

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium. Metode penelitian ini adalah bunga telang (*Clitoria ternatea L*) diekstrak dengan pelarut etanol dan etil asetat menggunakan metode FRAP (*Feric Reducing Antioxidant Power*).

#### **B. Lokasi Penelitian**

##### 1. Lokasi penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik MIPA di Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Pembuatan ekstrak etanol dan etil asetatbunga telang (*Clitoria ternatea L*) dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP, dilaksanakan di Laboratorium Program Studi Farmasi Univeristas Ngudi Waluyo.

#### **C. Subjek Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah maserasi ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L*)dengan pelarut etanol dan etil asetat yang diambil di Desa Talun Gedong Songo, Kecamatan Bandungan, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.Sampel dari penelitian ini adalah ekstrak etanol dan etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea L*).

#### **D. Definisi Operasional**

##### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi pelarut yang terdiri dari etanol dan etil asetat dengan variasi konsentrasi uji sebesar 10ppm, 20ppm, 30ppm, 40ppm, dan 50ppm.

##### 2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah daya antioksidan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L*) dengan variasi konsentrasi 50, 60, 70, 80, dan 90 ppm menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) dilihat dari nilai  $IC_{50}$ .

##### 3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol adalah suhu pengeringan sampel terendah dan oven pada suhu 50°C selama 2 jam, suhu maserasi (suhu ruang), waktu pengeringan dan maserasi (2 hari 1 hari remaseasi) reagen, pH dan panjang gelombang pada uji antioksidan.

#### **E. Pengumpulan Data**

##### 1. Bahan penelitian

###### a. Bahan Simplisia

Bahan uji yang digunakan adalah bunga telang (*Clitoria ternatea L*) yang sebelumnya telah dideterminasi di laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Program Studi Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

b. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain etanol 96% dan etil asetat, asam oksalat 1%, asam trikloroasetat (TCA),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck), dapar fosfat, Kalium Ferrisianida, Vitamin C (Merck), Etanol 96% p.a (Brataco), Aquades (CV. Bratachem), asam asetat glasial 2% dari Merck.

2. Alat Penelitian

- a. Alat untuk pembuatan ekstrak etanol dan etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea L*) meliputi satu set alat maserasi (oven (Memmert), blender (Maspion), ayakan (ukuran 40 Mesh) dan timbangan elektrik (Ohaus)), corong kaca (*iwaki pirex*), penyaring (kertas saring), camber KLT, bejana maserasi, *rotary evaporator* (RE 100-Pro), *waterbath* (Memmert).
- b. Alat untuk karakterisasi meliputi spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV Mini 1240).
- c. Alat untuk menguji antioksidan adalah batang pengaduk, labu ukur (Pyrex®), pipet volume, tabung reaksi (Pyrex®), oven (J. P. Selecta), Ph-meter dan thermometer.

**F. Prosedur Penelitian**

1. Determinasi Tumbuhan

Sampel tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea L*) diperoleh dari Desa Talun Gedong Songo, Kecamatan Bandungan, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Determinasi bahan dilakukan dilaboratorium Ekologi dan

Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Program Studi Biologi  
Universitas Diponegoro Semarang.

## 2. Penyiapan Bahan

Bunga telang (*Clitoria ternatea L*) yang diperoleh di desa Talun Kabupaten Semarang selanjutnya dilakukan sortasi untuk memisahkan bunga dari rantingnya dan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji. Bunga telang yang sudah disortasi selanjutnya dicuci dengan air mengalir, kemudian diangin-anginkan hingga tidak ada sisa air. Bunga telang kemudian dirajang dan dikeringkan. Bunga telang yang sudah kering kemudian digiling menjadi serbuk halus, diayak dan dilakukan ekstraksi.

## 3. Pembuatan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea L*)

Sampel bunga telang (*Clitoria ternatea L*) diambil dari desa Talun Gedong Songo Kecamatan Bandungan Kabupaten Semarang. Bunga telang (*Clitoria ternatea L*) yang diperoleh selanjutnya dicuci dengan air mengalir kemudian ditiriskan lalu diblender dan dikeringkan pada panas matahari dimana bunga ditutup menggunakan kain warna hitam selama 6 hari hingga diperoleh serbuk bunga telang sebanyak 600 gram.

