

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Objek Penelitian

Objek dari penelitian ini ialah penentuan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari fraksi n-heksana, etil asetat, dan etanol 96% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.).

3.2 Sampel dan Teknik Sampling

Sampel yang digunakan adalah bunga telang yang diperoleh dari Kota Tegal, Jawa Tengah. Pengumpulan sampel dilakukan dengan teknik *Simple Random Sampling*.

3.3 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat tiga variabel antara lain :

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol 96%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar total flavonoid dan nilai IC_{50} pada fraksi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.)

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi, metode fraksinasi dan spektrofotometri UV-Vis.

3.4 Teknik Pengumpulan Data

3.4.1 Cara Pengambilan Data

1. Jenis data yang digunakan bersifat kualitatif dan kuantitatif
2. Metode pengumpulan data menggunakan eksperimen di Laboratorium Farmasi Politeknik Harapan Bersama Kota Tegal.

3.4.2 Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : bunga telang dalam keadaan kering, n-heksana, etil asetat dan etanol 96%, metanol, aquadest, asam asetat 5%, H₂SO₄, AlCl₃ 2%, Magnesium (Mg), HCl pekat, kuersetin, DPPH 0,4mM

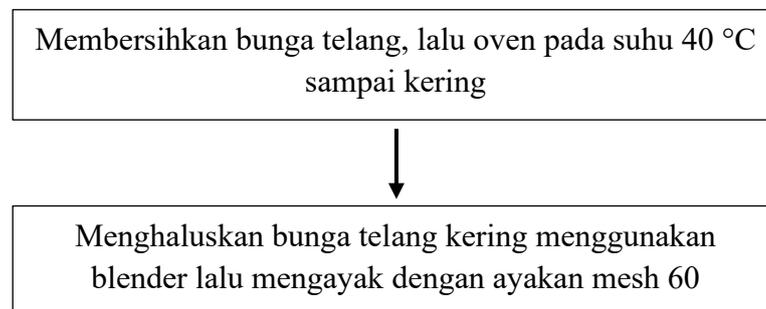
2. Alat Penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain; maserator, batang pengaduk, gelas ukur, kantong plastik hitam, solasi hitam, kain flanel, klem, statif, corong pisah, tabung reaksi, neraca analitik, beaker glass, corong kaca, waterbath, cawan uap, pipet tetes, pipet volume, sarung tangan, masker, spektrofotometer UV-Vis, mikroskop, deg glass, objek glass, ayakan mesh 60, blender, oven.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pembuatan Serbuk Simplisia

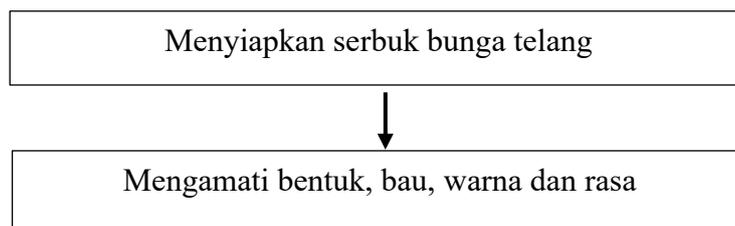
Bunga telang dibersihkan dari kotoran kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40 °C. Setelah kering, bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dihaluskan menggunakan blender hingga menghasilkan serbuk simplisia, lalu diayak dengan ayakan mesh 60 (Aprilianti, 2023).



