

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental. Eksperimental merupakan penelitian yang dilakukan di laboratorium bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan menggunakan metode CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari – Juni 2022, di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia STIKES Borneo Lestari Banjarbaru.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas yaitu variasi konsentrasi dari ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.).

3.3.2 Variable terikat

Variabel terikat yaitu nilai IC_{50} dari aktivitas antioksidan.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu alat-alat gelas (*Pyrex*, *Iwaki*), Aluminium foil, Batang pengaduk, Cawan penguap, maserator, mikropipet (*Dragonlab*), *blender*, *rotary evaporator* (*IKARV10*®), Sendok tanduk, spektrofotometer UV-Vis (*PG Instrumen T60*®), timbangan analitik (*Fujitsu*®), kuvet, *waterbath* (*Memmert*®).

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, aquadest (*Waterone*TM), amoniak (*Emsure*®), amil alkohol (*Emsure*®), etanol 70% (PT. Pandu Medika), pereaksi *Dragendorff* (*Nitrat kimia*), pereaksi *Liebermann-Burchard* (*Nitrat kimia*), pereaksi *Mayer* (*Nitrat kimia*), pereaksi *Wagner* (*Nitrat kimia*), FeCl₃ (PT. kimia Jaya), serbuk magnesium (*Nitrat kimia*), HCl pekat (*Nitrat kimia*), H₂SO₄ (*Nitrat kimia*), kloroform (*Nitrat kimia*), kuersetin (*Sigma*), CuCl₂.2H₂O (*Pudak*), ammonium asetat (NH₄Ac) (*Pudak*), *Neocupproine* (Nc) (*Merck*). Simplisia yang digunakan bunga telang.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Pengambilan Bahan

Tumbuhan bunga telang diambil dari Kelompok Wanita Tani Sri Rejeki, Landasan Ulin Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Pengambilan dilakukan pada bulan Desember 2021. Bahan yang digunakan yaitu bagian bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) bagian bunga yang diambil adalah bunga yang mekar dan segar.

3.5.2 Determinasi Sampel Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)

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

3.5.3 Pembuatan Simplisia Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)

Bunga telang diambil sebanyak 2,9 kg disortasi basah terlebih dahulu kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir lalu dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari hingga kering pada jam 08.00 – 11.00, pengeringannya selama 2 hari hingga bunga benar-benar kering. Setelah dikeringkan kemudian dilakukan sortasi kering tujuan dilakukan sortasi kering adalah untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang masih ada tertinggal pada saat proses pengeringan. Simplisia yang

sudah dilakukan sortasi kering kemudian dihaluskan menggunakan *blender*, dan diayak menggunakan *mesh* 40, kemudian dimasukkan kedalam wadah toples tertutup rapat (Khairina dkk., 2019). Rumus perhitungan rendemen

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot simplisia kering}}{\text{bobot bunga segar}} \times 100\%$$

3.5.4 Pembuatan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)

Ditimbang sebanyak 350 gram simplisia bunga telang, kemudian dilakukan maserasi dengan 3 L pelarut etanol 70% (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 (Kemenkes, 2017).

Rumus perhitungan rendemen

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

3.5.5 Skirining Fitokimia

a. Fenol

Ekstrak sebanyak 0,1 gram ekstrak kental dilarutkan dengan etanol 20 mL, larutan yang dihasilkan diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 1%. Terbentuknya larutan warna hijau atau hijau kebiruan mengindikasikan adanya senyawa fenol (Nugrahani dkk., 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 dkk., 2016).

c. Alkaloid

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL kloroform dan 4 tetes 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 dkk., 2016).

d. Saponin

Sebanyak 0,1 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit, kemudian dikocok kuatkuat selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit, 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 dkk., 2016).

e. Steroid dan Triterpenoid

Sebanyak 0,1 gram sampel dilarutkan dalam pelarut, kemudian ditambahkan pereaksi *Liebermann-Burchard* (CH_3COOH anhidrat : H_2SO_4 pekat). Adanya steroid ditunjukkan oleh warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Purwaniati dkk., 2020).

f. Tannin

Sebanyak 0,1 gram ekstrak dilarutkan dengan 2 mL pelarut, kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan gelatin 1% dan dimasukkan 2-3 tetes larutan NaCl. Hasil positif jika terbentuk endapan (Saputri & Putri, 2017).

3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan

1. Pembuatan Larutan

a. Pembuatan Larutan CUPRAC

Larutan CuCl_2 M dibuat dengan melarutkan 0,04262 gram $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam air dan diencerkan sampai 25 ml, ammonium asetat dengan pH 7 dibuat dengan melarutkan 1,927 gram NH_4Ac dalam air dan diencerkan sampai 25 mL. Larutan *Neocupproine* (Nc) 0,0075 M disiapkan dengan melarutkan 0,0390 gram Nc ke dalam etanol 96% dan diencerkan sampai 25 mL (Maryam dkk., 2015).

b. Pembuatan Larutan Kuersetin

Larutan induk 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 10 mg kuersetin, kemudian dilarutkan dengan etanol 96% dalam labu ukur 10 mL. Dari larutan tersebut, dibuat pengenceran menjadi 100 ppm dengan cara larutan induk kuersetin 1000 ppm dipipet sebanyak 1 mL dan ditambahkan dengan etanol 96% dalam labu ukur 10 mL. Setelah itu, dibuat beberapa variasi konsentrasi yaitu 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Dibuat dengan cara masing-masing larutan induk kuersetin 100ppm dipipet 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL dan 0,5 mL, lalu diencerkan dengan etanol 96% dalam labu ukur 10 mL (Aminah dkk., 2016).

c. Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol Bunga Telang

Ekstrak bunga telang ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan etanol 96% ke dalam labu ukur 10 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan tersebut, dibuat beberapa konsentrasi menjadi 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm dan 500 ppm. Dibuat dengan cara masing-masing larutan induk 1000 ppm dipipet 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 4 mL dan 5 mL, lalu ditambahkan dengan etanol 96% dalam labu ukur 10 mL (Andriani & Murstiwi, 2020).

2. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ Maks)

CUPRAC

Pengujian dilakukan dengan mencampur 1 mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, ditambahkan 1 mL *Neocupproine* 0,0075 M, dan 1 ml ammonium asetat, kemudian ditambahkan 1 ml etanol 96% dan ditambahkan 0,1 mL aquadest. Kemudian diinkubasi selama 50 menit, selanjutnya mengukur serapannya pada panjang gelombang 400 – 600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Haeria dkk., 2018).

b. Pengukuran Larutan Blanko CUPRAC

Pengukuran dilakukan dengan mencampurkan 1 mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, ditambahkan 1 mL *Neocupproine* 0,0075

M, dan 1 mL ammonium asetat, kemudian ditambahkan 1 ml etanol 96% dan ditambahkan 0,1 mL aquadest. Kemudian diinkubasi selama 50 menit pada suhu dingin. Absorbansi ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan (Haeria dkk., 2018).

c. Pengukuran Antioksidan Larutan Kuersetin

Larutan kuersetin (kontrol positif) pipet 1 mL dari berbagai konsentrasi kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan sebanyak 1 mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, ditambahkan 1 mL *Neocupproine* 0,0075 M, dan 1 mL ammonium asetat 1 M, kemudian ditambahkan 0,1 ml aquadest. Diinkubasi selama 50 menit, kemudian absorbansi ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah didapatkan dari pengukuran panjang gelombang maksimum (Haeria dkk., 2018).

d. Pengukuran Antioksidan Larutan Ekstrak Etanol Bunga Telang

Larutan ekstrak etanol bunga telang di pipet 1 mL dari berbagai konsentrasi kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan sebanyak 1 mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, ditambahkan 1 mL *Neocupproine* 0,0075 M, dan 1 mL ammonium asetat 1 M, kemudian ditambahkan 0,1 ml

aquadest. Diinkubasi selama 50 menit pada suhu ruangan, kemudian absorbansi ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Haeria dkk., 2018).

e. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Bunga Telang

Besarnya aktivitas antioksidan bunga telang dinyatakan dengan nilai EC_{50} yang diperoleh dengan cara membuat regresi linear dari konsentrasi ekstrak terhadap % kapasitas. Aktivitas antioksidan diukur sebagai persen kapasitas sampel uji dengan menggunakan persamaan (Amilin, 2018).

Rumus :

$$Abs_{\text{sampel}} = Abs_{\text{uji}} - Abs_{\text{blanko}}$$

$$Abs_{\text{sampel}} = -\text{Log } Ts$$

$$Ts = \text{Antilog } Abs_{\text{sampel}}$$

$$\% \text{ kapasitas} = (1 - Ts) \times 100\%$$

Keterangan :

$$\% \text{ kapasitas} = \% \text{ kapasitas CUPRAC}$$

$$Ts = -\text{Log absorbansi sampel}$$

$$As = \text{Absorbansi sampel uji setelah penambahan larutan uji}$$

CUPRAC

Kurva regresi linier didapatkan dari perhitungan antara konsentrasi sampel vs % kapasitas CUPRAC

$$y = a + bx$$

Keterangan :

x = konsentrasi (ppm)

y = presentase kapasitas (%)

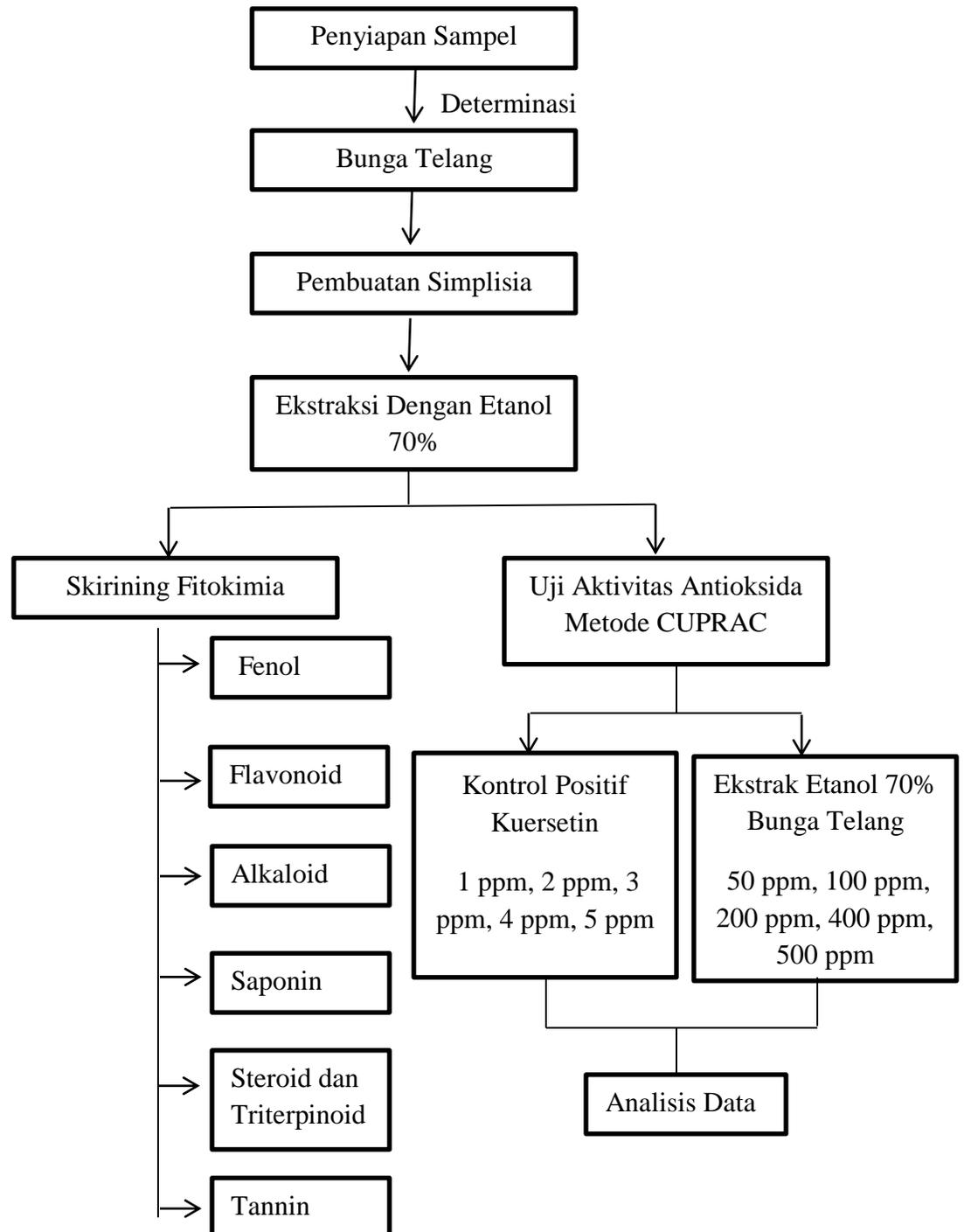
Dari persamaan diatas, nilai EC_{50} dapat dihitung menggunakan persamaan :

$$EC_{50} = \frac{(50-a)}{b}$$

3.6 Analisis Data

Setelah didapatkan absorbansi, kemudian ditentukan persamaan regresi linear ($y = a + bx$), dimana x adalah konsentrasi dan y adalah presentasi inhibisi. Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Efficiency Concentration* (EC_{50}). Nilai EC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti $y = 50$. Menurut Molyneux (2004) suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila ($EC_{50} < 50$ ppm), kuat ($EC_{50} 50 - 100$ ppm), sedang ($EC_{50} 100 - 150$ ppm), lemah ($EC_{50} 150 - 200$ ppm), dan sangat lemah ($EC_{50} > 200$ ppm). Setiap pengukuran dilakukan secara *triplo* dan hasil data diolah dan disajikan dalam bentuk tabulasi dan grafik (Haeria dkk., 2018).

3.7 Rancangan Penelitian



Gambar 6. Skema rancangan penelitian

