

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium. Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) akan diekstraksi dengan tiga metode ekstraksi yaitu maserasi, soxhlet, dan refluks dan kemudian diuji kandungan flavonoid total (metode kolorimetri dengan $AlCl_3$ dengan pembanding kuarsetin) dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (IC_{50}) dengan pembanding vitamin C.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistemik MIPA di Universitas Diponegoro Semarang Jawa Tengah.

2. Penyiapan Simplisia

Simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) diperoleh dari Kecamatan Selemadeg Timur, Tabanan.

3. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol 96% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan metode ekstraksi maserasi, soxhlet, dan refluks dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo.

4. Uji kromatografi lapis tipis (KLT) dan Flavonid total

Uji KLT dan flavonoid tota ekstrak etanol 96% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

5. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji ativitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

1. Pada penelitian ini populasinya adalah bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang di peroleh dari Kabupaten Selemadeg Timur, Tabanan.
2. Sampel untuk penelitian ini yaitu ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang diperoleh dari metode ekstraksi maserasi, soxhlet, dan refluks.

D. Definisi Operasional

1. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menangkal atau meredam senyawa radikal bebas dengan cara mendonorkan elektronnya kepada senyawa oksidan yaitu radikal bebas tersebut. Sehingga senyawa oksidan menjadi menjadi lebih stabil (Sayuti & Yenrina, 2015). Nilai efektif suatu senyawa antioksidan dapat menurunkan aktivitas radikal bebas sebesar 50% disebut IC₅₀ (Wulansari, 2018).

2. Proses pembuatan ekstrak dilakukan dengan tiga metode yaitu maserasi, soxhlet dan reflux.
 - a. Maserasi merupakan suatu teknik dalam ekstraksi tanpa melalui proses pemanasan. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari dalam kurun waktu satu hari sampai satu minggu (Agung, 2017).
 - b. Soxhletasi merupakan teknik ekstraksi melalui proses pemanasan. Metode soxhletasi ini memisahkan suatu senyawa kimia dengan cara penyarian berulang (Sudarwati & Fernanda, 2019). Metode ekstraksi selanjutnya adalah reflux.
 - c. Reflux merupakan teknik ekstraksi dengan menggunakan pemanasa tinggi untuk menguapkan pelarut dan kondensor sebagai pendingin. Sehingga akan terjadi proses penyarian simplisia secara kontinyu (Sudarwati & Fernanda, 2019).

3. Variabel Bebas (*independen*)

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah variasi dari tiga metode ekstraksi yaitu maserasi, soxhlet, dan refluks yang akan digunakan dalam proses pembuatan ekstrak etanol 96 % bunga telang (*Clitoria ternatea L.*).

4. Variabel Terikat (*dependen*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% bunga telang (*Clitoria ternatea L.*)

dengan tiga metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi, soxhlet, dan refluks.

5. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dari penelitian ini yaitu cara pembuatan simplisia mulai dari pengumpulan sampel, pencucian, hingga pengeringan, pelarut yang digunakan, bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang mekar dengan sempurna serta berasal dari kecamatan Selemadeg Timur, Tabanan.

E. Pengumpulan Data

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu belender Philips®, pengayak Retsch 50 mesh, neraca analitik Ohaus®, satu set alat maserasi berupa toples kaca, satu set alat soxhlet, satu set alat refluks, *rotary evaporator* RE 100 Pro®, *rotary evaporator* RE 2000E®, *Chamber* kaca, plat KLT silika gel G₆₀ F₂₅₄, labu ukur 10 mL iwaki®, labu ukur 50 mL iwaki®, labu ukur 100 mL herma®, spektrofotometri UV-Vis Shimadzu UV-1800®, magnetic stirrer + hot plat stirrer Thermo®, aluminium foil, cawan porselin pyrex®, pipet volum pyrex®, pipet tetes, beker glass pyrex®, pipet ukur iwaki®

2. Bahan Penelitian

a. Bahan Simplisia

Pada penelitian ini menggunakan bahan berupa simplisia kering bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang berasal dari Kecamatan

Selemadeg Timur, Tabanan. Bunga telang yang diambil adalah bunga yang telah mekar sempurna, terlihat segar dan berwarna ungu kebiruan.

b. Bahan Kimia

Berikut adalah bahan-bahan kimia yang digunakan dalam praktikum ini : etanol 96% PA emsure®, etanol 96% teknis, ammonia emsure®, AlCl_3 10% Sigma®, asam asetat 5% emprove®, kuarsetin Sigma®, DPPH Sigma®, H_2SO_4 pekat, aquadent, asam asetat glacial, vitamin C (asam askorbat).

3. Prosedur Penelitian

a. Determinasi Tanaman Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)

Tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang diperoleh dari Kabupaten Selemadeg Timur, Tabanan dibawa ke Ungaran untuk kemudian dilakukan determinasi di laboratorium Ekologi dan Biosistemik MIPA di Universitas Diponegoro Semarang Jawa Tengah.

b. Penyiapan Simplisia Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)

Proses penyiapan simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) ini dilakukan di Kabupaten Selemadeg Timur, Tabanan. Bagian tanaman yang digunakan adalah bunga. Bunga yang dipetik harus mekar sempurna dan terlihat segar, serta berwarna ungu kebiruan. Bunga yang telah dipetik kemudian akan disortasi dengan tujuan untuk memisahkan kotoran atau benda asing yang terikut saat pemetikan. Selanjutnya dilakukan proses pencucian bunga dengan menggunakan air mengalir

agar bunga bersih dari debu dan kotoran. Kemudian bunga telang dijemur diatas papan bambu yang ditutupi dengan kain hitam fungsinya agar tidak terpapar sinar matahari secara langsung, karena paparan sinar matahari langsung dapat merusak kandungan metabolit sekunder dari tanaman. Bunga telang yang sudah kering kemudian diblender dan diayak dengan ayakan 30 mesh.

c. Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan metode Maserasi, Refluks, dan Soklet

