

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium yaitu untuk menentukan perbandingan aktivitas antioksidan ekstrak Etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dua tempat tumbuh yang berbeda dengan menggunakan metode *Ferric Reducing Antioxidant Power* FRAP.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik MIPA di Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan ekstrak etanol bunga telang dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP, dilaksanakan dilaboratorium Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi dalam penelitian ini adalah bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang didapatkan dari dua daerah yaitu kabupaten Lombok Utara dan Wonosobo.
2. Sampel pada penelitian ini adalah ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan dua daerah tumbuh yang berbeda.

D. Definisi Operasional

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal dampak negative radikal bebas dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa radikal bebas sehingga aktivitasnya dapat dihambat. (Mutsiroh, 2010). Konsentrasi efektif 50 (IC₅₀) merupakan konsentrasi ekstrak yang mampu memberikan persentase penangkapan radikal bebas dan mereduksi ion Fe sebanyak 50% suatu sampel (ppm) yang diperoleh dari persamaan regresi (Setiawan, *et al*, 2018).

1. Variabel Terikat (*Dependent Variabel*)
 - a. IC₅₀ Bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dari kabupaten Lombok Utara
 - b. IC₅₀ Bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dari kabupaten Wonosobo

2. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah tanaman budidaya, suhu pengeringan, dan kondisi tempat.

E. Pengumpulan Data

1. Alat Penelitian
 - a. Alat untuk pembuatan ekstrak etanol bunga telang meliputi satu set alat maserasi, penyaring, *rotary evaporator* (RE 100-Pro), cawan penguap, *waterbath* (Memmert).
 - b. Alat untuk uji in vitro meliputi labu takar 10 ml, 25 ml, 100 ml, tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikropipet BioHit 1000µL, pipet ukur, spatula, vial, Inkubator, pH meter, kuvet, sentrifuge, tabung

sentrifuge, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV Mini 1240, beaker glass,

2. Bahan Penelitian

a. Bahan Simplisia

Ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea L.*)

b. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain asam trikloroasetat (TCA), Besi Klorida (FeCl_3), buffer fosfat (0,2 M pH 6,6), Kalium Ferrisianida 1 % ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), AlCl_3 , Vitamin C (Merck), Etanol p.a (Brataco), Aquades (CV. Bratachem).

3. Prosedur Penelitian

a. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tanaman pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Program Studi Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

b. Penyiapan Bahan

Tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) diperoleh dari dua daerah yaitu Lombok dan wonosobo, bagian yang diambil adalah bunganya. Bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan sortasi untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji, kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu diangin-anginkan hingga tidak terdapat sisa air. Bunga telang

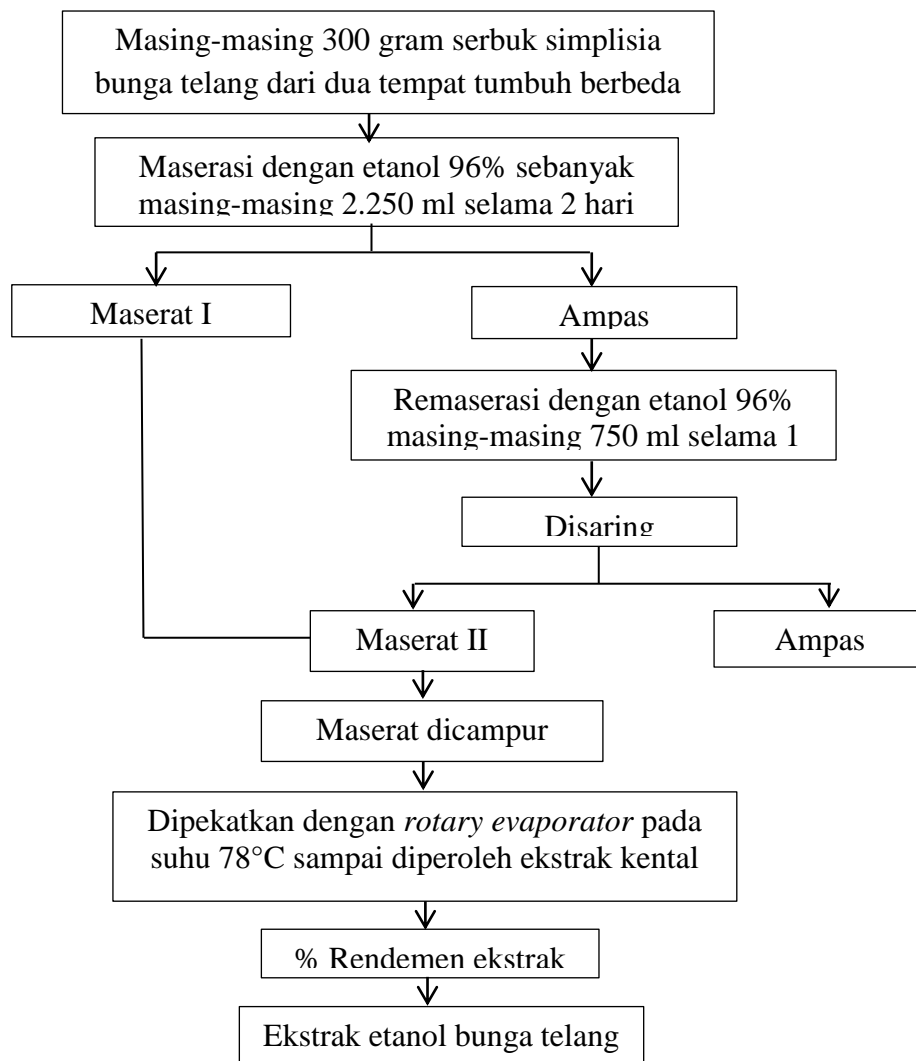
dipotong-potong lalu dikeringkan dan kemudian dihaluskan dengan blender, setelah diblender didapatkan serbuk halus kemudian diayak menggunakan pengayak nomor 18 kemudian dilakukan ekstraksi.

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

Ekstrak bunga telang dibuat dengan menggunakan metode maserasi dengan cara ditimbang sebanyak 300 gram serbuk simplisia kering dari daerah Wonosobo dan 300 gram serbuk simplisia kering dari daerah Lombok dan kemudian dilakukan ekstraksi dengan menggunakan perbandingan 1: 10. 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.

Maserasi dilakukan dengan pelarut etanol masing-masing 2.250 ml di dalam wadah terhindar dari cahaya selama 2 hari sambil sesekali diaduk tiap 12 jam. Kemudian maserat yang diperoleh disaring dilakukan proses remaserasi dengan sisa pelarut etanol hingga warna pelarut etanol bening yang menandakan pelarut tersebut sudah tidak bisa menarik senyawa yang terdapat dalam simplisia. Maserat yang diperoleh dipisahkan menggunakan kertas saring dan dilakukan proses remaserasi dengan pelarut yang sama. Hasil maserat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan filtrat ekstrak bunga telang menggunakan alat *rotatory evapaporator* dengan suhu 78°C dan

residukan dengan water bath dengan suhu $<65^{\circ}\text{C}$ sehingga diperoleh ekstrak etanol kental. (Riyanto, *et al.*,2019). Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk menghitung rendemen dan simplisia di tempat yang terlindung dari cahaya atau botol berwarna gelap sampai saat digunakan untuk pengujian (Arunachalam, *et al.*, 2009).



Bagan 3.1 Skema Ekstraksi Bunga Telang

4. Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Lakukan pembacaan dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 350-450 nm (Das *et al.*, 2013).

b. Penentuan *Operating Time*

Larutan kuersetin ppm diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval pada waktu 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

c. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan kuersetin sebagai baku standar dibuat kadar sebesar 50, 60, 70, 80 dan 90 ppm. Sebanyak 1 mL larutan kadar dari masing-masing konsentrasi dimasukkan, direaksikan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Didiamkan selama 2 menit pembacaan absorbansi kadar dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

d. Penentuan Flavonoid Total

Larutan ekstrak 1000 ppm diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5% didiamkan selama 2 menit. Dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang

gelombang maksimum.

5. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Air Bebas CO₂

Mengambil aquades 250 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

Larutan disiapkan dengan menimbang 2 gram NaOH dan dilarutkan dengan aquades bebas CO₂ hingga tepat 100 mL dalam labu takar. Kemudian sebanyak 6,8 gram KH₂PO₄ yang dilarutkan dengan aquades bebas CO₂ 100 mL dalam labu takar. Kemudian dipipet sebanyak 16,4 mL NaOH dimasukkan dalam labu takar dan dicampurkan 50 mL KH₂PO₄, selanjutnya diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan aquades bebas CO₂ hingga 100 mL.

c. Pembuatan Kalibrasi pH

Larutan KH₂PO₄ dimasukkan kedalam beaker glass dan dicek pH-nya dengan menggunakan alat pH meter buffer 4, 7, 10, Kemudian ditambah dengan air bebas CO₂ ad 100 mL. Larutan ditambah tetes demi tetes NaOH dan HCl pekat sampai diperoleh pH 6,6. Diperoleh larutan dapar fosfat pH 6,6.

d. Larutan FeCl_3 0,1 %

Larutan disiapkan dengan melarutkan 0,1 gram FeCl_3 dalam aquades dan diencerkan dalam labu takar 100 mL.

e. Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10 %

Larutan disiapkan dengan melarutkan 10 gram TCA dalam aquades dan diencerkan dalam labu takar 100 mL.

f. Pembuatan Baku Perbandingan

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 25 mg vitamin C yang dilarutkan dengan etanol p.a hingga batas labu ukur 25 mL. Selanjutnya dari larutan stok 1000 ppm diambil masing-masing 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mL ditempatkan dalam labu ukur 25 mL yang berbeda dan diencerkan dengan etanol 96% hingga 25 mL dan dihomogenkan, dipipet 1 mL, ditambahkan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 1 mL $(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1% setelah itu diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50 °C. Ditambahkan 1 mL aquades dan 0,5 mL FeCl_3 0,1% setelah itu diinkubasi dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 698,2 nm pada spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi standar 1000 ppm asam askorbat yakni 10; 20; 30; 40; 50 ppm (Mamat *et al.*,2018).

