

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental. Diawali dengan pengumpulan simplisia, determinasi tanaman, pembuatan ekstrak dari bunga telang dengan rasio pelarut etanol 70% dan lama ekstraksi menggunakan metode ultrasonik, skrining fitokimia, penentuan total fenolik dan flavonoid, dan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS.

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi

Pengambilan sampel bunga telang berlokasi di Desa Glagah, Kecamatan Temon, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta dengan titik koordinat -7,9046070, 110,0760730.

2. Waktu

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Prodi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian ini mulai bulan April sampai Juni tahun 2023.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Bunga telang (*Clitoria ternatea*) seluruh populasinya diperoleh dari perkebunan Kaum Wanita Tani (KWT) Telang Sari di Desa Glagah, Kecamatan Temon, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini digunakan sebanyak 7 kg bunga telang dengan teknik pengambilan sampel secara acak. Bunga telang yang dipilih berwarna ungu, bunga yang masih segar, dengan kelopak

bunga utuh dan diambil seluruh bagian bunga serta dipanen pada pagi hari saat bunga telang masih segar. Sampel yang dipanen yaitu pada usia bunga \pm 2 bulan.

D. Variabel Penelitian

- Variabel bebas : Rasio pelarut etanol 70% dan lama ekstraksi dengan metode ultrasonik
- Variabel terikat : Rendemen, kandungan total fenolik dan flavonoid serta nilai IC_{50}
- Variabel terkontrol : Waktu pengambilan sampel, warna bunga, usia panen bunga, suhu, pelarut, dan tahapan ekstraksi

E. Definisi Operasional Variabel

1. Rasio pelarut, yaitu rasio pelarut etanol 70% dengan air yang dibutuhkan untuk melakukan ekstraksi. Pada penelitian ini digunakan rasio pelarut etanol 70% : sampel perbandingan 1:5, 1:10, dan 1:15.
2. Waktu ekstraksi, yaitu waktu yang dibutuhkan untuk melakukan ekstraksi. Pada penelitian ini digunakan rentang waktu ekstraksi yaitu 10, 20, 30 menit.
3. Skirining fitokimia dari sampel bunga telang
4. Kandungan total fenolik, yaitu konsentrasi senyawa fenolik yang ada dalam sampel yang di uji dengan menggunakan standar baku asam galat dan dinyatakan pada mg *Gallic Acid Equivalent* (GAE) g^{-1}
5. Kandungan total flavonoid, yaitu konsentrasi senyawa flavonoid yang terkandung dalam sampel di uji dengan menggunakan standar baku kuersetin dan dinyatakan dalam mg *Quercetin Equivalent* (QE) g^{-1}
6. Kekuatan aktivitas antioksidan dalam IC_{50} , yang dihitung dari rasio pelarut dan waktu yang telah ditetapkan.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Grinder (Fomac), oven listrik (Mommert), *ultrasonic bath* (Cole-Palmer), ayakan 40 mesh (Test Scieve), timbangan analitik (Ohaus SW version 10S), *magnetic stirrer*, *hot plate*, *glassware* (gelas beaker, labu takar, erlenmeyer, batang pengaduk, corong, pipet ukur, tabung reaksi, pipet tetes),

mikro pipet, rak tabung reaksi, aluminium foil, kuvet, *waterbath*, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer), *moisture balance analyzer* (Ohaus), *vacum buchner* (Rocker).

2. Bahan

Bunga telang, etanol 70%, (Teknis), etanol *p.a*, aquades, pereaksi (Mayer, Wagner, Dragendroff), Folin-Ciocalteu (Merck), Mg (Magnesium), CH₃COOH 5%, Na₂CO₃ 7%, AlCl₃, FeCl₃ 10%, HCl pekat (Mallinckrodt), HCl 1%, HCl 1 N, FeCl₃ 1%, standar (kuersetin (Sigma) dan asam galat), metanol *p.a*, ABTS, kertas whatman no 1, *blue tip*, *yellow tip* dan *Water For Injection*.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan

a. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilaksanakan pada Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.

b. Persiapan Sampel

Bunga telang dipanen pada pagi hari, dipilih bunga telang yang segar dan dilakukan proses sortasi sebanyak 2 kali untuk memisahkan bunga telang dari kotoran dan sampel bunga yang rusak. Sampel kemudian disortasi basah untuk menghilangkan partikel-partikel asing dari bunga. Dikeringkan sampel dengan menggunakan oven listrik dengan suhu 45°C selama 3 x 24 jam, kemudian sampel kering di blender lalu di ayak dengan ayakan ukuran 40 mesh (Anjani, 2019).