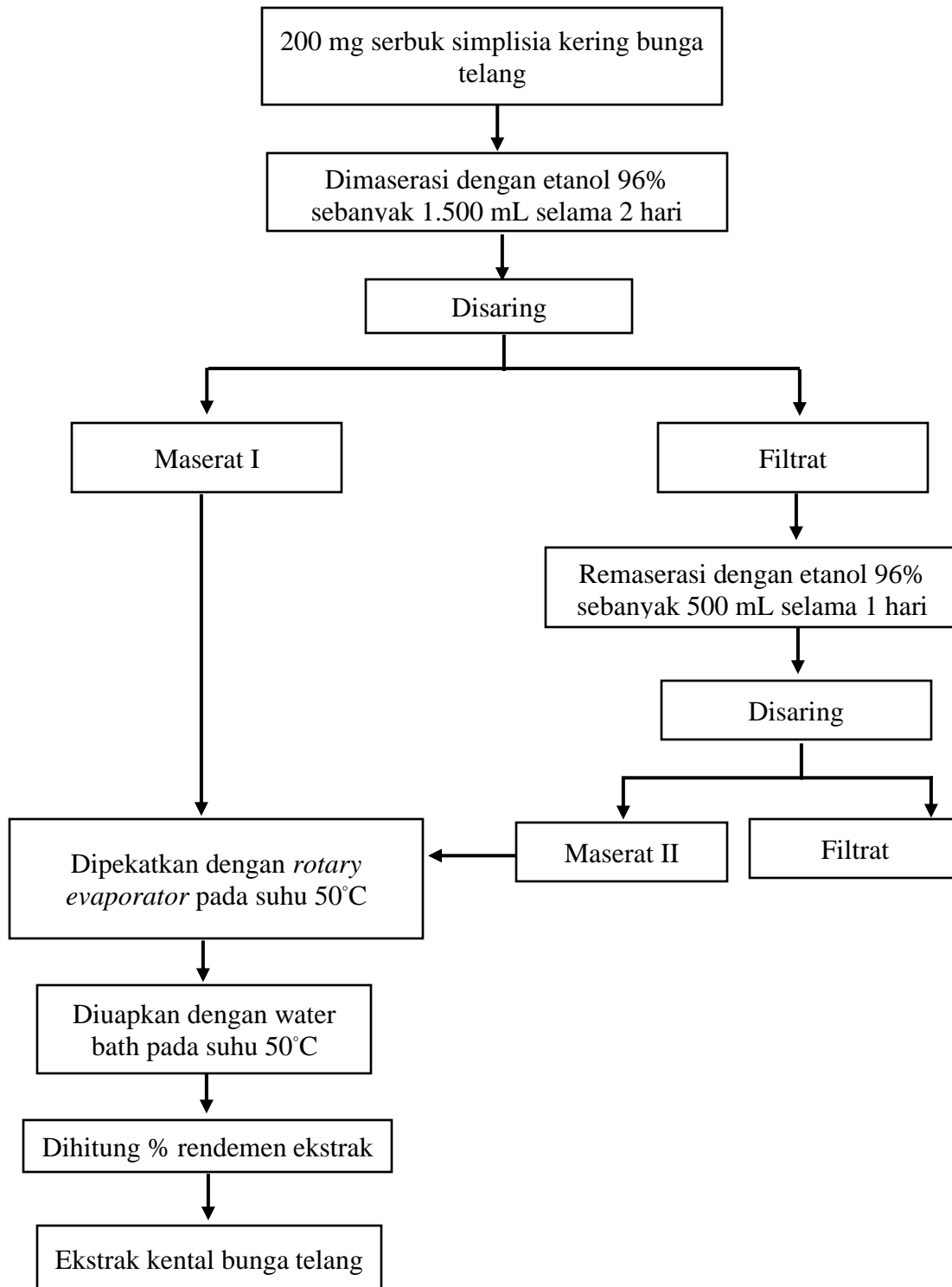
1) Maserasi

Pembuatan ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) ini dilakukan di laboratorium Universitas Ngudi Waluyo. Bunga telang yang telah menjadi simplisia diblender kemudian diayak. Proses pembuatan ekstrak bunga telang menggunakan teknik maserasi dilakukan dengan merendam 200 gram simplisia kering bunga telang. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Pemilihan pelarut ini dikarenakan etanol 96% mampu menyari bahan aktif yang lebih banyak mulai dari yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar. Diharapkan menghasilkan jumlah ekstrak yang optimal. Pada prosesnya perendaman serbuk simplisia kering bunga telang sebanyak 200 mg menggunakan 1.500 mL pelarut etanol 96%. Maserasi dilakukan selama 2 hari dalam toples kaca tertutup rapat dan diletakan ditempat yang terhindar dari cahaya. Setiap 24 jam sekali dilakukan pengadukan.

Setelah 2 hari dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain flanel untuk memisahkan maserat dan filtrat. Filtrat kemudian di remaserasi menggunakan sisa pelarut sebanyak 500 mL.

Proses remaserasi dilakukan sama seperti diatas. Selanjutnya maseraat yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 50°C sampai terbentuk ekstrak semi kental, kemudian diuapkan dengan *water bath* pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental (Narsih & Agato, 2018). *Rotary evaporator* mampu menguapkan pelarut dibawah titik didihnya dikarenakan prinsip kerja alat ini menggunakan vakum destilasi sehingga tekanan akan menurun dan pelarut menguap dibawah titik didihnya (Pangestu & Handayani, 2011). Selanjutnya lakukan perhitungan rendemen dengan rumus sebagai berikut :