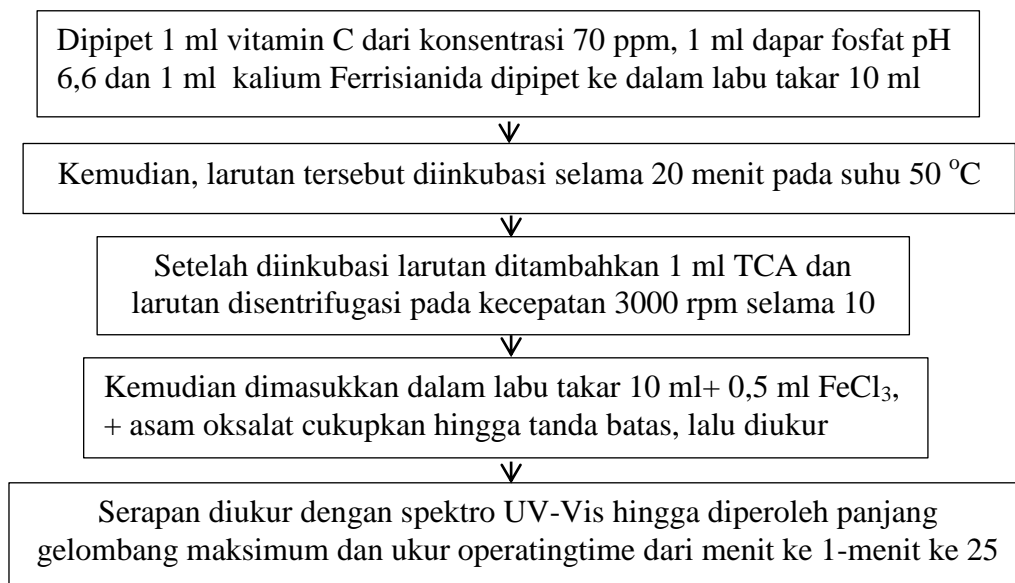
g. Penentuan Panjang Gelombang

Panjang gelombang maksimum diperoleh melalui pengukuran absorbansi dari larutan standar vitamin C pada konsentrasi 70 ppm. Sebanyak 1 mL larutan tersebut dicampurkan dengan 1 mL dapar

fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 1 ml kalium ferrisianida 1 %, campuran diinkubasi pada 50 °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 FeCl₃, 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).

h. Penentuan Operating Time

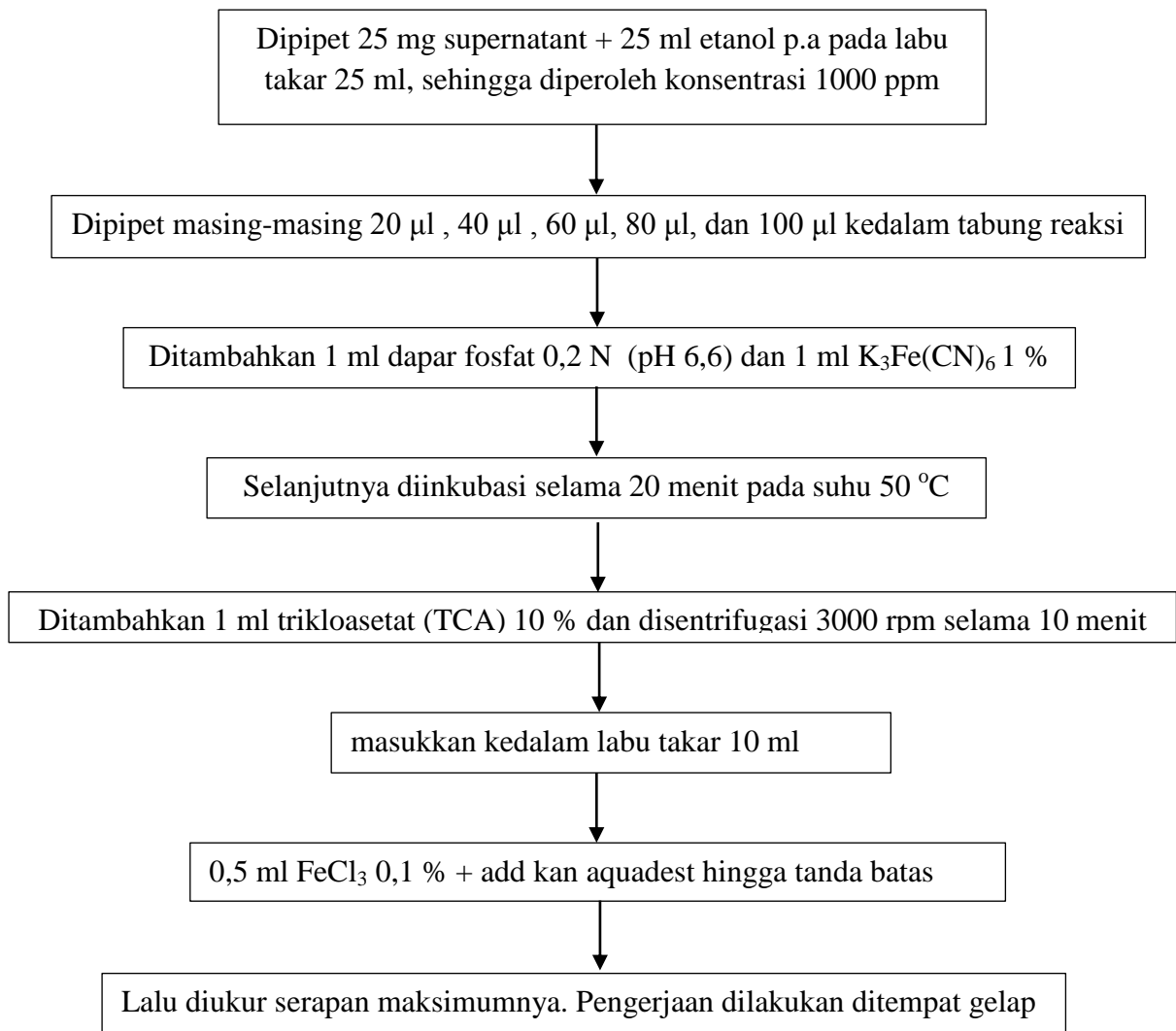
Hasil dari panjang gelombang maksimal dilanjutkan dengan pengujian *operating time* untuk menentukan waktu dimana reaksi paling stabil dan dibaca absorbansinya pada menit ke 1 sampai menit ke 30.



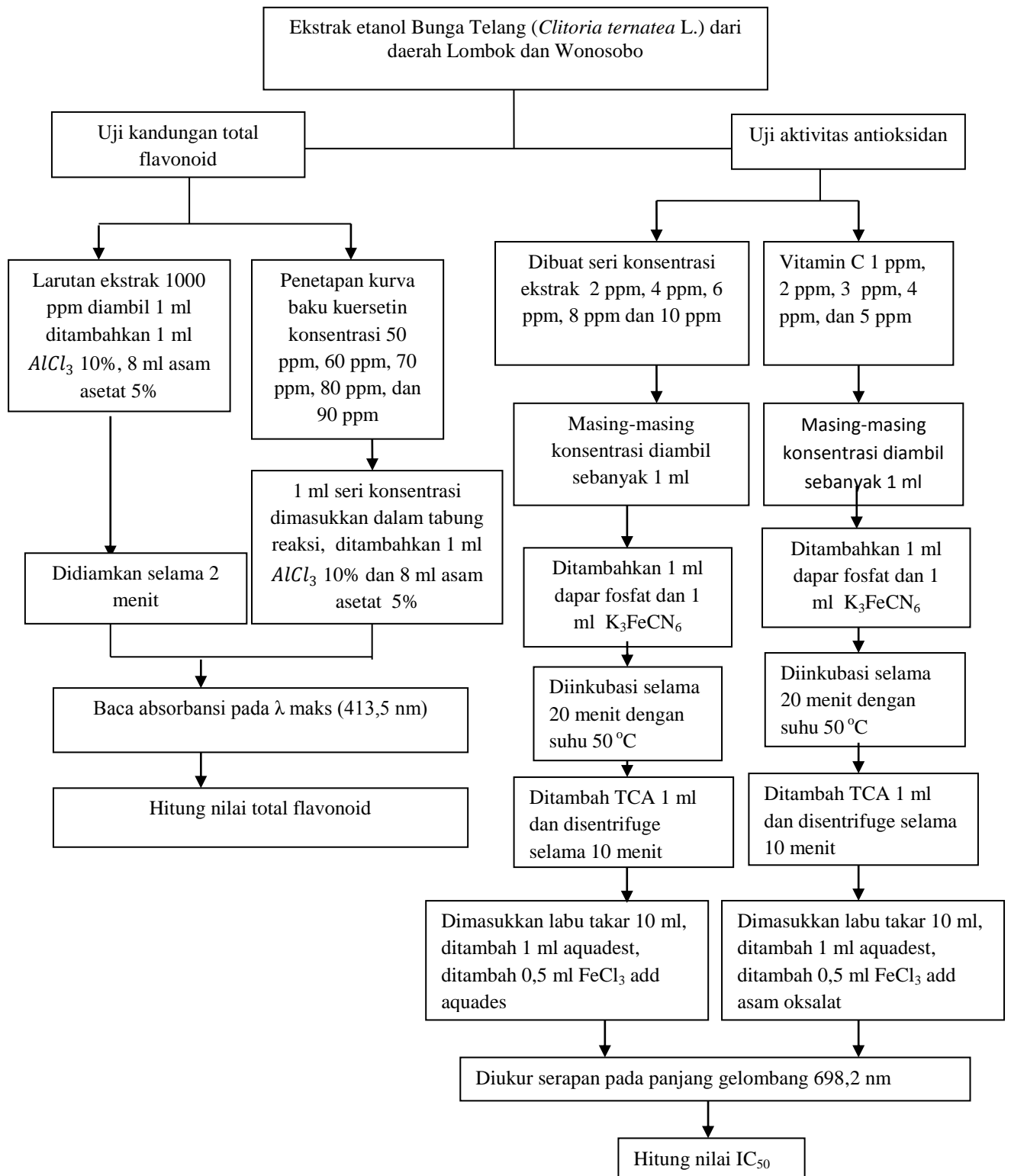
Bagan 3.2 Skema Penentuan Panjang Gelombang Maksimal dan *Operating time*

i. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga telang

Diambil 25 mg ekstrak bunga telang dan dilarutkan dalam 25 ml etanol p.a pada labu takar 25 ml hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dipipet masing-masing 20 μ l , 40 μ l , 60 μ l, 80 μ l, dan 100 μ l 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 $K_3Fe(CN)_6$ 1 %. Diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50 °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 $FeCl_3$ 0,1 % kemudian add kan aquadest hingga tanda batas. Lalu diukur serapan dengan panjang gelombang maksimumnya.



Bagan 3.3 Skema Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang



Bagan 3.4 Skema Penelitian

F. Pengolahan Data

Untuk menghitung kadar flavonoid yang terdapat pada bunga telang dapat dihitung dari nilai absorbansi yang diperoleh dari 5 konsentrasi kuersetin dengan persamaan regresi linier: $y = a + bx$

Dimana :

y = luas kurva

x = konsentrasi sampel

a = intercept (perpotongan garis)

b = slope (kemiringan)

Kadar flavonoid dalam sampel dapat dihitung dengan rumus :

$$C = \frac{C1 \times v \times FP}{m}$$

Keterangan :

C = Total flavonoid(mg/g)

$C1$ = Konsentrasi kuersetin (mg/L)

V = Volume Sampel

M = berat ekstrak (g)

FP = Faktor pengenceran (L)

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *inhibisi concentration* 50% atau

IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat mereduksi ion Fe sebanyak 50

%. Rumus menghitung % aktivitas mereduksi ion Fe^{3+} :

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

Keterangan :

A_0 = adalah absorbansi blangko (tidak mengandung senyawa uji/ekstrak)

A_1 = 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 IC₅₀ dimana X sebagai konsentrasi (µg/ml) dan y sebagai presentasi aktivitas (%). IC₅₀ sampel dan pembanding diperoleh dengan rumus $y=Bx+A$. Nilai IC₅₀ didapatkan dari x setelah mengganti y dengan 50 (Wachidah, 2013;Magfira, 2018). Nilai IC₅₀ yang semakin kecil, menunjukkan semakin tinggi daya antioksidan dari sampel tersebut (Magfira, 2018).

G. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini adalah untuk menentukan perbandingan kadar flavonoid total dan nilai IC₅₀ ekstrak etanol bunga telang dari daerah Lombok dan daerah wonosobo . Hasil dari penelitian kemudian dianalisis menggunakan T-test atau Uji T. Dalam penelitian akan didapat rata-rata nilai kadar flavonoid total dan IC₅₀ yang selanjutnya dibuat grafik dan tabel untuk menentukan nilai perbandingan dari nilai flavonoid total dengan pembanding kuersetin dan nilai IC₅₀ ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan nilai IC₅₀ vitamin C.