Pelarut pertama yang digunakan adalah etanol 96%. Pemilihan etanol 96% dikarenakan bertujuan untuk menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal dan mudah berpenetrasi ke dalam sel serta mampu menarik semua zat aktif baik yang bersifat polar, semipolar, maupun nonpolar dan kadar toksisitas rendah. Proses maserasi serbuk bunga telang dan pelarut

etanol 96% dilakukan dengan perbandingan 1:10. Berdasarkan perbandingan tersebut maka serbuk bunga telang diambil 300 gram diekstraksi secara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 3 liter (3000 ml). Perendaman dilakukan selama 2 hari dimana tiap 1 x 12 jam dilakukan pengadukan.

Setelah hari ke 2 kemudian maserat yang diperoleh disaring dengan menggunakan kertas saring. Selanjutnya maserat yang telah dilakukan proses penyaringan dilakukan proses remaserasi selama 1 hari dengan sisa pelarut etanol hingga warna pelarut etanol bening yang menandakan pelarut tersebut sudah tidak bisa menarik senyawa yang terdapat dalam simplisia.

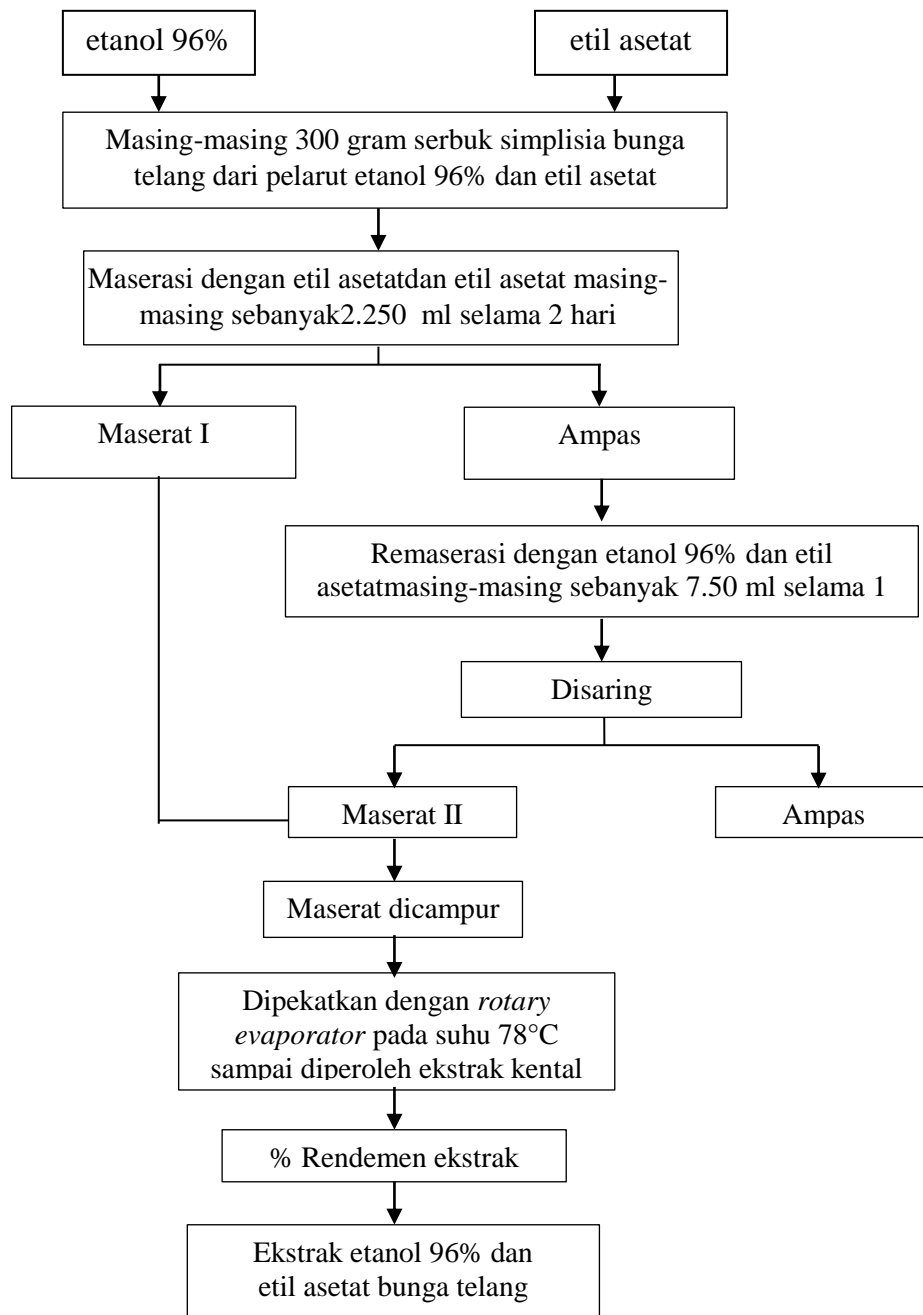
Hasil maserat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbatch* dengan suhu 78°C sampai mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang di peroleh ditimbang untuk menghitung rendemen dan simplisia di tempat yang terlindung dari cahaya atau botol berwarna gelap sampai saat digunakan untuk pengujian. (Arunachalam, *et al.*, 2019).