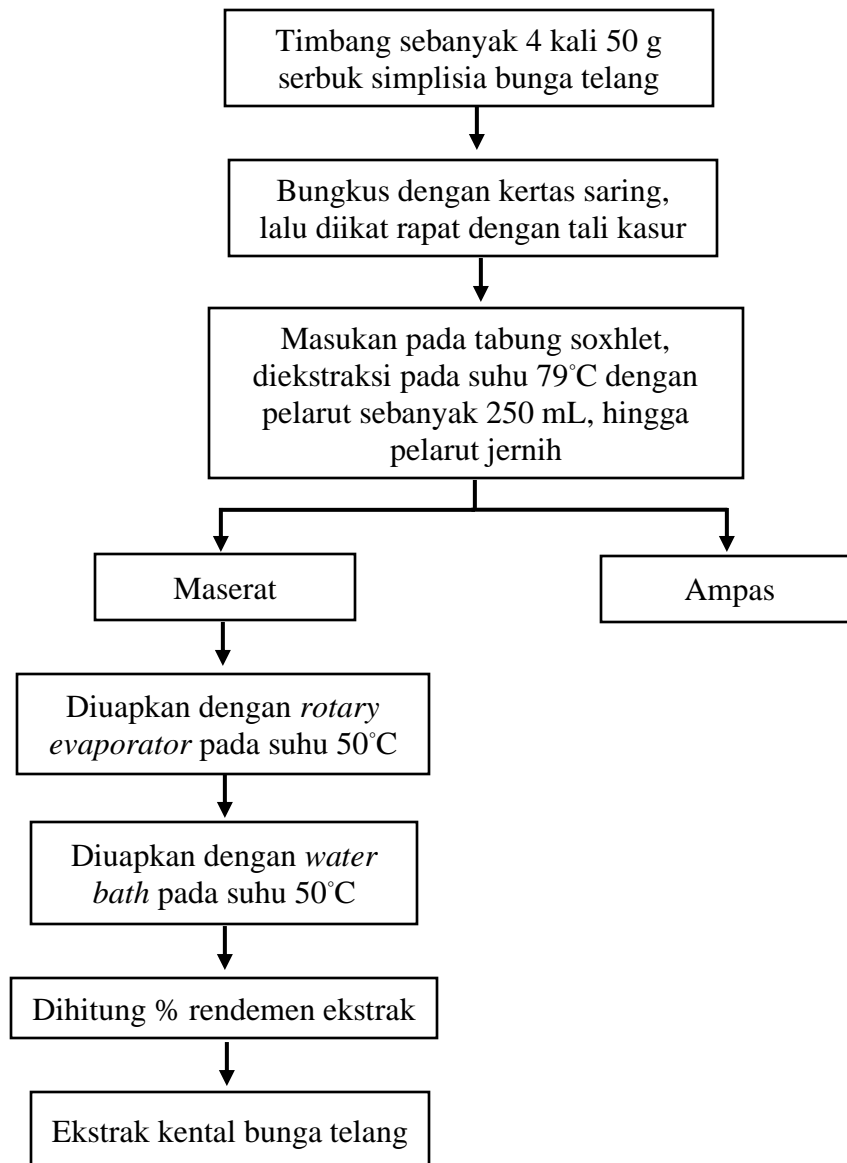
$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental (g)}}{\text{berat simplisia awal (g)}} \times 100\%$$



Gambar 3.1 Skema Maserasi Bunga Telang

2) Soxhlet

Proses ekstraksi dengan teknik soxhletasi dilakukan dengan menimbang 50 gram serbuk simplisia kering bunga telang sebanyak 4 kali. Bungkus masing-masing serbuk tersebut menggunakan kertas saring, lalu ikat rapat bungkusannya serbuk dengan tali kasur. Kemudian masukan ke dalam tabung alat soxhlet masing masing. Masukan pelarut etanol 96% ke dalam labu alas bulat sebanyak 250 mL, rangkai alat soxhlet sedemikian rupa lalu mulai proses ekstraksi. Pemanasan sesuai dengan titik didih pelarut etanol 96% yaitu pada suhu 79°C (Arlene, 2013). Pelarut akan menguap kertas menuju kondensor dan mengalami pendinginan sehingga pelarut menjadi cair kembali. Tetesan pelarut jatuh pada serbuk simplisia yang diekstrak. Serbuk akan terendam, jika tinggi cairan pelarut melebihi sifon maka secara otomatis akan keluar mengalir ke labu alas bulat (Melwita *et al.*, 2014). Proses ini akan berlangsung secara kontinyu sampai senyawa aktif akan terekstrak dengan sempurna (Anam *et al.*, 2014). Akhir dari ekstraksi ditunjukkan dengan perubahan warna pelarut menjadi jernih. Selanjutnya maserat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga menjadi ekstrak semi kental, kemudian diuapkan dengan *water bath* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Dilanjutkan dengan perhitungan rendemen.

