

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui gejala atau pengaruh yang dapat ditimbulkan, sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu (eksperimen). Penelitian eksperimen atau percobaan (*Eksperimental Research*) adalah suatu penelitian yang melakukan kegiatan percobaan. Percobaan itu berupa perlakuan atau intervensi terhadap suatu variabel (Notoatmodjo, 2018).

Pada penelitian ini melakukan uji aktivitas antioksidan ekstrak tunggal dan kombinasi daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) berdasarkan nilai IC_{50} dengan menggunakan metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Pada penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium sebagai berikut:

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Pembuatan ekstrak daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

- c. Uji metabolit sekunder daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- d. Uji aktivitas antioksidan di Laboratorium Analisis Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu

Waktu penelitian uji aktivitas antioksidan ekstrak tunggal dan kombinasi daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan menggunakan metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) dalam waktu Mei-Juli 2023

C. Subyek Penelitian

Adapun subyek penelitian yang digunakan sebagai berikut:

1. Populasi

Daun dan bunga telang yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh di daerah Ungaran Barat, Jawa Tengah, Semarang.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dan diuji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*).

D. Definisi Operasional

Definisi Operasional pada penelitian ini sebagai berikut:

1. Ekstrak Daun dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)

Daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang menjadi sampel diperoleh dari daerah Ungaran Barat, Jawa Tengah, Semarang. Daun dan bunga telang dilakukan pembuatan simplisia terlebih dahulu, kemudian dilakukan pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.

2. Metode Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi maserasi merupakan metode yang digunakan untuk ekstraksi daun dan bunga telang dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan wadah yang tertutup rapat dan terhindar dari cahaya matahari langsung selama 3 hari kemudian disaring, lalu dilakukan remaserasi selama 2 hari, setelah itu dilanjutkan dengan *rotary evaporator* suhu 50°C dan dikentalkan dengan *waterbath* suhu 50-60°C.

3. Etanol 96%

Etanol 96% merupakan pelarut yang bersifat polar yang mudah menguap sehingga baik digunakan untuk pelarut ekstrak.

4. Kombinasi Ekstrak

Kombinasi yang menggabungkan dua ekstrak antara daun dan bunga telang untuk menentukan aktivitas antioksidan berdasarkan IC₅₀.

5. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji yang dilakukan dengan menggunakan metode DPPH sampel daun dan bunga telang dengan spektrofotometri UV-Vis.

E. Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang digunakan pada penelitian sebagai berikut:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak tunggal daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) serta kombinasi dengan perbandingan 1:1, 2:1, dan 1:2 serta menggunakan konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ekstrak tunggal dan kombinasi daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) adalah untuk menganalisis aktivitas antioksidan berdasarkan % inhibisi dan nilai IC_{50} .

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah alat, bahan, suhu, cahaya, reagen, waktu, kondisi laboratorium.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian sebagai berikut:

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu blender (PHILIPS), ayakan 40 mesh, oven (MEMMERT), tanur listrik

(THERMO), batang pengaduk, neraca analitik (OHAUS), tabung reaksi (IWAKI), rak tabung reaksi, penjepit kayu, cawan porselen, cawan kursible, gelas ukur (IWAKI), pipet tetes, corong kaca, gelas beaker (APROX), labu ukur (PYREX), pipet ukur (IWAKI), evaporator rotary (HOT PLATE MASPION), waterbath, spektrofotometri UV-VIS (SHIMADZU), kain flanel, serbet, tisu, spatula, aluminium foil.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), etanol 96% (Technical), Etanol Pro Analisis (PT. Smart Lab Indonesia), pereaksi Mayer, pereaksi Dragendroff, serbuk Mg (Magnesium), HCl pekat (Asam Klorida), HCl 1N (Asam Klorida), HCl 2N (Asam Klorida), H₂SO₄ pekat (Asam Sulfat), FeCl₃ (Besi Klorida), K₂CrO₇ (Kalium Dikromat), Kuersetin (Sigma), Aquadest, dan baku DPPH (Tokyo Chemical Industry).