Dilakukan penetapan kadar air pada serbuk sampel dengan menggunakan alat *Moisture Balance Analyzer* yaitu dengan memasukkan serbuk sebanyak 5 gr ke dalam alat kemudian didiamkan selama beberapa menit sampai didapatkan total kadar air dalam sampel.

c. Desain Faktorial

Penelitian ini dilakukan dengan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) pada 2 faktor yaitu rasio pelarut (1:5, 1:10, 1:15) : waktu

ekstraksi (10, 20, 30). Pada percobaan ini dilakukan 2 kali pengulangan. Kombinasi rasio pelarut dan lama ekstraksi digambarkan pada tabel berikut:

Tabel 2. Desain Faktorial

Rasio Pelarut	Lama Ekstraksi (Menit)		
1 : 5	10	20	30
1 : 10	10	20	30
1 : 15	10	20	30

2. Pelaksanaan

a. Pembuatan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea*)

Ditimbang serbuk sampel bunga telang menggunakan timbangan analitik masing-masing sebanyak 10 gram lalu dilarutkan ekstrak sampel bunga telang dengan pelarut etanol 70% 50 mL, 100 mL, dan 150 mL dengan perbandingan (1:5, 1:10 dan 1:15) dalam erlenmeyer, dilakukan proses ekstraksi dengan menggunakan rasio pelarut dan waktu ekstraksi dengan frekuensi 40 kHz menggunakan alat *ultrasonic bath*, kemudian dilakukan penyaringan pada sampel hasil ekstraksi dengan kertas saring whatman no 1 sampai memperoleh filtrat ekstrak dari bubuk bunga telang, setelah itu diuapkan masing-masing pelarut di *waterbath* pada suhu 45°C sampai diperoleh ekstrak kental dan dilakukan skrining fitokimia, perhitungan % rendemen dapat dilihat pada persamaan (1).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot simplisi awal (gram)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

b. Uji Organoleptik

Ekstrak sampel etanol 70% akan diuji meliputi warna, bau, rasa dan tekstur yang bertujuan untuk mengetahui sifat fisik dari ekstrak bunga telang, dimana ekstrak bunga memiliki warna biru tua, dengan bau khas, dan rasa yang pahit serta tekstur yang kental (Arifah *et al.*, 2022).

c. Skrining Fitokimia

1) Identifikasi Fenolik

Dimasukkan ekstrak sebanyak 50 mg pada tabung reaksi dan tambahkan 1 mL FeCl₃ 1%. Positif fenolik ditandai adanya warna hitam kehijauan, biru tua atau merah ungu (Riyanto & Suhartati, 2019) (Aryantini *et al.*, 2020).

2) Identifikasi Flavonoid

Dimasukkan 50 mg ekstrak ke dalam air panas 100 mL lalu dididihkan selama 5 menit dan saring. Diambil filtrat 10 mL lalu ditambah dengan 1 mg magnesium dan HCl pekat 1 mL dan kocok kuat. Sampel menjadi warna merah, kuning atau jingga artinya positif (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

3) Identifikasi Alkaloid

Diambil sebanyak 50 mg ekstrak kemudian diberikan 1-3 tetes HCL 1% dan dilarutkan lalu ditambah 1-3 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif dilihat dari sampel yang menunjukkan adanya endapan atau larutan menjadi keruh. Kemudian uji Wagner akan menunjukkan hasil endapan coklat dan uji Dragendorf menghasilkan endapan merah kecoklatan (Frisca *et al.*, 2021).

4) Identifikasi Tanin

Ekstrak 50 mg dilarutkan dalam aquades 10 mL lalu diambil sebanyak 3 mL kemudian ditambahkan dengan 2 mL FeCl₃ 10%. Positif tanin ditandai adanya warna hitam kehijauan atau warna biru tua (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

5) Identifikasi Saponin

Diambil 50 mg ekstrak kemudian dikocok dengan 10 mL air hangat dan menghasilkan busa lalu ditetesi 2 tetes HCl 2N. Positif saponin apabila busa yang terbentuk stabil ± 7 menit (Frisca *et al.*, 2021).

d. Uji Total Fenolik

1) Pembuatan larutan uji

Dibuat larutan uji ekstrak sebanyak 20 mg diadd dalam 5 ml metanol *p.a* atau setara dengan 4000 ppm, kemudian sampel divortex sampai semua ekstrak larut setelah itu disaring menggunakan kertas saring whatman no 1 dimasukkan ke dalam vial (Malik & Ahmad, 2014).

2) Pembuatan larutan baku 1000 ppm

Dilakukan dengan menimbang 10 mg asam galat kemudian dituangkan ke labu 10 mL dan tambahkan metanol *p.a* sampai batas. Dibuatkan seri konsentrasi 60, 80, 100, 120 dan 140 ppm dari larutan induk kemudian di pipet 600, 800, 1000, 1200 dan 1400 μ l.

3) Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum

Ditentukan dengan mengukur standar asam galat pada konsentrasi 100 ppm. Diambil 0,2 mL asam galat dengan konsentrasi 100 ppm lalu ditambah reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 0,1 mL, kocok dan 1 mL Na_2CO_3 7% diadkan selama 5 menit kemudian ditambahkan *Water For Injection* sampai batas labu 5 mL. Dilakukan pengukuran absorbansinya dengan panjang gelombang 500-800 nm pada spektrofotometer UV-Vis (Malik & Ahmad, 2014) (Ikhwan Rizki *et al.*, 2022).

4) Penentuan *operating time*

Dengan mengambil 0,2 mL larutan asam galat konsentrasi 100 ppm lalu ditambahkan dengan 0,1 mL pereaksi Folin-Ciocalteu digojog kemudian ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 7% lalu diadkan selama 5 menit kemudian ditambahkan *Water For Injection* sampai batas labu 5 mL. Baca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan dengan rentang waktu 0-60 menit dengan interval waktu 1 menit sampai absorbansi stabil (Ikhwan Rizki *et al.*, 2022).

5) Pembuatan kurva baku

Dilakukan dengan mengambil masing-masing 0,2 mL dari seri konsentrasi kemudian dimasukkan ke tabung reaksi lalu tambahkan 0,1 mL pereaksi Folin-Ciocalteu lalu 1 mL Na_2CO_3 7% dan diadkan dalam labu 5 mL dengan *Water For Injection*, dikocok hingga tercampur merata lalu diadkan selama *operating time*. Dibaca absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan panjang gelombang maksimum (Ikhwan Rizki *et al.*, 2022).

6) Penentuan total kadar fenolik

Ekstrak etanol bunga telang diuji dengan mengambil 0,2 mL dari larutan uji yang telah dibuat tambahkan pereaksi Folin-Ciocalteu sebanyak 0,1 mL lalu tambahkan larutan Na_2CO_3 7% sebanyak 1 mL dikocok sampai tercampur merata dan diamkan selama *operating time*. Dibaca absorbansi pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (Ikhwan Rizki *et al.*, 2022). Pengukuran dilakukan dengan cara 2 kali pengulangan dengan konsentrasi fenolik dihitung dari substitusi pada persamaan regresi linier dan dinyatakan sebagai kadar total fenolik ekstrak.

e. Uji Total Flavonoid

1) Pembuatan larutan uji

Ekstrak bunga telang 40 mg dilarutkan dalam aquades 10 tetes dan etanol *p.a* di *vortex* hingga larut dan *add* ke dalam labu takar 5 ml setara dengan 8000 ppm, setelah itu disaring menggunakan kertas saring whatman no 1 (Suharyanto & Hayati, 2021).

2) Pembuatan larutan baku 1000 ppm

Standar kuersetin 10 mg masukkan ke labu ukur 10 mL setelah itu tambahkan etanol *p.a* sampai tanda. Dibuat seri konsentrasi 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm dari larutan baku.

3) Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum

Dilakukan pengukuran larutan baku kuersetin pada konsentrasi 100 ppm dengan mengambil sebanyak 0,5 ml kemudian ditambahkan 0,5 ml AlCl_3 10% dan 4 ml CH_3COOH 5% lalu diukur pada spektrofotometer UV-Vis dengan λ 400-475 nm dan panjang λ teoritis 415 nm (Rahayu *et al.*, 2021) (Suharyanto & Hayati, 2021).

4) Penentuan *operating time*

Larutan baku kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm ukur pada panjang gelombang yang sudah didapatkan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan rentang waktu 0-60 menit dengan interval setiap 1 menit (Suharyanto & Hayati, 2021).

5) Pembuatan kurva baku

Dilakukan pengambilan larutan baku sebanyak 0,5 ml dari variasi konsentrasi larutan baku dimasukkan ke dalam vial kemudian ditambahkan 0,5 ml AlCl_3 10% dan 4 ml CH_3COOH 5%. Ditunggu selama *operating time*, kemudian diukur absorbansi dengan panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Hawari *et al.*, 2022) (Rahayu *et al.*, 2021).

6) Penentuan kadar total flavonoid

Larutan uji diambil 0,5 mL lalu masukkan ke tabung reaksi, lalu diberikan aluminium klorida 10%, lalu 0,5 mL CH_3COOH 5% ditunggu selama *operating time*, kemudian lihat absorbansinya dengan panjang gelombang maksimal yang sudah ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Suharyanto & Hayati, 2021). Pengukuran dilakukan dengan cara 2 kali pengulangan dengan konsentrasi flavonoid dihitung dari substitusi pada persamaan regresi linier dan dinyatakan sebagai kadar total flavonoid ekstrak.

f. Uji Aktivitas Antioksidan

1) Pembuatan reagen ABTS

Diambil ABTS sebanyak 19,2 mg dilarutkan dalam 5 mL metanol *p.a* dengan konsentrasi akhirnya 7 mM. Kalium persulfat ditimbang sebanyak 3,24 mg (2,4 mM) lalu dilarutkan dengan 5 mL aquadest. Keduanya kemudian dicampurkan lalu disimpan dalam ruangan gelap dengan suhu ruang selama 12-16 jam sampai menghasilkan warna biru gelap, larutan ABTS yang sudah diinkubasi diambil 1 mL dan diencerkan dengan metanol *p.a* sampai diperoleh absorbansi $0,70 \pm 0,02$ pada λ 734 nm (Shah & Modi, 2015) (Khasanah *et al.*, 2014).

2) Penetapan panjang gelombang (λ) maksimal ABTS

Diambil 1 mL dari larutan ABTS yang telah diencerkan dengan metanol *p.a* \pm 10 mL hingga telah diperoleh absorbansi $0,70 \pm 0,02$ lalu diamati pada panjang gelombang 700-750 nm, dengan

methanol *p.a* sebagai blanko dan panjang gelombang teoritis 734 nm (Wicaksono *et al.*, 2021) (Khasanah *et al.*, 2014).

3) Penentuan *operating time* ABTS

Larutan baku kuersetin 1,5 ppm dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 2 ml ABTS, kemudian diukur dengan panjang gelombang yang sudah ditentukan dengan rentang waktu 0-45 menit pada interval 1 (Wicaksono *et al.*, 2021).

