UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL, FRAKSI POLAR, SEMI POLAR DAN NON POLAR BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L) DENGAN METODE ABTS

(Antioxidant activity Test of Ethanol Extract of Polar, Semi polar and Non Polar Fraction of Butterfly Pea Flower (*Clitoria ternatea* L) by ABTS Method)

SKRIPSI

Oleh :

BRIAN WICAKSONO
4161010

PROGRAM STUDI S1 FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL
SURAKARTA
2020

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL, FRAKSI POLAR, SEMI POLAR DAN NON POLAR BUNGA TELAN (*Clitoria ternatea* L) DENGAN METODE ABTS

(Antioxidant activity Test of Ethanol Extract of Polar, Semi Polar and Non Polar Fractions of Butterfly Pea Flower (*Clitoria ternatea* L) by ABTS Method)

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm) pada Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional di Surakarta

Oleh :

BRIAN WICAKSONO

4161010

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL

SURAKARTA

2020

PENGESAHAN SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL, FRAKSI POLAR, SEMI POLAR DAN NON POLAR BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L) DENGAN METODE ABTS

(Antioxidant Activity Test of Ethanol Extract of Polar, Semi polar and Non Polar Fraction of Butterfly Pea Flower (*Clitoria ternatea* L) by ABTS Method)

Oleh:
BRIAN WICAKSONO
4161010

Dipertahankan di hadapan Penguji Skripsi Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional Pada tanggal : 16 September 2020

Pembimbing Utama

Apt Diah Pratimasari, M.Farm.

Pembimbing Pendamping

Apt. Novena Yety Lindawati, S. Farm., M. Sc

Mengetahui,
Program Studi S1 Farmasi
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional
Ketua Program Studi,

Apt. Eusia Murtiningsi, S.Farm., M.Sc

Tim Penguji

Ketua : Tesia Aisyah Rahmania, S. Si., M. Pharm. Sci .....

Anggota :

1. Apt. Susilowati, S.Farm., M.Sc 1. .....
2. Apt. Diah Pratimasari, M.Farm. 2. .....
3. Apt. Novena Yety Lindawati, S. Farm., M. Sc 3. .....

HALAMAN PERSEMBAHAN

Janganlah hendaknya kamu kuatir tentang apapun juga, tetapi nyatakanlah dalam segala hal keinginanmu kepada Allah dalam doa dan permohonan dengan ucapan syukur (Filipi 4;6).

Hari takkan indah tanpa mentari dan rembulan, begitu juga hidup takkan indah tanpa tujuan, harapan serta tantangan. Meski terasa berat, namun manisnya hidup justru akan terasa, apabila semuanya terlalu dengan baik, meski harus memerlukan pengorbanan.

Tuhan telah menjanjikan ada pelangi sehabis hujan setelah badai.

Karya ini saya persembahkan kepada

Bapak dan Ibu saya

Dan keluargaku semuanya

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Sukoharjo, 16 September 2020
Peneliti

(Brian Wicaksono)

PRAKATA

Segala puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala berkat dan anugerah-Nya sehingga dapat menyelesaikan penelitian dengan judul " Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Fraksi Polar, Semi Polar dan Non Polar Bunga Telang (Clitoria ternatea L) Dengan Metode ABTS" sebagai salah satu syarat menyandang gelar Sarjana Farmasi di Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional. Dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Untuk itu penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. apt. Hartono, M.Si. selaku Ketua Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional
2. apt. Lusia Murtisiwi, S.Farm., M.Sc. Selaku Kepala Program Studi S1 Farmasi.
3. apt. Diah Pratimasari. M.Farm. dan apt. Novena Yety Lindawati, S.Farm., M.Sc. selaku pembimbing yang telah membimbing penulis hingga mampu menyelesaikan skripsi ini .
4. Tesia Aisyah Rahmania, S.Si., M.Pharm.Sci dan apt. Susilowati, S.Farm., M.sc. selaku tim penguji skripsi.
5. Dosen S1 Farmasi yang selalu memberikan semangat dan dukungan doa
6. Wibowo, A.Md selaku laboran yang telah membantu menyelesaikan skripsi
7. Seluruh staf pengajar dan karyawan Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional yang telah memberikan banyak pelajaran berharga.
8. Keluarga besar yang senantiasa memberikan dukungan doa dan motivasi supaya dapat menyelesaikan skripsi ini.
9. Sahabat-sahabatku yang telah memberikan motivasi, doa dan selalu ada dalam keadaaan suka dan duka dengan nama Arvani, Arina dan Garnes

