

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif eksperimen dengan pengambilan data dilakukan di laboratorium. Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Juni 2022 di Laboratorium Kimia farmasi Universitas Sahid Surakarta dan Laboratorium Kimia analitik Poltekkes Kemenkes Surakarta.

3.2. Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah bunga telang yang diambil di desa Danguran Kecamatan Klaten Selatan, Kabupaten Klaten, Propinsi Jawa Tengah

3.2.2. Sampel

Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol 70% bunga telang di desa Danguran Kecamatan Klaten Selatan, Kabupaten Klaten, Propinsi Jawa Tengah

3.3. Instrument

3.3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan untuk praktikum ini adalah batang pengaduk, cawan porselin, botol coklat untuk maserasi, corong, erlenmeyer (*pyrex*), gelas kimia (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), kain flannel, labu takar (*pyrex*), mikropipet (*one-Med*), neraca analitik (*labex*), blender simplisia (*fumoc*)

pipet tetes, pipet volume (*pyrex*), waterbath (*equitron*), spatula, *rotary*

evaporator (IKA), Spektrofotometer *UV-Vis (Genesys)* oven (*capp*),

3.3.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia bunga telang, *aquadest (ikapharma)*, etanol teknis 70% (*bratachem*), DPPH (*biochem*), metanol (*e-merck*), etanol absolute (*e-merck*), serbuk magnesium (*e-merck*), HCl (*mallincrod*), pereaksi *mayer (e-merck)*, pereaksi *dragendroft (e-merck)*, aseton (*e-merck*), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (*e-merck*), gelatin (*e-merck*), NaOH (*e-merck*), Vitamin C (*sigma aldrich*), Petroleum eter (*e-merck*), Natrium asetat (*e-merck*), KCl (*e-merck*), pH universal (*e-merck*).

3.4. Variabel Penelitian

- 3.4.1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) di Kecamatan danguran Klaten Selatan.
- 3.4.2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah skrining fitokimia, kadar antosianin total dan aktivitas antioksidan dalam ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea L.*).

3.5. Definisi Operasional

- 3.5.1 Ekstrak etanol bunga telang adalah sediaan bunga telang yang dibuat dengan pelarut etanol 70% kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dilanjutkan dengan penguapan menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak yang lebih kental.
- 3.5.2 Kadar antosianin adalah besarnya nilai antosianin dalam ekstrak bunga telang yang dinyatakan dalam mg/100 gram
- 3.5.3 Skrining fitokimia adalah reaksi kualitatif pada tabung reaksi bunga telang meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji saponin, uji tanin, uji steroid dan terpenoid dan uji antosianin.
- 3.5.4 Nilai IC_{50} adalah konsentrasi ekstrak dan standar yang memberikan % aktivitas antioksidan sebesar 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier antara kadar terhadap % penangkapan radikal.

3.6. Rencana Jalannya Penelitian

Langkah-langkah yang dilakukan dalam melaksanakan penelitian ini adalah:

3.6.1 Determinasi Tanaman Bunga Telang

Tahap pertama pada penelitian ini adalah memastikan kebenaran dari tanaman bunga telang yang dilihat dari morfologinya. Tanaman bunga telang dideterminasi terlebih dahulu di Universitas Setia Budi Surakarta.

3.6.2 Pembuatan serbuk bunga telang

Bunga telang yang telah dipilih diperoleh disortasi basah lalu dicuci. Bunga telang kemudian dikeringkan dengan cara di oven pada suhu

60⁰C, kemudian dilakukan sortasi kering dan diserbukkan dengan blender simplisia dan diayak dengan ayakan ukuran nomor 30 (Andriani dan Murtisiwi,2018).

3.6.3 Pembuatan ekstrak etanol 70% bunga telang

Menimbang bunga telang sebanyak 100 g dimaserasi dengan tabung maserasi dengan perbandingan 1:10 dan diekstraksi dengan 1000 mL etanol 70% , Kemudian didiamkan selama 5x24 jam, lalu diperas dan ampas yang diperoleh diremaserasi kembali dengan etanol 70% sebanyak 1000 mL, hasil ekstraksi dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 60⁰ C sampai diperoleh ekstrak kental, emudian dipekatkan diatas menggunakan *waterbath* untuk kemudian dihitung % rendemen menggunakan rumus :

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{bobot total ekstrak}}{\text{bobot total simplisia}} \times 100\% \text{ (Yuliani,2016).}$$

3.6.4. Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ditimbang 0,5 gram ekstrak etanol bunga telang ditambah 10 mL kloroform dan 5 tetes NH_4OH 2 N, campuran disaring, filtrat di kocok dan ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 2 M. Lapisan asam (atas) dibagi menjadi dua ke dalam tabung reaksi. Tabung pertama ditetesi pereaksi *Dragendorff*. Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga. Tabung kedua ditambahkan pereaksi *Mayer*. Uji positif ditandai dengan terbentuknya kabut putih hingga endapan putih (Anggistia, 2016).

b. Uji Flavonoid

Ditimbang 1 gram ekstrak etanol bunga telang dalam 100 mL air panas dididihkan selama 5 menit dan disaring. Kedalam 5 mL filtrat ditambahkan serbuk Mg dan 2 mL asam klorida 2 N, kemudian dikocok dengan 10 mL amil alkohol. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga, kuning atau merah pada lapisan amil alkohol (Purwaniati, 2020).

c. Uji Saponin

Ditimbang 1 gram ekstrak etanol bunga telang dalam 100 mL air panas dididihkan selama lima menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk penapisan senyawa golongan saponin, kuinon, dan tanin. Selanjutnya disebut larutan C. Sebanyak 10 mL larutan C dalam tabung reaksi dikocok secara vertikal selama 10

detik dan didiamkan. Pengamatan dilakukan terhadap busa yang terbentuk. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil, ketika ditambahkan satu tetes asam klorida 2 N (Purwaniati, 2020).

d. Uji Tanin

Dipipet 5 mL larutan C ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Jika terbentuk warna biru kehitaman menunjukkan adanya tanin. Kemudian 5 mL ditambahkan larutan gelatin, jika terbentuk endapan putih menunjukkan adanya tanin (Purwaniati, 2020).

e. Uji Steroid dan Terpenoid

Ditimbang 500 mg sampel ditambahkan 20 mL eter, maserasi selama 2 jam kemudian disaring, filtrat sebanyak delapan tetes dipindahkan kedalam cawan penguap ditambahkan beberapa tetes dipindahkan kedalam cawan penguap ditambahkan beberapa tetes pereaksi *Lieberman Burchard*. Bila terjadi warna merah atau hijau menunjukkan adanya senyawa steroid atau triterpenoid (Purwaniati, 2020).

f. Uji Antosianin

Uji warna golongan senyawa antosianin menurut (Harbone, 1987) yakni 0,5 mL ekstrak cair sampel ditambahkan HCl 2 M kemudian dipanaskan 100°C selama 5 menit. Hasil positif bila timbul warna merah. Selain itu, dapat dilakukan juga sebanyak 0,5 mL ekstrak cair sampel ditambahkan NaOH 2 M tetes demi tetes sambil

diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil positif bila timbul warna hijau yang memudar secara perlahan-lahan (Sandra,2020).

3.6.5 Penyiapan Larutan Uji Antosianin Total

a. Pembuatan larutan *buffer* pH 1,0 dan pH 4,5

Larutan *buffer* pH 1,0 dibuat dengan cara menimbang sebanyak 0,465 gram KCl dilarutkan dengan *aquadest* dalam labu takar 250 mL sampai tanda batas. Tambahkan HCl sampai pH mencapai $1,0 \pm 0,1$. Larutan *buffer* pH 4,5 dibuat dengan cara menimbang sebanyak 8,2 gram natrium asetat dilarutkan dengan *aquadest* dalam labu takar 250 mL sampai tanda batas. Tambahkan HCl sampai pH $4,5 \pm 0,1$ (Worlstad dkk.,2015).

b. Penentuan *Scanning Panjang Gelombang Maksimum*

Penentuan λ maksimum ekstrak etanol 70% bunga telang dilakukan dengan metode spektrofotometri *UV-Vis*. Sebanyak 1 mL dari ekstrak hasil maserasi. Dilarutkan dalam metanol karena untuk memunculkan warna biru atau merah pada antosianin ,selanjutnya ukur absorbansi pada panjang gelombang 400-800 nm (Vian,2018).

c. Pengukuran *Operating Time* Antosianin

Tujuan penentuan waktu operasional (*operating time*) adalah untuk mengetahui jangka waktu pengukuran yang stabil. Kemudian dibuat hubungan antara waktu dan absorbansi. Ditimbang sampel berupa ekstrak etanol 70% bunga telang sebanyak 25 mg dilarutkan dalam 5,0 mL metanol yang sudah ditambahkan HCl 1% .

d. Pengukuran dan Perhitungan Konsentrasi Total Antosianin

Ditimbang ekstrak sebanyak 25 mg, kemudian dilarutkan dalam 5,0 mL metanol yang sudah ditambahkan HCl 1%. Sebanyak 1,0 mL larutan ekstrak dimasukkan dalam labu ukur 5,0 mL, tambahkan larutan dapar KCl pH 1,0. Sebanyak 1,0 mL larutan ekstrak dimasukkan dalam labu ukur 5,0 mL, tambahkan larutan dapar natrium asetat pH 4,5 aduk hingga larut. Larutan yang telah dibuat tersebut didiamkan selama 30 menit. Masing-masing larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm dan pada panjang gelombang 700 nm dengan blanko larutan dapar KCl dan larutan dapar natrium asetat (Vian, 2018).

3.6.6 Penyiapan Larutan Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH

Ditimbang DPPH sebanyak 15,77 mg dilarutkan sedikit dengan etanol absolute kemudian di adkan sampai tanda batas dengan etanol 70% masukkan dalam labu ukur 100 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM larutan DPPH, kemudian disimpan dalam wadah yang dilapisin alumunium foil masukkan dalam almari es (Andriani & Murtisiwi, 2020).

b. Penentuan *Scanning* Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Dipipet 1,0 mL DPPH dari larutan induk 0,4 mM dimasukkan dalam labu takar 5,0 ditambahkan etanol 70% sampai tanda

batas, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450-545 nm kemudian diplotkan sebagai harga absorbansi maksimum (Andriani & Murtisiwi, 2020).

c. Pengukuran *Operating Time* DPPH

Tujuan penentuan waktu operasional (*operating time*) adalah untuk mengetahui jangka waktu pengukuran yang stabil. Kemudian dibuat suatu kurva hubungan antara waktu dan absorbansi. Pencarian *operating time* diukur pada panjang gelombang 521 nm dengan cara memipet 1 mL DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM kemudian diadkan dengan etanol 70% sampai tanda batas dan diamati serapannya dengan waktu 0-30 menit (Umbingo dkk.,2015).

d. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Etanol 70% Bunga Telang

Ditimbang sampel ekstrak etanol 70% bunga telang sebanyak 25 mg ditambah pelarut etanol 70% divortex sampai homogen, dimasukkan dalam labu ukur 25 mL, sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm (Andriani & Murtisiwi, 2020).

e. Penentuan IC_{50} Ekstrak Etanol 70% Bunga Telang

Dibuat larutan deret sampel ekstrak etanol 70% bunga telang dengan lima konsentrasi yaitu 50; 100; 200; 300; 400 ppm dimasukkan dalam labu takar 5,0 mL. Sampel ditambahkan 1,0

mL DPPH 0,4 mM kemudian ditambah dengan etanol 70% hingga tanda batas campuran tersebut divorteks selama 30 detik dan diinkubasi selama 30 menit. Selain itu, dibandingkan dengan kontrol Vitamin C dengan berbagai seri konsentrasi yaitu 1,25; 2,5; .5; 10; 20 ppm dan ditambahkan 0,7 mL DPPH 0,4 mM dalam etanol 70% hingga tanda batas. Kemudian dihitung % aktivitas antioksidan Pembuatan kurva regresi linier antara konsentrasi melawan % aktivitas antioksidan sehingga didapatkan persamaan regresi linier untuk menentukan konsentrasi sampel pada aktivitas 50%. Uji aktivitas antioksidan direplikasi sebanyak tiga kali (Andriani & Murtisiwi, 2020).

3.7. Analisis Data

3.7.1. Analisis Antosianin dengan spektrofotometer UV-Vis

Penentuan kandungan antosianin menggunakan metode *diferensial pH*. Ekstrak etanol 70% bunga telang ditambahkan larutan dapar pH 1,0 dan larutan dapar pH 4,5 kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 545 nm dan 700 nm setelah diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruangan.

$$A = (A_{545} - A_{700}) \text{ pH } 1,0 - (A_{545} - A_{700}) \text{ pH } 4,5$$

Sehingga kadar Antosianin (mg/g) = $A \times B \times F \times 1000 / \epsilon \cdot b$

Keterangan:

A = Absorbansi larutan

BM =	Berat molekul (449,2 g/mol)
Fp =	Faktor pengenceran
ϵ =	Absorptivitas molar <i>cyanidin-3-glucoside</i>
b =	tebal kuvet = 1

3.7.2. Analisis Aktivitas Antioksidan dengan Spektrofotometer UV-Vis

Aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan nilai persen penghambatan oksidasi DPPH yang dihitung berdasarkan data serapan sampel dan blanko sebagaimana rumus berikut (Raudhotul dkk.,2018).

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

Setelah didapatkan data yang dibutuhkan, dilakukan perhitungan aktivitas antioksidan radikal bebas DPPH (%) yang dihituang dengan persamaan $y = bx + a$ dengan perbandingan antara presentase peredaman (y) dengan log konsentrasi (x) dan kemudian ditentukan nilai IC_{50} yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas.

Tabel 3. 1 Parameter aktivitas antioksidan

Intensitas	Nilai IC_{50}
Sangat kuat	<50 $\mu\text{g/ml}$
Kuat	50-100 $\mu\text{g/ml}$
Sedang	100-250 $\mu\text{g/ml}$
Lemah	250-500 $\mu\text{g/ml}$
Tidak aktif	> 500 $\mu\text{g/ml}$

(Sumber:Putri & Hidajati,2015)