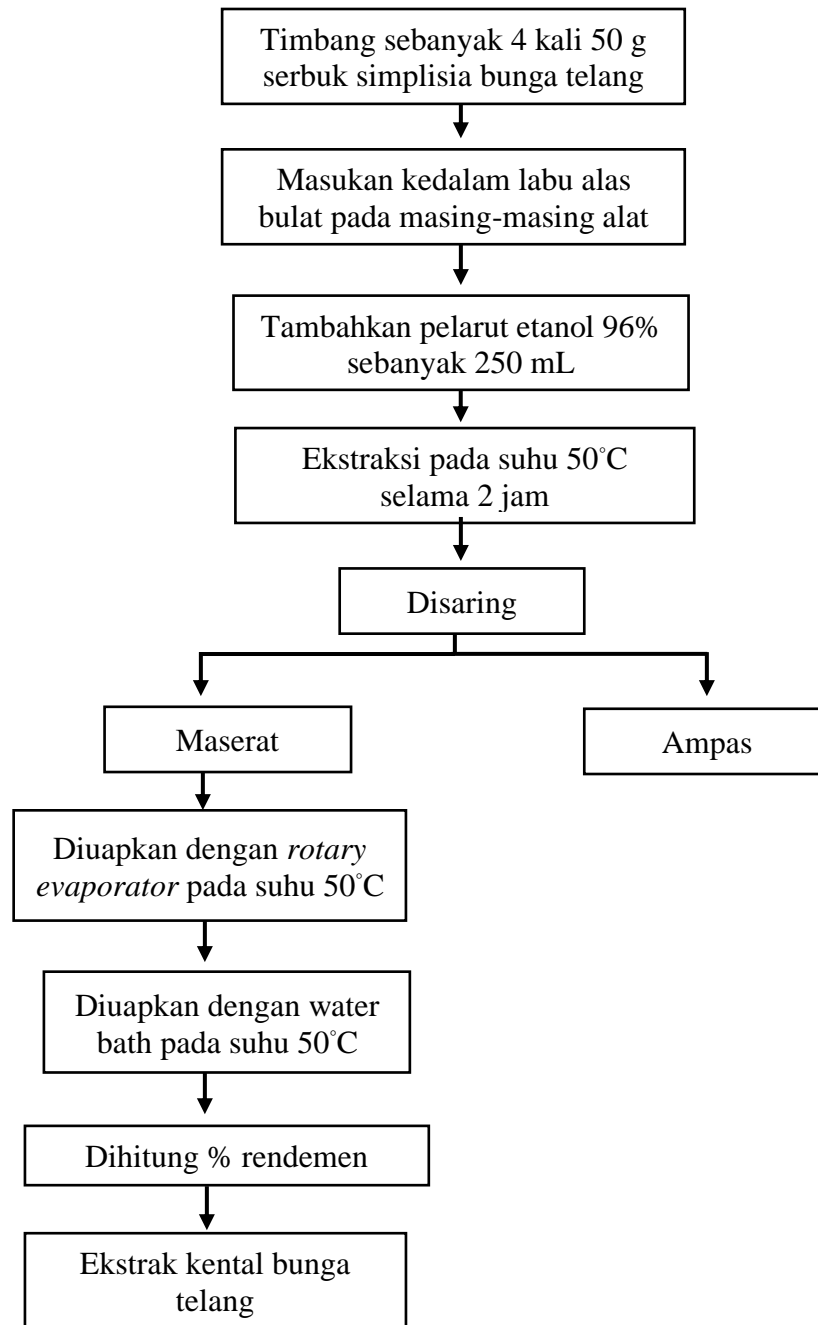


Gambar 3.2 Skema Soxhletasi Bunga Telang

3) Refluks

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan empat alat reflux. Timbang 50 gram serbuk simplisia kering bunga telang sebanyak 4 kali, sehingga total simplisia kering untuk metode ini adalah 200 gram. Masukkan ke dalam labu alas bulat pada masing-masing alat reflux diikuti dengan penambahan etanol 96% sebanyak 250 mL. Kemudian dipanaskan pada suhu 50°C (Susanty & Bachmid, 2016). Pemanasan dilakukan menggunakan *water bath* dan suhu diatur 50°C. Pelarut akan menguap dan terkondensasi pada kondensor dan kembali turun mencair menuju labu alas bulat, proses ini terus berjalan hingga 2 jam (Susanty & Bachmid, 2016).

Selanjutnya setelah dingin dilakukan penyaringan larutan menggunakan kain flanel. Pelarut diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 50 rpm. Proses penguapan dihentikan saat ekstrak mulai kental dan terlihat batas garis tebal pada labu dan ekstrak berbentuk semi kental. Ekstrak kemudian diuapkan dengan *water bath* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak pekat. Lanjutkan dengan perhitungan % rendemen.



Gambar 3.3 Skema Reflux Bunga Telang

d. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Proses identifikasi senyawa flavonoid ekstrak bunga telang dilakukan menurut penelitian (Yuda *et al.*, 2017) yang dimodifikasi. Diawali dengan penyiapan fase diam silica gel G₆₀ F₂₅₄ (plat KLT) dengan ukuran panjang 14 cm dan lebar 5 cm. Selanjutnya ekstrak ditimbang 10 mg dilarutkan dengan etanol sebanyak 1 mL kemudian ditotolkan pada lempeng KLT.

