Skrining fitokimia

1) Uji Flavonoid

0,5 gram ekstrak bunga telang dimasukkan dalam tabung reaksi dan tambahkan 0,1 gram bubuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Indikasi positif adanya flavonoid ditandai dengan perubahan warna menjadi jingga, kuning atau merah (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

2) Uji Tanin

0,5 g ekstrak bunga telang tambahkan 5 ml akuades dalam tabung reaksi lalu dididihkan. Setelah itu, 3 ml larutan FeCl₃ 1% ditambahkan ke dalam ekstrak setelah dingin. warna hijau kehitaman menunjukkan hasil positif tanin (Harborne, 1987).

3) Uji Fenolik

0,5 g ekstrak bunga telang ditambah 5 tetes etanol 70% dan 2-3 tetes FeCl₃ 5% dalam tabung reaksi. Campuran sampel diaduk hingga merata. Positif fenolik ditandai munculnya warna hijau, orange, kuning, atau merah (Harborne, 1987).

4) Uji Saponin

0,5 gram ekstrak dilarutkan dengan 10 ml akuades dalam tabung reaksi kemudian dikocok selama satu menit, dan ditetesi 2 tetes HCl 2 N hingga terbentuk busa dengan tinggi sekitar 1-10 cm. Jika buih tidak menghilang dalam waktu 7 menit, hal itu menunjukkan keberadaan saponin (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

5) Uji Alkaloid

0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 ml etanol 70% lalu tambahkan beberapa tetes HCl 1%. Setelah itu, larutan ekstrak dibagi

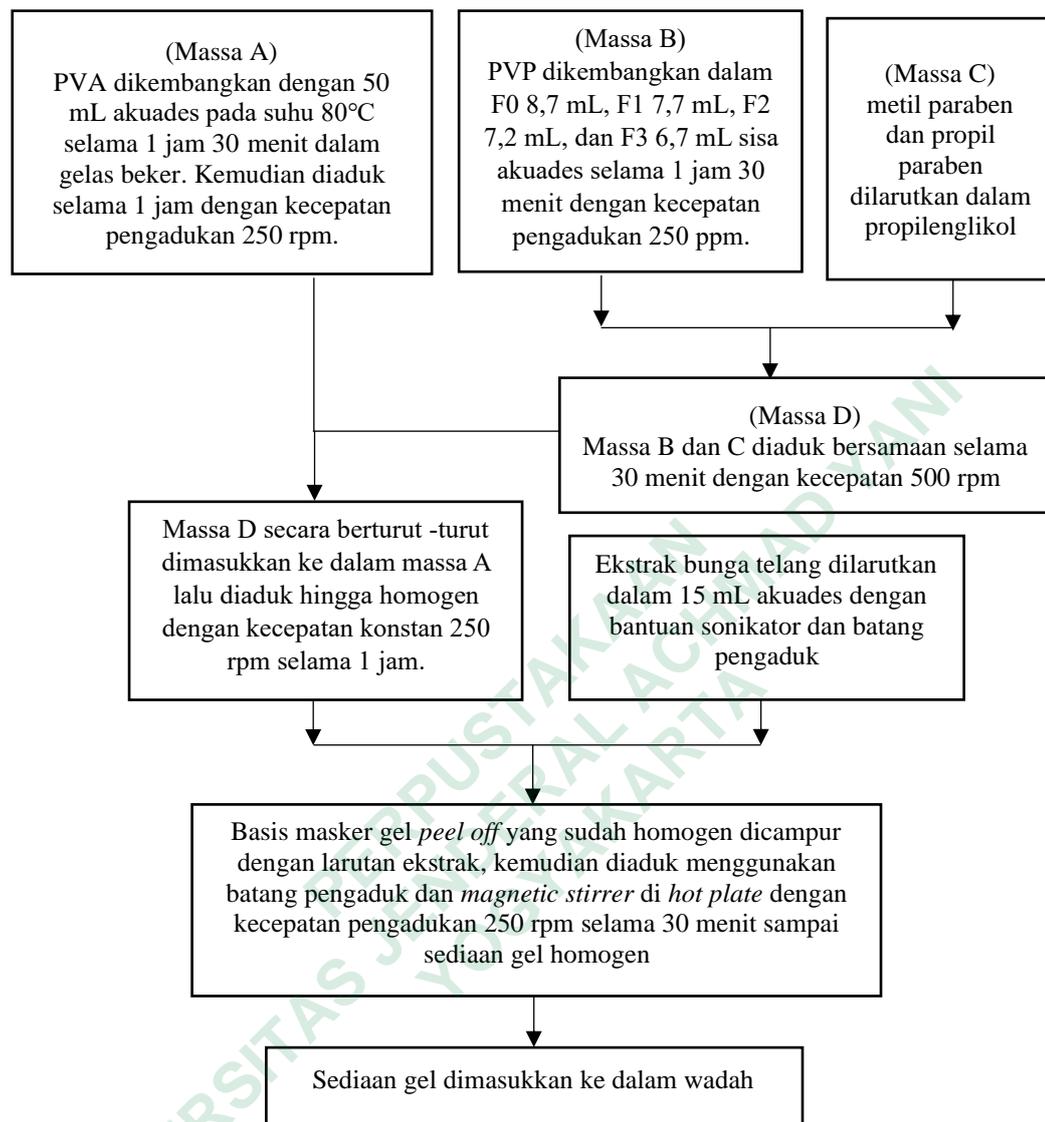
menjadi 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambah 1 ml reagen mayer. Hasil positif menunjukkan adanya endapan berwarna putih kekuningan atau kecoklatan (Cahyaningsih *et al.*, 2019). Tabung kedua ditambahkan 1 ml reagen wagner. Hasil positif ditandai dengan terbentuk endapan berwarna coklat. Pada tabung ketiga, ditambah 1 ml reagen Dragendorff. Hasil positif menunjukkan adanya endapan berwarna jingga. Jika 2 reaksi menunjukkan hasil positif, maka ekstrak mengandung alkaloid (Makalalag *et al.*, 2015).

5. Formulasi masker gel *peel off* ekstrak dari bunga telang

Penelitian ini membuat 4 sediaan yaitu 1 gel tanpa ekstrak (F0) dan 3 gel *peel off* dengan variasi konsentrasi ekstrak bunga telang (F1, F2, F3). Variasi konsentrasi ekstrak bunga telang yang digunakan merujuk pada penelitian Andriani & Murtisiwi (2020) dengan nilai IC_{50} sebesar 41 ppm. Perhitungan konsentrasi ekstrak dalam gel dapat dilihat pada lampiran 7. Variasi konsentrasi yang digunakan dalam gel adalah 1% b/v ($200 \times IC_{50}$), 1,5% b/v ($300 \times IC_{50}$), dan 2% b/v ($400 \times IC_{50}$). Formula masker gel *peel off* yang digunakan mengacu pada penelitian Lestari dkk (2023) yang sudah dimodifikasi. Formula masker gel *peel off* yang dimodifikasi yakni ekstrak, konsentrasi *gelling agent*, serta tidak menggunakan pelarut etanol. Komposisi penyusun masker gel *peel off* dapat dilihat pada **Tabel 2**. Proses pembuatan masker gel *peel off* dapat dilihat pada **Gambar 9**.

Tabel 2 . Formula sediaan masker gel *peel off* ekstrak bunga telang

Bahan	Konsentrasi (% b/v)			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak	0	1	1,5	2
PVA	11	11	11	11
PVP	5	5	5	5
Propilenglikol	10	10	10	10
Metil paraben	0,2	0,2	0,2	0,2
Propil paraben	0,1	0,1	0,1	0,1
Akuades ad	100	100	100	100



Gambar 9. Prosedur pembuatan sediaan masker gel *peel off* ekstrak bunga telang

6. Evaluasi aktivitas antioksidan ekstrak dan masker gel *peel off* ekstrak bunga telang
 - a. Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM

3,94 mg serbuk DPPH dilarutkan dalam etanol p.a menggunakan labu takar 100 mL (Arman *et al.*, 2021).
 - b. Pembuatan seri konsentrasi larutan ekstrak bunga telang

Larutan induk ekstrak konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 100 mg ekstrak bunga telang dengan etanol p.a dalam labu

takar 100 mL. Lalu, seri kadar 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm dibuat dengan pengambilan masing-masing sebesar 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, dan 5 mL dari larutan induk ke dalam labu takar 5 mL. Pelarut yang digunakan adalah etanol p.a.

c. Pembuatan seri konsentrasi larutan standar kuersetin

10 mg kuersetin dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu takar 10 mL sehingga diperoleh larutan induk konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, dalam 1 mL larutan induk diencerkan dengan etanol p.a dalam labu takar 10 mL untuk menghasilkan konsentrasi 100 ppm. Kemudian, seri kadar 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm dibuat dengan pengambilan 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, dan 500 μ L larutan konsentrasi 100 ppm dalam labu takar 5 mL. Pelarut yang digunakan adalah etanol p.a (Susiloningrum & Sari, 2021).

d. Pembuatan seri konsentrasi larutan basis gel *peel off*

Gel sebanyak 5 gram dilarutkan dalam akuades 50 mL, menghasilkan larutan dengan konsentrasi 2000 ppm. Sebanyak 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, dan 10 mL larutan induk dimasukkan dalam labu takar 10 mL untuk mendapatkan masing-masing konsentrasi 1200, 1400, 1600, 1800, dan 2000 ppm secara berurutan. Pelarut yang digunakan adalah akuades.

e. Pembuatan seri konsentrasi larutan gel ekstrak bunga telang

Gel ekstrak sebanyak 2,5 gram dilarutkan dalam akuades 25 mL, menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Sebanyak 1 mL, 3 mL, 5 mL, 7 mL, dan 9 mL larutan induk dimasukkan dalam labu takar 10 mL untuk mendapatkan masing-masing konsentrasi 100, 300, 500, 700, dan 900 ppm secara berurutan. Pelarut yang digunakan adalah akuades.

f. *Scanning* panjang gelombang maksimum

Sebanyak 2 mL larutan DPPH direaksikan dengan 1 mL larutan kuersetin pada konsentrasi 6 ppm. Absorbansi kemudian diukur pada λ maks yang telah ditentukan sebelumnya setiap menit selama 1 jam. Waktu operasi ditentukan berdasarkan menit di mana absorbansi menunjukkan kestabilan (Liandhajani & Septiani, 2022).

g. Penentuan *operating time*

Sejumlah 2 mL Larutan DPPH direaksikan dengan 1 mL larutan kuersetin konsentrasi 6 ppm. Kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya setiap menit selama 1 jam. *Operating time* diperoleh dari menit beberapa yang menunjukkan absorbansi yang stabil (Nadillah *et al.*, 2022).

h. Uji penangkapan radikal bebas DPPH

Sebanyak 1 mL sampel (larutan kuersetin, ekstrak etanol bunga telang, dan larutan gel ekstrak) ditambahkan 2 mL larutan DPPH dan digojog homogen. Kemudian tabung reaksi disimpan di tempat gelap selama *operating time*. Absorbansi diukur pada λ maks yang terukur (Koto *et al.*, 2019).

7. Evaluasi sifat fisik sediaan masker gel *peel off* ekstrak bunga telang

a. Uji Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan menggunakan viskometer Brookfield dengan spindel nomor 6. Gel dimasukkan ke dalam gelas beker, kemudian spindel yang sudah dipasang dimasukkan ke dalam gel hingga mencapai batas yang ditentukan. Uji viskositas dilakukan dengan kecepatan putar 50 rpm, dan hasil pengukuran viskositas dicatat (Putriani *et al.*, 2022).

b. Uji daya sebar

Sejumlah 0,5 gram gel ditaruh ditengah cawan petri ditimpa menggunakan cawan petri lain selama 60 detik. Cawan petri yang digunakan untuk menindih sebelumnya ditimbang terlebih dahulu. Beban 50 gram ditambahkan di atas cawan petri didiamkan selama 1 menit. Daya sebar diukur sampai berat beban tambahan 200 gram. Selanjutnya diukur diameter gel secara vertikal, horizontal, dan diagonal (Istiana *et al.*, 2021).

c. Uji daya lekat

Sejumlah 0,5 g gel diletakkan di atas gelas objek. Lalu gelas objek yang lain diletakkan di atas gel selanjutnya diberi beban 1 kg dalam jangka waktu 5 menit. Setelah itu, beban diangkat dan tuas pada alat uji daya lekat ditarik. Waktu dihitung Ketika tuas mulai ditarik sampai gelas objek

terlepas. Pengujian ini diulangi 3 kali untuk setiap gel. Kriteria waktu lekat yang baik adalah >1 detik (Thomas *et al.*, 2023).

d. Uji waktu mengering

0,7 gram gel dioleskan pada slide kaca (1x3 inch) hingga membentuk lapisan tipis dengan ketebalan 1 mm. Setelah gel mengering dan dapat dikupas, dihitung waktu yang diperlukan untuk proses pengeringan. Gel dikategorikan memenuhi syarat jika waktu pengeringannya berada dalam rentang 15-30 menit (Eni *et al.*, 2023).

e. Uji pH

Sebanyak 1 gram gel dilarutkan dalam 10 mL akuades. Pengukuran larutan pH menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi. (Adhayanti *et al.*, 2022).

G. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Metode pengolahan aktivitas antioksidan terhadap DPPH

Evaluasi aktivitas antioksidan dari sampel ekstrak dan masker gel *peel off* bunga telang dilakukan dengan mengukur nilai IC₅₀. Nilai ini merupakan konsentrasi senyawa antioksidan yang diperlukan untuk meredam 50% dari radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Nilai IC₅₀ didapatkan dari perhitungan % inhibisi sesuai dengan persamaan 2 (Ambari *et al.*, 2021).

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi DPPH} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

Setelah mendapatkan persen inhibisi, konsentrasi sampel (X) dan persen inhibisi (Y) tersebut diplotkan sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = bx + a$. Nilai IC₅₀ didapatkan ketika nilai y dari persamaan tersebut diganti dengan 50.

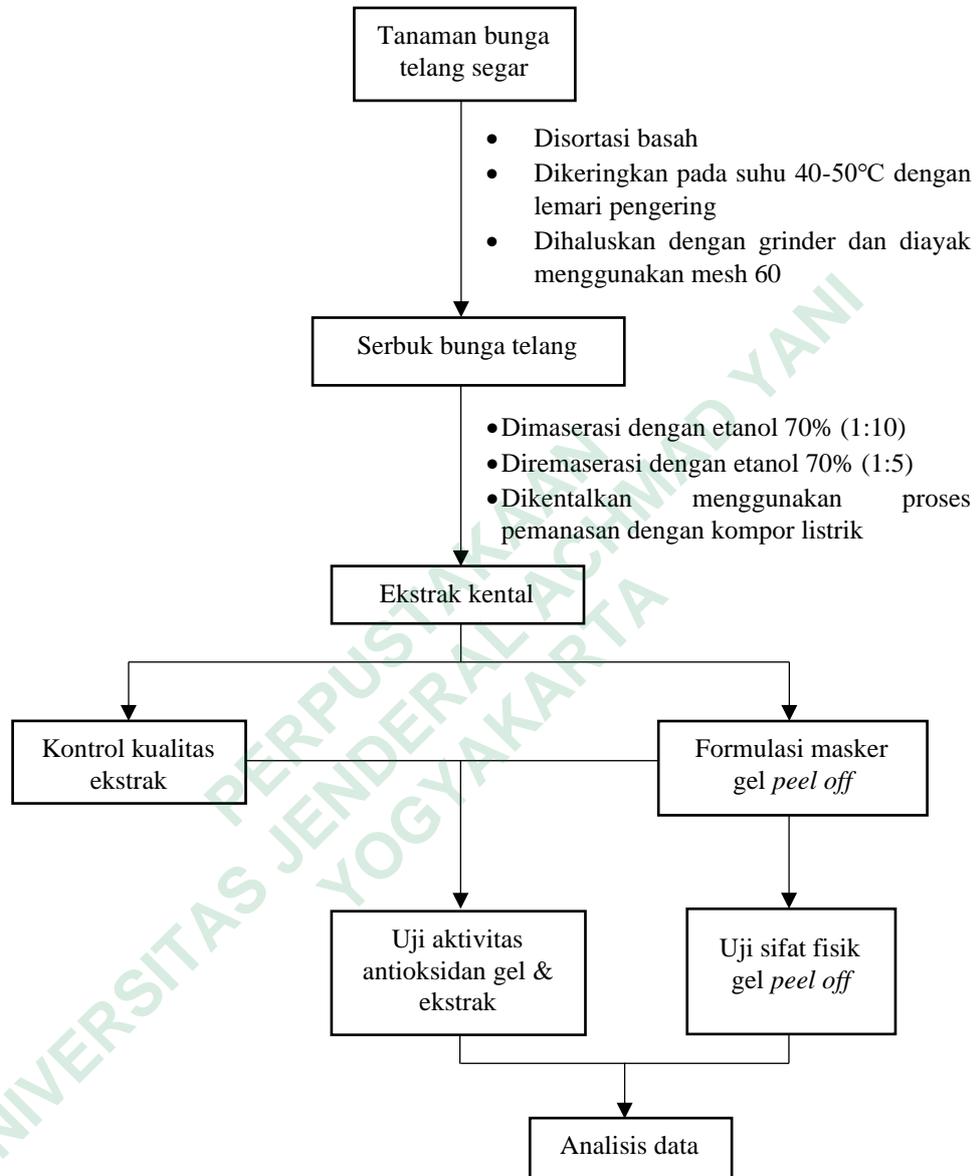
2. Analisis Data

Dalam penelitian ini, data (IC₅₀ dan sifat fisik gel) dianalisis menggunakan uji homogenitas Levene dan uji normalitas Shapiro-Wilk. Metode Shapiro-Wilk dipilih karena jumlah sampel yang digunakan <50. Jika

data terbukti normal dan homogen, dilanjutkan uji Anova satu arah (*one-way* Anova) untuk membandingkan nilai IC_{50} dan sifat fisik gel (daya sebar, daya lekat, viskositas, pH, dan waktu mengering) dari tiga variasi konsentrasi ekstrak. Untuk data yang tidak normal atau tidak homogen, menggunakan analisis non-parametrik Kruskal-Wallis. Hasil yang signifikan dari uji *one-way* Anova atau Kruskal-Wallis kemudian dianalisis lebih lanjut dengan uji *post hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang menunjukkan perbedaan signifikan.

PERPUSTAKAAN
JENDERAL ACHMAD YANI
UNIVERSITAS YOGYAKARTA

Bagan penelitian



Gambar 9. Bagan Penelitian