10. Seluruh teman-teman angkatan 2016 yang telah berjuang bersama-sama untuk menempuh Sarjana Farmasi di Sekolah Tinggi Nasional Surakarta.

Penulis mengucapkan terima kasih untuk semua pihak guna membantu menyelesaikan skripsi ini dan diharapkan semoga skripsi penelitian ini dapat bermanfaar bagi pembaca.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL ….....i

HALAMAN PENGESAHAN ii

HALAMAN PERSEMBAHAN.....iii

HALAMAN PERNYATAAN iv

PRAKATA.....v

DAFTAR ISI.....vi

DAFTAR GAMBAR.....vii

DAFTAR TABEL.....viii

DAFTAR LAMPIRAN.....ix

DAFTAR SINGKATAN.....x

INTISARI.....xi

ABSTRACT….....xii

BAB I PENDAHULUAN.....1

A. Latar Belakang Masalah.....1

B. Perumusan Masalah.....3

C. Tujuan Penelitian.....3

D. Manfaat Penelitian 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....5

A. Radikal Bebas.....5

B. Antioksidan.....6

1. Antioksidan.....5

C. Tanaman Bunga Telang.....6
1. Klasifikasi Tanaman.....6
2. Morfologi.....7
3. Kandungan Kimia.....8
D. Ekstraksi.....8
1. Ekstraksi.....9
2. Maserasi.....10
E. Senyawa Bahan Alam yang Berpotensi Sebagai Antioksidan.....10
1. Senyawa Fenolik.....10
2. Senyawa Alkaloid.....11
3. Senyawa Saponin.....11
4. Senyawa Flavonoid.....12
F. Spektrofotometer UV-Vis.....13
G. Metode ABTS.....14
1. Mekanisme ABTS.....15
H. Fraksinasi.....15
I. Landasan Teori.....16
J. Hipotesis….....16
K. Kerangka Konsep Penelitian.....17
BAB III METODE PENELITIAN.....18
A. Desain Penelitian.....18
B. Tempat dan Waktu Penelitian.....18
C. Populasi dan Sampel.....24

