

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini merupakan penelitian secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 Faktor konsentrasi kombinasi dari bunga telang dan teh putih dengan 3 kali pengulangan. Penelitian meliputi formulasi teh celup bunga telang dan teh putih dengan variabel perbandingan kombinasi teh celup bunga telang dan teh putih, uji mutu fisik dan uji mutu kimia teh celup bunga telang dan teh putih, serta uji aktivitas antioksidan teh celup bunga telang dan teh putih. analisis data dilakukan dengan menggunakan uji *one-way ANOVA*.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan yaitu simplisia kering bunga telang (*Clitoria ternatea*. L) yang berasal dari Kabupaten Sukabumi sebanyak 200 gram dan simplisia kering teh putih (*Camellia sinensis*) yang berasal dari PT Perkebunan Nusantara VIII Bandung 150 gram.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Batang Pengaduk (Pyrex®), Pipet, Kertas Perkamen, Cawan Porselen (Pyrex®), Tabung Reaksi (Pyrex®), Neraca analitik digital, Gelas Ukur (Pyrex®), Gelas Kimia (Pyrex®), Labu Ukur (Pyrex®), pH meter (Neomet) dan pH meter *Universal* (MColorpHast), Spektrofotometer *UV-Vis* (Thermo Scientific), *Water Bath* (Memmert), *Tanur* (Nabertherm), *Oven* (Gemmyco), Kurs Porselen, Kuvet, *aluminium foil*, dan *Impulse Sealer*.

3.3.2 Bahan

Bahan yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea*. L) yang telah dikeringkan dari Sukabumi sebanyak 200 gram, simplisia teh putih (*Camellia sinensis*) yang telah dikeringkan dari PT Perkebunan Nusantara VIII Bandung sebanyak 150 gram, kantong teh sebanyak 120 pcs, aquadest, methanol *pa*, DPPH, vitamin C, kloroform, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, larutan amonia, larutan hidrogen klorida (HCl), larutan sodium hidroksida (NaOH), pereaksi Lieberman-Burchard.

3.4 Lokasi Penelitian Dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Teknologi dan Mikrobiologi, Laboratorium Instrumental Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dan determinasi bunga telang dan teh putih dilakukan di UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional Tawangmangu. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Desember 2022 s/d Juli 2023.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu perbandingan kombinasi antara bunga telang (*Clitoria ternatea*. L) dan teh putih (*Camellia sinensis*) yaitu 50%:50%, 60%:40%, dan 70%:30%.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu pengujian mutu fisik teh celup meliputi uji organoleptik, pengujian mutu kimia teh celup meliputi uji pH, uji kadar air, uji kadar ekstrak dalam air, dan uji kadar abu, serta pengujian aktivitas antioksidan teh celup kombinasi bunga telang (*Clitoria ternatea*. L) dan teh putih (*Camellia sinensis*).

3.5.3 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas				
Formulasi teh celup bunga telang dan teh putih	Formulasi teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih dengan variasi konsentrasi perbandingan	Pengujian mutu fisik (kehalusan teh, organoleptik), dan pengujian mutu kimia (kadar air, kadar abu, dan pH), uji aktivitas antioksidan dan uji hedonik.	Nominal	1. Kontrol positif 2. Kontrol negatif 3. F1 50%:50% 4. F2 60%:40% 5. F3 70%:30%.
Variabel Terikat				
Warna	Parameter fisik menggunakan indera mata dalam pengujian teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih	Uji organoleptik	Nominal	1. Biru 2. Biru pekat
Bau	Parameter fisik menggunakan indera penciuman dalam pengujian teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih	Uji organoleptik	Nominal	1. Berbau khas 2. Tidak berbau
Rasa	Parameter fisik menggunakan indera perasa dalam pengujian teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih	Uji organoleptik	Nominal	1. Rasa khas 2. Tidak berasa
Kadar air	Nilai % kadar air pada seduhan teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih	Mutu kimia	Rasio	% kadar air

