

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian di laboratorium Universitas Buana Perjuangan, penelitian ini menguji Standarisasi parameter spesifik dan non-spesifik simplisia bunga telang dari daerah Sukabumi.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan menggunakan bunga Telang yang didapatkan dari petani daerah Sukabumi. Simplisia bunga telang sebanyak 1 Kg didapatkan dari kota Sukabumi.

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga telang (*clitoria Ternatae L*) yang dipanen dari Sukabumi, Jawa Barat, aquades, etanol 96%,methanol, $AlCl_3$ (alumunium Klorida),Mg, $FeCl_3$, Eter,KOH,Amil alcohol,vanillin, Reagen Dragendrof,Reagen Mayer, Na_2CO_3 (Natrium karbonat), toluene, H_2SO_4 (Asam sulfat), $HClO_4$ (Asam perklorat), kuersetin, dan HCL (Asam klorida), kloroform.

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas (merk Pyrex,@Iwaki), cawan porselin, labu erlemeyer, labu alas bulat, piknometer (Pyrex @ Iwaki), PH meter (ISTEK), tabung reaksi, vial, klem, statif, mortir, stemper, thermometer, botol coklat, timbangan analitik, botol semprot,cawan krus, tang krus, kuvet, kondensor, desikator, penangas air, spectrometri uv-vis, tanur oven, mixer, neraca analitis dan Kertas saring Whatman.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel tanaman Bunga Telang

Bunga telang yang digunakan dalam Hasil determinasi ini digunakan untuk menunjukan bahwa tumbuhan yang dipakai untuk menjamin standarisasi parameter spesifik dan non spesifik pada simplisia bunga telang.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pengujian dengan parameter spesifik dan non spesifik. Pengujian dengan parameter spesifik meliputi identitas simplisia, uji organoleptic, dan pengujian kadar sari, uji skrinning fitokimia, dan flavonoid total, sedangkan parameter nonspesifik meliputi susut pengeringan, bobot jenis, kadar air, kadar abu, cemaran logam berat.

3.5 Prosedur penelitian

3.5.1 Penyiapan simplisia

Bunga telang yang diambil yaitu berusia antara 1 bulan 19 hari – 2 bulan 4 hari. bunga telang lebih baik di panen di pagi hari sekitar jam 06.00 – 08.00 WIB dalam posisi kuncup atau telah mekar sebagian, karena pada saat itu kandungan air dan kandungan makanan lainnya dalam tanaman masih cukup dan segar, Proses persiapan sampel dilaksanakan dengan metode sortasi dalam keadaan basah untuk memilah kotoran dan materi asing dari bunga telang menggunakan aliran air. Setelah itu, sampel dikeringkan dengan cara diudangkan hingga tidak ada kelembapan yang tersisa. Jika kekeringan belum optimal, sampel diolah lebih lanjut dengan menggunakan oven pada suhu 50°C hingga mencapai tingkat kering yang memadai. Bahan tanaman yang telah dikeringkan dihancurkan dengan menggunakan blender kasar dan kemudian disaring.

3.5.2 Pembuatan Ekstrak

Teknik ekstraksi yang diterapkan adalah metode maserasi. Langkah awal melibatkan pengolahan bunga telang yang telah dikeringkan dan dihaluskan, yang kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi. Proses selanjutnya melibatkan penambahan etanol 96% hingga semua bagian sampel terendam dalam pelarut tersebut. 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 Penentuan Parameter-parameter standarisasi

A. Parameter Spesifik

1. Identifikasi dan organoleptik simplisia (Depkes, 2000)

Deskripsi tata nama, nama lain tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan dan nama Indonesia tumbuhan. Penetapan organoleptic simplisia (Depkes, 2000). Penetapan organoleptic meliputi bentuk warna, bau dan rasa.

2. Penentuan kadar sari larut air dan kadar sari larut dalam etanol (Depkes.2000)

a. Penentuan kadar sari larut air

5 gram serbuk dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform P, menggunakan labu bersumbat kaca sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam, Kemudian disaring. Di pipet sejumlah 20 ml filtrate dan diuapkan hingga kering dalam cawan porselin. lalu diuapkan 20 ml filtrate hingga kering dalam cawan penguap, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung dengan rumus (WHO, 2011).

Perhitungan :

$$Rumus = \frac{w_1 - w_0}{\text{bobot simplisia}} \times \frac{100}{20} 100\%$$

Keterangan :

W_0 = bobot cawan kosong

W_1 = bobot cawan + residu

b. Penentuan kadar sari larut etanol

5 gram serbuk dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 96%, menggunakan labu bersumbat kaca sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam, Kemudian disaring. Di pipet sejumlah 20 ml filtrate dan diuapkan hingga kering dalam cawan porselin. lalu diuapkan 20 ml filtrate hingga kering dalam cawan penguap, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung dengan rumus (WHO, 2011).