D. Variabel Penelitian.....18

E. Alat dan Bahan.....19

1. Alat.....19

2. Bahan.....19

F. Jalannya Penelitian.....19

1. Persiapan Serbuk Bunga Telang... 19

2. Pembuatan Ekstrak Etanol Bunga Telang.....20

3. Pembuatan Fraksi.....20

4. Skrining Fitokimia..... 21

5. Penentuan Aktivitas Antioksidan.....23

G. Analisis Hasil.....36

H. Alur Penelitian.. 29

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....30

A. Persiapan Serbuk Bunga Telang 37

B. Pembuatan Ekstrak Bunga Telang.....37

C. Pembuatan Fraksi.....33

D. Skrining Fitokimia..... 35

E. Uji Aktivitas Antioksidan 38

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....47

A. Kesimpulan.....47

B. Saran.....47

DAFTAR PUSTAKA.....48

LAMPIRAN.....52

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Bunga Telang.....7

Gambar 2. Struktur Dasar Fenol..... 10

Gambar 3. Struktur Saponin..... 12

Gambar 4.Struktur flavonoid……...….12

Gambar 5. Reaksi Pembentukan radikal bebas dari ABTS…….....…….15

Gambar 6. Kerangka Konsep……...….17

Gambar 7. Alur Penelitian.....29

Gambar 8. Bunga Telang Kering dan Serbuk Bunga Telang……....……31

Gambar 9. Ekstrak Etanol Bunga Telang……....……..33

Gambar 10. Skrining Fitokimia Alakaloid, Saponin, Polifenol Ekstrak 35

Gambar 11. Mekanisme alkaloid dengan Mayer.....37

Gambar 12. Mekanisme Flavonoid dengan serbuk Mg.....38

Gambar 13. Mekanisme tanin/polifenol dengan $FeCl_3$ 1%.....38

Gambar 14. Mekanisme reaksi saponin dengan air.....38

Gambar 15. Spektrum pengukuran panjang gelombang maksimum ABTS.....41

Gambar 16. Kurva Hubungan Konsentrasi dengan % inhibisi Ekstrak dan Fraksi Bunga Telang Replikasi 1.....44

Gambar 17. Kurva Hubungan Konsentrasi dengan % Inhibisi Ekstrak dan Fraksi Bunga Telang Replikasi 2.....44

Gambar 18. Kurva Hubungan Konsentrasi dengan % Inhibisi Ekstrak dan Fraksi Bunga Telang Replikasi 3.....45

GAMBAR TABEL

Tabel 1. Spektrum Cahaya Tampak…….....…… 13

Tabel 2. Berat Rendemen Fraksi……...……34

Tabel 3. Hasil Identifikasi Senyawa Kimia Ekstrak……..... 35

Tabel 4. Hasil Identifikasi Senyawa Kimia Fraksi……....36

Tabel 5. Penentuan *operating time*.....40

Tabel 6. Hubungan Konsentrasi Kuersetin Dengan % Inhibisi……..... 42

Tabel 7. Data Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Bunga Telang……. 43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan larutan…….....……53

Lampiran 2. Perhitungan rendemen ekstrak dan fraksi…….....……56

Lampiran 3. *Operating time*……...……57

Lampiran 4. Panjang gelombang maksimal…….....58

Lampiran 5. Kurva Data dan Perhitungan IC_{50} Kuersetin……...……59

Lampiran 6. Kurva Data dan Perhitungan IC_{50} Ekstrak Etanol ……....…..64

Lampiran 7. Kurva Data dan Perhitungan IC_{50} Fraksi n-heksan ……....…….68

Lampiran 8. Kurva Data dan Perhitungan IC_{50} Fraksi Etil Asetat……...…73

Lampiran 9. Kurva Data dan Perhitungan IC_{50} Fraksi Air……...……78

Lampiran 10. *Kruskal-Wallish Test*……...…84

Lampiran 11. Rangkaian Penyiapan Bunga Telang dan Tahapannya…….....85

Lampiran 12. Ekstrak dan Fraksi Bunga Telang……....87

Lampiran 13. Larutan Untuk Spektrofotometri…….....88

Lampiran 14. Skrining Fitokimia.....90

DAFTAR SINGKATAN

ABTS	(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-asam sulfonat)
IC_{50}	*Inhibition Concentration 50%*

INTISARI

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat atau mengurangi radikal bebas dengan cara menangkap atau memberikan pasangan elektron yang tidak berpasangan sehingga membuat tidak reaktif salah satu satunya adalah bunga telang (*Clitoria ternatea* L) mempunyai kandungan senyawa flavonoid yang dapat digunakan sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dengan metode ABTS.

Bunga telang diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% selanjutnya setelah mendapat ekstrak kental dilarutkan dengan akuades untuk dilakukan fraksinasi dengan pelarut n-heksan, etil asetat. Uji aktivitas antioksidan ini menggunakan metode ABTS (*2,2'-azino-bis-(3etilbenzotiazolin)-6 sulfonate acid*). Pada *operating time* pada menit ke-6 dan panjang gelombang maksimal 735 nm. Pada penelitian ini menggunakan pembanding kuersetin, analisis data dari uji aktivitas antioksidan antara ekstrak dan fraksi bunga telang (*Clitoria ternatea* L) dilakukan dengan *Kruskal-Wallish*.