Pelarut kedua yang digunakan adalah etil asetat. Pemilihan etil asetat dikarenakan bertujuan untuk menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal dan mudah berpenetrasi ke dalam sel serta mampu menarik semua zat aktif baik yang bersifat polar, semipolar, maupun nonpolar dan kadar toksisitas rendah. Proses maserasi serbuk bunga telang dan pelarut etil asetat dilakukan dengan perbandingan 1:10. Berdasarkan perbandingan

tersebut maka serbuk bunga telang diambil 300 gram diekstraksi secara maserasi dengan menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 3 liter (3000 ml). Perendaman dilakukan selama 2 hari dimana tiap 1 x 12 jam dilakukan pengadukan. Setelah hari ke 2 kemudian maserat yang diperoleh disaring dengan menggunakan kertas saring. Selanjutnya maserat yang telah dilakukan proses penyaringan dilakukan proses remaserasi selama 1 hari dengan sisa pelarut etil asetat hingga warna pelarut etil asetat bening yang menandakan pelarut tersebut sudah tidak bisa menarik senyawa yang terdapat dalam simplisia.

Hasil maserat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbatch* dengan suhu 78 °C sampai mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang di peroleh ditimbang untuk menghitung rendemen dan simplisia di tempat yang terlindung dari cahaya atau botol berwarna gelap sampai saat digunakan untuk pengujian. (Arunachalam, *et al.*, 2019). Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100 \%$$



**Gambar 3.1 Skema Ekstraksi Bunga Telang dengan Etanol 96% dan Etil Asetat**

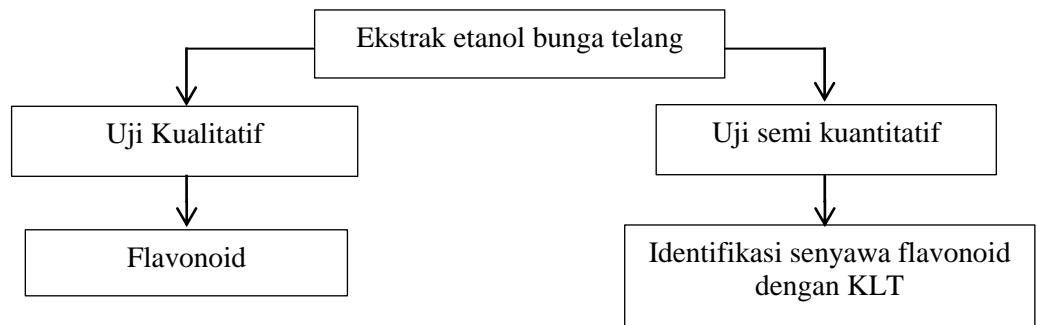
#### 4. Skrining Fitokimia Metode Kualitatif

Metode kualitatif merupakan metode penapisan fitokimia yang dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna. Menurut Yuhernita dan Juniarti (2011). Hal utama yang berperan penting dalam penapisan fitokimia adalah pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. Penapisan fitokimia pada penelitian ini dilakukan identifikasi terhadap senyawa flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan pada ekstrak bunga telang, yaitu sebanyak masing-masing 200 mg sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi dicampur dengan etanol kemudian dipanaskan diatas penangas air kemudian disaring, ditambahkan serbuk magnesium dan HCl 2 N. Warna merah hingga merah muda menunjukkan adanya flavonoid (Herawati, 2012).