Gambar 3.1 Skema Pembuatan Serbuk Bunga Telang

3.5.2 Uji Makroskopis

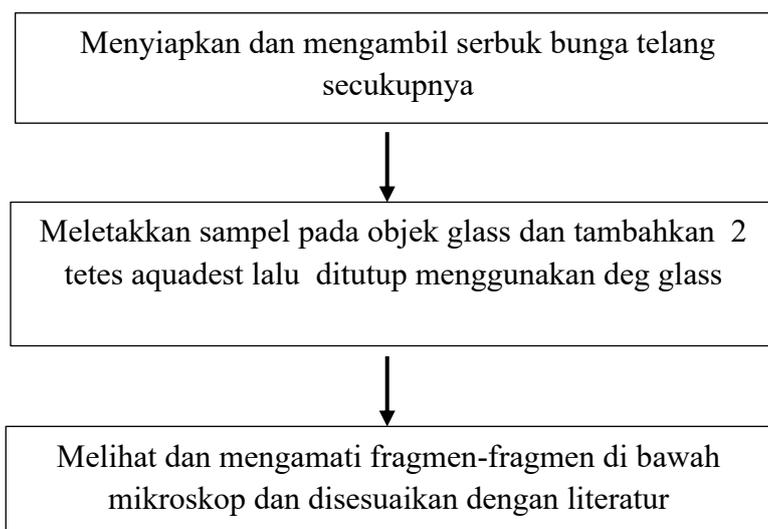
Mengidentifikasi serbuk bunga telang berdasarkan bentuk, bau dan warna.



Gambar 3.2 Skema Identifikasi Bunga Telang Secara Makroskopis

3.5.3 Uji Mikroskopis

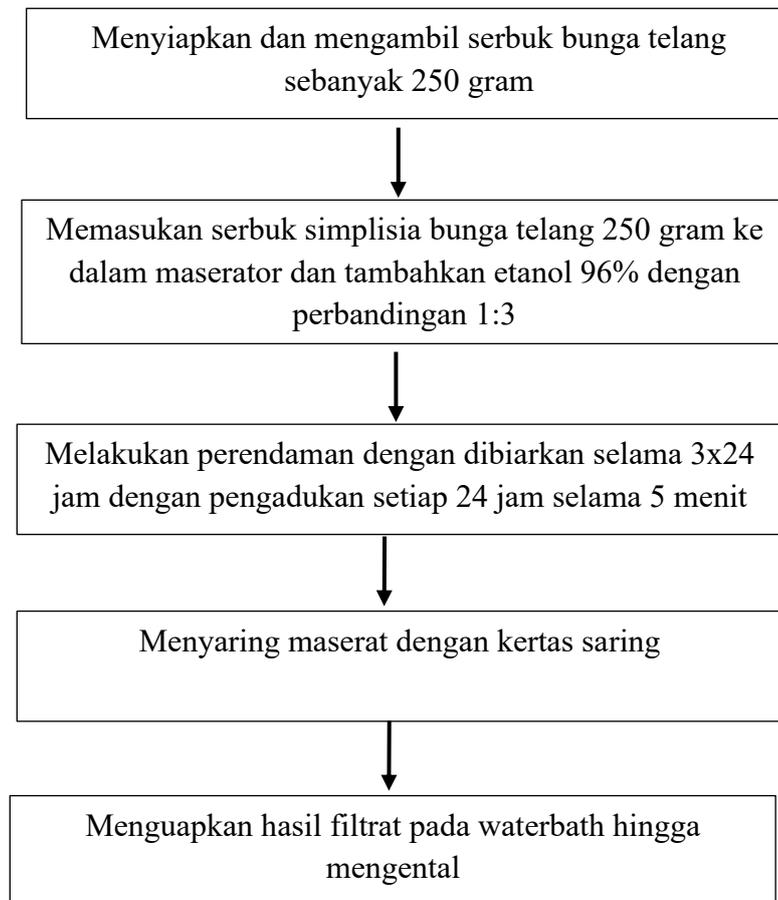
Mengambil serbuk bunga telang secukupnya dan letakkan serbuk di atas objek glass, kemudian tambahkan 2 tetes aquadest lalu tutup dengan deg glass selanjutnya melihat dan mengamati fragmen-fragmen di bawah mikroskop menyesuaikan dengan literatur.



Gambar 3.3 Skema Identifikasi Bunga Telang Secara Mikroskopis

3.5.4 Pembuatan Ekstrak Bunga Telang

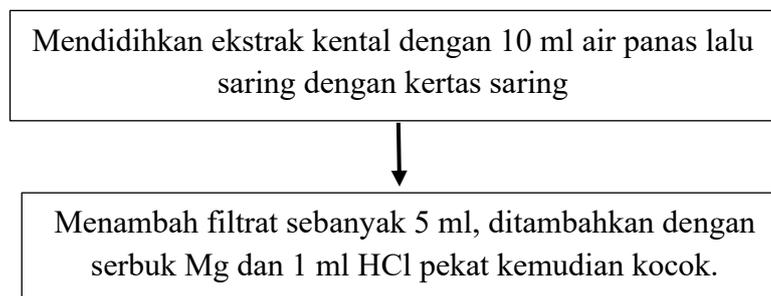
Pembuatan ekstrak dilakukan dengan 250 gram simplisia bunga telang dicampur dengan 750 ml etanol 96% dengan perbandingan 1:3. Campuran tersebut direndam selama 3×24 jam dan diaduk selama ± 5 menit. Filtrat kemudian dipisahkan dari residu dengan menggunakan kain flanel, selanjutnya diuapkan di atas waterbath hingga ekstrak bunga telang mengental.



Gambar 3.4 Skema Pembuatan Ekstrak Bunga Telang

3.5.5 Uji Kualitatif Kandungan Flavonoid Bunga Telang

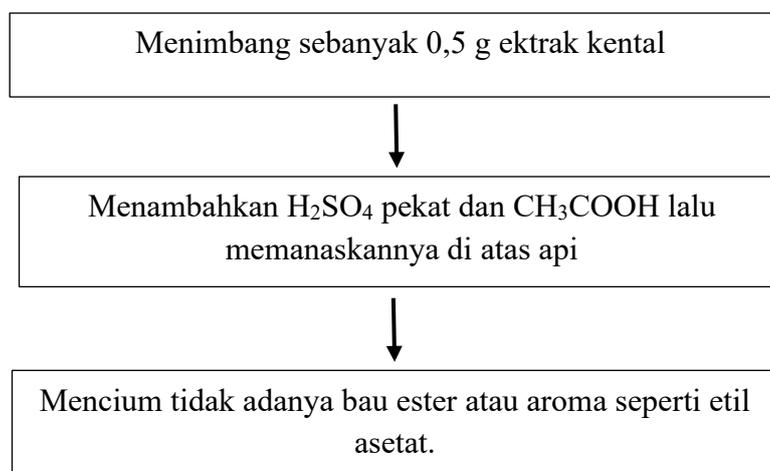
Mengambil 0,5 g ekstrak kemudian ditambahkan dengan 10 mL air panas, selanjutnya didihkan selama 5 menit dan saring dengan kertas saring. Filtrat diukur sebanyak 5 ml kemudian ditambahkan 0,05 serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, selanjutnya dikocok kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan larutan menjadi warna merah, kuning atau jingga (Sulistyoningdyah, 2017).



Gambar 3.5 Skema Uji Kandungan Flavonoid Bunga Telang

3.5.6 Uji Bebas Etanol

Menimbang sebanyak 0,5 gr ekstrak kental, setelah itu menambahkan H_2SO_4 pekat dan CH_3COOH lalu memanaskannya di atas api. Hasil positif bebas pelarut ditunjukkan dengan tidak terciumnya bau ester atau aroma seperti etil asetat (Shofi dan Suwitasari, 2020).



Gambar 3.6 Skema Uji Bebas Etanol Kandungan Bunga Telang

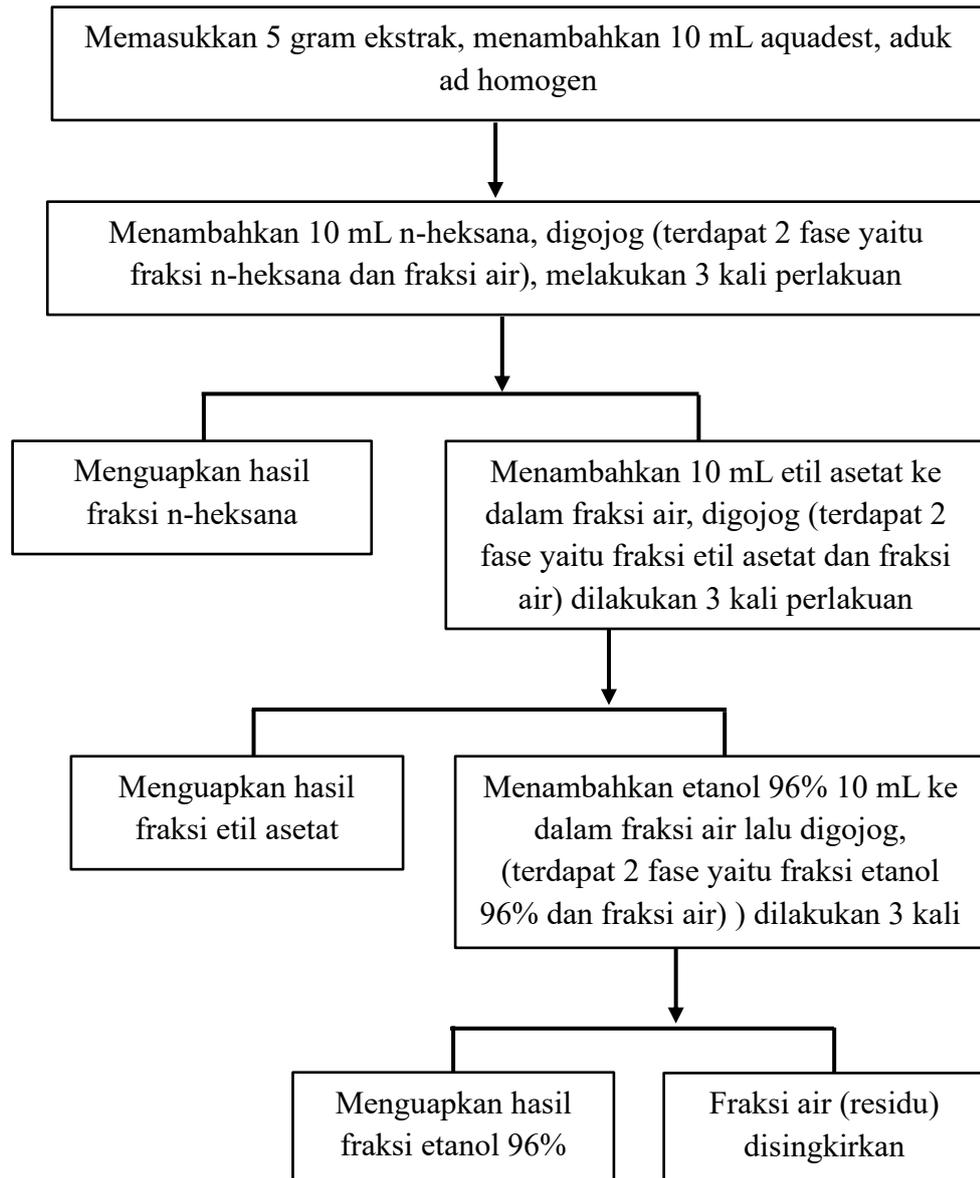
3.5.7 Fraksinasi

Timbang 5 gram ekstrak kental bunga telang, larutkan dengan 10 mL aquadest, kemudian masukkan ke corong pisah lalu tambahkan 10 mL n-heksana. Selanjutnya digojog dan diletakkan pada klem dan statif yang telah dirangkai, tunggu hingga fase pelarut dan air terpisah. Ambil fase pelarut dan diampung pada cawan uap. Untuk fase air, tambahkan 10 mL n-heksana lagi dan digojog, lalu tunggu hingga kedua senyawa terpisah, kemudian ambil fase pelarut dan disatukan dengan fraksi n-heksana sebelumnya. Setelah itu, lakukan tahap yang sama seperti sebelumnya, lalu uapkan fraksi n-heksana hingga kental. Untuk fase air (residu) masukkan ke dalam corong pisah dan tambahkan 10 mL etil asetat.

Campuran antara air dan etil asetat digojog dan diamkan hingga terjadi pemisahan. Diambil fase pelarut etil asetat dan diletakkan pada cawan uap. Untuk fase air, dimasukkan kembali ke corong pisah dengan ditambahkan 10 mL etil asetat. Tunggu hingga dua senyawa terpisah, lalu ambil fase etil asetat dan gabungkan dengan fraksi etil asetat sebelumnya. Selanjutnya, lakukan prosedur yang sama seperti sebelumnya hingga 3 kali perlakuan, lalu uapkan fraksi fase etil asetat dengan waterbath hingga kental.

Fase air atau residu dari fraksinasi etil asetat kemudian dimasukkan ke corong pisah dan ditambahkan dengan 10 mL etanol 96%. Selanjutnya digojog dan diamkan hingga terjadi dua lapisan, lapisan atas (pelarut)

bawah (air), tampung kedua fase tersebut dengan cawan uap. Lakukan perlakuan tersebut hingga 3 kali. Setelah itu, fraksi etanol 96% diuapkan hingga kental, selanjutnya dilakukan pengujian flavonoid total dan nilai IC_{50} (Aprilianti, 2023).



Gambar 3.7 Skema Fraksinasi

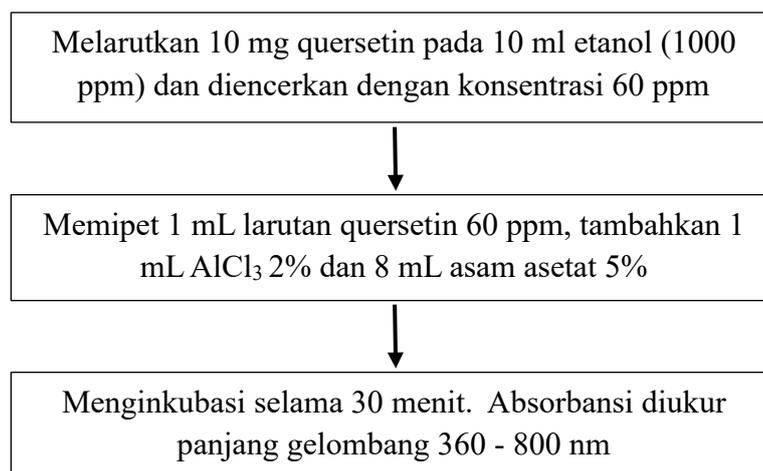
3.5.8 Penentuan Kadar Flavonoid Total Menggunakan Spektrofotometri

UV-Vis

Penentuan kadar flavonoid total dalam ekstrak n-heksana, etil asetat dan etanol bunga telang dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis dengan metode kolorimetri (AlCl_3) dan dinyatakan sebagai flavonoid total dalam ekuivalen kuarsetin (EQ) (Rebaya et al., 2015).

1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Quersetin

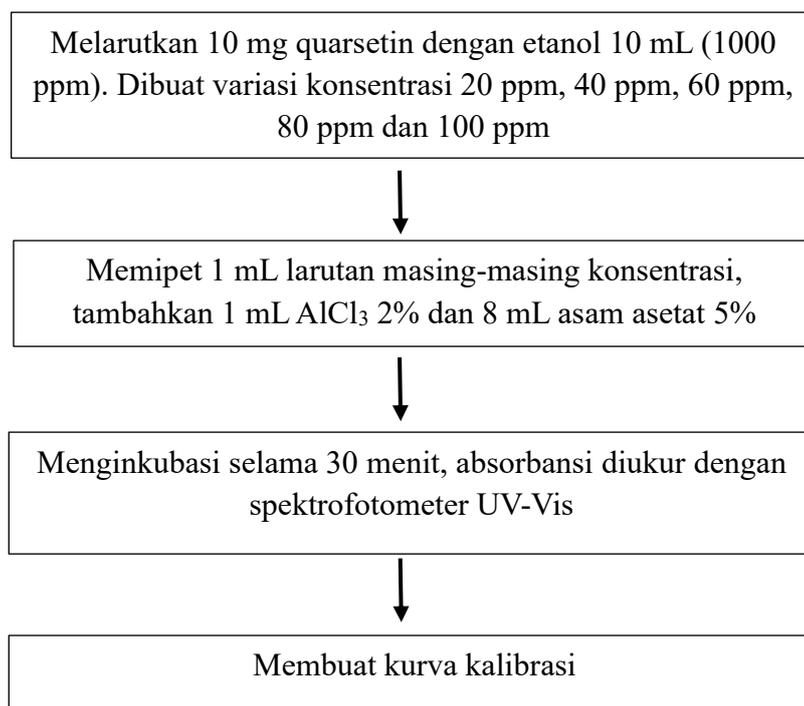
Sebanyak 10 mg quersetin dilarutkan dalam 10 mL etanol (1000 ppm). Larutan tersebut kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 60 ppm. Sebanyak 1 mL larutan quersetin 60 ppm dipipet, diikuti dengan 1 mL AlCl_3 2% dan 8 mL asam asetat 5%, kemudian diinkubasi selama 30 menit (Ipandi et al., 2016). Absorbansi diukur panjang gelombang 360 - 800 nm (Dy et al., 2021).



Gambar 3.8 Skema penentuan panjang gelombang maksimum quersetin

2. Pembuatan Kurva Standar Quarsetin

Ditimbang quersetin hingga 10 mg dan melarutkannya dalam 10 mL etanol (1000 ppm). Variasi konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm dilakukan. 1 mL larutan standar dipipet dan dicampur dengan 1 mL AlCl_3 2% dan 8 mL asam asetat 5%. Setelah 30 menit inkubasi, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang maksimum quersetin. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan nilai absorbansi sebagai koordinat (Y) dan konsentrasi absis larutan standar (X) (Dy et al., 2021).



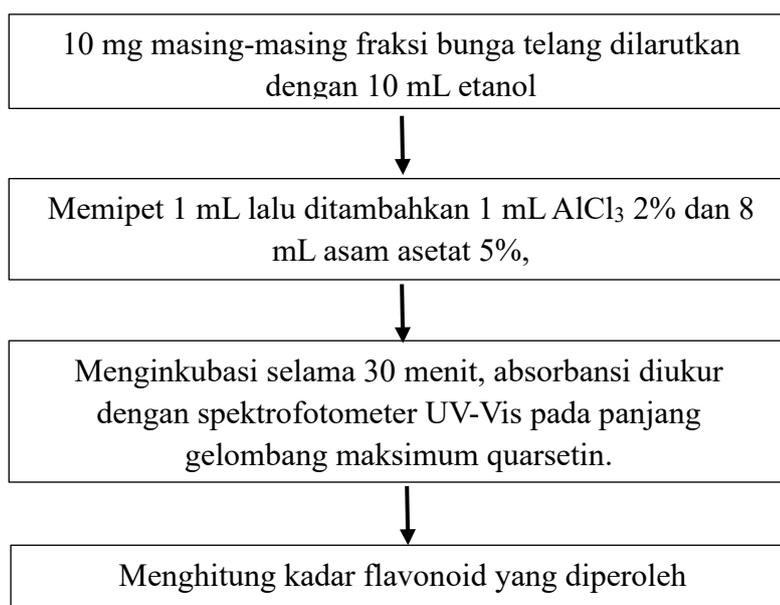
Gambar 3.9 Skema Pembuatan Kurva Standar Quersetin

3. Penentuan Kadar Flavonoid Total Fraksi N-heksana, Etil Asetat dan Etanol 96% Bunga Telang

Masing-masing fraksi bunga telang dilarutkan dalam 10 mL etanol 96% dan diaduk hingga homogen. Sampel dipipet 1 mL, lalu ditambahkan dengan 1 mL AlCl₃ 2%, dan 8 mL asam asetat 5%. Selanjutnya inkubasi selama 30 menit, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum quersetin. Setelah diperoleh absorbansi ekstrak etanol bunga telang, dihitung kadar flavonoid total (Ipandi et al., 2016). Pengujian dilakukan secara triplo. Kadar flavonoid dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar Total Flavonoid} = \left(\frac{\text{Absorbansi sampel} - \text{Intersep}}{\text{Slope}} \right) \div \text{Konsentrasi awal} \times \text{FP} \times 100\%$$

Keterangan: FP : Faktor Pengenceran

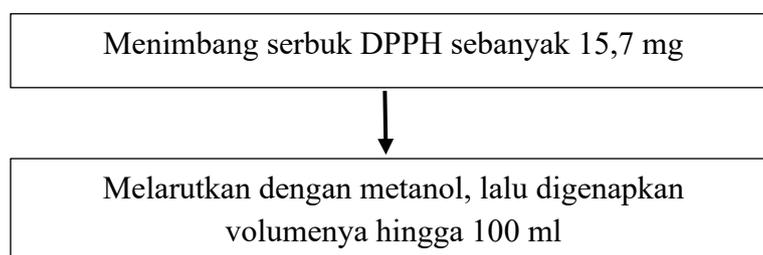


Gambar 3.10 Skema Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak

3.5.9 Penentuan Nilai IC_{50} pada Bunga Telang Menggunakan Metode DPPH

1. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

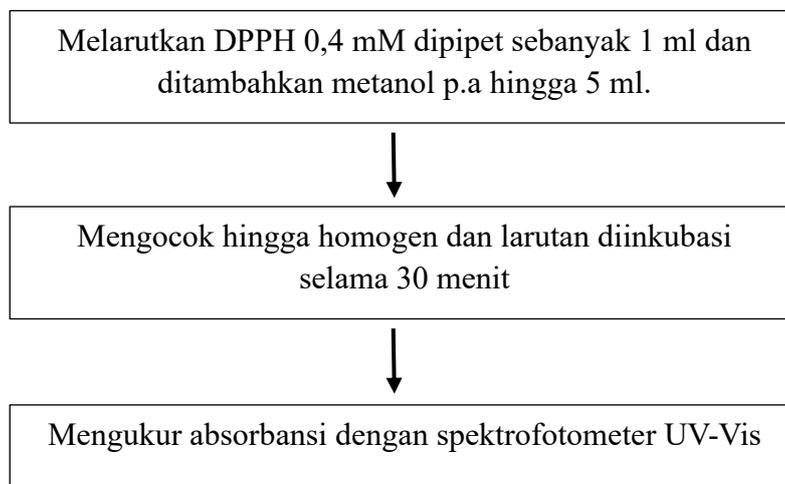
Menimbang 15,7 mg bubuk DPPH, larutkan dalam metanol p.a., dan genapkan volumenya menjadi 100 ml dalam labu ukur. (Pujiastuti dan Islamiyati, 2021).



Gambar 3.11 Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks}) DPPH

Larutan DPPH 0,4 mM dipipet 1 mL dan tambahkan dengan metanol hingga 5 ml. Selanjutnya dikocok hingga homogen dan larutan diinkubasi selama 30 menit. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam kuvet hingga seluruh bagian kuvet terisi, lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Pujiastuti dan Islamiyati, 2021).



Gambar 3.12 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks}) DPPH

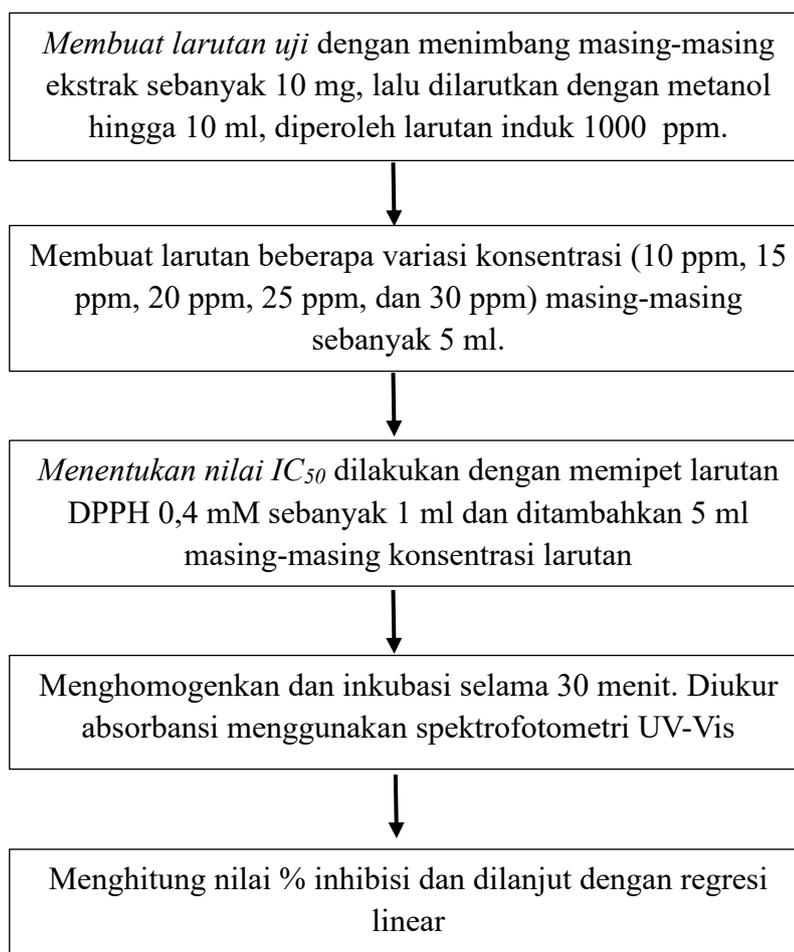
3. Penentuan Nilai IC_{50} dari Ekstrak Bunga Telang

Pembuatan larutan uji dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga 10 mL. Diperoleh larutan induk 1000 ppm. Setiap larutan dibuat beberapa variasi konsentrasi (10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm) masing-masing sebanyak 5 mL (Pujiastuti dan Islamiyati, 2021).

Penentuan nilai IC_{50} pada sampel dilakukan dengan memipet larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL lalu tambahkan 5 ml masing-masing konsentrasi larutan. Campuran dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit. Diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} (Pujiastuti dan Islamiyati, 2021). Diinterpretasikan nilai % inhibisi masing-masing sampel dengan persamaan berikut :

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

Dilanjutkan dengan regresi linear antara % inhibisi dan konsentrasi ekstrak bunga telang, hingga diperoleh persamaan $y = bx + a$.



Gambar 3.13 Skema Penentuan Nilai IC_{50} dari Ekstrak Bunga Telang

3.6 Analisis Data

Pengukuran absorbansi flavonoid dan IC_{50} pada ekstrak bunga telang dilakukan secara spektrofotometri UV-Vis dan analisa data dilakukan dengan menggunakan regresi linear.