Perhitungan :

$$Rumus = \frac{w_1 - w_0}{\text{bobot simplisia}} \times \frac{100}{20} 100\%$$

Keterangan :

W_0 = bobot cawan kosong

W_1 = bobot cawan + residu

3. Uji skrinning fitokimia

Skirinning Fitokimia diawali dengan membuat filtrat A dan B, Filtrat A dibuat dengan cara mencampurkan 1 gram simplisia dengan akuades lalu dipanaskan dan setelahnya didinginkan lalu siap untuk diuji, dan filtrat B dibuat dengan cara 1 gram simplisia dicampurkan dengan eter dan digerus kuat lalu siap untuk diuji. Skrinning fitokimia meliputi:

a) Alkaloid

Masing-masing tabung reaksi yang berisi 2-3 mL filtrat A, lalu tambahkan dengan masing-masing 1% amonia dan kloroform. Setelah itu ambil lapisan kloroform dan ditempatkan pada tabung reaksi, lalu ditambahkan HCl 2 N dan kocok kuat hingga terbentuk lapisan. Lapisan asam di pipet dan dibagi menjadi tiga tabung berbeda, tabung reaksi 1 ditambahkan pereaksi mayer, dan tabung reaksi 2 ditambahkan pereaksi dragendrof dan tabung ke tiga digunakan sebagai blangko. Hasil positif ditunjukkan pada tabung. reaksi 1 dengan membentuk endapan putih dan tabung reaksi 2 merah kecoklatan (Tjitraresmi et al., 2020).

b) Flavonoid

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan dengan 0,2 gram logam Mg dan 2 tetes HCl 2 N, lalu tambahkan amil alkohol dan kocok kuat, biarkan beberapa menit, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning sampai merah (Harborne, 1987).

c) Polifenol

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan $FeCl_3$ 1% jika terbentuk warna biru kehitaman maka hasil yang didapatkan ialah positif (Tjitraresmi et al., 2020).

d) Tanin

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan pelarut gelatin 1% jika terbentuk endapan putih pada larutan menunjukan hasil yang positif (Tjitraresmi et al., 2020).

e) Kuinon

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan larutan KOH 5%. Jika terbentuk warna kuning hingga merah maka menunjukkan hasil yang positif (Tjitraresmi et al., 2020).

f) Saponin

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan akuades dan didihkan, lalu filtrat dikocok dan didiamkan selama 15 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa setelah didiamkan atau setelah penambahan HCL (Harborne, 1987; Tjitraresmi et al., 2020).

g) Triterpenoid

Masukan filtrat 1 filtrat B lalu diuapkan hingga kering, lalu diteruskan pereaksi Lieberman-Burchard. Jika hasil positif senyawa golongan triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu dan senyawa golongan steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru kehijauan (Tjitraresmi et al., 2020).

4. Kadar Total Flavonoid

a) Pembuatan kurva standar kuersetin

Timbang baku standar kuersetin sebanyak 1 mL larutan di pipet dan volumenya dicukupkan hingga 10 mL dengan etanol hingga konsentrasi 100 ppm. 100 ppm larutan standar kuersetin di buat beberapa konsentrasi diantaranya 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 14 ppm. Pada masing-masing konsentrasi di pipet sebanyak 1 mL lalu tambahkan 1 mL $AlCl_3$ 2% dan 1 mL kalium asetat 120 mm, sampel diinkubasi pada suhu kamar selama satu jam. Absorbansi digunakan memakai metode

spektrofotometri Uv-Vis dengan panjang gelombang maksimum 435 (Stankovic, 2011).

- b) Penentuan kadar flavonoid total simplisia bunga telang timbang ekstrak air bunga telang sebanyak 15 mg lalu dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%. Sebanyak 1 mL larutan stok di pipet lalu tambahkan 1 mL AlCl₃ 2% dan 1 mL kalium asetat 120 Mm. Absorbansi digunakan memakai metode spektrofotometri Uv-Vis dengan panjang gelombang maksimum 435 (Stankovic, 2011) dilakukan tiga kali replikasi sampel setiap analisis.

B. Parameter Nonspesifik

1. Penetapan susut pengeringan

Cawan porselin dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit lalu dinginkan pada desikator selama 15 menit dengan suhu kamar. Simplisia ditimbang sebanyak 1 gram. Masukkan simplisia pada cawan porselin lalu masukan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 30 menit, didinginkan dengan dimasukan ke dalam desikator, lakukan perlakuan ini sampai mendapatkan bobot tetap dan catat. (WHO, 2011).

Susut Pengeringan (g/g) =

$$\frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

2. Penetapan Bobot Jenis

Ekstrak cair dimasukan ke dalam piknometer. Dukurangkan bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C (Depkes RI, 2000). Bobot jenis ekstrak didapat dari perhitungan menggunakan rumus :

$$\text{Bobot jenis} = \frac{w_3 - w_1}{w_2 - w_1}$$

Keterangan :

W 1 = Bobot piknometer + ekstrak cair (g)

W 3 = Bobot Piknometer kosong (g)

W 2 = Bobot piknometer + akuades (g)

3. Kadar Air

Untuk mencari kadar air simplisia bunga telang dilakukan dengan menggunakan metode destilasi azeotrop dengan pelarut toluena yang sudah di jenuhkan, toluene 200 ml + 2 ml dimasukan ke dalam labu corong pisah lalu diamkan selama 24 jam. Hasil endapan air dalam toluene dibuang lalu ambil toluenya saja. Timbang simplisia sebanyak 2 gram masukan ke dalam labu alas bulat kemudian masukan Toluene yang sudah dijenuhkan dituangkan ke dalam labu alas bulat. Alat destilasi dipasang, labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit, setelah toluene mendidih, penyulingan diatur selama 2 tetes per detik, lalu 4 tetes per detik. Setelah toluene mendidih semua dibiarkan tabung penerima mendingin hingga suhu kamar. Setelah lapisan memisah sempurna, volume air dihitung kadar airnya dalam persen terhadap berat ekstrak semula.

Rumus Kadar air:

$$\frac{volume\ air(ml) \times Bj\ air\ (g/m)}{berat\ simplisia\ awal\ (g)} \times 100\%$$

4. Kadar Abu

a) Kadar abu total

Sebanyak 2 gram simplisia digerus dan ditimbang. Masukan ke dalam krus silikat yang sudah dipijarkan secara perlahan. Kemudian suhu dinaikan secara bertahap hingga $600 \pm 25^{\circ}\text{C}$ hingga terbebas dari karbon. Setelah itu didinginkan dala desikator. Lalu timbang berat

abu (A1). Kadar abu dihitung dalam persen terhadap berat sampel awal (Depkes RI, 2000).

Rumus kadar abu total :

$$\frac{W1 - W2}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

w_1 = Bobot krus + ekstrak setelah pemijaran
(g)

$W2$ = Bobot krus kosong (g)

W = 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 (A1) tentukan kadar abu yang tidak larut asam dalam persen terhadap berat sampel awal (Depkes, 2000)

Rumus kadar abu tidak larut asam :

$$\frac{W1 - (c \times 0,0076) - W2}{W} \times 100\%$$

$W1$ = Bobot krus + ekstrak setelah pemijaran (g)

$W2$ = Bobot krus kosong (g)

W = Bobot sampel awal (g)

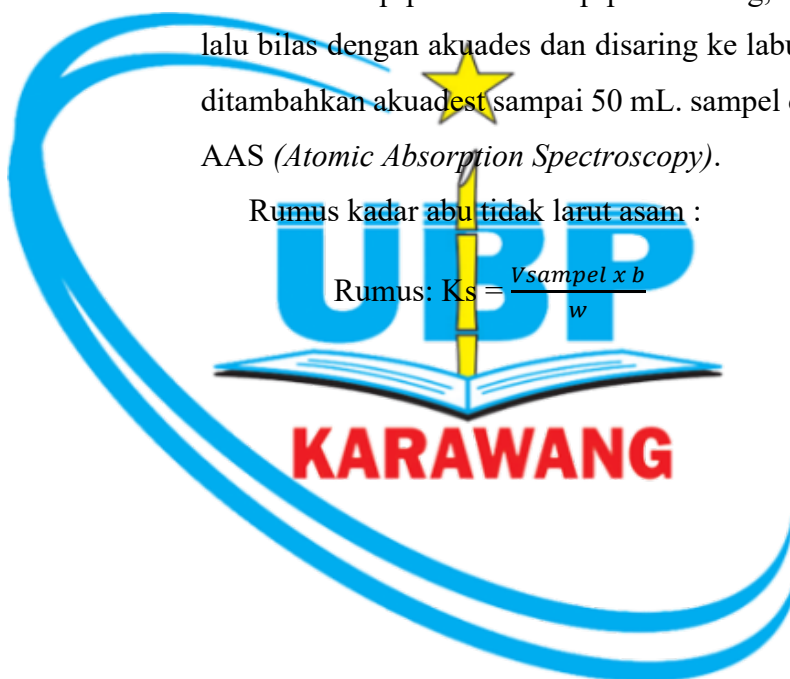
C = Bobot kertas saring bebas abu (g)