#### 5. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi flavonoid dengan menggunakan plat silika. Plat KLT silika gel GF<sub>254</sub> diaktivasi dengan cara dioven pada suhu 105 °C selama 10 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat KLT. Ekstrak kental hasil ekstraksi kemudian ditotolkan pada plat KLT pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis atas. Selanjutnya dielusi dengan menggunakan eluen. Pereaksi (eluen) yang digunakan untuk pemisahan komponen pada ekstrak bunga telang adalah cairan pengelusi n-heksan : etil asetat (5:1) (Riswadi,2010).





**Gambar 3.2 Skema Penapisan Fitokimia**

## 6. Penyiapan Reagen Penelitian

### a. Pembuatan Air Bebas CO<sub>2</sub>

Mengambil aquades 1000 ml didihkan selama 5 menit (terhitung dimulai saat air mendidih), kemudian ditutup dengan aluminium foil, dicegah hubungan dengan udara semaksimal mungkin. Didinginkan tanpa membuka penutup dan segera digunakan (Farmakope Indonesia, edisi IV; Rahmawanty *et.al.*,2015).

### b. Larutan Dapar Fosfat 0,2 N pH 6,6

Pertama, menimbang 2 gram NaOH dan dilarutkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> hingga 250 ml dalam labu takar. Kedua, menimbang KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 6,8 gram dan dilarutkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> hingga 250 ml dalam labu takar. Kemudian dipipet sebanyak 16,4 ml NaOH, dimasukkan dalam labu takar dan dicampurkan 50 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, selanjutnya diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> hingga 200 ml.

c. Larutan Kalium Ferrisianida 1%

Menimbang 1 gram Kalium Ferrisianida dan dilarutkan dengan aquades, dicukupkan hingga 100 ml dalam labu takar.

d. Larutan  $\text{FeCl}_3$  0,1%

Menimbang 0,1 gram  $\text{FeCl}_3$  dan dilarutkan dengan aquades, dicukupkan hingga 100 ml dalam labu takar.

e. Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%

Menimbang 10 gram TCA dan dilarutkan dengan aquades, dicukupkan hingga 100 ml dalam labu takar.

f. Pembuatan larutan standar asam askorbat

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 50 mg asam askorbat yang dilarutkan dengan asam oksalat 1 % hingga tanda batas labu ukur 50 ml. Selanjutnya dari larutan stok 1000 ppm diambil masing-masing 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 dan ditempatkan pada labu ukur 10 ml yang berbeda dan diencerkan dengan asam oksalat 1 % hingga 10 ml dan dihomogenkan. Konsentrasi standar 1000 ppm asam askorbat yakni 10; 20; 30; 40; 50 (Mamat *et al.*, 2018).

7. Penentuan pH

Tahapan kalibrasi dimulai dengan melakukan rendam sebentar elektroda dalam akuades, bilas berkali-kali dengan menggunakan botol semprot (gunakan gelas kimia 250 mL untuk menampung air sisa semprotan. Keringkan dengan menggunakan kertas tissue (pastikan elektroda kering). Rendam dalam larutan bufer pH 7 (dalam gelas kimia