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air menghasilkan IC_{50} berturut-turut sebesar 19,9741 ± 0,0181, 30,1265 ± 0,0503, 17,8659 ± 0,0196 dan 26,4522 ± 0,3914. Hasil *Kruskal-Wallish* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara aktivitas antioksidan ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air (Sig) <0,05

Kata kunci : Bunga Telang, Antioksidan, ABTS, Kuersetin

ABSTRACT

Antioxidants are compounds that can inhibit or reduce free radicals by capturing or giving unpaired electron pairs so that they are not reactive, one of which is that the butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L) contains flavonoid compounds that can be used as antioxidants. This study aims to determine the antioxidant activity of the extract and fraction of butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L) using the ABTS method.

Butterfly pea flowers were extracted by maceration method with 96% ethanol solvent then after obtaining the thick extract was dissolved with distilled water to be fractionated with n-hexane, ethyl acetate as a solvent. This antioxidant activity test used the ABTS method (2,2'-azino-bis- (3ethylbenzothiazolin) -6 sulfonate acid). The operating time is in the 6th minute and the maximum wavelength is 735 nm. In this study using as comparison and *Kruskal-Wallis Test* for the data analysis, the analysis of the antioxidant activity test between the extract and fraction of butterfly pea flower (*Clitoria* ternatea L) was carried out using *Kruskal-Wallis Test*

The test results of the antioxidant activity of the extract, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction and water fraction yielded an IC 50 of 19.9741 ± 0.0181, 30.1265 ± 0.0503, 17.8659 ± 0.0196 and 26, respectively. 4522 ± 0.3914. The *Kruskal-Wallis Test* results showed a significant difference between the antioxidant activity of ethanol extract, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction and water fraction (Sig) < 0,005

Keywords: Butterfly Pea Flower, Antioxidant, ABTS, Quercetin

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Radikal bebas adalah suatu gugus atau atom yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini dapat terbentuk akibat dari lingkungan sekitar seperti polusi, asap rokok, makanan dalam kemasan, zat aditif dan lain-lainnya (Stevi G *et al*., 2012). Adanya satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dapat menyerang dan mengikat elektron pada molekul lainnya yang berada disekitarnya (Winarsih, 2007). Radikal bebas bersifat sangat reaktif dan tidak stabil (Khaira, 2010). Paparan radikal bebas di dalam tubuh dapat menyebabkan terganggunya aktivitas sel normal, sehingga menghasilkan kerusakan. Kerusakan membran sel pada pembuluh darah dapat menyebabkan stroke (Sayuti dan Yenrina, 2015). Oleh karena itu, maka diperlukan senyawa antioksidan yang dapat menghambat atau mengurangi radikal bebas dengan cara memberikan pasangan elektron bagi radikal bebas sehingga membuatnya tidak reaktif (Khosasih *et al*., 2014).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa metabolit-metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman memiliki aktivitas antioksidan. Salah satunya adalah flavonoid (Teow *et al*., 2006). Salah satu tanaman yang telah diteliti memiliki kandungan flavonoid adalah bunga telang (*Clitoria ternatea* L). Mahkota bunga telang memiliki kandungan flavonoid yang cukup tinggi yaitu sebesar 20,07 ± 0,53 mmol/mg bunga (Kazuma, 2003). Selain itu ekstrak bunga telang juga diteliti

memiliki kadar fenolik total yaitu 1,621 GAE (mg/g sampel) (Andriani *et al*., 2018). Beberapa penelitian menyatakan bahwa secara umum tanaman dan buah-buahan memiliki senyawa antioksidan guna mencegah terbentuknya radikal bebas, antioksidan dapat tersebar di berbagai bagian tanaman tumbuhan misalnya pada daun, akar, bunga, rimpang, buah, biji dan lain-lainnya (Selawa, 2013). Sebelumnya bunga telang telah diteliti aktivitas antioksidannya dengan metode FRAP dan menghasilkan data aktivitas antioksidan sebesar 0,33 ± 0,01 mmol/gram *ascorbic equivalent* (Iamsaard *et al*., 2014). Namun peneliti ingin melakukan pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode ABTS. Dikarenakan ABTS mempunyai kelebihan dapat digunakan di sistem larutan berbasis air maupun organik, mempunyai absorbansi spesifik pada panjang gelombang dari region *visible* dan mempunyai waktu reaksi yang lebih cepat (Lee *et al*., 2003).