5. Penentuan cemaran logam

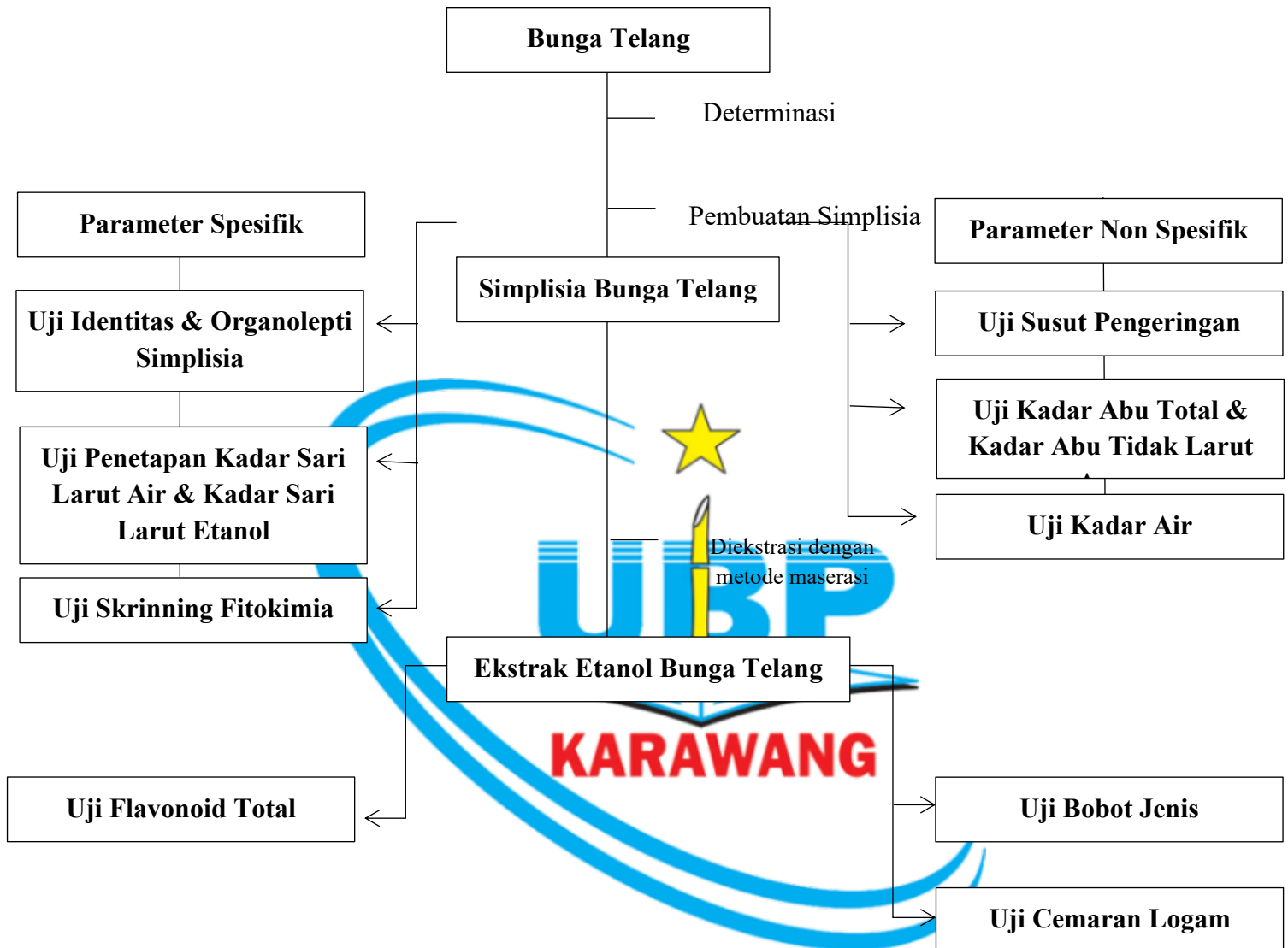
Untuk mengetahui kadar Pb menggunakan metode *Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)*. Penetapan kadar dilakukan dengan cara desktruksi basah. Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang lalu ditambahkan 10 mL HNO₃ Pekat, kemudian dipanaskan dengan *Hot plate* atau Heating mentle hingga kering atau kental. Ekstrak yang kental dan dingin ditambahkan HClO₄ 5 mL. kemudian dipanaskan hingga berbentuk asap putih dan asap putih hilang, biarkan dingin lalu bilas dengan akuades dan disaring ke labu ukur 50 mL. ditambahkan akuadest sampai 50 mL. sampel diukur dengan AAS (*Atomic Absorption Spectroscopy*).

Rumus kadar abu tidak larut asam :

$$\text{Rumus: } K_s = \frac{V_{\text{sampel}} \times b}{w}$$



3.6 Prosedur Peneliti



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian