

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini akan menggunakan metode penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 12 perlakuan yang berbeda. Perlakuan tersebut meliputi berbagai konsentrasi gula aren berbeda yaitu 20 gram, 30 gram, dan 40 gram dan berbagai lama fermentasi berbeda yaitu 0, 4, 8, dan 12 hari. Jumlah pengulangan akan ditentukan berdasarkan rumus Federer, sebagaimana yang dijelaskan oleh Prihanti (2016), diketahui bahwa jumlah pengulangan dalam penelitian ini adalah 3 kali ulangan.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia bunga telang yang bersumber dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO) Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi dan Mikrobiologi, Laboratorium Instrumentasi, dan Laboratorium Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dimulai pada bulan Juni 2024.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

Berikut alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini:

3.4.1 Alat Penelitian

Gelas Kimia, Batang Pengaduk, Pipet Tetes, Cawan Porselin, Timbangan Digital, Spektrofotometer Uv-Vis, Toples Kaca, Kain Penutup Atau Serbet, Labu Ukur, Ph Meter, Saringan, Panci *Stainless Steel*, Gelas Ukur, Sendok Tanduk, Karet Gelang, Kompor, Penangas Air, Pengaduk Magnet, Corong, Autoklaf, Kertas Saring, Erlenmeyer, Kertas Perkamen, Buret, Klem, dan Dudukan merupakan beberapa alat yang digunakan dalam penelitian ini.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi gula aren dari Kabupaten Cianjur, Simplisia Bunga Telang (*Clitoria Ternatea* L.) dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO) Kabupaten Bogor, dan *Scoby* dengan diameter 7 cm dan tebal 0,5 cm yang diperoleh dari mambucha dari Kabupaten DKI Jakarta. Air, Kertas Cokelat, Etanol p.a., NaOH 3 N, Pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Wagner; Mg; HCl Pekat; FeCl₃ 1%; HCl 2 N; FeCl₃ 1%; NaCl 10%; Pereaksi Fenoltalein; dan NaOH 0,1 N.

3.5 Variabel Penelitian

Berikut beberapa variabel yang digunakan dalam penelitian ini :

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi gula dan lama fermentasi kombucha bunga telang (*Clitoria ternatea* L.). Lama fermentasi yang digunakan adalah 0 hari, 4 hari, 8 hari, dan 12 hari.

3.5.2 Variabel terikat

Penilaian atribut fisik produk yang meliputi uji organoleptik, uji skrining fitokimia, uji kadar pH, uji kadar total asam titrasi, uji aktivitas antioksidan, dan uji alkohol merupakan variabel dependen dalam penelitian ini.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi

Identifikasi tanaman akan dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini memang *Clitoria ternatea* L.

3.6.2 Tahap Sterilisasi Alat

Toples kaca yang dilapisi kertas coklat disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Stoples steril ini akan digunakan sebagai wadah untuk menyiapkan kombucha bunga telang (*Clitoria ternatea* L.).

3.6.3 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan adalah simplisia bunga telang yang bersumber dari Kabupaten Bogor. Prosesnya diawali dengan memanen bunga pada saat mekar penuh dan memilah spesimen yang masih utuh dan segar. Bunga tersebut kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Selanjutnya, bunga tersebut dibentangkan di atas kertas dan dijemur. Setelah kering sempurna, bunga telang disimpan dalam wadah untuk selanjutnya direbus atau difermentasi dengan Scoby (Mulangsri, D. A. K. 2019).

3.6.4 Tahap Pembuatan Kombucha Bunga Telang

Untuk menyiapkan teh bunga telang, 36 gram bunga kering (0,5% b/v) diseduh dengan 7.200 ml air mendidih. Setelah diseduh, teh disaring dan dipindahkan ke dalam stoples kaca, masing-masing berisi 200 ml teh. Gula aren ditambahkan ke setiap stoples dengan konsentrasi 20 gram (10% b/v), 30 gram (15%

b/v), dan 40 gram (20% b/v), dan diaduk hingga merata. Kemudian, starter kombucha berusia 14 hari ditambahkan dengan konsentrasi 10% (v/v atau b/v). Sampel sebanyak 50 ml diambil untuk dianalisis sebelum fermentasi. Stoples ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan dingin hingga mencapai suhu ruangan. Setelah dingin, stoples ditutup dengan kain bersih dan dibiarkan berfermentasi selama 4, 8, dan 12 hari (Rosyada, F., 2023).