Pembuatan fase gerak BAA (butanol : asam asetat : air) dengan perbandingan (6:2:2) yang telah dimodifikasi dari penelitian yang dilakukan oleh (Vifta *et al.*, 2019). Fase gerak tersebut kemudian dijenuhkan pada *chamber*. Plat fase diam KLT dimasukkan ke dalam *chamber* yang jenuh. Setelah fase gerak merambat mencapai jarak yang diinginkan kemudian plat dikeluarkan dari *chamber* dan dikeringkan, selanjutnya plat KLT tersebut diamati. Sebagai penampak noda dapat menggunakan uap ammonia (Wulandari, 2011). Sampel positif mengandung flavonoid saat diamati pada sinar tampak terbentuknya noda berwarna kuning coklat, jika diamati dengan sinar UV 366 nampak noda berwarna biru dan lempeng berwarna gelap, sedangkan pada sinar UV 254 nampak noda berwarna gelap dan lempeng berwarna hijau (Yuda *et al.*, 2017).

e. Pengujian Flavonoid Total Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)

1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan kuarsetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan AlCl_3 10% sebanyak 1 mL dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL, lalu dibaca menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 350-450 nm. (A. K. Sari & Ayuhecacia, 2017).

2) Penentuan *Operating Time*

Larutan kuarsetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan AlCl_3 10% sebanyak 1 mL dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh. Pengujian dilakukan dengan interval waktu 1 menit selama kurang lebih 30 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (A. K. Sari & Ayuhecacia, 2017).

3) Penentuan Kurva Baku Kuarsetin

Membuat larutan standar dengan menggunakan kuarsetin dalam berbagai konsentrasi 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm. Kemudian, diambil masing-masing larutan sebanyak 1 mL direaksikan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Diamkan sesuai dengan *operating time* kemudian dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (A. K. Sari & Ayuhecacia, 2017).

4) Penentuan Flavonoid Total

Ekstrak bunga telang konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan menimbang 10 mg ekstrak kemudian dilarutkan dengan etanol 96% ad 10 ml. Larutan bunga telang 1000 ppm dipipet sebanyak 1 mL, ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%, kemudian didiamkan selama *operating time*. Kemudian lakukan pembacaan absorbansi dengan panjang gelombang maksimum (A. K. Sari & Ayuchecaria, 2017). Pengujian dilakukan pada masing-masing metode maserasi, reflux dan soxhlet dengan replikasi sebanyak 3 kali tiap metode.

f. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak bunga telang dilakukan dengan menggunakan DPPH dengan pembanding vitamin C. Langkah-langkahnya sebagai berikut :

1) Pembuatan larutan baku induk DPPH 100 ppm

Ditimbang 10 mg serbuk DPPH masukan kedalam labu ukur 100 mL dilarutkan dengan etanol 96% sampai tada batas, kocok hingga homogen.

- 2) Penentuan panjang gelombang maksimal larutan baku DPPH 100 ppm

Pipet larutan baku DPPH 100 ppm sebanyak 4 mL masukan kedalam kuvet kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-Vis. Dicatat absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm. Larutan blangko menggunakan 4 mL etanol 96%. Dari kurva serapan dapat diketahui panjang gelombang maksimum.

- 3) Pengukuran *Operating Time* DPPH (*2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil*)

Setelah diketahui panjang gelombang maksimumnya dilanjutkan dengan pengukuran OT (*Operating Time*) DPPH. Larutan DPPH 100 ppm diambil sebanyak 4 mL kemudian dimasukan kedalam kuvet diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh.

- 4) Pengukuran absorbansi DPPH (*2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil*)

Larutan baku DPPH 100 ppm diambil sebanyak 2 mL lalu masukan kedalam tabung reaksi ditambahkan 2 mL etanol 96% kemudian kocok dan dinkubasi selama 25-30 menit. Setelah itu masukan kedalam kuvet kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-Vis dengan absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

5) Pengukuran antioksidan Vitamin C Sebagai Kontrol Positif

Larutan vitamin C dibuat dalam konsentrasi 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 ppm dengan cara mengambil larutan induk vitamin C 10 ppm sebanyak 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 mL masukan kedalam labu ukur 10 mL dilarutkan dengan etanol 96% sampai tanda batas, kocok hingga homogen. Selanjutnya tiap larutan dipipet sebanyak 2 mL ditambah 2 mL larutan DPPH 100 ppm diinkubasi selama 25-30 menit pada suhu ruang. Lalu dibaca dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Haeria *et al.*, 2018).

6) Pembuatan larutan baku induk ekstrak bunga telang 1000 ppm pada masing-masing metode ekstraksi (maserasi, soxhlet dan reflux)

Timbang 50 mg ekstrak kental bunga telang. Masukan kedalam labu ukur 50 mL di larutkan dengan etanol 96 % sampai tanda batas, kemudian kocok hingga homogen.

7) Pembuatan sampel uji ekstrak bunga telang untuk masing-masing metode ekstrak (maserasi, soxhlet dan reflux)

Larutan sampel ekstrak etanol bunga telang dibuat dalam konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 dan 600 ppm. Dengan memipet larutan induk secara berturut-turut yaitu 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 mL kemudian masing-masing dilarutkan ke dalam labu ukur 10 mL lalu dilarutkan dengan etanol 96 % sampai tanda batas, kocok hingga homogen.

- 8) Pengukuran aktivitas penangkal radikal bebas DPPH dengan spektrofotometri UV-Vis

Larutan uji ekstrak bunga telang diambil sebanyak 2 mL untuk masing-masing konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 dan 600 ppm. Larutan tersebut dimasukkan pada tabung reaksi masing-masing, kemudian ditambahkan 2mL larutan baku DPPH 100 ppm. Semua tabung reaksi dikocok ad homogen dan dibiarkan selama 25-30 menit. Kemudian diukur aktivitas antioksidannya dengan spektrofotometri UV-Vis dengan tiga kali replikasi.

- 9) Penentuan nilai IC_{50} dan pembuatan kurva kalibrasi

Setelah diperoleh nilai absorbansi dari masing-masing konsentrasi maka selanjutnya dilakukan perhitungan nilai % peredaman menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ peredaman} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel uji}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

Selanjutnya dibuat kurva regresi linier dengan persamaan $y = bx + a$ dimana konsentrasi ekstrak dalam ppm adalah absis sumbu x dan nilai % peredaman adalah sumbu y. Kemudian akan diketahui nilai IC_{50} . Semakin rendah nilai IC_{50} maka semakin tinggi nilai aktivitas antioksidan yang diperoleh (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

F. Pengolahan Data

1. Perhitungan Kadar Flavonoid Total

Setelah diperoleh absorbansi dari larutan kuarsetain dengan 5 konsentrasi yang berbeda maka dihasilkan persamaan regresi linier sebagai

berikut : $y = a + bx$

keterangan :

y = luas kurva

a = perpotongan garis

b = kemiringan (slope)

x = konsentrasi sampel

Dilanjutkan dengan perhitungan kadar flavonoid dalam sampel dihitung

menggunakan rumus sebagai berikut : $C = \frac{C_1 \times v \times FP}{m}$

Keterangan :

C = total flavonoid (mg/g)

C₁ = konsentrasi kuarsetin (mg/L)

v = volume sampel

FP = paktor pengenceran (L)

M = berat ekstrak (g)

2. Perhitungan Aktivitas Antioksidan

Nilai aktivitas antioksidan dinyatakan dalam IC 50 (*inhibisi concentration*) yaitu konsentrasi sampel yang dapat menghambat absorbansi DPPH sebesar 50%. Rumus perhitungan nilai aktivitas penangkal radikal bebas adalah sebagai berikut :

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel uji}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

G. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini berfokus kepada perbedaan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol bunga telang dengan tiga metode ekstraksi yang berda yaitu maserasi, reflux dan soxhlet. Hasil yang diperoleh akan dianalisis dengan *microsoft excel* dan IBM SPPS *Statistics 23*. Pengolahan data dengan *microsoft excel* menghasilkan nilai rata-rata kadar flavonoid total dan IC₅₀. Dilanjutkan dengan pembuatan grafik dan tabel untuk mempermudah pembacaan data perbandingan kadar flavonoid total dengan pembanding vitamin C dan IC₅₀ ekstrak bunga telang (*Clitoria terntea* L.). Pengolahan data dengan IBM SPPS *Statistics 23* diawali dengan melakukan uji normalitas (shapiro-Wilk) untuk mengetahui data terdistri normal atau tidak, dilanjutkan dengan uji T-test untuk mengetahui adanya perbedaan antara dua kelompok, selanjutnya uji Anova untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antara dua kelompok atau lebih.