

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang akan dilakukan kali ini adalah model eksperimental. Penelitian ini diawali dengan pembuatan simplisia bunga telang yang telah menjadi serbuk kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak bunga telang yang telah dihasilkan dilakukan skrining fitokimia agar diketahui metabolit sekunder yang ada pada bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) selanjutnya ekstrak dibuat sediaan nanoemulsi dan diuji karakteristik fisik dari sediaan nanoemulsi yang meliputi uji % transmitan, uji organoleptis, uji pH, uji ukuran partikel dan indeks polidispersitas. Tahap selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan dihitung nilai IC_{50} .

B. Lokasi Penelitian

1. Lokasi penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

2. Waktu Penelitian

Februari - April 2024

C. Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan bunga telang pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Ekstrak yang diperoleh dari simplisia bunga telang menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96% selama 5 hari.
2. Kosurfaktan yang digunakan pada pembuatan formula ini yaitu PEG 400 dengan konsentrasi yaitu 10 g dan 15 g.
3. Skrining fitokimia dilakukan pada ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) meliputi alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Konsentrasi kosurfaktan PEG 400 dalam formula nanoemulsi F1 10 gram dan F2 15 gram.

2. Variabel Terikat

- a. Karakteristik fisik nanoemulsi ekstrak bunga telang meliputi Uji % transmittan, organoleptis, pH, ukuran partikel dan indeks polidispersitas.
- b. Aktivitas antioksidan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan parameter metode DPPH dari nilai IC_{50}

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu suhu pada setiap perlakuan, waktu ekstraksi, volume pelarut dalam proses ekstraksi, dan cahaya.

E. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Magnetic stirrer, *particle size analyzer* (PSA), Spektrofotometer UV-VIS, pH meter, timbangan analitik, *beaker glass*, erlenmeyer, labu ukur, waterbath, Rotary Evaporator, cawan penguap, alat maserasi, tabung reaksi, kertas saring, pipet tetes, dan pipet volume.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak bunga telang, kuersetin, etanol 96%, etanol p.a DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhidrazyl), tween 80, PEG 400, VCO (*Virgin coconut oil*), dan aquades.

3. Determinasi Tanaman

Tanaman Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) didapatkan pada bulan Januari di Bandungan, Jawa Tengah. Sampel tanaman kemudian dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

4. Pembuatan Simplisia

Pengumpulan bunga telang didapat dari Kecamatan Bandungan. Bunga telang yang digunakan adalah bagian bunga, kemudian dilakukan pemilihan / sortasi basah untuk menghilangkan ada bagian yang tidak diperlukan, lalu dicuci menggunakan air mengalir sampai bersih dan

dilakukan perajangan, setelah dirajang dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering kemudian dilakukan sortasi kering, bunga yang sudah disortasi di blender dan dihasilkan serbuk bunga telang, kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 40 dan disimpan dalam wadah tertutup rapat (Rivai *et al.*, 2014).

5. Pembuatan Ekstrak

Serbuk bunga telang yang telah diayak, ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dimaserasi dengan perbandingan 1 : 5 menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1.750 mL. Serbuk simplisia yang dimaserasi kemudian diaduk secara berkala dan didiamkan selama 3×24 jam pada suhu ruang dan gelap yang terlindung dari cahaya langsung. Kemudian disaring menggunakan kain flanel dan dilakukan proses remaserasi atau penambahan ulang pelarut sebanyak 750 mL etanol 96% selama 1 hari. Setelah dilakukan proses remaserasi dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain flannel, kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 50- 55⁰ C hingga sedikit kental. Setelah proses evaporator dilakukan penguapan dengan waterbath dengan suhu 50⁰C (Rivai *et al.*, 2014).

Hasil rendemen ekstrak bunga telang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{bobot simplisia sebelum diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

6. Skrining Fitokimia Ekstrak Bunga Telang

a. Alkaloid

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan beberapa tetes HCl 1% ,setelah larut kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi Mayer. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya endapan atau larutan yang berubah menjadi keruh (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

b. Flavonoid

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan dengan 100 mL air panas, kemudian didihkan selama 5 menit, dan selanjutnya disaring. Filtrat diukur sebanyak 5 mL kemudian ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, selanjutnya dikocok kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan larutan menjadi warna merah kuning atau jingga (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

c. Saponin

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan dengan 10 mL air, kemudian dikocok selama 1 menit, selanjutnya ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Bila busa yang terbentuk tetap stabil ± 7 menit, maka ekstrak menunjukkan hasil positif mengandung saponin (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

d. Tanin

Sebanyak 40 mg ekstrak dilarutkan dengan 4 mL air, selanjutnya ekstrak yang sudah larut diambil sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan 1 mL FeCl₃ 10%. Reaksi positif ditunjukkan dengan

terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

7. Formulasi Nanoemulsi

Sediaan nanoemulsi ekstrak bunga telang (*Clirtoria ternatea*) dibuat dalam dua formula, Kedua formula sediaan nanoemulsi yang dibuat disajikan pada Tabel 3.1. Menurut (Widyastuti & Saryanti, 2023) Semakin tinggi konsentrasi kosurfaktan maka stabilitas sediaan semakin baik, sediaan nanoemulsi yang memiliki stabilitas yang baik yaitu pada formula 2.

Tabel 3.1 Formula Sediaan Nanoemulsi Bunga Telang

Bahan	Formula 1	Formula 2
Ekstrak Bunga Telang	15,1 mg	15,1 mg
Fase minyak (VCO)	3 g	3 g
SurFaktan (Tween 80)	25 g	25 g
Kosurfaktan (PEG 400)	10 g	15 g
Aquades	100 mL	100 mL

Sumber : (Widyastuti & Saryanti, 2023)

8. Prosedur Pembuatan Nanoemulsi

Prosedur pembuatan formula sediaan topikal nanoemulsi bunga telang seperti pada tabel 3.1. Tween 80 dan PEG 400, ekstrak bunga telang dan VCO dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan dimasukkan magnetic stirrer selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Setelah 10 menit, aquades ditambah sedikit demi sedikit dan kecepatan pengadukan ditingkatkan menjadi 1250 rpm selama 10 menit. Bahan yang telah tercampur dihomogenkan. Penambahan aquades dihentikan setelah volume ad 100 mL (b/v), nanoemulsi yang terbentuk akan berwarna jernih (Kusumawardani, 2019).

9. Karakteristik Fisik Nanoemulsi

a. Persen Transmittan (%)

Sediaan nanoemulsi dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur persen transmittannya pada panjang gelombang 650 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Aquades digunakan sebagai blangko saat pengujian. Formulasi yang memiliki persentase transmittan 90%-100% menunjukkan bahwa formulasi tersebut memiliki penampakan visual yang jernih dan transparan (Destiyana *et al.*, 2018).

b. Organoleptis

Pengamatan organoleptis nanoemulsi dilakukan secara visual menggunakan panca indera, parameter yang diamati meliputi warna, bau, kejernihan, dan homogenitas (Destiyana *et al.*, 2018).

c. pH

Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter. Sebelum digunakan, elektroda dikalibrasi atau diverifikasi dengan menggunakan larutan standar dapar pH 4 dan 7. Proses kalibrasi selesai apabila nilai pH yang tertera pada layar telah sesuai dengan nilai pH standar dapar dan stabil. Setelah itu elektroda dicelupkan ke dalam sediaan. Nilai pH akan tertera pada layar (Destiyana *et al.*, 2018).

d. Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersitas

Pengujian dilakukan dengan menggunakan PSA (Particle Size Analyzer) dengan tipe Dynamic Light Scattering. Sebanyak 10 ml

sediaan diambil dan dimasukkan ke dalam kuvet. Kuvet harus terlebih dahulu dibersihkan sehingga tidak mempengaruhi hasil analisis. Kuvet yang telah diisi dengan sediaan kemudian dimasukkan ke dalam sampel holder dan dilakukan analisis oleh instrumen. Data yang diperoleh yaitu, ukuran partikel dan nilai polidispersibilitas (distribusi ukuran partikel) (Destiyana *et al.*, 2018).

10. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Cara Pembuatan Larutan DPPH

Ditimbang sebanyak 4 mg DPPH yang kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 40 ppm (Bakti *et al.*, 2017).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH 40 ppm diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450-550 nm untuk mendapatkan absorbansi \pm 0,2 – 0,8. Panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi paling besar merupakan panjang gelombang maksimum DPPH (Bakti *et al.*, 2017).

c. Operating Time

Larutan DPPH 40 ppm dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dengan interval waktu 1-30 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Bakti *et al.*, 2017). Hasil

stabil yang diperoleh pada penelitian sebelumnya pada menit ke 15-30 menit (Suwarni & Cahyadi, 2016).

d. Pembuatan Larutan Blanko DPPH

Larutan blanko DPPH dibuat dengan memipet larutan baku. DPPH 40 ppm sebanyak 3 mL dan dicukupkan dengan etanol pa 2 mL. Selanjutnya diukur pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Jumawardi *et al.*, 2021).

e. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Kuersetin ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas. sehingga didapat larutan baku kuersetin 1000 ppm. Tahap berikutnya diencerkan menjadi 100 ppm dengan memipet 1 mL baku kuersetin dalam labu ukur 10 mL tambahkan etanol pa sampai batas. Larutan 100 ppm dibuat seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 ppm dengan memipet masing-masing 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 dan dicukupkan dengan etanol pa pada labu ukur 10 ml. Masing-masing seri diukur sebanyak 2 mL kuersetin dan 3 mL larutan DPPH. Campuran dihomogenkan dan tutup dengan alumunium foil, diinkubasi sesuai operating time dengan suhu ruangan. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh, yaitu 515 nm (Jumawardi *et al.*, 2021).

f. Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Sebanyak 10 mg ekstrak bunga telang ditimbang dan tambahkan dengan etanol p.a pada labu ukur 100 ml sampai batas sehingga didapat

konsentrasi 100 ppm. Larutan 100 ppm dibuat seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 ppm dengan memipet masing-masing 1, 2, 3, 4, 5 dan dicukupkan dengan etanol p.a pada labu ukur 10 mL. Masing-masing seri diukur sebanyak 2 mL ekstrak bunga telang dan 3 mL larutan DPPH. Campuran dihomogenkan dan ditutup dengan alumunium foil, diinkubasi sesuai operating time dengan suhu ruangan. Absorbansi diukur pada panjang gelombang yang telah diperoleh, yaitu 515 nm.

g. Pengukuran Formula Nanoemulsi

Sebanyak 10 mL nanoemulsi ditambahkan dengan etanol p.a pada labu ukur 100 mL sehingga didapat konsentrasi 100 ppm. Larutan 100 ppm dibuat seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 ppm dengan memipet masing-masing 1, 2, 3, 4, 5 dan ditambahkan dengan etanol p.a pada labu ukur 10 mL. Masing-masing seri diukur sebanyak 2 mL formula nanoemulsi dan 3 mL larutan DPPH. Campuran dihomogenkan dan ditutup dengan alumunium foil, diinkubasi sesuai operating time dengan suhu ruangan. Absorbansi diukur pada panjang gelombang yang telah diperoleh, yaitu 515 nm.

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol bunga telang yang diperoleh kemudian dihitung besarnya hambatan serapan radikal bebas DPPH dengan cara menghitung persentase inhibisi serapan DPPH (Bakti et al., 2017). Rumus persentase inhibisi serapan DPPH :

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

h. Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ diperoleh persamaan regresi linier (x adalah konsentrasi sampel dan y adalah persen inhibisi). Persamaan tersebut adalah $y = bx + a$ (Pujiastuti & Saputri, 2019).

F. Pengolahan Data

1. Perhitungan Aktivitas Antioksidan

Nilai IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji yang dapat menangkap radikal bebas sebesar 50%. Jika nilai IC₅₀ diperoleh 0% maka sampel tersebut tidak memiliki aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% peredaman total perlu dilakukan pengenceran untuk melihat batas konsentrasi aktivitas antioksidannya. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol bunga telang yang diperoleh kemudian dihitung besarnya hambatan serapan radikal bebas DPPH dengan cara menghitung persentase inhibisi serapan DPPH (Bakti *et al.*, 2017).

Rumus Persentase inhibisi serapan DPPH :

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Hasil perhitungan dimasukkan dalam persamaan regresi linier dengan menggunakan konsentrasi sampel ($\mu\text{g/ml}$) atau ppm sebagai sumbu x dan nilai % inhibisi sebagai sumbu y (Butarbutar, 2019). Kategori nilai IC₅₀ terdapat pada tabel 3.2.

Tabel 3. 2 Kategori nilai IC₅₀

No	Kategori	Nilai IC ₅₀
1	Sangat Kuat	<50
2	Kuat	50-100
3	Sedang	100-250
4	Lemah	250-500
5	Tidak aktif	>500

Sumber : (Lung & Destiani, 2017)

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil uji karakteristik fisik sediaan nanoemulsi berdasarkan parameter uji persen transmittan, ukuran partikel, indeks polidispersitas, uji pH dan uji aktivitas antioksidan ekstrak dengan sediaan nanoemulsi hasil pengukuran nilai IC₅₀ terhadap Ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan dilakukan analisis data secara statistik menggunakan regresi linear. Hasil dari persamaan tersebut kemudian di analisis data statistika menggunakan SPSS dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) One Way Anova, langkah pertama yakni melakukan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak (Anderha & Maskar, 2021). Uji normalitas dalam penelitian ini menggunakan uji Shapiro-Wilk dikarenakan data yang digunakan kurang dari 50 yaitu 3 kali replikasi dengan taraf uji signifikansi 5% atau 0,05 (Fiqih Sabilillah *et al.*, 2016). Bila signifikansi pada p-value hasilnya hasilnya 0,05 atau sama dengan 0,05 maka H₀ diterima (Gaspersz & Salamor, 2021). Jika pada pengujian parametrik normalitas didapatkan hasil yang tidak normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu Kolmogorov-Smirnov dengan taraf signifikan uji 5% atau 0,05 dan apabila nilai p-value <50 maka H₀ ditolak (Quraisy, 2022).

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data yang digunakan dalam analisis telah homogen atau tidak. Uji homogenitas ini dilakukan menggunakan uji Levene, jika p-value menunjukkan hasil $<0,05$ maka H_0 ditolak atau data tidak terdistribusi homogen. Jika uji homogenitas didapatkan hasil yang tidak homogen maka selanjutnya dilakukan uji non parametrik Kruskal Wallis. Bila nilai p-value pada pengujian Kruskal Wallis didapatkan hasil $<0,05$ maka kelompok penelitian memiliki perbedaan yang bermakna atau menerima H_1 (Rosida *et al.*, 2014). Analisis lanjutan dari uji non parametrik Kruskal Wallis ini adalah Mann Whitney untuk mengetahui pasangan nilai yang berbeda signifikan.

Untuk data yang telah terdistribusi normal dan homogen selanjutnya diuji One Way Anova. Jika nilai signifikan yang didapatkan $>0,05$ maka menerima H_0 dan menolak H_1 bila tidak terdistribusi normal maka $<0,05$ maka H_0 ditolak (Rosida *et al.*, 2014). Untuk uji akhir dilakukan uji posthoc, jika terdapat perbedaan antar kelompok, maka dilanjutkan uji Post Hoc LSD. Apabila menunjukkan signifikansi $< 0,05$ maka dinyatakan signifikan.