

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% bunga telang yang diujikan dengan menggunakan metode ABTS (2,2- *azinobis (3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonate)*).

#### **3.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Bahan Alam dan Kimia Universitas Borneo Lestari Banjarbaru dengan waktu penelitian bulan Januari sampai Juni 2022.

#### **3.3. Variabel Penelitian**

- a. Variabel bebas dalam penelitian adalah konsentrasi ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.).
- b. Variabel terikat dalam penelitian adalah dilihat dari nilai aktivitas antioksidan berdasarkan nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.).

#### **3.4. Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.4.1. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu alat-alat besar (Maserator, Mikropipet, Kulkas, *Rotary evaporator (IKARF10)*, Spektrofotometri Uv-Vis (T60®), Timbangan analitik (Ohaus Cp214), *Waterbath* (Memmer), alat-alat gelas (Pirex®, Iwaki®).

### **3.4.2. Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ABTS (*2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)*), Amonium hidroksida ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), Asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), Asam sulfat 98% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), Aquadest, Etanol 70%, Gelatin, *Hydrogen chloride* ( $\text{HCl}$  2N), *Iron (III) chloride* ( $\text{FeCl}_3$ ), magnesium, natrium klorida ( $\text{NaCl}$ ), Reagen Dragendorff, Reagen Mayer, Reagen Wagner, Kloroform, Quersetin.

## **3.5. Prosedur Penelitian**

### **3.4.1. Pengambilan Bahan**

Tumbuhan bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) diambil dari KWT (Kelompok Wanita Tani), Sri Rejeki, Landasan Ulin di daerah Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Pada bulan Desember 2021, Bagian yang digunakan yaitu bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) yang mekar (Budiasih, 2017).

### **3.4.2. Determinasi Tumbuhan**

Determinasi sampel dilakukan dengan cara mengambil bunga dari tumbuhan bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) di daerah Banjarbaru untuk dibuat herbarium lalu dideterminasi di Laboratorium Dasar Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

### **3.4.3. Pembuatan Simplisia Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)**

Ditimbang bunga Telang terlebih dahulu sebanyak 150 gram kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir lalu dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari hingga kering pada pkl 08.00 – 11.00, kemudian dilanjutkan lagi esok hari pada waktu yang sama. Lamanya waktu pengeringan bunga telang selama 2 hari, hingga bunga

sudah benar-benar kering. Setelah dikeringkan dimasukkan kedalam wadah toples tertutup rapat (Khairina, 2021).

#### **3.4.4. Pembuatan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)**

Ditimbang sebanyak 100 gram simplisia bunga Telang, kemudian dilakukan maserasi dengan 1 L pelarut etanol 70% (1:10), pada 6 jam pertama diaduk sesekali. kemudian didiamkan selama 18 jam sesekali diaduk. Setelah 24 jam dilakukan pergantian pelarut dan maserasi kembali (remaserasi) 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 (Depkes RI, 2017).

Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dihitung randemennya dengan rumus:

$$\text{Randemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

#### **3.4.5. Skrining Fitokimia**

##### **a. Fenol**

Diekstrak sebanyak 0,1 gram ekstrak kental melarutkan dengan etanol 20 ml, larutan yang menghasilkan dengan mengambil sebanyak 1 ml kemudian menambahkan 2 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Terbentuknya

larutan warna hijau atau hijau kebiruan mengindikasikan adanya senyawa fenol (Nugrahani *et.al.*, 2016).

**b. Flavonoid**

Diekstrak 0,1 gram dilarutkan kedalam pelarut, selanjutnya ditambah 0,5 mg logam magnesium, HCl 1 ml dan 1 mL amil alkohol kedalam tabung reaksi. Warna merah muda atau ungu menunjukkan adanya flavonoid (Nugrahani *et.al.*, 2016).

**c. Alkaloid**

Diambil sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL kloroform dan 4 tetes NH<sub>4</sub>OH 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 masingmasing 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.*, 2016).

**d. Saponin**

Dimasukkan sebanyak 0,1 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian menambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit , kemudian mengocok kuat-kuat 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 *et.al.*, 2016).

**e. Terpenoid/ Steroid**

Diambil sebanyak 0,1 gram sampel dilarutkan dalam pelarut, kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  anhidrat :  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat). Adanya steroid ditunjukkan oleh warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Purwaniati *et.al.*, 2020).

**f. Tanin**

Diambil sebanyak 0,1 gram ekstrak dilarutkan dengan 2 ml pelarut, kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan gelatin 1% dan NaCL. Hasil positif jika terbentuk endapan putih (Saputri & Putri, 2020).

**3.4.6. Uji Aktivitas Antioksidan**

**1. Pembuatan Larutan**

**a. Pembuatan Larutan ABTS 98% (2,2- azinobis (3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonate).**

Ditimbang ABTS sebanyak 18 mg, dan melarutkan dengan 5 ml aquadest. Kemudian menimbang kalium persulfat sebanyak 3,5 mg, melarutkan dengan 5 ml aquadest. Kedua larutan dicampurkan dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a sampai 25 ml, kemudian diinkubasi selama 16 jam. Penentuan serapan larutan blanko ABTS dengan cara larutan ABTS sebanyak 1 ml dipipet kedalam labu ukur 5

ml dan dicukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas (Jatmiko, 2021).

**b. Pembuatan Larutan Blanko ABTS**

Larutan ABTS dipipet sebanyak 1 ml dan dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan etanol absolut dalam vial. Larutan ini kemudian diukur dengan spektrofotometer Uv-Vis panjang gelombang 500-800 nm (Amin, 2021).

**c. Pembuatan Larutan Kuersetin**

Larutan induk 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 10 mg kuersetin, kemudian larutkan dengan etanol sampai tanda batas labu ukur 25 ml. Dari larutan tersebut, dibuat pengenceran larutan induk dengan cara larutan induk kuersetin 1000 ppm dipipet sebanyak 25 ml dengan etanol p.a sampai tanda batas labu ukur. Setelah itu, dibuat beberapa variasi konsentrasi yaitu 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, dan 4 ppm (Jatmiko, 2021).

**d. Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol Bunga Telang**

Ekstrak bunga Telang ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan etanol p.a 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 p.a dalam labu ukur 50 ml. kemudian dibuat beberapa konsentrasi dari larutan tersebut yaitu 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, dan 150 ppm (Wibowo *et.al.*, 2017).

## **2. Uji Aktivitas Antioksidan**

### **a. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Dengan Metode ABTS.**

Memipet larutan radikal ABTS sebanyak 1 mL dan mencukupkan volumenya sampai 25 ml dalam labu ukur. Larutan ini kemudian diukur pada panjang gelombang 500-800 nm, sehingga diperoleh panjang gelombang maksimal untuk pengukuran aktivitas antioksidan (Wicaksono, 2020).

### **b. Penentuan *Operating Time***

Larutan baku kerja kuersetin 3 ppm, memipet sebanyak 1 mL larutan dan menambah 1 mL larutan radikal ABTS. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Wicaksono, 2020).

### **c. Penentuan Aktivitas Antioksidan Metode ABTS Dengan Kuarsetin**

Membuat larutan baku kerja kuersetin dari larutan kuersetin 100 ppm dengan konsentrasi 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm dan 4 ppm atau memipet masing-masing sebanyak 50 ml , 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml dan 0,4 ml kedalam labu ukur 10 mL kemudian menambahkan etanol sampai tanda batas dan memipet sebanyak 1 mL larutan dan menambahkan 1 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama 40 menit dari hasil *Operating Time* yang diperoleh dan diukur

serapan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm (Faisal, 2019).

#### **d. Penentuan Aktivitas Antioksidan**

Hasil uji penangkal bebas metode ABTS pada ekstrak dan fraksi bunga telang dipaparkan sebagai hasil penelitian, sehingga didapat jumlah persen penangkal antioksidan dihitung menggunakan rumus.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{serapan radikal ABTS} - \text{Serapan radikal sisa}}{\text{serapan radikal ABTS}} \times 100\%$$

### **3.5. Analisis Data**

Perhitungan nilai  $IC_{50}$  menggambarkan konsentrasi larutan uji yang dapat menangkal radikal bebas sebesar 50% melalui persamaan garis regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan uji (x) dengan % inhibisi (y). Persamaan regresi linier  $Y = bx + a$  yang diperoleh dari mencari nilai  $IC_{50}$  dengan Y adalah % inhibisi sebesar 50% dan x adalah konsentrasi. Perhitungan  $IC_{50}$  dapat dituliskan dengan cara mengubah  $Y = 50$

$$Y = bx + a$$

$$50 = bx + a$$

$$X = \frac{50 - a}{b} \times 100\% = IC_{50}$$

Antioksidan sangat kuat jika nilai  $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ , kuat jika  $IC_{50} 50-100 \mu\text{g/ml}$ , sedang jika nilai  $IC_{50} 100-150 \mu\text{g/ml}$  dan lemah jika  $IC_{50} 151-200 \mu\text{g/ml}$  (Wicaksono, 2020).

### 3.6. Tabel Aktivitas Antioksidan Nilai IC<sub>50</sub>

**Tabel 2.** Kategori Antioksidan (Mustarichie, 2017).

Nilai IC <sub>50</sub>	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