

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan objek dengan ciri atau sifat tertentu guna menarik identifikasi dan kesimpulan. Pada penelitian ini adalah bunga telang dan daun manggis yang diambil langsung dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Jl. Raya Lawu, Kalisoro, Tawangmangu, Karanganyar, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu menggunakan bagian bunga dan daun. Tanaman bunga telang diambil secara acak bagian yang masih segar, berwarna biru keunguan dan baru mekar atau sudah mekar seutuhnya. Daun manggis yang diambil dengan kondisi yang masih segar dan tidak rusak akibat hama.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama penelitian ini adalah kombinasi ekstrak etanol 96% bunga telang dan daun manggis dengan beberapa perbandingan kombinasi.

Variabel utama kedua berupa aktivitas antioksidan dari kedua ekstrak dengan menggunakan metode DPPH.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Terdapat berbagai metode untuk mengelompokkan faktor-faktor utama yang telah diidentifikasi, seperti variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel tergantung.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas merupakan variabel yang disesuaikan dan dapat dimanipulasi oleh peneliti untuk mempermudah pada variabel tergantung nya. Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini yaitu kombinasi ekstrak etanol bunga telang dan daun manggis dengan perbandingan 1:3, 1:1, 3:1.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung merupakan variabel yang menjadi titik permasalahan yang nilainya dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah

aktivitas antioksidan dari ekstrak kombinasi bunga telang dan daun manggis yang di uji dengan menggunakan metode DPPH.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantungnya sehingga perlu menetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar atau terulang oleh peneliti yang lain secara cepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi dan kebersihan laboratorium, kondisi peneliti dan kondisi simplisia dari bunga telang dan daun manggis.

C. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, bunga telang dan daun manggis yang dibeli langsung dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) jl. Raya Lawu, Kalisoro, Tawangmangu, Karanganyar, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Dengan kondisi tanaman yang sudah kering.

Kedua, bunga telang di ambil dari bunga yang masih segar, tidak layu, dan sudah mekar.

Ketiga, daun manggis dipilih dari daun yang masih segar dan tidak rusak akibat hama.

Keempat, ekstrak bunga telang serbuk bunga telang yang di maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Kelima, ekstrak daun manggis berasal dari serbuk bunga telang yang di maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Keenam, kombinasi ekstrak bunga telang dan daun manggis 1:3 adalah hasil dari ekstrak etanol bunga telang sebanyak 25 mg/L: ekstrak etanol daun manggis sebanyak 75 mg/L dengan pelarut methanol p.a.

Ketujuh, kombinasi ekstrak bunga telang dan daun manggis 1:1 adalah hasil dari ekstrak etanol bunga telang sebanyak 50 mg/L: ekstrak etanol daun manggis sebanyak 50 mg/L dengan pelarut methanol p.a.

Kedelapan, kombinasi ekstrak bunga telang dan daun manggis 3:1 adalah hasil dari ekstrak etanol bunga telang sebanyak 75 mg/L: ekstrak etanol daun manggis sebanyak 25 mg/L dengan pelarut methanol p.a.

Kesembilan, Penilaian aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH, di mana ekstrak tunggal dan kombinasi ekstrak dari bunga telang dan daun manggis dibuat dengan variasi

perbandingan kombinasi (1:3), (1:1), dan (3:1). Pengujian dilakukan dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-VIS, dan nilai IC_{50} dihitung untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dari masing-masing kombinasi.

Kesepuluh, IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50*) merupakan konsentrasi dari ekstrak bunga telang dan daun manggis yang diperlukan untuk menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50%.

Kesebelas, Persen inhibisi (% inhibisi) mencerminkan kemampuan senyawa antioksidan dalam ekstrak bunga telang dan daun manggis untuk melawan radikal bebas yang diukur dengan metode DPPH.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah oven, ayakan mesh 40, timbangan analitik, botol timbang, krus porselen, kertas timbang, desikator, gelas ukur, beaker glass, botol maserasi, kain flanel, kertas saring, rotary evaporator, vortex, tabung reaksi, rak tabung reaksi, plat tetes, hot plate, kaca arloji, pipet tetes, pipet volume, labu tentukur, kuvet, Spektrofotometer UV-VIS, laptop, program SPSS versi 25.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga telang daun manggis, etanol, 96%, HCl pekat, $FeCl_3$, HCl 2N, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, reagent Bouchardat, eter, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, $KMnO_4$, DPPH, serbuk kuersetin, metanol p.a.

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman berfungsi untuk membuktikan dan memastikan kebenaran nya bahwa sampel bunga telang dan daun manggis. Determinasi dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri makroskopis serta mikroskopis secara mendetail. Determinasi tanaman ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia.

2. Persiapan Sampel

2.1 Sampel bunga telang. Sebanyak 3.755 mg bunga telang segar dibersihkan dengan cara mencuci bersih dengan air mengalir. Kemudian tanaman dikeringkan dengan cara diangin anginkan diudara terbuka terlindung dari sinar matahari langsung hingga kering. Simplisia yang sudah kering kemudian diblender lalu diayak dengan ayakan mesh 40 (Nadia *et al.*, 2022).

2.2 Sampel daun manggis. Sebanyak 4.250 mg daun manggis yang telah dicuci bersih dengan air mengalir, daun manggis dikeringkan dengan di jemur di bawah sinar matahari hingga kering. sampel yang sudah kering kemudian di blender dan diayak dengan ayakan *mesh* 40 (Pengow *et al.*, 2018).

3. Susut Pengerinan

Metode susut pengerinan pada Farmakope Herbal edisi VI, menimbang masing masing sampel 2 g masukkan dalam botol timbang berbeda beda dengan tiga kali replikasi. botol timbang yang akan digunakan dipanaskan dalam oven dengan suhu 105 derajat kemudian di tara. Sampel dimasukkan dalam botol timbang tersebut, dan timbang saksama botol beserta isinya. Perlahan-lahan dengan menggoyang, ratakan sampel sampai rata kemudian masukkan ke dalam oven, buka tutup botol timbang dan biarkan tutup di dalam oven. Panaskan pada suhu 105 derajat hingga bobot sampel konstan (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

Susut pengerinan menurut (Kementerian Kesehatan RI, 2020) pada sampel dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Kadar} = \frac{\text{berat sampel} - [(\text{krus kosong} + \text{zat konstan}) - (\text{krus kosong konstan})]}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$

2. Ekstraksi

Farmakope Herbal Edisi II menjelaskan bahwa, 550 mg serbuk bunga telang dan 850 g daun dimasukkan dalam masing masing bejana maserasi kemudian ditambahkan pelarut sebanyak 5,5 liter (10 bagian) etanol 96% untuk bunga telang dan 8,5 liter (10 bagian) etanol 96% untuk daun manggis. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali digojak, kemudian diamkan selama 18 jam. Hasil maserasi disaring menggunakan flannel. Residu kemudian dimaserasi ulang dengan setengah bagian etanol 96% pada maserasi pertama diamkan kembali selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Hasil maserasi dan remaserasi dipekatkan menggunakan *Rotary Evaporator* dengan kecepatan 200

rpm pada suhu 50°C (Indonesia, 2017). Menghitung rendemen yang didapatkan dengan rumus:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

3. Penetapan Kadar Air Ekstrak

Kadar air ekstrak bunga telang dan ekstrak daun manggis. Kedua ekstrak ditimbang kurang lebih 10 g (W0) masukkan kedalam masing masing kurs porselen yang telah di tara (W1). Kurs yang sudah berisi sampe dikeringkan pada suhu 105 derajat selama 5 jam dan timbang. Pengovenan dan penimbangan dilakukan berulang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaaan antara dua penimbang berturut turut tidak lebih dari 0,25%. Penetapan kadar air ekstrak menggunakan metode gravimetri dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{kadar air (\%)} = \frac{W1-W2}{W1-W0} \times 100\%$$

ket: **W1** = berat sampel beserta wadah sebelum pengeringan (g), **W2** = berat sampel beserta wadah setelah pengeringan (g), **W0** = berat wadah kosong (g)

4. Skrining Fitokimia Ekstrak Dengan Uji Tabung

6.1 Uji flavonoid. Ambil 4 mL ekstrak dan campurkan dengan jumlah air panas secukupnya. Rebus campuran selama 5 menit, lalu saring. Tambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat ke dalam filtrat, kemudian kocok secara kuat. hasil uji yang positif dapat dilihat dari perubahan warna menjadi merah, jingga, atau kuning (Hidayah & Anggarani, 2022).

6.2 Uji alkaloid. Uji alkaloid dilakukan menggunakan tiga reagen, yaitu reagen Bouchardat, Mayer, dan Dragendorff. Sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan 2 tetes reagen Bouchardat. Keberadaan alkaloid ditunjukkan oleh munculnya endapan berwarna coklat hitam. Selanjutnya, 1 mL ekstrak ditambahkan 2 tetes reagen Mayer. Jika terbentuk endapan berwarna putih atau pucat yang dapat larut dalam metanol, maka hasilnya dianggap positif mengandung alkaloid. Langkah terakhir, 1 mL ekstrak ditambahkan 2 tetes reagen Dragendorf. Jika hasilnya positif, ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna jingga coklat (Habibi, 2017).

6.3 Uji saponin. Analisis saponin dengan mengambil 4 mL ekstrak dan memasukkannya ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 10 mL air suling yang telah dipanaskan, lalu dinginkan. Kocok campuran

secara kuat selama sekitar 10 detik. Hasil positif untuk uji saponin adalah munculnya busa yang konstan setinggi 1-10 cm selama 10 menit. Busa tersebut tidak hilang setelah penambahan 2 tetes HCl 2 N (Hidayah & Anggarani, 2022).

6.4 Uji tanin dan fenolik. Mendeteksi adanya kandungan tanin, ambil 4 mL ekstrak dan tambahkan 3-5 tetes larutan FeCl₃ 10%. Jika warnanya berubah menjadi biru tua atau hitam kehijauan, menandakan adanya kandungan tanin di dalamnya (Hidayah *et al.*, 2022) dan pengujian fenol dianggap positif apabila terjadi perubahan warna menjadi hijau, biru, atau ungu, hal ini menandakan keberadaan senyawa fenol (Fajrianty *et al.*, 2018).

6.5 Uji terpenoid dan steroid. Sampel masing masing ekstrak bunga telang dan daun manggis sebanyak 0,5gram ditambahkan asam asetat pekat sampai semua sampel terendam, dibiarkan selama 15 menit kemudian 6 tetes sampel yang sudah terendam ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes asam sulfat pekat. Adanya terpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah, jingga atau ungu, sedangkan steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehijauan (Marlinda *et al.*, 2021).

6.6 Uji antosianin. Keberadaan antosianin dapat dilakukan secara sederhana, ada dua cara yang dapat dilakukan. Cara pertama adalah dengan memanaskan sampel menggunakan larutan HCl 2M selama 2 menit pada suhu 100°C, kemudian diamati perubahan warna sampel. Jika warna merah pada sampel tetap tidak berubah (tetap stabil), maka itu menunjukkan adanya antosianin. Cara kedua adalah dengan meneteskan larutan NaOH 2M ke dalam sampel secara perlahan. Jika warna merah berubah menjadi hijau biru dan kemudian memudar perlahan, itu menunjukkan adanya antosianin (Febriani *et al.*, 2021).

5. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

7.1. Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM. Larutan DPPH dibuat dengan cara menimbang serbuk DPPH sebanyak 15,8 mg, kemudian masukkan ke dalam labu tentukur 100mL dan dilarutkan dengan menggunakan pelarut methanol p.a sampai tanda batas labu (Alfila *et al.*, 2023).

7.2. Pembuatan larutan sampel. Menimbang masing masing ekstrak tunggal bunga telang dan daun manggis serta kombinasi ekstrak dengan perbandingan (1:3); (1:1); (3:1). Ekstrak bunga telang dan daun

manggis dilarutkan ke dalam labu tentukur 50 mL sedangkan, ekstrak kombinasi (1:3); (1:1); (3:1) di larutkan ke dalam labu tentukur 100 mL kemudian ditambahkan methanol p.a sampai tanda batas didapat larutan induk dengan kadar 1000 ppm, kemudian buat pengenceran menjadi 100 ppm dan buat seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 ppm sebanyak 10 mL (Sarastri *et al.*, 2023).

7.3. Pembuatan pembanding kuersetin. Kuersetin ditimbang sebanyak 10 mg masukkan ke dalam labu tentukur 100 mL kemudian tambahkan methanol p.a hingga tanda batas. Di dapat larutan kuersetin dengan kadar 100 mg/L kemudian buat sari konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 ppm (Indrawati *et al.*, 2022).

7.4. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum DPPH. Larutan stok DPPH konsentrasi 100 ppm sebanyak 1 mL ditambahkan methanol p.a 4 mL, kocok hingga homogen masukkan dalam kuvet kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-700 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh sampai didapat absorbansi yang stabil dan tidak adanya penurunan absorbansi (Alfila *et al.*, 2023).

7.5. Operating time (OT). Penentuan *operating time* dilakukan dengan memipet 1 mL baku yang sudah di lakukan pengenceran bersama dengan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM menggunakan vortex selama 1 menit. Kemudian, diukur absorbansinya pada menit ke-0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, dan 60 pada panjang gelombang maksimal yang telah diidentifikasi sebelumnya (Arista, 2024).

7.6. Pembuatan larutan blanko. Tambahkan 1 mL larutan DPPH ke dalam labu ukur, lalu tambahkan 1 mL etanol p.a. Campurkan hingga homogen, kemudian simpan di tempat gelap (Harningsih & Wimpy, 2018).

7.7. Pengukuran aktivitas antioksidan larutan pembanding kuersetin. Memipet 1 mL larutan baku kuersetin dan masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM. Campurkan menggunakan vortex selama 1 menit hingga homogen, lalu diamkan di tempat gelap sesuai waktu operasi yang telah ditentukan. Setelah itu, ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

7.8. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Bunga Telang. Ekstrak bunga telang sebanyak 50 mg dilarutkan kedalam 50 mL methanol p.a untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1000

ppm. Kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan sampel dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 ppm masing masing. Dari konsentrasi sampel tersebut dipipet 1 mL dan dicampur dengan 1 mL larutan DPPH. Diinkubasi pada suhu ruang, tempatkan dalam kuvet dan ukur absorbansinya (Harningsih & Wimpy, 2018).

7.9. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Daun Manggis. Ekstrak daun manggis sebanyak 50 mg dilarutkan kedalam 50 mL etanol untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan sampel dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 ppm masing masing. Dari konsentrasi sampel tersebut dipipet 1 mL dan dicampur dengan 1 mL larutan DPPH 40. Diinkubasi pada suhu ruang, tempatkan dalam kuvet dan ukur absorbansinya (Harningsih & Wimpy, 2018).

7.10. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Bunga Telang dan Ekstrak Daun Manggis. Pembuatan konsentrasi dengan perbandingan (1:3) (1:1) dan (3:1) diambil dari pemipetan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm ekstrak bunga telang dan 1000 ekstrak ppm daun manggis (Tabel 3).

Tabel 3. Perbandingan volume untuk masing masing kombinasi (Harningsih et al.,2018).

Kombinasi	Bunga telang	Daun manggis	Vol	Konsentrasi
1:3	25 mg	75 mg	100 mL	1000 ppm
1:1	50 mg	50 mg	100 mL	1000 ppm
3:1	75 mg	25 mg	100 mL	1000 ppm

Kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan sampel dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 ppm masing masing. Konsentrasi sampel tersebut dipipet 1 mL dan dicampur dengan 1 mL larutan DPPH. Diinkubasi pada suhu ruang, tempatkan dalam kuvet dan ukur absorbansinya (Harningsih & Wimpy, 2018).

F. Analisis Hasil

Hasil rumusan diimplementasikan dengan pendekatan statistik menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) kemudian dilakukan analisis probit menentukan % inhibisi dengan menggunakan persamaan regresi linier $y = a + bx$ dimana x adalah konsentrasi ppm dan y adalah persentase inhibisi (%). Perbedaan aktivitas antioksidan ekstrak kombinasi dapat dilihat dengan uji tukey.