2. Prosedur Kerja

a. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

b. Pembuatan Simplisia

Proses pembuatan simplisia diawali dengan menyiapkan daun dan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilanjutkan dengan sortasi basah atau pemilihan yang berkualitas baik. Pencucian daun dan bunga telang di air yang mengalir hingga diperkirakan kotoran (tanah, debu serangga, rumput kering dan sebagainya) sudah hilang lalu bahan-bahan yang sudah bersih ditiriskan.

Setelah itu dilakukan proses pengeringan dengan cara tidak langsung (bahan baku ditutupi dengan kain hitam) yang dijemur dibawah sinar matahari langsung. Simplisia yang sudah dikeringkan dilakukan sortasi kering dengan cara memilih daun dan bunga telang yang sudah kering dari yang rusak atau terkena kotoran. Selanjutnya simplisia dihaluskan dengan menggunakan blender, kemudian diayak menggunakan ayakan dengan derajat kehalusan 40 mesh (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

c. Uji Kadar Air Pada Simplisia

Pemeriksaan kadar air yang dilakukan dengan mengambil masing-masing sampel daun dan bunga telang sebanyak 2 g yang menggunakan cawan porselen kemudian dimasukkan ke dalam alat oven dengan suhu 105°C selama 3 jam kemudian dicatat hasil yang tertera (Sumiati *et al.*, 2019).

Rumus :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{B-C}{B-A} \times 100\%$$

Ket : A = Bobot Cawan Kosong (gram)

B = Bobot Cawan + isi/bahan sebelum pengeringan (gram)

C = Bobot Cawan + Isi/bahan sesudah pengeringan (gram)

d. Uji Kadar Abu

Pada proses uji kadar abu yang dilakukan dengan cara ditimbang simplisia sebanyak 2 g lalu dimasukkan ke dalam cawan kursible yang sudah diketahui bobotnya, kemudian diabukan dalam tanur listrik dengan suhu maksimum 600°C dalam waktu 3 jam (sekali-kali pintu tanur dibuka sedikit, agar oksigen dapat masuk) dilakukan sampai proses pengabuan sempurna, selanjutnya didiamkan sampai dingin baru ditimbang sampai mendapatkan bobot yang tepat dan catat hasil yang tertera (Helilusiatiningsih & Soenyoto, 2020).

Rumus perhitungan kadar abu yaitu:

$$\% \text{ Abu} = \frac{\text{Berat abu (g)}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

Ket :

Berat abu = Berat cawan + sampel sesudah pengeringan – Berat cawan kosong

Berat sampel = Berat cawan + sampel sebelum pengeringan – Berat cawan kosong

e. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak daun dan bunga telang menggunakan metode maserasi atau perendaman, pada proses maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Daun dan bunga telang masing-masing sebanyak 300 g simplisia kering dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 liter (1500 ml) dengan perbandingan (1:5). Proses maserasi ekstrak dilakukan selama 3x24 jam disertai

dengan pengadukan dan dilakukan di dalam ruangan yang terhindar dari sinar matahari langsung, setelah itu dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain flanel.

Remaserasi dilakukan dengan pelarut yang sama sebanyak satu liter (1000 ml) yang dilakukan selama 2x24 jam disertai dengan pengadukan, setelah selesai proses remaserasi ekstrak dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain flanel. Kemudian hasil maserasi I & II dicampur menjadi satu, setelah itu hasil filtrat dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dari cairan penyari dengan suhu 50°C, ekstrak kental tersebut kembali diuapkan dengan menggunakan *waterbath* untuk mendapatkan ekstrak lebih kental. Selanjutnya ekstrak kental di hitung rendeman total dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

Rumus perhitungan rendemen yaitu:

$$\% \text{ Rendeman} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

f. Uji Kadar Air Pada Ekstrak

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara diambil ekstrak masing-masing sebanyak 2 g lalu ditimbang dalam wadah cawan porselen yang sudah ditara, kemudian masukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam (Najib et al., 2017).