Variabel	Definisi	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
Kadar ekstrak dalam air	Nilai % kadar ekstrak dalam air pada seduhan teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih	Mutu kimia	Rasio	% kadar ekstrak dalam air
Kadar abu	Nilai % kadar abu pada seduhan teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih	Mutu kimia	Rasio	% kadar abu
pH	Nilai pH pada seduhan teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih	Ph meter	Rasio	Angka dalam pH meter
Aktivitas antioksidan	Uji aktivitas teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih menggunakan metode DPPH dengan mengukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio	Ppm (<i>per part million</i>)

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi

Determinasi ialah proses identifikasi suatu tumbuhan agar dibandingkan dengan tumbuhan lain yang sudah diketahui/dikenal, bertujuan guna menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan/sampel untuk penelitian. Determinasi bunga telang dan teh putih dilakukan di UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional Tawangmangu.

3.6.2 Preparasi Simplisia

Sampel berupa bunga telang yang diperoleh dari kabupaten Sukabumi. Kemudian untuk mendapatkan Simplisia bunga telang langkah awal yang dilakukan yaitu sortasi basah pada bahan, ditimbang untuk mengetahui bobot sebelum mengalami pengeringan, selanjutnya pencucian dengan air mengalir setelah itu penirisan, pelayuan dan pengeringan bahan menggunakan sinar matahari. Kemudian setelah bahan kering dilakukan sortasi kering dan pengecilan ukuran bahan menjadi lebih kecil dengan menggunakan blender hingga ukuran bunga telang sama seperti ukuran teh pada umumnya yaitu yang lolos pada ayakan 70 mesh (Sinambela, 2021).

Sampel berupa teh putih yang diperoleh dari PT Perkebunan Nusantara VIII Bandung. Teh putih yang digunakan adalah teh yang sudah dikeringkan dengan cara setelah pemetikan segera dikeringkan dibawah sinar matahari tanpa proses fermentasi. Teh putih utuh dilakukan pengecilan ukuran bahan menjadi lebih kecil dengan menggunakan blender hingga ukuran bunga telang sama seperti ukuran teh pada umumnya yaitu yang lolos pada ayakan 70 mesh (Fajrina *et al.*, 2016).

3.6.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan suatu prosedur pemeriksaan kandungan kimia suatu tumbuhan agar dapat mengetahui golongan-golongan senyawa yang ada pada tumbuhan. pemeriksaan fitokimia meliputi pemeriksaan golongan senyawa seperti alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, dan kuinon (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

1. Alkaloid

1g serbuk bunga telang, dan 1g teh putih masing-masing dilarutkan dalam 20 ml larutan ammonia dan 20 ml kloroform kemudian disaring. Masukkan 2 ml filtrat kedalam tabung reaksi, lalu 2 tetes reagen Mayer, dan 2 tetes reagen Dragendorff ditambahkan ke masing-masing tabung reaksi. Jika terbentuk

endapan dan kekeruhan pada 2-3 sampel pereaksi maka positif mengandung senyawa alkaloid (Gafur, A. & Bialangi, 2011).

2. Flavonoid

1g serbuk bunga telang dan 1g teh putih masing-masing dilarutkan dengan aquadest, dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring. tambahkan serbuk mg sebanyak 1g kemudian ditetaskan amil alkohol dan asam klorida kemudian dikocok kuat. Jika warna kuning, jingga hingga merah terbentuk pada larutan, maka sampel dinyatakan positif mengandung flavonoid (Ulfah *et al.*, 2021)

3. Tannin

1g bunga telang, dan 1g teh putih masing-masing dilarutkan dengan 50 ml aquadest kemudian disaring. Tambahkan larutan gelatin 1% pada filtrat. Jika warna hitam terbentuk maka positif mengandung senyawa tannin (Gafur, A. & Bialangi, 2011)

4. Saponin

1 g serbuk bunga telang dan 1 g serbuk teh putih masing-masing dilarutkan dalam 10 ml air panas pada tabung reaksi, kemudian dikocok kuat-kuat dalam waktu 10 detik dan didiamkan selama 10 menit. Jika buih atau busa terbentuk hingga 1-2cm dan jika ditambahkan larutan HCl 2N tidak hilang, maka sampel dinyatakan positif mengandung saponin (Ulfah *et al.*, 2021).

5. Kuinon

1 g bunga telang dan 1g teh putih masing-masing dilarutkan dengan 100 ml aquadest panas, kemudian saring. Tambahkan beberapa tetes NaOH 1N pada 5 ml filtrat, jika sampel positif mengandung kuinon ditandai dengan terbentuknya warna jingga/merah/violet (Gunarti, 2017).

3.6.4 Formulasi

1. Formulasi Teh Celup Kombinasi Bunga Telang dan Teh Putih

Berikut merupakan formulasi teh celup bunga telang dan teh putih yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan % b/b :

Tabel 3. 2 Formulasi Teh Celup Bunga Telang dan Teh Putih

Bahan	Perlakuan					
	F1		F2		F3	
	Jumlah (% b/b)	Jumlah (g)	Jumlah (% b/b)	Jumlah (g)	Jumlah (% b/b)	Jumlah (g)
Bunga telang	50	1	60	1,2	70	1,4
Teh putih	50	1	40	0,8	30	0,6
Total	100	2	100	2	100	2

(Sumber : Humaera, 2021)

Keterangan :

Jumlah (% b/b) : jumlah yang diambil dari total 100%.

Jumlah (g) : jumlah yang diambil dari total 2 gram (berat total teh celup dipasaran).

2. Pembuatan Minuman Seduh Teh Celup Kombinasi Bunga Telang dan Teh Putih

Pembuatan minuman teh celup dengan kombinasi antara bunga telang dan teh putih dicampur sesuai perlakuan kemudian dibungkus dengan menggunakan *tea bag* dan seduh dengan 200 ml air panas dengan suhu 80°C selama 4 menit (Taufik *et al.*, 2016). Suhu 80°- 90°C digunakan saat menyeduh teh karena diduga dapat menjaga kandungan antioksidan teh dari kerusakan (Wansi *et al.*, 2014). Diperoleh minuman teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih. Kemudian dilakukan analisa pengujian mutu fisik, mutu kimia dan antioksidan.

3.6.5 Uji Mutu Fisik Teh Celup

1. Uji Organoleptik

Uji Organoleptik dilakukan dengan pengamatan menggunakan panca indera, dengan dilihat secara langsung fisik sediaan meliputi warna, bau, dan rasa. Hasil pengamatan kemudian langsung dicatat (Wahyuningtias, 2010).

3.6.6 Uji Mutu Kimia Teh Celup

1. Uji Nilai pH

Nilai pH diukur menggunakan pH meter kemudian sampel filtrat diambil sebanyak kurang lebih 50 ml dan dicampur sampai merata. Dilakukan pengukuran pH yang hasilnya dapat langsung dibaca dengan membaca angka yang ditampilkan oleh alat (Sinambela, 2021).

2. Uji Kadar Air

Kadar air ditentukan dengan oven. Wadah atau cawan dipanaskan dalam oven sampai 105°C selama sekitar satu jam dan didinginkan dalam desikator selama 20 sampai 30 menit. Kemudian ditimbang dengan timbangan analitik (W_0). Sampel sebanyak 2 g dimasukkan kedalam cawan dan ditimbang (W_1). Cawan yang berisi sampel dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama tiga jam, lalu didinginkan selama 20-30 menit dan ditimbang. Pemanasan diulangi selama 1 jam dan ditimbang, lalu ulangi kembali pemanasan hingga perubahan berat ≤ 1 mg (W_2). Pengujian kadar air dilakukan duplo kemudian dilakukan penghitungan kadar air. Kadar air dihitung dengan menggunakan rumus :

$$Kadar\ air = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan :

W₀ adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g)

W₁ adalah bobot cawan, tutupnya dan sampel sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g)

W₂ adalah bobot cawan, tutupnya dan sampel setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g)

(SNI 3836:2013)

3. Uji Kadar Ekstrak Dalam Air

Analisis kadar ekstrak dalam air dilakukan dengan cara cawan dikeringkan terlebih dahulu pada suhu 105°C selama 60 menit, kemudian didinginkan dalam desikator selama 30 menit agar uang yang dihasilkan hilang, lalu ditimbang dengan timbangan analitik (W₀). Sampel sebanyak 2 gram ditimbang (W₁) lalu dimasukkan kedalam beaker glass 250mL lalu ditambahkan air mendidih sebanyak 200mL, diamkan selama 1 jam. Larutan disaring ke dalam labu ukur 500mL dan sampel dibilas dengan air panas sampai warna larutannya menjadi jernih atau bening, kemudian ditambahkan aquadest sampai tanda garis. Labu ukur digojog agar tercampur merata, kemudian 50mL filtrat dipipet kedalam cawan yang telah ditimbang, lalu dikeringkan diatas waterbath. Masukkan cawan kedalam oven selama 2 jam, dingin dalam desikator dan ditimbang. Panaskan kembali dalam oven selama 1 jam, dinginkan dalam desikator dan ditimbang (W₂). Perlakuan ini diulang sampai tercapai berat yang konstan. Dilakukan secara triplo kemudian kadar ekstrak dalam air dihitung dengan menggunakan rumus :

$$Kadar\ ekstrak = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times P \times \frac{100}{100 - KA} \times 100$$

Keterangan :

W0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g)

W1 adalah bobot cawan, tutupnya dan sampel, dinyatakan dalam gram (g)

W2 adalah bobot cawan, tutupnya dan ekstrak, dinyatakan dalam gram (g)

P Adalah pengenceran

KA Adalah kadar air

(SNI 3836:2013)

4. Uji Kadar Abu

Analisis kadar abu dilakukan dengan cara cawan dikeringkan dalam terlebih dahulu pada suhu 525°C selama 60 menit, kemudian didinginkan dalam desikator selama 30 menit agar uap yang dihasilkan hilang lalu ditimbang dengan timbangan analitik (W_0). Sampel ditimbang sebanyak 2 gram dalam cawan (W_1). Cawan berisi sampel dipanaskan didalam tanur pada suhu 525°C hingga terbentuk abu putih, kemudian dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit, kemudian setelah dingin bobotnya ditimbang (W_2). Cawan berisi abu dimasukkan kembali ke dalam tanur selama 30 menit, dinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang kembali. Perlakuan ini diulang sampai tercapai berat abu yang konstan. Dilakukan secara triplo kemudian kadar abu dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar abu} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g)

W1 adalah bobot cawan, tutupnya dan sampel sebelum diabukan, dinyatakan dalam gram (g)

W2 adalah bobot cawan, tutupnya dan sampel setelah diabukan, dinyatakan dalam gram (g)

(SNI 3836:2013)

3.6.7 Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dari teh celup bunga telang dan teh putih dilakukan dengan metode DPPH, sesuai yang dilakukan oleh Andriani & Murtisiwi (2020)

1. Pembuatan Larutan Induk DPPH

DPPH ditimbang dengan seksama sebanyak 2,5 mg kemudian dilarutkan dalam metanol *p.a* hingga tepat 50,0 mL. Konsentrasi larutan DPPH yang diperoleh adalah 50 ppm. Simpan larutan DPPH dalam wadah yang dilapisi dengan alumunium foil di dalam lemari es.

2. Pembuatan Larutan Stok Teh Celup bunga telang dan teh putih

Sebanyak 5,00 mg Sampel ekstrak teh celup bunga telang dan teh putih ditimbang, kemudian pelarut aquades ditambahkan kedalamnya, divorteks hingga homogen dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm.

3. Pembuatan Larutan Stok Vitamin C

Sebanyak 2,50 mg Vitamin C ditimbang, kemudian ditambah pelarut, divorteks hingga homogen, dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL lalu tambahkan pelarut sampai tanda batas, diperoleh larutan dengan konsentrasi 50 ppm.

4. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH sebanyak 0,7 mL dimasukkan dalam labu ukur 5,0 mL, tambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas, kemudian absorbansi ditentukan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 450-545 nm terhadap blangko berisi 5,0 mL etanol *p.a*, diplotkan harga absorbansi maksimum.

5. Penentuan Uji Antioksidan

Serangkaian larutan stok ekstrak teh celup bunga telang dan teh putih yang sudah diencerkan dalam lima seri konsentrasi yaitu 5,

10, 15, 20, dan 25 ppm, diambil sebanyak 1 ml lalu ditempatkan dalam botol coklat 5,0 mL. Selanjutnya larutan DPPH 50 ppm diambil sebanyak 0,7 ml lalu dimasukkan kedalam larutan sampel, divorteks selama 30 detik lalu diinkubasi selama 30 menit dalam tempat kedap cahaya. Pengukuran nilai absorbansi sampel dilakukan terhadap blangko yang terdiri dari sejumlah larutan stok dalam etanol pada panjang gelombang maksimum. Selain itu, dibandingkan dengan kontrol Vitamin C dengan berbagai seri konsentrasi yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm diambil sebanyak 1 ml lalu ditempatkan dalam botol coklat 5,0 mL. Selanjutnya larutan DPPH 50 ppm diambil sebanyak 0,7 ml lalu dimasukkan kedalam larutan sampel. Setelah itu persentase aktivitas antiradikal dihitung. Pembuatan kurva regresi linier antara konsentrasi dan persentase aktivitas antiradikal sehingga didapatkan persamaan regresi linier untuk menentukan konsentrasi sampel pada aktivitas 50%. Uji aktivitas antiradikal direplikasi sebanyak tiga kali (triplo). Pada setiap pengujian, pembuatan stok dan juga pengenceran sampel direplikasi sebanyak tiga kali (triplo).

6. Penentuan Kadar Nilai IC₅₀

Aktivitas antiradikal ditentukan dengan menghitung *inhibitory concentration* (IC₅₀). Nilai IC₅₀ adalah konsentrasi ekstrak dan vitamin C yang memberikan persentase aktivitas antiradikal sebesar 50% dibanding kontrol menggunakan persamaan garis regresi linier antara konsentrasi terhadap persentase penangkapan radikal (Widhihastuti, 2011).

$$\% \text{ aktivitas antiradikal} = \frac{\text{abs.kontrol} - \text{abs sampel}}{\text{abs.kontrol}} \times 100\%$$

Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi

$$Y = bX + a$$

dengan konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu X) dan nilai persentase inhibisi (antioksidan) sebagai ordinat (sumbu Y).

Nilai IC_{50} dari perhitungan pada saat persen inhibisi sebesar 50%.

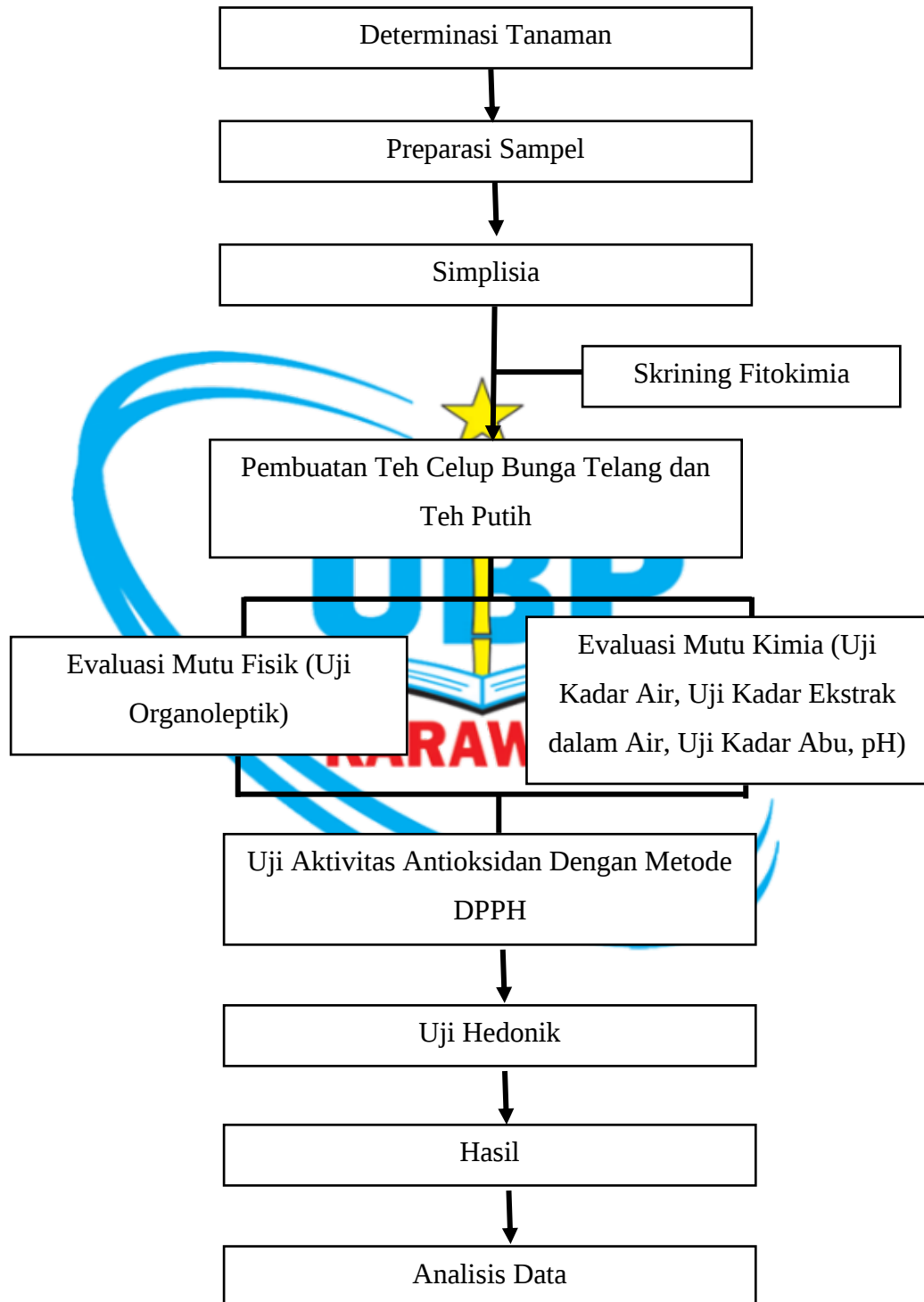
3.6.8 Uji Hedonik

Uji hedonik dilakukan di mana setiap panelis harus mengungkapkan reaksi pribadi mereka terhadap produk yang disajikan. Uji hedonik dilakukan dengan menggunakan 20 orang panelis semi terlatih. Dalam uji ini panelis diminta untuk mengungkapkan reaksi pribadi mereka terhadap warna, rasa, dan bau teh celup kombinasi bunga telang dan teh putih. reaksi pribadi yang diminta tersebut berupa kesan suka atau tidak suka panelis dengan skala hedonik yang digunakan adalah 1-5, dimana angka 1 = sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = netral, 4 = suka, 5 = sangat suka (Putri & Mardesci, 2018).

3.7 Analisis Data

Analisis statistik pengujian aktivitas antioksidan terhadap kombinasi bunga telang dan teh putih menggunakan *one-way* ANOVA. Pengujian dilakukan menggunakan statistik SPSS versi 24 meliputi Uji normalitas (*Kolmogorov-Smirnov*) dan homogenitas kemudian jika data terdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan uji *one-way* ANOVA. Namun jika data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik pengganti uji *one-way* ANOVA menggunakan *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui perbedaan nilai aktivitas antioksidan terhadap formulasi teh celup. Untuk uji organoleptis diamati sebagai data deskriptif (Atmadja *et al.*, 2019).

3.8 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian