

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini meliputi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang dibudidayakan di daerah Klaten, Jawa Tengah, serta daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze), dan daun mint (*Mentha piperita* L.) yang berasal dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Adapun sampel yang digunakan adalah bunga telang segar dan masih muda, daun teh hijau segar dan muda yang diambil dari daun urutan pertama hingga ketiga dari pucuk tanaman, serta daun mint yang juga diambil dalam kondisi muda dan segar.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Dalam penelitian ini variabel utamanya adalah bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze), dan daun mint (*Mentha piperita* L.) yang akan diformulasikan menjadi sediaan rebusan teh terhadap kemampuan peredaman radikal bebas menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kombinasi proporsi pada formula sediaan rebusan teh bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze), dan daun mint (*Mentha piperita* L.).

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah bahan-bahan, alat-alat dan media yang digunakan.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah senyawa yang terkandung untuk dilakukan uji fitokimia dan uji kemampuan peredaman radikal bebas DPPH dari kombinasi proporsi sediaan rebusan teh bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze), dan daun mint (*Mentha piperita* L.).

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, bunga telang adalah bagian bunga dari tanaman telang yang didapatkan dari daerah Klaten, Jawa Tengah yang berwarna ungu, masih muda, segar dan telah mekar, kemudian dikeringkan dan diserbuk.

Kedua, daun teh hijau adalah bagian dari tanaman teh yang didapatkan di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Diambil daun pada pucuk ditambah dengan 2-3 helai daun muda yang masih segar, kemudian dikeringkan dan diserbuk.

Ketiga, daun mint adalah bagian dari tanaman mint yang didapatkan di daerah Tawangmangu, Jawa tengah. Diambil daun yang masih segar, masih berwarna hijau, memiliki aroma khas mint dan memiliki rasa segar seperti menthol, kemudian dikeringkan dan diserbuk.

Keempat, air rebusan teh adalah sediaan cair yang mengandung bunga telang, daun teh hijau, dan daun mint yang disajikan dengan cara dipanaskan dengan air pada *hot plate* dan disaring.

Kelima, kombinasi rebusan dari bunga telang, daun teh hijau, dan daun mint adalah kombinasi yang dihasilkan dengan menggunakan metode perebusan.

Keenam, variasi formula adalah variasi proporsi bunga telang, daun teh hijau, dan daun mint yang sudah kering dan sudah diserbuk.

Ketujuh, kemampuan peredaman radikal bebas DPPH adalah kemampuan air rebusan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze), dan daun mint (*Mentha piperita* L.) dengan proporsi yang berbeda pada konsentrasi 500 ppm dalam meredam radikal bebas DPPH.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven laboratorium (Memmert Un 55 53l), corong kaca (Herma 75 mm), termometer (GEA S-006), timbangan analitik (OHAUS Pioneer PA214C), spatula stainless (SS 18 cm), gelas ukur (Pyrex 10 mL, 100 mL), Erlenmeyer (Pyrex 100 mL), gelas beaker (Pyrex 100 mL), spektrofotometer UV-Vis (Double beam UV-1800), kufet kaca (Quartz 10 mm), pipet volume (Pyrex 0,5 mL, 1 mL, 2 mL 10 mL), pipet tetes (ONEMAD 10 cm, 15 cm), tabung reaksi (Pyrex), labu ukur (Pyrex 100 mL, 10 mL), sendok tanduk (Pudak), rak tabung reaksi, labu alas bulat (Pyrex), seperangkat alat destilasi, corong pisah (Pyrex), *stirrer*, kertas perkamen, *hot plate*, cawan porselen (Haldenwanger 50 mL), krus porselen (Haldenwanger 50 mL).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze), daun mint (*Mentha piperita* L.), DPPH (*1,1-diphenyl-2picryl hydrazil*), metanol 96%, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, HCl 2N, FeCl₃ 1%, serbuk Mg, larutan Mg alkohol, pelarut amil alkohol, toluen, air.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze), dan daun mint (*Mentha piperita* L.) di B2P2TOOT Tawangmangu secara mikroskopik dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada di buku.