Rumus :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{B-C}{B-A} \times 100\%$$

Ket : A = Bobot Cawan Kosong (gram)

B = Bobot Cawan + isi/bahan sebelum pengeringan (gram)

$$C = \text{Bobot Cawan} + \text{Isi/bahan sesudah pengeringan (gram)}$$

g. Uji Bebas Etanol

Pengujian yang digunakan untuk uji bebas etanol ini dengan cara sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 (asam sulfat) pekat dan ditambahkan 1 ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (kalium dikromat). Sampel dinyatakan positif mengandung etanol ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada saat pencampuran yaitu berwarna jingga, tidak berubah menjadi warna ke hijau kebiruan (Adiningsih *et al.*, 2021).

h. Uji Skrining Fitokimia

Menurut penelitian Cahyaningsih, *et al* (2019) uji skrining fitokimia dilakukan sebagai berikut:

1) Flavonoid

Ekstrak sebanyak 40 mg ditambahkan dengan 100 ml air panas, lalu dididihkan selama 5 menit dan kemudian disaring. Hasil filtrat diukur sebanyak 5 ml lalu ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, selanjutnya dikocok kuat. Hasil positif mengandung Flavonoid di tandai dengan adanya perubahan warna larutan menjadi warna merah, kuning atau jingga.

2) Tanin

Ekstrak sebanyak 40 mg dilarutkan dengan air sebanyak 4 ml, kemudian diambil 2 ml ekstrak yang sudah larut dan ditambahkan

1 ml FeCl_3 10%. Hasil positif mengandung Tanin di tandai dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan .

3) Alkaloid

Ekstrak sebanyak 40 mg dilarutkan dengan air 10 ml, kemudian diambil sebanyak 5 ml yang ditambahkan dengan 1 ml HCl 2N, setelah itu dibagi menjadi 2 tabung untuk ditetaskan pereaksi mayer dan pereaksi dragendroff. Hasil positif pereaksi mayer ditandai dengan adanya endapan putih menjadi keruh sedangkan pereaksi dragendroff ditandai dengan warna jingga.

4) Saponin

Ekstrak sebanyak 40 mg ditambahkan air sebanyak 10 ml, kemudian di kocok selama 1 menit, selanjutnya ditambahkan HCl 1 N sebanyak 2 tetes. Hasil positif mengandung saponin ditandai dengan terbentuknya busa, bila terbentuk busa dan dalam waktu lebih kurang 7 menit tetap stabil, maka ekstrak dinyatakan mengandung saponin.

i. Pengujian Aktivitas Antioksidan

1) Penimbangan DPPH (0,4 mM)

Molaritas DPPH yang dibutuhkan \Rightarrow 0,4 mM = 0,0004 M
(4×10^{-4} M)

BM (Berat Molekul) DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 ml = 0,1 liter

$$\begin{aligned}
 \text{Penimbangan DPPH} &= \text{BM} \times \text{Vol larutan} \times \text{Molaritas} \\
 &= 394,32 \text{ g/mol} \times 0,1 \text{ L} \times 0,0004 \\
 &= 0,0157728 \text{ g} \rightarrow 15,8 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

2) Pembuatan Larutan Baku DPPH (0,4 mM)

Larutan DPPH 0,4 mM dibuat dengan melarutkan 15,8 mg serbuk DPPH ke 100 mL etanol p.a dalam labu ukur. Larutan DPPH yang diperoleh selanjutnya diukur panjang gelombang maksimumnya dan *operating time* (Pamungkas *et al.*, 2017).

3) Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang DPPH dilakukan dengan cara diambil sebanyak 1 ml dari larutan DPPH, kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 5 ml. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit ditempat yang gelap dan tertutup. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara mengukur serapan DPPH dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm untuk memperoleh absorbansi $\pm 0,2-0,8$ (Pamungkas *et al.*, 2017).

4) Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara diambil 1 ml larutan DPPH 0,4 mM lalu ditambahkan kuersetin 3 ppm hingga tanda batas pada labu ukur 5 ml. Larutan tersebut kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang yang

telah diperoleh dengan interval 1 menit selama 30 menit sampai diperoleh absorbansi yang paling stabil (Bakti *et al.*, 2017).

5) Penentuan absorbansi blanko

Penentuan absorbansi blanko dilakukan dengan cara diambil larutan induk DPPH sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 4 ml etanol p.a dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml. Setelah itu diinkubasi ditempat yang gelap. Serapan larutan diukur dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Susiloningrum & Sari, 2021).

6) Pembuatan Larutan Kuersetin Sebagai Pembanding

Larutan kuersetin dibuat konsentrasi 100 ppm dengan cara mengambil 10 mg kuersetin dibuat larutan sebanyak 100 ml dengan etanol p.a, kemudian dibuat seri kadar dengan menggunakan kuersetin sebagai baku standar dengan kadar 1, 2, 3, 4, 5 ppm. Larutan standar 0,4 mM DPPH diambil sebanyak 1 ml ditambahkan 1 ml larutan standar kuersetin, kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL, lalu diinkubasi pada tempat yang terlindung dari cahaya selama *operating time* yang telah diperoleh. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Susiloningrum & Sari, 2021).

7) Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun dan Bunga Telang

Uji ekstrak tunggal daun dan bunga telang serta kombinasi dengan perbandingan (1:1) (2:1) dan (1:2). Pada ekstrak tunggal daun telang diambil ekstrak sebanyak 20 mg, pada ekstrak tunggal bunga telang diambil ekstrak sebanyak 20 mg, pada perbandingan (1:1) diambil ekstrak daun telang 10 mg dan ditambah ekstrak bunga telang 10 mg, pada perbandingan (2:1) diambil ekstrak daun telang 13 mg ditambah ekstrak bunga telang 7 mg, dan pada perbandingan (1:2) diambil ekstrak daun telang 7 mg ditambah ekstrak bunga telang 13 mg. Kemudian masing-masing perbandingan ekstrak diambil sebanyak 10 mg dilarutkan 10 ml etanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Larutan ekstrak daun dan bunga telang diencerkan menjadi beberapa seri kadar yaitu 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Seri kadar yang telah dibuat masing-masing larutan ekstrak diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan sebanyak 1 ml larutan DPPH lalu ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas labu ukur 5 ml. Larutan diinkubasi pada tempat yang terlindung dari cahaya selama *operating time* yang diperoleh. Kemudian dibaca absorbansinya pada masing-masing konsentrasi dengan spektrofotometri Uv-Vis (sesuai panjang gelombang maksimum) (Pujiastuti *et al.*, 2022).

G. Analisis Data

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan perhitungan *Inhibition Concentration* (IC₅₀). Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi yang memberikan % aktivitas antiradikal sebesar 50% dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi $Y = bx + a$, dimana sumbu (X) konsentrasi ekstrak (ppm) dan sumbu (Y) nilai % inhibisi (antioksidan) sebagai ordinat. Nilai IC₅₀ dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50% (Andriani & Murtisiwi, 2020).

Data yang didapat dilakukan analisis dengan menggunakan *Software Statistical Product and Service Solutions* (SPSS). SPSS adalah salah satu software analisis statistik yang cukup lengkap digunakan oleh penggunanya, mulai dari analisis *univariate*, *bivariate*, sampai *multivariate* baik uji untuk membedakan maupun hubungan. Pada penelitian ini dilakukan uji statistika yaitu uji normalitas dan homogenitas untuk mengetahui data yang diperoleh telah berdistribusi normal dan homogen, selanjutnya dilakukan uji non parametik yaitu uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan atau tidak (Santjaka, 2015).