3.6.5 Tahap Uji Analisis Teh Kombucha Bunga Telang

1. Uji Organoleptik

Kombucha bunga telang dilakukan uji warna, aroma, dan rasa sebagai bagian dari proses evaluasi organoleptik yang melibatkan 15 responden. Responden adalah mahasiswa dan mahasiswi Universitas Buana Perjuangan Karawang yang berusia 20-25 tahun dan dalam kondisi sehat. Kombucha bunga telang disajikan dalam sembilan sampel dengan menggunakan kuesioner yang berisi indikator warna (ungu tua keruh, ungu tua kecokelatan, coklat), aroma (agak asam, khas kombucha asam, sangat asam), dan rasa (manis agak asam, asam agak manis, asam). Sampel diberi label dengan kode untuk mengidentifikasi sampel berdasarkan lama fermentasi dan kadar gula. Berikut ini adalah spesifikasi pengkodean kombucha bunga telang:

Kode A1 : Perlakuan fermentasi 4 hari dengan 20 gram gula
Kode A2: Perlakuan fermentasi 4 hari dengan 30 gram gula
Kode A3 : Perlakuan fermentasi 4 hari dengan 40 gram gula
Kode B1: Perlakuan fermentasi 8 hari dengan 20 gram gula
Kode B2: Perlakuan fermentasi 8 hari dengan 30 gram gula
Kode B3: Perlakuan fermentasi 8 hari dengan 40 gram gula
Kode C1: Perlakuan fermentasi 12 hari dengan 20 gram gula
Kode C2 : Perlakuan fermentasi 12 hari dengan 30 gram gula
Kode C3 : Perlakuan fermentasi 12 hari dengan 40 gram gula

2. Uji Skrining Fitokimia

Untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder dalam larutan fermentasi bunga kombucha, dilakukan penyaringan fitokimia terhadap sampel larutan fermentasi. Alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan fenol merupakan beberapa senyawa fitokimia yang telah diuji (Abdilah *et al.*, 2023)

a. Uji Alkaloid

Sampel yang diambil sebanyak 5 ml, ditambahkan 1 ml HCl 2N, dan ditambahkan 10 ml air. Campuran tersebut kemudian dicampur dan dipanaskan dalam penangas air selama dua menit. Setelah didinginkan dan disaring, campuran tersebut dipisahkan menjadi dua bagian dan ditempatkan dalam dua tabung reaksi. Munculnya endapan putih pada reagen Mayer dan warna jingga kemerahan pada reagen Dragendorf merupakan tanda hasil positif (Yuningtyas *et al.*, 2021).

b. Uji Flavonoid

Sampel sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan dua hingga tiga tetes etanol 96% ditambahkan sebelum sampel mengering. Sebanyak 10 mL HCl dan 0,1 gram bubuk magnesium ditambahkan. Jika terjadi perubahan warna merah, berarti mengandung flavonoid (Cholidah *et al.*, 2020).

c. Uji Saponin

Tabung reaksi diisi dengan sampel sebanyak 3 mL, kemudian ditambahkan larutan HCl 2N sebanyak 5 mL. Setelah dingin, campuran dikocok kuat-kuat selama 30 detik. Saponin hadir jika terbentuk busa dan tidak hilang setelah 30 detik (Cholidah *et al.*, 2020).

d. Uji Tanin

Sampel diambil sebanyak 5 ml kemudian ditetaskan FeCl_3 1%. Apabila terjadi perubahan warna seperti munculnya warna hijau kecokelatan atau biru kehitaman, maka menunjukkan adanya tanin dalam sampel (Yuningtyas *et al.*, 2021).

e. Uji Fenol

Sebanyak 3 ml sampel diambil dan ditambahkan aquadest panas, kemudian didinginkan hingga suhu ruang. Setelah dingin, ditambahkan 5 tetes larutan NaCl 10% dan 3 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi hitam kebiruan atau hijau (Cholidah *et al.*, 2020).

