

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk jenis penelitian eksperimental laboratoris. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian yang dilakukan yaitu standarisasi simplisia *C. ternatae* L. menggunakan parameter spesifik dan nonspesifik.

3.2 Sampel

Simplisia bunga telang sebanyak 1 Kg didapatkan dari kota Bogor dan Solo.

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.4.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia *C. ternatae* L. aquadest, etanol 96%, etanol 70% (Brataco), AlCl₃ (aluminium klorida) (Emprove), reagen *mayer, bouchardat, drangendorff*, Na₂CO₃ (narium karbonat) (Emsure), toleuna (Emsure), H₂SO₄ (asam sulfat) (Emsure), HClO₄ (asam perklorat) (Emsure), kuersetin (Sigma), dan HCl (asam klorida) (Emsure), serbuk Mg (Emsure), n-heksana (Emsure), CH₃COOH (Asam Asetat) (Emsure), kertas saring (Whatman).

3.4.2 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah maserator, alat-alat gelas (Pyrex @ Iwaki), cawan porselin, labu erlenmeyer, labu alas bulat, piknometer (Pyrex @ Iwaki), pH meter (ISTEK), tabung reaksi (pyrex), vial, klem, statif, mortir, stemper, botol coklat, timbangan analitik (Shimadzu), botol semprot, cawan krus, tang krus, kuvet, kondensor (Pyrex), Aufhauser (Iwaki), desikator (Duran), penangas air (Memmert), spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific), spektroskopi serapan atom, tanur (Nabertherm), Kompur Listrik (Maspion), Rotary Epavorator (Eyela) dan Oven (Gemmyco).

3.4 Variable Penelitian

3.4.1 Variable Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini yaitu variasi perbedaan kota pada simplisia bunga telang yaitu Kota Bogor dan Solo.

3.4.2 Variable Terikat

Variable terikat pada penelitian ini yaitu pengujian dengan parameter spesifik dan non spesifik. Pengujian dengan parameter spesifik meliputi identitas simplisia dan ekstrak, uji organoleptik, dan pengujian kadar sari larut etanol dan air dan pengujian kadar flavonoid total, sedangkan parameter nonspesifik meliputi susut pengeringan, bobot jenis, kadar air, kadar abu, cemaran logam berat.

3.4.3 Definisi Operasional Variable

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variable

No	Variable	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variable Bebas					
1	Variasi perbedaan kota simplisia bunga telang	Perbedaan kota pada pengambilan simplisia bunga telang, kota pengambilan simplisia bunga telang yaitu kota Bogor dan Solo.			
Variable Terikat					
Parameter Spesifik					
1	Identitas Simplisia	Pengujian yang dilakukan untuk	Organoleptik	Nominal	

		memberikan identitas yang obyektif terhadap simplisia.			
2	Bentuk	Pengujian dengan indera penglihatan.	Organoleptik	Nominal	1. Kering 2. Agak kering.
3	Bau	Pengujian fisik menggunakan indera penciuman	Organoleptik	Nominal	1. Tidak berbau. 2. Bau khas simplisia bunga telang.
4	Warna	Pengujian menggunakan indera penglihatan.	Organoleptik	Nominal	1. Coklat muda. 2. Coklat 3. Coklat tua.
5	Rasa	Pengujian menggunakan pengecapan.	Organoleptik	Nominal	1. Pahit. 2. Tidak pahit.
6	Kadar sari larut air dan etanol	Uji untuk memberikan gambaran kadar persentase senyawa yang dapat tersari dengan		Rasio	%

		menggunakan pelarut air dan etanol dari suatu simplisia.			
7	Kadar total flavonoid	Uji menentukan jumlah total flavonoid dari simplisia	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio	Catechin equivalent (CE) (mg/g)
Parameter Nonspesifik					
1	Penetapan susut pengeringan	Uji untuk mengukur sisa zat setelah dikeringkan sampai konstan dan dinyatakan sebagai persen	Oven Desikator	dan Rasio	%
2	Bobot jenis pengujian identitas dan kemurnian dari simplisia	Uji untuk mengidentifikasi identitas dan kemurnian dari simplisia	Piknometer	Rasio	g/mL
3	Kadar air	Untuk mencari kadar air dari simplisia bunga telang.	Destilasi	Rasio	%
4	Kadar abu	Uji untuk memperkirakan kandungan dan keaslian bahan	Tanur	Rasio	%

		yang digunakan.			
5	Penentuan cemaran logam	Uji mengetahui berat dalam simplisia	Spektrofotometri serapan atom	Rasio	Mg/Kg

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Penyiapan simplisia

Penyiapan sampel dilakukan dengan cara sortasi basah untuk memisahkan kotoran dan bahan asing lain dari bunga. Setelah itu dilakukan pencucian bunga telang dengan air mengalir. Kemudian diangin-anginkan hingga tidak terdapat sisa air. Setelah kering bunga dirajang dan dikeringkan dengan dua cara yaitu dengan sinar matahari langsung dan pengeringan pada oven dengan suhu 50°C. Kemudian bunga yang sudah kering ditandai dengan mudah hancurnya sampel ketika diremas, setelah kering bunga telang digiling hingga menjadi serbuk halus dan diayak.

3.5.2 Pembuatan Ekstrak

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Dengan perlakuan awal *C. ternatae* L. yang sudah dikeringkan dan dihaluskan, kemudian dimasukkan ke dalam maserator dan ditambahkan etanol 96% sampai semua sampel terendam. Kemudian dilakukan maserasi selama 1 x 24 jam dengan remaserasi sebanyak 3 kali. Dengan perbandingan 1 : 10 menggunakan 30 gram simplisia dan 300 mL pelarut etanol 96%.

3.5.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk menentukan senyawa kimia yang terkandung dalam simplisia, meliputi golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid/steroid dan saponin.

1 Identifikasi Alkaloid

0,5 gram serbuk simplisia lalu tambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL aquadest, panaskan selama 2 menit, di dinginkan dan disaring.

Filtrat yang didapat digunakan untuk pengujian alkaloid. Filtrat dibagi menjadi dua bagian, masing – masing filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi *Mayer* dan *Dragendorff*. Positif alkaloid pada pereaksi *mayer* akan terbentuk endapan putih dan pada pereaksi *dragendorff* terbentuk endapan kuning jingga (Mondong *et al.*, 2015; Depkes RI, 1989).

2 Identifikasi Flavonoid

Serbuk simplisia sebanyak 1 gram lalu tambahkan air panas 10 mL, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang didapatkan diambil 5 mL, tambahkan 0,1 gram serbuk Mg, 1 mL HCl dan 2 mL amil alkohol, kocok dan biarkan memisah. Positif terdapat flavonoid apabila terjadinya perubahan warna merah kuning pada filtrat atau warna jingga merah pada lapisan amil alkohol (Handayani *et al.*, 2019; Fikayuniar *et al.*, 2022).

3 Identifikasi Saponin

Serbuk simplisia sebanyak 0,5 gram ditambahkan 10 mL air panas, dinginkan, lalu kocok kuat selama 15 menit. Jika terbentuk buih selama 10 menit dengan tinggi buih 1-10 cm saat ditetesi dengan asam klorida 2 N, maka positif mengandung saponin (DepKes RI, 1989; Muthmainnah, 2017; Fikayuniar *et al.*, 2022).

4 Identifikasi Tanin

Serbuk simplisia sebanyak 1 gram ditambahkan aquadest sebanyak 10 mL, didihkan selama 3 menit. Filtrat yang didapat diencerkan dengan aquadest hingga bening tidak berwarna. 2 mL larutan diambil tambahkan 1-2 tetes FeCl_3 5%. Positif mengandung tanin apabila terjadi perubahan warna dari biru atau hijau kehitaman (Harbone, 1987; Muthmainnah, 2017; Fikayuniar *et al.*, 2022).

5 Identifikasi Steroid/Triterpenoid

Serbuk simplisia sebanyak 0,5 gram dimaserasi dengan 10 mL n-heksana selama 1 jam lalu disaring. Filtrat yang didapat diuapkan, sisa filtrat tambahkan 10 tetes pereaksi asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. positif mengandung steroid maka akan terbentuk cincin

biru kehijauan, sedangkan positif triterpenoid maka akan terbentuk cincin kecoklatan atau ungu pada batas larutan (Harbone, 1987; Muthmainnah, 2017; Fikayuniar *et al.*, 2022).

3.5.4 Penentuan Parameter-parameter Standarisasi

3.5.4.1 Parameter Spesifik

1 Identitas simplisia (Depkes, 2000)

Deskripsi tata nama, nama lain tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan dan nama Indonesia tumbuhan.

2 Penetapan organoleptik simplisia (Depkes, 2000)

Penetapan organoleptik meliputi bentuk, warna, bau dan rasa.

3 Penentuan kadar sari larut air (Depkes, 2000)

Kurang lebih 5 gram dimasukkan ke dalam labu bersumbat lalu tambahkan 100 mL air jenuh kloroform (2,5 mL kloroform dalam 1000 mL aquadest), dikocok berkali kali selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan selama 18 jam. Disaring lalu diuapkan dengan 20,0 mL filtrat hingga kering dalam cawan yang telah dipanaskan pada suhu 105 °C dan ditara, dan sisanya dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari larut air (Kemenkes, 2017).

$$\text{Kadar Sari Larut Air} = \frac{A_1 - B_0}{B} \times 100 \% \dots\dots \quad 4.1)$$

Ket : A_1 = Bobot cawan + residu setelah pemanasan (g)

B_0 = Bobot cawan kosong (g)

B = Bobot sampel awal (g)

4 Kadar Sari Larut Etanol

Kurang lebih 5 gram dimasukkan ke dalam labu bersumbat lalu tambahkan 100 mL etanol 96%, dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama, lalu biarkan selama 18 jam. Saring cepat untuk menghindari penguapan etanol, diuapkan 20,0 mL filtrat hingga kering dalam cawan penguap yang telah dipanaskan

pada suhu 105 °C, kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari larut etanol (Kemenkes, 2017).

$$\text{Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{A_1 - B_0}{B} \times 100 \% . \quad 4.2)$$

Ket : A_1 = Bobot cawan + residu setelah pemanasan (g)

B_0 = Bobot cawan kosong (g)

B = Bobot sampel awal (g)

3.5.4.2 Parameter Nonspesifik

1 Penetapan susut pengeringan

Ekstrak ditimbang sebanyak 1 gram dalam cawan yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit yang sudah ditara. Goyangkan cawan yang berisi ekstra sampai rata hingga terbentuk lapisan tebal setebal 5 mm sampai 10 mm. Lalu dikeringkan dengan dimasukkan ke dalam ruang pengering. Buka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Biarkan cawan dalam keadaan tertutup dan akan mendingin dalam desikator hingga suhu kamar. Dicatat bobot tetap yang didapatkan (Depkes RI, 2000).

$$\% \text{ Susut Pengeringan} = \frac{A - B}{B} \times 100 \% \dots\dots \quad 4.3)$$

Ket : A = Bobot sampel sebelum dipanaskan (g)

B = Bobot sampel sebelum dipanaskan (g)

(Selawa, 2013).

2 Bobot Jenis

Gunakan piknometer yang kering dan bersih. Ditimbang terlebih dahulu piknometer yang akan digunakan. Diisi piknometer dengan aquadest lalu suhunya diatur 25 °C dan ditimbang. Aquadest yang berada dalam piknometer

dikeluarkan dan dikeringkan setelah itu masukan ekstrak cair 5% ke dalam piknometer dan diatur suhunya 25 °C dan ditimbang (Depkes RI, 2000).

$$\text{Bobot Jenis} = \frac{A_1 - B_0}{B - A_0} \times 100 \% \dots\dots\dots 4.4)$$

Ket : A_1 = Bobot piknometer + ekstrak cair (g)

A_0 = Bobot piknometer kosong (g)

B = Bobot piknometer + aquadest (g)

3 Kadar Air

Kadar air simplisia bunga telang dilakukan dengan menggunakan metode destilasi dengan pelarut toleuna. Pelarut yang akan digunakan dijenuhkan dahulu dengan 2 mL aquadest. Sebanyak 2 gram simplisia ditimbang lalu dimasukan ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan toluene yang sudah dijenuhkan. Alat destilasi dipasang lalu tuangkan toleuna ke dalam tabung penerima melalui pendingin. Labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit, setelah toleuna mendidih, penyulingan diatur selama 2 tetes per detik, lalu 4 tetes per detik. Setelah toluene mendidih semua biarkan tabung penerima mendingin hingga suhu kamar. Setelah lapisan memisah sempurna, volume air dihitung kadar airnya dalam persen terhadap berat ekstrak semula (Saifudin *et al.*, 2011).

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{\text{Volume Air (mL)}}{\text{Volume Bahan (g)}} \times 100 \% \dots 4.5)$$

4 Kadar Abu

a. Penetapan kadar abu total

Sebanyak 2 gram atau 3 gram simplisia digerus dan ditimbang. Masukan ke dalam krus silikat yang sudah dipijarkan secara perlahan, lalu ratakan. Kemudian pijarkan pada suhu 600 °C selama 3 jam. Setelah itu didinginkan dalam desikator hingga diperoleh bobot tetap.

Jika dengan cara ini arang tidak dapat hilang, tambahkan air panas lalu saring menggunakan kertas saring bebas abu, pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat dalam krus, lalu uapkan. Pijarkan hingga diperoleh bobot tetap. Lalu timbang berat abu (A_1). Kadar abu dihitung dalam persen terhadap berat sampel awal (Depkes RI, 2000) :

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{A_1 - B_0}{B} \times 100 \% \dots\dots\dots 4.6)$$

Ket : A_1 = Bobot krus+ekstrak setelah pemijaran (g)

A_0 = Bobot krus kosong (g)

B = Bobot sampel awal (g)

b. Kadar abu yang tidak larut asam

Abu yang didapatkan dari penetapan kadar abu dididihkan dalam 25 mL asam sulfat encer selama 5 menit. Bagian yang tidak larut asam dikumpulkan dengan menyaring menggunakan kertas saring bebas abu sebelum ditimbang (A_1). Tentukan kadar abu yang tidak larut asam dalam persen terhadap berat sampel awal (Depkes RI, 2000).

$$\% = \frac{A_1 - (C \times 0,0076) - A_0}{B} \times 100 \% \dots\dots\dots 4.7)$$

Ket : A_1 = Bobot krus+ekstrak setelah pemijaran (g)

A_0 = Bobot krus kosong (g)

B = Bobot sampel awal (g)

C = Bobot kertas saring bebas abu (g)

c. Kadar abu tidak larut air panas

Sebanyak 2 gram simplisia ditimbang, lalu masukan ke dalam krus silikat yang sudah dipijarkan, kemudian ditarakan dan pijarkan kembali perlahan – lahan hingga arang habis, setelah dipijarkan, dinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak hilang, ditambahkan air

panas lalu saring menggunakan kertas saring bebas abu. Dipijarkan kembali sisa dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, diuapkan lalu dipijarkan kembali hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang dikeringkan.

$$\% = \frac{A_1 - (C \times 0,0076) - A_0}{B} \times 100 \% \dots\dots\dots \mathbf{4.8)}$$

Ket : A_1 = Bobot krus+ekstrak setelah pemijaran (g)

A_0 = Bobot krus kosong (g)

B = Bobot sampel awal (g)

C = Bobot kertas saring bebas abu (g)

5 Penentuan cemaran logam

a. Pembuatan larutan standar

1) Larutan standar kadmium (cd) dengan konsentrasi 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 ppm.

2) Larutan standar timbal (pb) dengan konsentrasi 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 ppm.

b. Dekstruksi sampel

Sampel ditimbang sebanyak 0,326 g, sampel dimasukkan ke dalam labu lalu tambahkan HNO_3 pekat 65% sebanyak 5 mL untuk melarutkan logam-logam yang terdapat dalam sampel. Lalu ditambahkan 2 mL HCl 30 % yang merupakan oksidator kuat untuk menguraikan senyawa organik. Lalu dikocok sedang agar tercampur, diamkan selama 15 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam microwave. Setelah dari microwave dibiarkan selama 30 menit untuk disejukan. Lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL.

c. Metode spektrofotometri serapan atom

1) Pengukuran sampel larutan standar

Sederetan larutan standar dengan konsentrasi masing-masing 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 ppm untuk cd dan Pb, diukur serapannya pada panjang gelombang 228,8 nm (Cd) dan 217,0 nm (Pb) dengan SSA.

2) Pengukuran serapan sampel

Sampel yang sudah di destruksi dapat diukur serapan atomnya. Absorbansi larutan sampel diukur pada panjang gelombang 228,8 nm (Cd) dan 217,0 nm (Pb) dengan SSA.

Berdasarkan buku monografi ekstrak tumbuhan obat nilai logam Pb tidak lebih dari 10 mg/Kg, dan logam Cd tidak lebih dari 0,3 mg/Kg (Zulharmita, 2017).

3.5.5 Kadar total Flavonoid

a. Pembuatan Larutan Uji $AlCl_3$ 10%

Ditimbang sebanyak 10 gram Aluminium (III) Chlorida lalu dilarutkan dalam 100 mL aquadest

b. Pembuatan Larutan Uji CH_3COOH 1 M

Ditimbang 13,608 gram Natrium Asetat dalam 100 mL aquadest

c. Pembuatan Larutan Standar

Ditimbang 25 mg kuersetin kemudian dilarutkan dengan methanol p.a hingga 50 mL dibuat pengenceran dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100, 120.

d. Pembuatan kurva standar kuersetin

Total flavonoid pada ekstrak akan ditentukan sesuai dengan metode Chang (2002). Kuersetin digunakan sebagai larutan standar dan dibuat dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ yang kemudian diencerkan dengan konsentrasi 20-120 $\mu\text{g/mL}$ sebagai larutan kuersetin pembanding. Larutan standar kuersetin dibuat dengan konsentrasi pengenceran 20, 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm. Sebanyak 0,5 mL larutan kuersetin

ditambahkan dengan 1,5 mL etanol 96%, ditambahkan 0,1 mL alumunium (III) klorida 10%, lalu ditambahkan 0,1 mL asam asetat 1M, dan ditambahkan 2,8 mL aquadest, setelah itu dicampurkan dan diinkubasi selama 30 menit kemudian diukur absorbansinya dengan Panjang gelombang 415 nm. Masing masing larutan pembanding dengan variasi konsentrasi diukur dengan pengulangan sebanyak tiga kali.

e. Penentuan kadar Flavonoid Total simplisia Bunga Telang

Timbang ekstrak bunga telang sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam 50 mL methanol p.a sebagai larutan stok. Kemudian sampel dibuat pengenceran dibuat dengan konsentrasi (2000-8000) $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 0,5 mL larutan stok dipipet lalu tambahkan, 1,5 mL etanol 96%, lalu ditambahkan 0,1 mL alumunium (III) klorida 10%, dan 0,1 mL kalium asetat 1M lalu ditambahkan dengan 2,8 mL aquadest setelah itu diinkubasi selama 30 menit dan diukur absorbansinya dengan Panjang gelombang 415 nm. Dilakukan tiga kali replikasi sampel setiap analisis (Cheng, 2002; Fidrianny *et al.*, 2014).

3.6 Analisis Data

Hasil yang diperoleh dari standarisasi simplisia bunga telang dianalisis dengan metode deskriptif dan deskriptif komperatif. Analisis dilakukan dengan memaparkan hasil pengukuran yang diperoleh dari penelitian. Hasil yang dipaparkan secara deskriptif yaitu hasil pengujian identitas, organoleptik, susut pengeringan, bobot jenis dan cemaran logam. Untuk pengukuran kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar abu tidak larut air panas, kadar sari larut air dan etanol serta kadar air dipaparkan secara deskriptif komperatif dengan membandingkan hasil penelitian tersebut dengan nilai standar yang tercantum dalam *Materia Media Indonesia* Jilid V tahun 1989 sedangkan untuk cemaran logam pada PerBPOM No. 32 Th. 2019 dan hasil yang diperoleh juga dianalisis

perbandingan atau perbedaan menggunakan software SPSS menggunakan uji *Independent Sample T test*. Dengan cara berikut:

a) Pengujian Hipotesis

Ho : Tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok perlakuan

H1 : Terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok perlakuan

b) Pengambilan Kesimpulan

Pengambilan kesimpulan dilakukan dengan membandingkan hasil yang ada pada statistic. Apabila sig. $>0,05$ maka Ho diterima, yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok perlakuan dan apabila Sig. $<0,05$ maka Ho ditolak, yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan.

Sedangkan data yang diperoleh dari pengujian penetapan kadar flavonoid total dan cemaran logam dianalisis perbandingan menggunakan software SPSS yaitu uji *One Way Anova*. Dengan cara berikut :

a) Pengujian Hipotesis

Ho : Tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok perlakuan

H1 : Terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok perlakuan

b) Pengambilan Kesimpulan

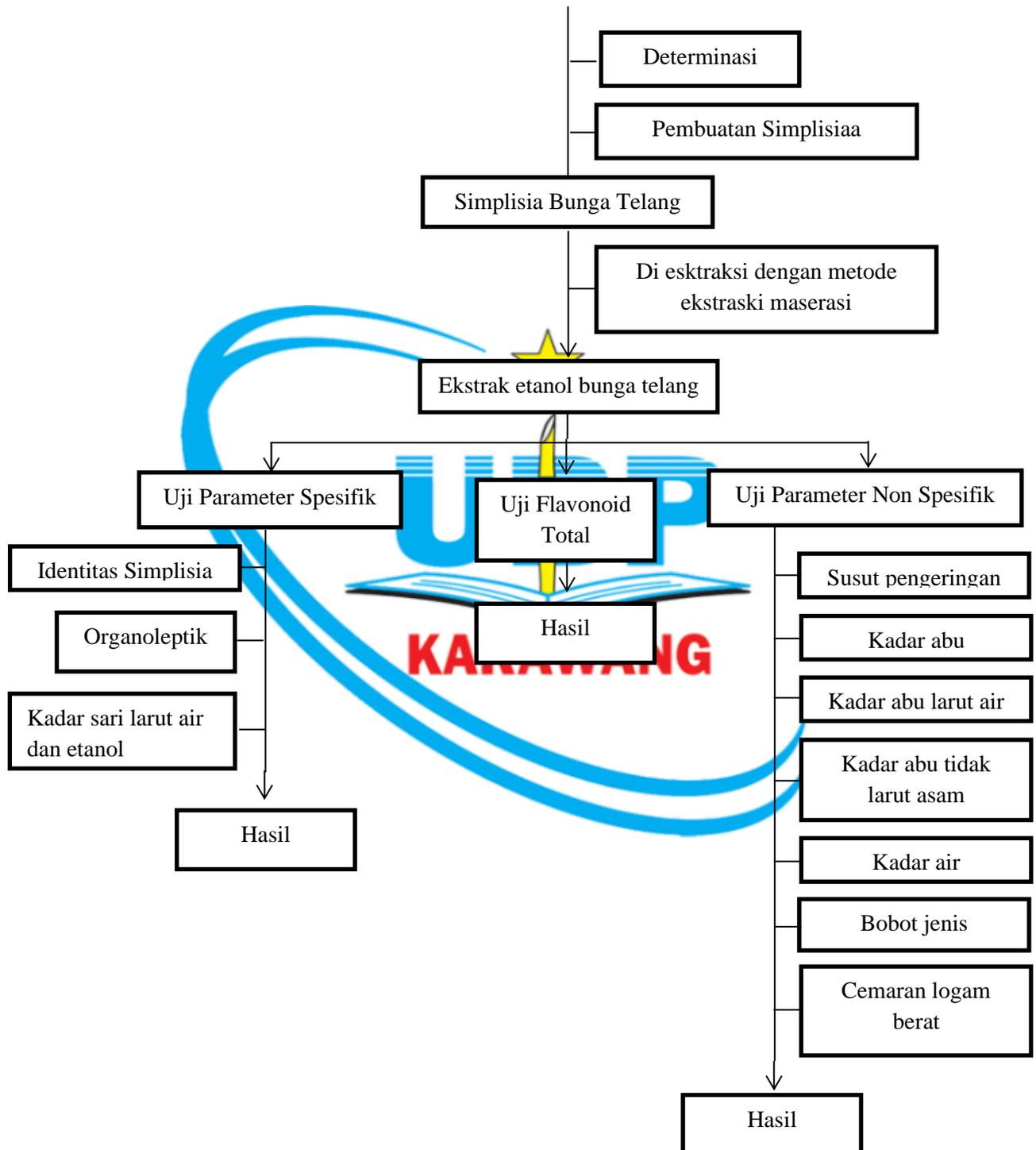
Pengambilan kesimpulan dilakukan dengan membandingkan hasil yang ada pada statistic. Apabila sig. $>0,05$ maka Ho diterima, yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok perlakuan dan apabila Sig. $<0,05$ maka Ho ditolak, yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan.

c) Analisis Lanjutan Uji Duncan

Setelah melakukan uji *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan dari ekstrak bunga telang dari masing-masing daerah, lalu dilanjutkan uji Duncan.

3.7 Diagram Alir Penelitian





Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian