

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui kadar aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol bunga telang (*C. ternatea* L.) menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian Januari – Juni, Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia STIKES Borneo Lestari Banjarbaru.

3.3. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas, yaitu ekstrak etanol bunga telang (*C. Ternatea* L)
- b. Variabel terikat, yaitu nilai aktivitas antioksidan.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian yaitu alat-alat gelas (*Pyrex*, *Iwaki*), alat-alat besar (*Maserator*, *Mikropipet*, *Kulkas*, *blender*, *Oven*, *Rotary evaporator* (*IKARF10*), *Spektrometer Uv-Vis* (*T60*), *Timbangan analitik*, dan *Waterbath* (*Memmert*), *pH meter*, *sentrifugasi*.

3.4.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu *aquadest*, *aluminium foil*, *asam trikloroasetat*, *ekstrak bunga telang*, *FeCl₃*, *dapar*

fosfat, etanol p.a (Merck), ethanol 70% (Merck), kertas saring, $K_3 Fe (CN)_6$, dan Kueresetin.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan Bahan

Tumbuhan bunga telang diambil dari KWT (Kelompok Wanita Tani). Sri Rejeki, Landasan Ulin Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Pengambilan dilakukan pada bulan Desember 2021. Bagian yang digunakan yaitu bunga telang (*C. ternatea* L).

3.5.2. Determinasi Sampel

Determinasi sampel dilakukan dengan cara mengambil bagian bunga dari tumbuhan bunga telang di daerah Banjarbaru untuk dibuat herbarium lalu dideterminasi di Laboratorium Dasar Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.5.3. Pembuatan Simplisia Bunga Telang

Bunga telang sortasi basah terlebih dahulu kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir lalu dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari hingga kering, pada pukul 08.00-11.00 WITA. Setelah dikeringkan dimasukkan kedalam wadah toples tertutup rapat (Khairina *et al.*, 2021).

3.5.4. Pembuatan Ekstrak Bunga Telang

Ditimbang sebanyak 100 gram simplisia bunga telang, kemudian dilakukan maserasi dengan 1 L pelarut etanol 70%, sehingga diperoleh perbandingan 1:10. Pada 6 jam pertama diaduk sesekali, setelah 18 jam kemudian didiamkan. Setelah 24 jam dilakukan pergantian pelarut remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Maserat berupa ekstrak cair yang diperoleh disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas, Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C secara perlahan untuk memisahkan ekstrak dari pelarutnya, selanjutnya dipekatkan diatas *waterbath* sampai mendapatkan ekstrak yang kental dan hingga mencapai bobot yang tetap (FHI Edisi II, 2017). Rumus Perhitungan Rendemen :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat}}{\text{bobot simplisia yang di ekstraksi}} \times 100\%$$

3.5.5. Skrining Fitokimia

a) Fenol

Ekstrak sebanyak 0,1 gam ekstrak kental dilarutkan dengan etanol 20 ml, larutan yang dihasilkan diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 1%. Terbentuknya larutan warna hijau, atau hijau kebiruan mengindikasikan adanya senyawa fenol (Nugrahani *et al.*, 2016).

b) Flavonoid

Ekstrak 0,1 gram dilarutkan kedalam pelarut, selanjutnya ditambah 1 ml logam magnesium, HCl 1 ml dan 1 ml amil alkohol ke dalam tabung reaksi. Warna merah muda atau ungu menunjukkan adanya flavonoid (Nugrahani *et al.*, 2016).

c) Alkaloid

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL kloroform dan 4 tetesi NH_4OH lalu disaring. Filtrat ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes, dikocok kuat-kuat, didiamkan sampai larutan asam sulfat dan kloroform memisah. Lapisan asam sulfat diambil dan dibagi dalam tiga tabung dan masing-masing tabung diuji untuk mengetahui keberadaan alkaloid. Penambahan dengan reagen Meyer akan menyebabkan endapan putih, dengan reagen Dragendorff akan menyebabkan ada endapan kemerahan, dan dengan reagen wagner timbul endapan kuning, jika positif ada alkaloid (Nugrahani *et al.*, 2020).

d) Steroid, Dan Triterpenoid

Sebanyak 0,1 gram sampel dilarutkan dalam pelarut, kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard CH_3COOH anhidrat : H_2SO_4 pekat (3:1). Adanya steroid ditunjukkan oleh warna

biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Purwaniati *et al.*, 2020).

e) Saponin

Sebanyak 0,1 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit, lalu ditambahkan 1 mL HCl 2 N. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit (Nugrahani *et al.*, 2020).

f) Tanin

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditimbang, ditambahkan dengan air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring. Sebagai filtrate yang diperoleh ditambahkan dengan larutan FeCl_3 1 %. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau kehitaman (Nugrahani *et al.*, 2020).

3.5.6. Pembuatan Larutan

a) Pembuatan Larutan FRAP

1) Dapar posfat

Larutan dapar fosfat 0,2 N pH 6,6 Ditimbang 2 gram NaOH dan dilarutkan dengan air bebas CO_2 hingga 250 ml dalam labu tentukur. Kemudian ditimbang KH_2PO_4 sebanyak

6,8 gram dan dilarutkan dengan air bebas CO₂ hingga 250 ml dalam labu ukur. Kemudian dipipet sebanyak 16,4 ml NaOH, dimasukkan dalam labu tentukur dan dicampurkan 50 ml KH₂PO₄, selanjutnya diukur sampai pH meter 6,6 dan dicukupkan dengan air bebas CO₂ hingga 200 ml.

2) Larutan kalium ferrisianida 1% (K₃Fe (CN)₆)

Ditimbang 1 gram kalium ferrisianida dan dilarutkan dengan air suling, dicukupkan hingga 100 ml dalam labu ukur.

3) Larutan FeCl₃ 0,1%

Ditimbang 0,1 gram FeCl₃ dan dilarutkan dengan air suling, dicukupkan hingga 100 ml dalam labu ukur.

4) Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%

Ditimbang 10 gram TCA dan dilarutkan dengan air suling, dicukupkan hingga 100 ml dalam labu ukur.

b) Pembuatan Larutan baku Kuersetin (1000 ppm)

Larutan baku kuersetin dibuat dengan menimbang seksama kurang lebih 25 mg kuersetin yang dilarutkan dengan etanol p.a hingga batas labu 25 mL.

c) Penyiapan larutan baku kerja kuersetin

Larutan baku induk kuersetin dipipet masing-masing 100,0µl, 1500µl, 2000µl, 2500µl, dan 300,0µl pada labu ukur 10 ml. Diencerkan dengan etanol p.a hingga 10 ml dan dihomogenkan,

sehingga diperoleh konsentrasi larutan baku kerja kuersetin 10,15,20,25,30 ppm.

d) Penyiapan kurva baku

Larutan baku kerja kuersetin dipipet masing-masing 1 mL ditambah 1 mL dapar fosfat (pH 6,6) dan 1 mL kalium ferrisianida 1 %, campuran diinkubasi dengan suhu 50°C selama 20 menit. Ditambah 1 mL aquades dan 0,5 FeCl₃ 0,1%. Setelah diinkubasi dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

e) Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol 70% Bunga Telang

Ekstrak bunga telang ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan etanol ke dalam labu ukur 100 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan tersebut, dibuat pengenceran 100 ppm dengan cara pipet 5 ml dan dicukupkan dengan etanol dalam labu ukur 50 ml. Kemudian dibuat beberapa konsentrasi dari larutan tersebut yaitu 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 75 ppm. Masing-masing larutan dipipet 0,5 ml, 1 ml, 2,5 ml, 5 ml, dan 7,5 ml, kemudian dicukupkan dengan etanol dalam labu ukur 10 ml (Wibowo *et al.*, 2017).

3.6.7. Uji Antioksidan Dengan Metode FRAP

1. Pembuatan Larutan Blanko

Sebanyak 1 ml dapar fosfat 0,2 M pH 6,6 dan 1 ml kalium ferrisianida 1% dipipet kedalam labu ukur 5 ml. kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA 10%, dan disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, ambil 1 ml pada lapisan atas kemudian ditambahkan 1 ml aquades dan 0,5 ml FeCl₃ 0,1%, cukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas kemudian diamkan selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis (Magfira, 2018).

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan blanko FRAP digunakan dalam pengukuran panjang gelombang maksimum terhadap FRAP. Sebanyak 1 mL 1 ml dapar fosfat 0,2 M pH 6,6 dan 1 ml kalium ferrisianida 1% dipipet kedalam labu ukur 5 ml. kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA 10%, dan disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, ambil 1 ml pada lapisan atas kemudian ditambahkan 1 ml aquades dan 0,5 ml FeCl₃ 0,1%. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400-800 nm (Magrifia, 2018).

3. Penentuan *Operating Time*

Ambil 1 mL larutan kuersetin pada konsentrasi 30 µg/mL kemudian dicampurkan dengan 1 mL dapar fosfat 0,2 M pH 6,6 dan 1 ml kalium ferrisianida 1% dipipet kedalam labu ukur 5 ml. kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA 10%, dan disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, ambil 1 ml pada lapisan atas kemudian ditambahkan 1 ml aquades dan 0,5 ml FeCl₃ 0,1%. Diamati serapannya menggunakan spektrofotometri pada menit ke 0-60 dengan interval tiap 2 menit, kemudian tentukan *operating time* dilihat dari nilai absorbansi yang stabil. Diamati kurva hubungan antara absorbansi, waktu dan penentuan *operating time* (Putri, 2020).

4. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.)

Diambil 100 gram ekstrak bunga telang dan dilarutkan dalam 100 ml etanol p.a pada labu takar 100 ml hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dipipet masing-masing dari larutan stok kedalam tabung reaksi hingga konsentrasi 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, dan 400 ppm selanjutnya ditambahkan masing-masing 1 ml dapar fosfat (pH 6,6) dan 1 ml K₃Fe(CN)₆ 1 %. Larutan diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C. Setelah diinkubasi, ditambahkan 1 ml larutan TCA 10% lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah

disentrifugasi, dipipet, dimasukkan kedalam labu takar 1 ml, dan ditambahkan 0,2 ml FeCl₃ 0,1 % kemudian ditambahkan aquades hingga tanda batas. Lalu diukur serapan dengan panjang gelombang maksimumnya (Rahayu *et al.*, 2020).

3.6. Analisis Data

Analisa data untuk mengukur aktivitas antioksidan menggunakan persamaan regresi kurva standar dengan persamaan linear $y = a + bx$ pada kurva baku. dan untuk menghitung nilai aktivitas antioksidan dimasukkan nilai absorbansi sampel yang diperoleh untuk mencari nilai IC₅₀. Absorbansi yang didapatkan dihitung nilai % inhibisi dengan rumus :

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

Setelah itu dihitung nilai probit. IC₅₀ didapatkan dari persamaan regresi linier dengan X = nilai log konsentrasi dan nilai Y = nilai probit.

3.7. Antioksidan dengan metode FRAP

Tabel 2. Kategori Antioksidan

Nilai IC ₅₀ (µg/mL)	Kategori
≤ 50 (µg/mL)	Sangat kuat
51-100 (µg/mL)	Kuat
101-250 (µg/mL)	Sedang
251-500 (µg/mL)	Lemah
≥ 500 (µg/mL)	Tidak aktif