3. Uji Kadar pH

Pengukuran pH sampel pada teh kombucha dilakukan dengan menempatkan sampel dalam gelas kimia, kemudian mencelupkan probe pH meter ke dalam larutan sampel. Tunggu hingga nilai pH stabil, kemudian catat hasilnya. Setelah setiap pengukuran, probe dicuci dan dinetralkan sebelum digunakan pada sampel berikutnya.

4. Uji Kadar Total Asam Titrasi

Proses pengukuran total kadar asam yang dititrasi menggunakan konsep titrasi asam basa. Pertama, 10 mililiter sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mililiter, kemudian ditambahkan air suling hingga sampel mencapai batas. Terakhir, sampel disaring. Selanjutnya, 10 mililiter filtrat dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer dan ditambahkan tiga tetes indikator pp. Setelah itu, larutan sampel yang tadinya bening dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga berubah menjadi merah muda. Berikut rumus yang digunakan untuk melakukan perhitungan:

$$\text{Total Asam (\%)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times \text{BM} \times 100\%}{V_{\text{sampel}} \times 1000}$$

Keterangan :

V_{NaOH} : Volume NaOH yang digunakan untuk titrasi.

N_{NaOH} : Konsentrasi standar NaOH.

V_{sampel} : Volume sampel yang digunakan untuk titrat.

BM : Berat molekul asam asetat.

5. Uji Aktivitas Antioksidan

Dengan menggunakan teknik DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), aktivitas antioksidan teh kombucha bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) diuji. Setelah sampel dilarutkan dengan etanol p.a. dan ditambahkan larutan stok DPPH, sampel diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Absorbansi sampel kemudian diukur pada panjang gelombang 516 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Derajat penghambatan penyerapan radikal DPPH dalam sampel dapat digunakan untuk menghitung aktivitas antioksidan dengan memanfaatkan rumus berikut untuk menghitung persentase penghambatan penyerapan DPPH (Hassmy, dkk., 2017).

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

a. Pembuatan Larutan DPPH (0,4mM)

Larutan DPPH 0,4 mM disiapkan dengan cara melarutkan 15,8 mg serbuk DPPH dalam etanol p.a hingga volume tepat 100 mL di dalam labu takar. Setelah itu, larutan DPPH yang dihasilkan digunakan untuk mengukur panjang gelombang maksimum DPPH 516 nm (Nastiti., 2021).

b. Pembuatan Larutan Asan Askorbat

Sejumlah 5mg asam askorbat dilarutkan oleh larutan etanol p.a didalam vial sampai 10mL sehingga memiliki konsentrasi

500ppm. Kemudian dipipet 6 μL , 12 μL , 18 μL , 24 μL , 30 μL dan 36 μL kedalam tabung reaksi skala 10mL lalu ditambahkan DPPH 0,4mM sebanyak 600 μL dan dicampurkan etanol p.a hingga 3mL, lalu dihomogenkan. Sehingga didapatkan konsentrasi 1ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm dan 6ppm. Tabung reaksi dibalut dengan aluminium foil agar tidak terkena cahaya matahari secara langsung. Dibuat larutan blanko seperti perlakuan pertama. Diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Diuji dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 516 nm (Nastiti., 2021).

c. Pembuatan Larutan Uji

Sejumlah 10ml sampel uji dilarutkan dengan etanol p.a didalam labu ukur 20ml sehingga memiliki konsentrasi 500ppm. Kemudian dipipet 30 μL , 60 μL , 150 μL , 300 μL , 600 μL , 900 μL , 1200 μL kedalam tabung reaksi skala 10mL, lalu ditambahkan DPPH 0,4mM sebanyak 600 μL dan ditambahkan etanol p.a hingga 3mL, lalu dihomogenkan (Nastiti., 2021).

6. Uji Alkohol

Uji kadar alkohol dilakukan dengan menyiapkan kombucha yang terbuat dari bunga telang yang telah difermentasi selama 0, 4, 8, dan 12 hari, dengan masing-masing sampel takaran 100 ml. Sampel-sampel tersebut ditaruh dalam labu alas bulat, dengan air mengalir sebagai pendingin. Labu yang berisi sampel kombucha kemudian dipanaskan di bawah 78°C, dan distilat ditampung dalam labu Erlenmeyer. Kadar alkohol ditentukan dengan menggunakan piknometer 25 ml. Piknometer terlebih dahulu dibilas dengan air suling dan dipanaskan dalam oven pada suhu 60°C selama 15 menit. Setelah kering, piknometer ditaruh dalam desikator selama 5 menit hingga dingin dan kemudian ditimbang dengan neraca analitik. Piknometer kemudian diisi dengan air suling hingga penuh dan

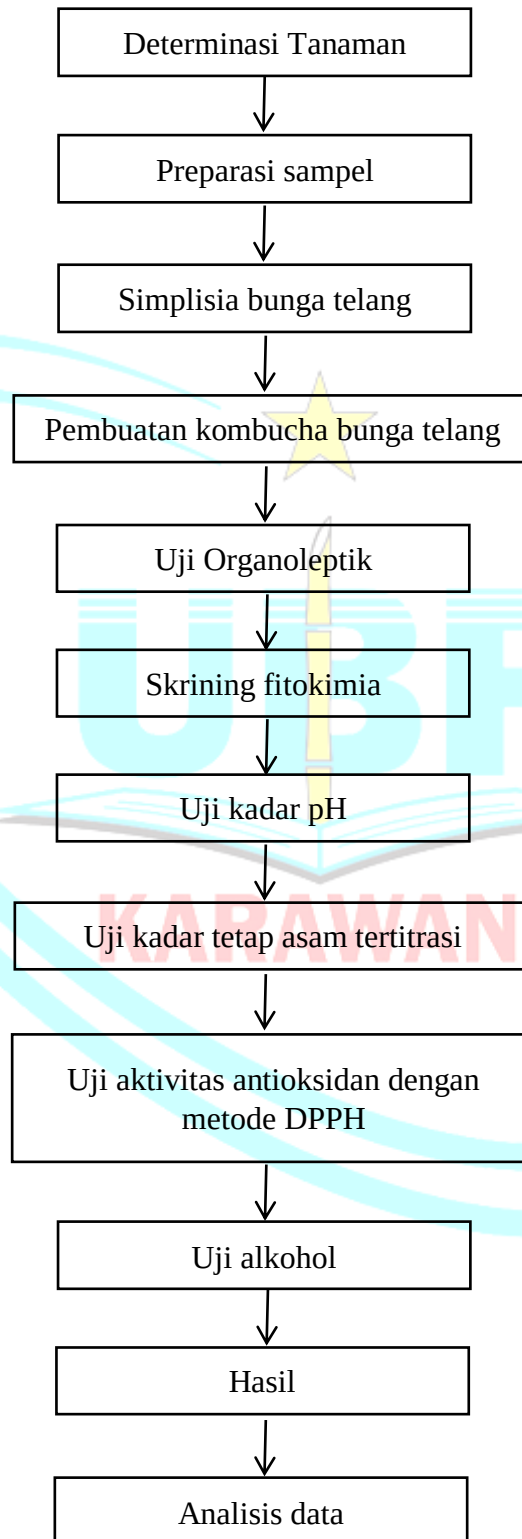
ditimbang kembali. Setelah dibilas, dipanaskan, dan didinginkan, piknometer diisi kembali dengan destilat kombucha bunga telang dan ditimbang sekali lagi. Kandungan alkohol dalam kombucha kemudian dihitung menggunakan rumus berat jenis berdasarkan berat yang diukur.

$$\frac{(\text{Berat piknometer} + \text{destilat}) - \text{berat piknometer kosong}}{(\text{Berat piknometer} + \text{aquadest}) - \text{berat piknometer kosong}}$$

Dengan mengetahui berat jenis (bobot jenis) alkohol, kadar alkohol dalam sampel dapat dicari dengan menggunakan tabel atau daftar nilai *specific gravity* (berat jenis) alkohol.



3.8 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data hasil uji antioksidan kombucha bunga telang dilakukan dengan metode uji ANOVA melalui SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 29. Apabila hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok, maka analisis dilanjutkan dengan uji Tukey untuk perbandingan post-hoc. Namun apabila data tidak memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas yang dipersyaratkan untuk ANOVA, maka digunakan uji Kruskal-Wallis. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan pada uji Kruskal-Wallis, maka dilakukan analisis lanjutan dengan menggunakan uji Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan kelompok secara spesifik.