2. Pengumpulan Bahan

2.1. Tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea* L.). Tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) diambil di daerah Klaten, Jawa Tengah. Diambil bunga berwarna ungu yang masih muda, segar dan telah mekar.

2.2. Tanaman daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze). Tanaman daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze) diambil di daerah Kemuning, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Diambil daun pada pucuk ditambah dengan 2-3 helai daun muda yang masih segar.

2.3. Tanaman daun mint (*Mentha piperita* L.). Tanaman daun mint (*Mentha piperita* L.) diambil di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Diambil daun yang masih segar, masih berwarna hijau, memiliki aroma khas mint, dan memiliki rasa segar seperti menthol.

3. Pembuatan Simplisia

Bahan baku teh yang sudah diambil sesuai dengan kriteria kemudian dicuci menggunakan air bersih yang mengalir sambil disortir untuk memastikan tidak ada bahan asing yang tercampur. Setelah itu, bahan ditiriskan dan dilayukan pada suhu ruang selama 18 jam (Arumsari *et al.*, 2019). Proses pengeringan dilanjutkan dengan penjemuran di bawah sinar matahari menggunakan wadah bersih yang ditutup kain hitam hingga bahan benar-benar kering. Selanjutnya, bahan dikeringkan lagi menggunakan oven pada suhu 50°C selama 2 jam. Setelah proses pengeringan selesai, bahan dihancurkan menjadi serbuk tanpa proses pengayakan. Serbuk dari masing-masing bahan baku

kemudian digunakan untuk pengujian parameter lebih lanjut (Purwaningsih *et al.*, 2020).

4. Penetapan Kadar Air

Kadar air ditetapkan dengan cara destilasi toluen. Penetapan kadar air ini dilakukan masing-masing untuk ke tiga simplisia yaitu simplisia bunga telang, daun teh hijau, dan daun mint. Sebelum digunakan, toluen dijenuhkan menggunakan air, kemudian ditimbang masing-masing sampel sebanyak 10 g. Pengujian kadar air dilakukan secara terpisah pada simplisia kering bunga telang, daun teh hijau, dan daun mint. Simplisia kering dimasukkan ke dalam labu alas bulat, kemudian ditambahkan toluen yang telah dijenuhkan dengan air sebelumnya. Labu tersebut dipanaskan selama 15 menit. Ketika toluen mulai mendidih, laju penyulingan diatur menjadi 2 tetes per detik, lalu meningkat menjadi 4 tetes per detik. Setelah seluruh air tersuling, proses pemanasan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penampung dibiarkan hingga suhunya turun ke suhu ruang. Selanjutnya, volume air dibaca dan dicatat saat pemisahan antara toluen dan air terjadi secara sempurna. Sesuai standar mutu (FHI, 2017), kadar air simplisia sebaiknya tidak melebihi 10%. Kadar air yang lebih tinggi dari batas tersebut dapat menurunkan kualitas simplisia, seperti merusak bentuk fisiknya dan meningkatkan risiko kontaminasi bakteri (Handayani *et al.*, 2017).

$$\text{Kadar air (v/b)} = \frac{\text{volume air (ml)}}{\text{Berat simplisia awal (g)}} \times 100\%$$

5. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Sebanyak 5 gram bahan kering ditimbang, kemudian dimaserasi selama 24 jam menggunakan 100 mL air jenuh kloroform. Setelah didiamkan selama 18 jam, campuran tersebut disaring. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditimbang sebelumnya. Residu yang diperoleh kemudian dipanaskan pada suhu 105°C hingga mencapai berat yang konstan. Persentase kandungan senyawa yang larut dalam air dihitung berdasarkan rumus yang telah ditetapkan (FHI, 2017). Standar minimal kadar sari larut air yang baik adalah $\geq 24\%$ untuk bunga telang, $\geq 8,4\%$ untuk daun teh hijau, dan $\leq 22\%$ untuk daun mint (FHI, 2017).

$$\text{Kadar sari larut air (b/b)} = \frac{\text{Berat sari larut air}}{\text{Berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

6. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Serbuk sebanyak 5 g dari masing-masing sampel diekstraksi menggunakan metode maserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 96% dalam erlenmeyer, sambil dikocok secara berkala selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah proses maserasi selesai, campuran disaring dan diambil sebanyak 20 mL filtrat untuk diuapkan hingga kering dalam cawan porselin yang telah ditimbang sebelumnya. Residu kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C hingga diperoleh bobot tetap. Persentase senyawa yang larut dalam etanol 96% dihitung berdasarkan berat awal ekstrak cair. Berdasarkan standar FHI (2017), kadar sari larut etanol yang baik adalah $\geq 11\%$ untuk bunga telang, $\geq 4,5\%$ untuk daun teh hijau, dan $\geq 5\%$ untuk daun mint. (FHI, 2017).

$$\text{Kadar sari larut etanol (b/b)} = \frac{\text{Berat sari larut etanol}}{\text{Berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

7. Uji Kandungan Senyawa

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia kering dari masing-masing sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas beaker. Selanjutnya, ditambahkan 100 mL aquades, kemudian dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk. Setelah itu, larutan dibiarkan selama 5 menit sebelum disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk pengujian kandungan senyawa pada sampel.

7.1. Uji fenol. Sebanyak 10 mL filtrat hasil penyaringan dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai kontrol pembanding, sedangkan tabung kedua digunakan untuk uji kandungan fenol. Pada tabung uji ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1%. Adanya senyawa fenol ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau, merah, ungu, biru, atau hitam (Harborne, 1987).

7.2. Uji flavonoid. Sebanyak 10 mL filtrat hasil penyaringan dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai kontrol pembanding, sedangkan tabung kedua diperuntukkan bagi uji flavonoid. Ke dalam tabung uji ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium, 2 mL larutan alkohol magnesium, HCl, dan pelarut amil alkohol dengan perbandingan 1:1, lalu dikocok hingga terbentuk pemisahan lapisan. Kehadiran flavonoid ditandai dengan munculnya warna merah, jingga, atau kuning pada lapisan amil alkohol (Junior *et al.*, 2020).

7.3. Uji tanin. Sebanyak 10 mL filtrat hasil penyaringan dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai kontrol pembanding, sedangkan tabung kedua digunakan untuk pengujian tanin. Ke dalam tabung uji ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1%. Adanya kandungan tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman, biru kehitaman, atau coklat. (Nugrahani *et al.*, 2016).

7.4. Uji saponin. Sebayak 10 mL filtrat hasil penyaringan dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai kontrol pembanding, sedangkan tabung kedua digunakan untuk pengujian saponin. Tabung uji dikocok selama ± 10 detik, kemudian didiamkan selama 10 menit (Nugrahani *et al.*, 2016). Kandungan saponin dinyatakan positif apabila terbentuk buih stabil yang bertahan selama 10 menit setelah pengocokan (Fitriyani *et al.*, 2011).

7.5. Uji alkaloid. Sebanyak 0,1 gram simplisia kering dimasukkan ke dalam gelas beaker, kemudian ditambahkan 10 mL kloroform (CHCl_3) dan 4 tetes hidroksilamin (NH_2OH). Campuran tersebut disaring dan filtratnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup. Selanjutnya, ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL larutan H_2SO_4 2M, lalu dikocok hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam di bagian atas dipindahkan ke tabung reaksi lain, kemudian diberi pereaksi identifikasi alkaloid. Pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih, pereaksi Dragendorff membentuk endapan merah jingga, sedangkan pereaksi Wagner menimbulkan endapan coklat (Nugrahani *et al.*, 2016).

8. Formulasi Teh

Formulasi proporsi bahan baku bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze), dan daun mint (*Mentha piperita* L.) dalam penelitian ini dibuat 7 formula teh, pada formula teh 1, 2, dan 3 berisi simplisia tunggal, sedangkan formula 4 sampai 7 terdiri dari campuran 3 simplisia dengan proporsi yang berbeda namun dengan bobot akhir yang sama. Rancangan formula teh dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rancangan formula teh bahan baku bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), daun teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kuntze), dan daun mint (*Mentha piperita* L.)

Formula	Bobot bahan dalam formula teh (g)			Bobot total kombinasi teh (g)
	Bunga telang	Daun teh hijau	Daun mint	
1	3	0	0	3
2	0	3	0	3
3	0	0	3	3
4	0,5	1,5	1,0	3
5	1,0	0,5	1,5	3
6	1,5	1,0	0,5	3
7	1,0	1,0	1,0	3

9. Pembuatan Air Rebusan Teh

Pembuatan air rebusan teh diawali dengan menimbang bahan serbuk teh yang sudah kering sesuai formula yang telah dibuat dengan bobot total masing-masing formula sebanyak 3 gram. Serbuk teh dimasukkan ke dalam gelas beker, kemudian diberi air sebanyak 100 mL, ditutup menggunakan alumunium foil dan diletakkan ke atas *hot plate* dengan *stirrer* 90 rpm, kemudian dipanaskan dengan suhu 90°C hingga mendidih sambil sesekali diaduk. Setelah mendidih, didiamkan selama 5 menit sambil dijaga suhunya agar tetap 90°C Kemudian dipindahkan dari atas *hot plate*, didiamkan kembali selama 10 menit. Kemudian air rebusan teh disaring menggunakan kertas saring ke dalam erlenmeyer. Ketika air rebusan sudah mencapai suhu kamar, pindahkan ke dalam botol bening (Arumsari, 2019).

10. Uji Kemampuan Peredaman Radikal Bebas DPPH

Sebanyak 0,0039 g DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL metanol. Larutan stok 1% air rebusan tiap formula dibuat dengan mengambil 1 mL air rebusan teh, dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, lalu ditambahkan aquades hingga tanda batas. Dari larutan tersebut, dipipet 0,5 mL dan diencerkan hingga 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 500 ppm. Uji peredaman radikal bebas DPPH dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-VIS dengan mengukur absorbansi larutan DPPH terlebih dahulu. Selanjutnya, 1 mL sampel dicampurkan dengan 3,8 mL larutan DPPH dalam wadah gelap, diaduk perlahan, dan diinkubasi selama 15 menit. Campuran kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian dilakukan pada konsentrasi 500 ppm dengan tiga kali pengulangan pembacaan (Indarwati, 2015).

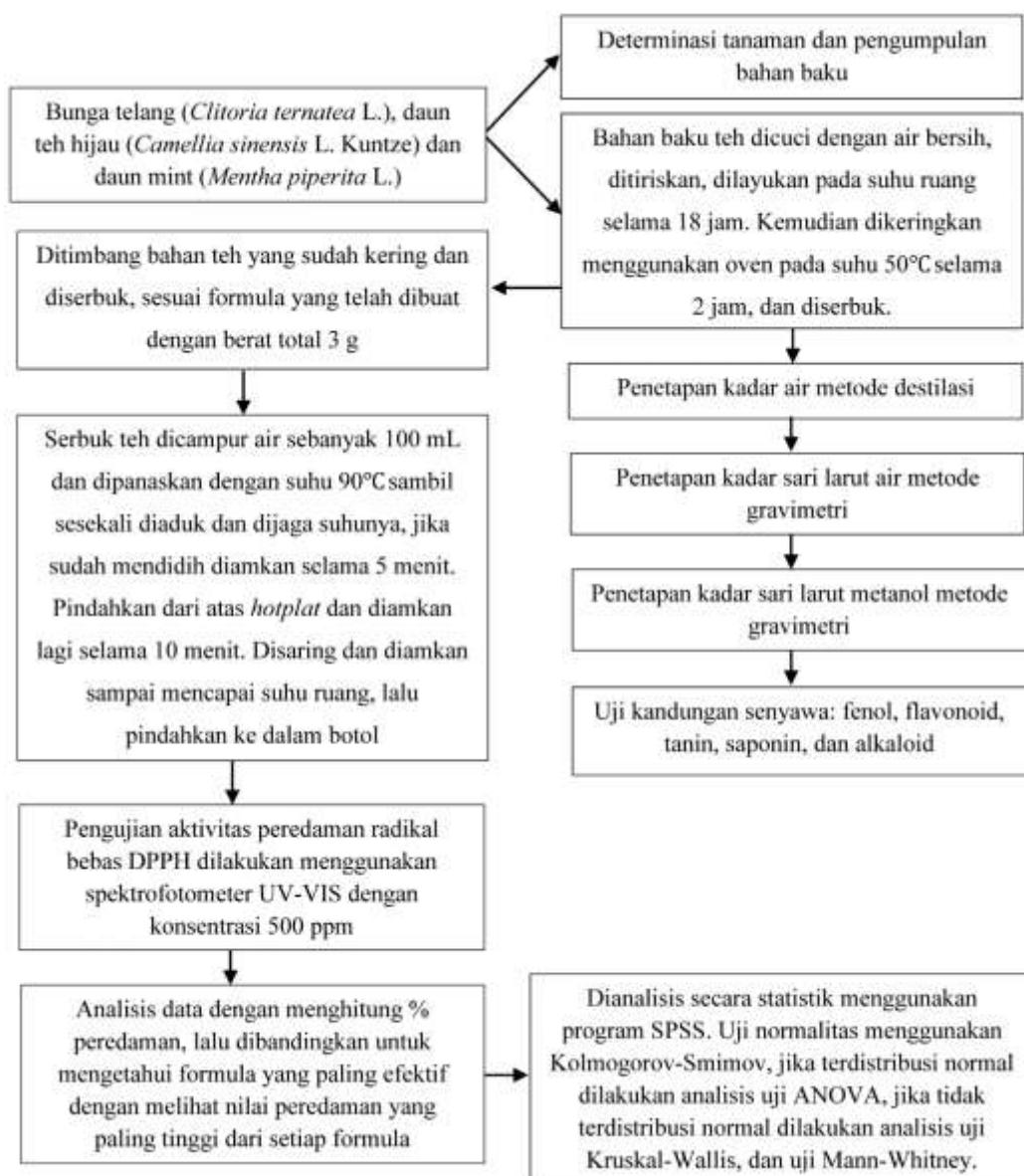
E. Analisis Data

Data hasil pengukuran absorbansi selanjutnya digunakan untuk menghitung kemampuan peredaman radikal bebas DPPH dari berbagai formula dengan cara membandingkan hasil perhitungan persen (%) peredaman radikal bebas DPPH untuk menunjukkan formula yang paling efektif dalam meredam aktivitas radikal bebas dengan nilai peredaman yang paling tinggi. Rumus persentase dari peredaman sebagai berikut:

$$\text{Peredaman (\%)} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Data persentase peredaman air rebusan teh bunga telang, daun teh hijau, dan daun mint dianalisis secara statistic menggunakan program SPSS. Uji normalitas dilakukan dengan metode Kolmogorov-Smirnov untuk menentukan distribusi data. Apabila data terdistribusi normal, analisis dilanjutkan dengan uji ANOVA. Sebaliknya, jika data tidak berdistribusi normal, digunakan uji Kruskal-Wallis. Untuk mengetahui perbedaan signifikan antara dua kelompok sampel, dilakukan uji lanjut menggunakan Mann-Whitney.

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 6. Skema Jalannya Penelitian