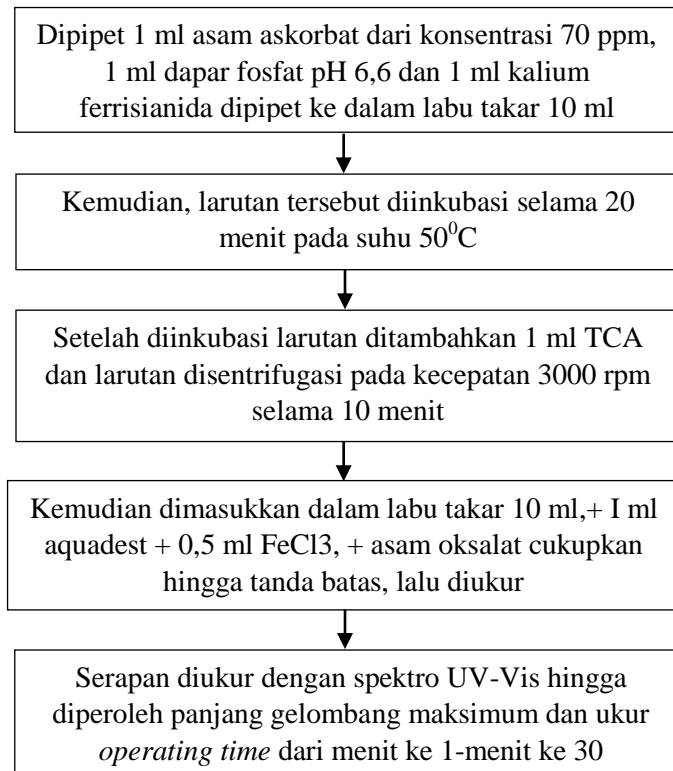
100 mL atau langsung dalam botol kecil) beberapa saat (untuk mencapai kesetimbangan). “On” kan pHmeter. Tunggu beberapa saat. Bacalah skala pH. Bila pH terbaca tidak sama dengan 7 putarlah tombol penyesuai pH agar pH menjadi terbaca 7. Cuci elektroda dengan akudes berulang-ulang. Keringkan Celupkan elektroda ke dalam larutan bufer pH 4, biarkan beberapa saat. Bacalah pH pada skala pH alat. pembacaan harus menunjukkan pH 4 + 0,02. Lakukan pekerjaan yang sama seperti di atas, tetapi menggunakan larutan bufer pH 7, 2 pembacaan harus menunjukkan pH 7 + 0,02. Apabila hasil pembacaan di luar range yang telah ditetapkan artinya pHmeter tidak terkalibrasi(Fatimah, 2018).

#### 8. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.

Panjang gelombang maksimum diperoleh melalui pengukuran absorbansi dari larutan standar asam askorbat pada konsentrasi 70 ppm. Sebanyak 1 mL larutan tersebut dicampurkan dengan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 1 ml kallium ferrisianida 1 %, campuran diinkubasi pada 50<sup>0</sup>C selama 20 menit. Setelah selesai diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA, larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, Kemudian dimasukkan dalam labu takar 10 ml, tambahkan 1 ml aquades dan 0,5 ml FeCl<sub>3</sub>, cukupkan dengan asam oksalat hingga tanda batas, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400-800 hingga diperoleh panjang gelombang maksimum (Magfira, 2018).

### 9. Penentuan *Operating Time*

Hasil dari panjang gelombang maksimal dilanjutkan dengan pengujian *operating time* untuk menentukan waktu dimana reaksi paling stabil dan dibaca absorbansinya pada menit ke 1 sampai menit ke 30.



**Gambar 3.3**Skema Penentuan Panjang Gelombang Maksimal dan *Operating Time*

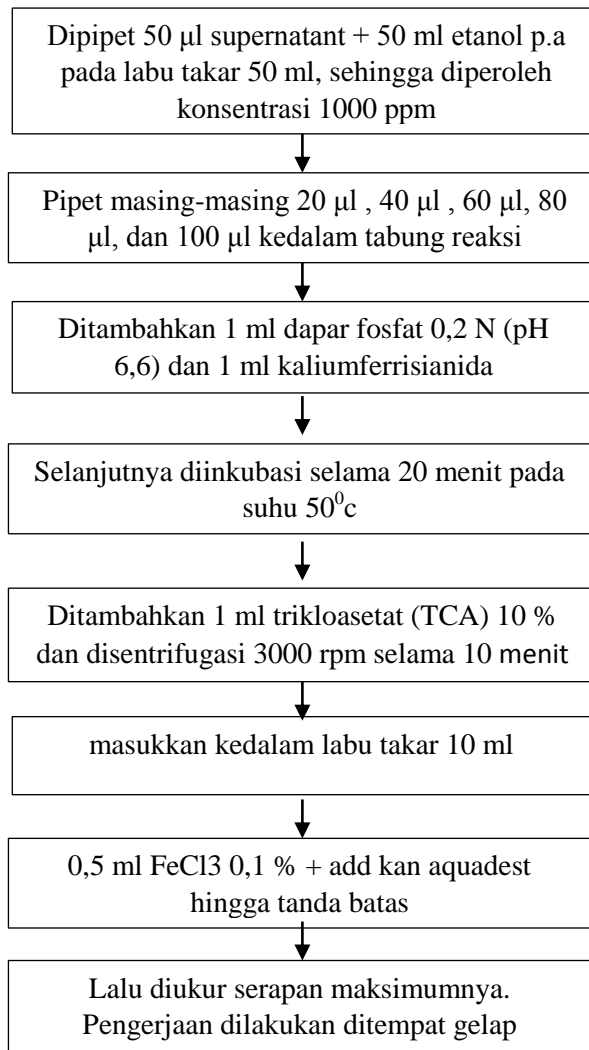
### 10. Pembuatan Larutan Blanko

Sebanyak 1 ml dapar fosfat pH 6,6 dan 1 ml kalium ferrisianida dipipet ke dalam tabung reaksi. Kemudian, larutan tersebut diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA, larutan disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil 1 ml lapisan atas dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml kemudian tambahkan 1 ml aquades dan 0,4 ml FeCl<sub>3</sub>, cukupkan dengan

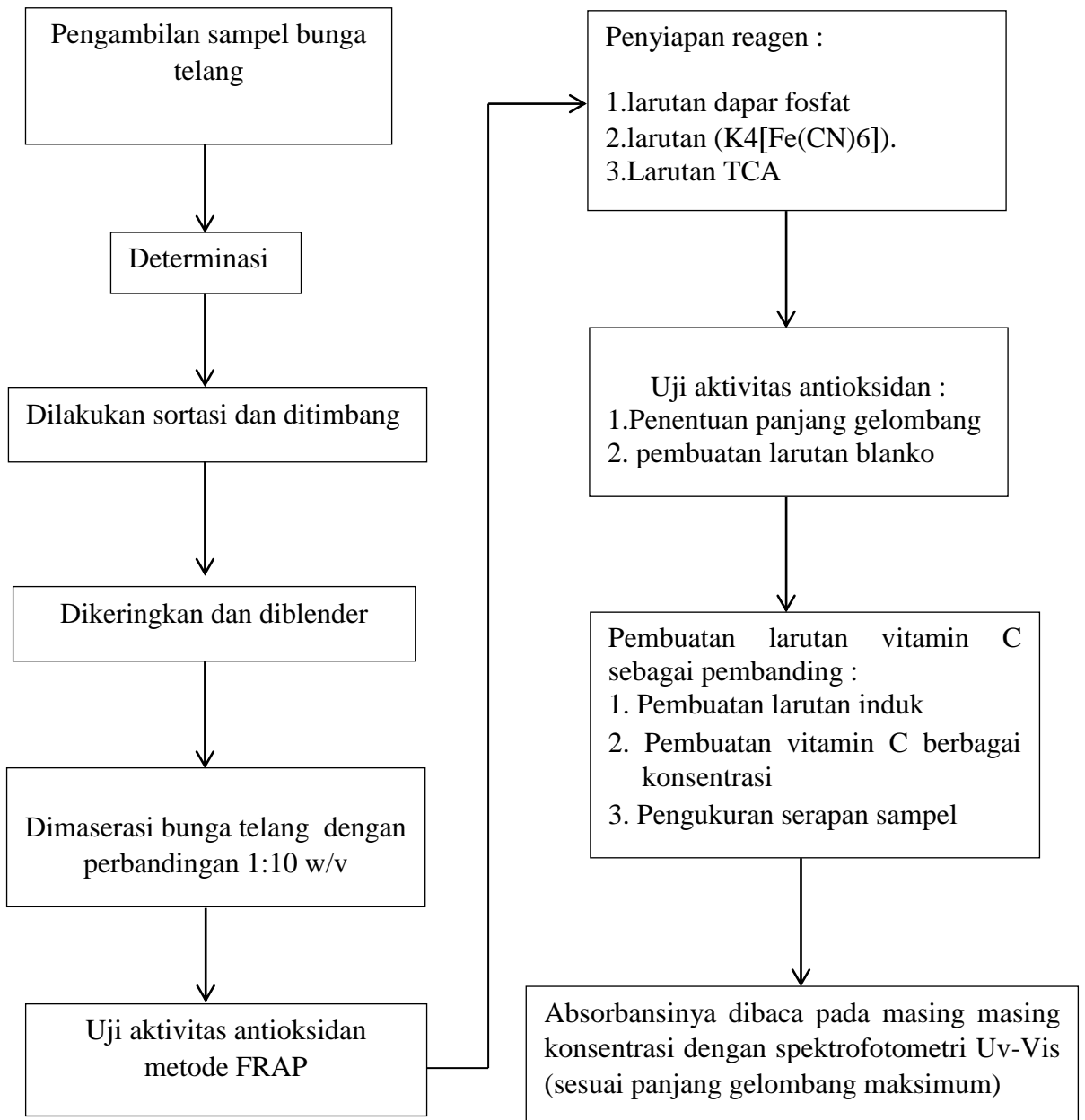
etanol p.a hingga tanda batas, didiamkan lagi selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya maksimal (Magfira, 2018).

11. Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L*)

Diambil 50 µl ekstrak bunga telang dan dilarutkan dalam 50 ml etanol p.a pada labu takar 50 ml hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dipipet masing-masing 20 µl , 40 µl , 60 µl, 80 µl, dan 100 µl dari larutan stok kedalam tabung reaksi hingga konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm selanjutnya ditambahkan masing-masing 1 ml dapar fosfat 0,2 N (pH 6,6) dan 1 ml kaliumferrisianida. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50<sup>0</sup>C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 ml larutan TCA 10% lalu disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuge dipipet dimasukkan kedalam labu takar 10 ml, dan tambahkan 0,5 ml FeCl<sub>3</sub> 0,1 % kemudian add kan aquadest hingga tanda batas. Lalu diukur serapan dengan panjang gelombang maksimumnya. Pengerjaan dilakukan ditempat gelap.



**Gambar 3.4 Skema Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga**



**Gambar 3.5 Skema Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea l.*)**

## G. Pengolahan Data

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *inhibisi concentration* 50% atau IC<sub>50</sub> yaitu konsentrasi sampel yang dapat mereduksi ion Fe sebanyak 50%. Rumus menghitung % aktivitas mereduksi ion Fe<sup>3+</sup> :

$$\text{Persen (\%)} \text{ sisa Fe}_{3+} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \times 100 \%$$

Keterangan :

A<sub>0</sub> = adalah absorbansi blangko (tidak mengandung senyawa uji/ekstrak)

A<sub>1</sub> = adalah absorbansi sampel uji/senyawa pembanding

Setelah didapatkan presentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, selanjutnya dengan perhitungan secara regresi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub> dimana X sebagai konsentrasi (µg/ml) dan y sebagai presentasi aktivitas (%). IC<sub>50</sub> sampel dan pembanding diperoleh dengan rumus  $y = Bx + A$ . Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan dari x setelah mengganti y dengan 50 (Wachidah, 2013; Magfira, 2018). Nilai IC<sub>50</sub> yang semakin kecil, menunjukkan semakin tinggi daya antioksidan dari sampel tersebut (Magfira, 2018).

## H. Analisa Data

Analisis data pada penelitian ini adalah untuk menentukan perbandingan Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol dan etil asetat bunga telang. Hasil dari penelitian kemudian di analisis menggunakan T-test atau Uji T. Dalam penelitian akan di dapat rata-rata nilai IC<sub>50</sub> yang selanjutnya di buat grafik dan tabel untuk menentukan nilai perbandingan dari nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol dan etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dengan nilai IC<sub>50</sub> vitamin C.