4) Penentuan aktivitas antioksidan kuersetin

a) Pembuatan sampel standar kuersetin 1000 ppm

Kuersetin ditimbang 10 mg larutkan dalam metanol *p.a* pada labu ukur 10 mL sampai diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Diencerkan larutan baku induk menjadi 100 ppm dengan mengambil sebanyak 1 mL larutan baku diencerkan menggunakan metanol *p.a* 10 mL, lalu diencerkan menjadi 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 ppm dalam labu 5 mL (Wicaksono *et al.*, 2021).

b) Pembacaan aktivitas antioksidan

Dibaca serapannya dengan mencampurkan dari masing-masing konsentrasi sebanyak 1 mL standar kuersetin dengan 2 mL ABTS kemudian diamkan selama *operating time* dan baca serapan dengan panjang gelombang maksimal.

5) Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak bunga telang

a) Pembuatan sampel ekstrak bunga telang

Ekstrak 10 mg dilarutkan menggunakan metanol *p.a* sampai batas labu 10 mL setara dengan 1000 ppm. Larutan baku ekstrak dibuat seri konsentasi menjadi 40, 80, 120, 160, dan 200 ppm kemudian diadddkan dengan metanol *p.a* sampai batas labu 5 mL (Wicaksono *et al.*, 2021).

b) Pembacaan aktivitas antioksidan sampel

Setelah itu masing-masing konsentrasi sampel diambil 1 mL ditambahkan ABTS 2 mL. Diinkubasi selama *operating time* dan

diukur dengan panjang gelombang maksimal (Wicaksono *et al.*, 2021).

Tabel 3. Tingkat Aktivitas Antioksidan

Kategori Antioksidan	Nilai IC ₅₀
Sangat kuat	< 50
Kuat	50 – 100
Sedang	100 – 150
Lemah	151 – 200

(Faisal, 2019).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Perhitungan Absorbansi

Hasil yang diperoleh adalah nilai absorbansi yang kemudian dihitung menggunakan rumus persamaan garis linier $y = bx + a$, sehingga mendapatkan nilai berupa x (Kadar/C).

2. Total Fenolik

Penentuan total fenolik dihitung dengan persamaan (2)

$$TPC = \frac{C \times V \times Fp}{g} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

TPC = *Total Phenolic Content*

C = Konsentrasi fenolik (Nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (ml)

Fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (gram)

3. Total Flavonoid

Penentuan total flavonoid dihitung dengan persamaan (3)

$$TFC = \frac{C \times V \times Fp}{g} \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan:

TFC = *Total Flavonoid Content*

C = Konsentrasi fenolik (Nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (ml)

Fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (gram)

4. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Data yang telah diperoleh dianalisis aktivitas antioksidannya dengan menghitung % inhibisi menggunakan persamaan (4).

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\% \dots \dots \dots (4)$$

5. Perhitungan Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi larutan uji yang dapat menangkal sebesar 50% radikal bebas. Perhitungan nilai IC₅₀ yaitu dengan persamaan menggunakan regresi linier $y = bx+a$ antara konsentrasi larutan uji (x), % inhibisi (y) dan nilai $y = 50$. Perhitungan IC₅₀ dihitung dengan rumus:

$$y = bx + a$$

$$50 = bx + a$$

$$x = \frac{50 - a}{b} = \text{IC}_{50}$$

6. Analisis Data

a. Pendekatan teoritis

Hasil uji yang diperoleh dari analisis fitokimia ekstrak etanol bunga telang dibandingkan dengan penelitian terdahulu.

b. Analisis kuantitatif

Penelitian ini dilakukan dengan meneliti ada tidaknya pengaruh dari rasio pelarut dengan lama ekstraksi terhadap total fenolik dan flavonoid. Hasil ekstrak yang paling optimal akan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dari data total fenolik dan total flavonoid yang diperoleh diuji terlebih dahulu normalitas dan homogenitas. Sampel yang dibuat <50 sehingga menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk uji normalitas data yang diperoleh. Data yang terdistribusi normal apabila diperoleh nilai >0,05. Uji homogenitas menggunakan uji *Levene's* untuk menguji varian data dari semua kelompok, data homogen apabila nilai >0,05. Apabila data yang dianalisis normal dan homogen, kemudian dilanjutkan dengan uji

one-way ANOVA dan jika data yang diperoleh tidak normal maka diuji dengan uji Kruskal Wallis.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PEPUSTAKAAN
YOGYAKARTA