Salah satu tahapan penting dalam penemuan senyawa aktif bahan alam yaitu fraksinasi. Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa aktif bahan alam yang berkhasiat dari komponen lain. Fraksinasi dapat dilakukan secara bertingkat dengan menggunakan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Masing-masing pelarut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda sebagai contoh pelarut etanol dapat menarik glikosida yang mengandung komponen gula dan non gula. Kemampuan penarikan senyawa dengan menggunakan pelarut tertentu, sesuai dengan teori *like dissolve like*, pelarut polar akan menarik senyawa bersifat polar, pelarut semi polar akan menarik senyawa semi polar dan pelarut non polar akan menarik senyawa non polar. Pelarut polar akan menarik senyawa glikosida, pelarut semi polar akan menarik senyawa

flavonoid, fenolik dan senyawa non polar akan menarik steroid dan terpenoid. Oleh karena itu, peneliti ingin menguji potensi ekstrak etanol, fraksi polar, semi polar dan non polar bunga telang terhadap penghambatan radikal dengan menggunakan metode ABTS.

B. Rumusan masalah

1. Berapakah nilai IC_{50} ekstrak etanol, fraksi polar, semi polar dan non polar bunga telang (*Clitoria ternatea* L) yang menunjukkan aktivitas antioksidan ?
2. Ekstrak atau fraksi manakah dari bunga telang *(Clitoria ternatea* L) yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi ?
3. Bagaimana aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol, fraksi polar, semi polar dan non polar bunga telang ?

C. Tujuan penelitian

1. Penelitian ini digunakan untuk mengetahui nilai IC_{50} pada ekstrak etanol, fraksi polar, semi polar dan non polar bunga telang (*Clitoria ternatea* L).
2. Penelitian ini digunakan untuk mengetahui ekstrak atau fraksi manakah dari bunga telang *(Clitoria ternatea* L) yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi.
3. Penelitian ini digunakan untuk mengetahui adanya aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol, fraksi polar, semi polar dan non polar bunga telang (*Clitoria ternatea* L)

D. Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk menjadi dasar penelitian dan untuk menentukan senyawa yang dapat berpotensi sebagai antioksidan.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian eksperimental, karena dalam penelitian akan dilakukan analisis terhadap efektivitas antioksidan antara ekstrak etanol dan fraksi etil asetat bunga telang.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Obat Tradisional, Laboratorium Kuantitatif Instrumen STIKES Nasional Surakarta pada bulan Januari 2020 sampai bulan Mei 2020.

C. Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bunga telang. Sampel yang diperoleh dan dikumpulkan dari daerah Kamongan Kalurahan Ban mati Kecamatan Sukoharjo Kabupaten Sukoharjo Jawa Tengah.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Konsentrasi ekstrak etanol, fraksi air, etil asetat dan n-heksan bunga telang

2. Variabel tergantung

Aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol fraksi air, etil asetat dan n-heksan bunga telang dengan metode ABTS.

3. Variabel terkendali

Operating time, panjang gelombang maksimal, suhu, penyimpanan.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan yaitu mikropipet (*Mammert®), Rotary evaporator* (*Ika® RV 10 basic*), spektrofotometer UV-vis (*Apel®,PD 303 UV*), timbangan analitik, Sentrifuge (*Onemed*), tabung sentrifuge (*Pyrex),* chamber, penutup chamber, corong pisah (*pyrex*), kuvet (*HELMA*), gelas beker, penangas air, cawan, bejana maserasi.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga telang, akuades, etanol p.a (*Merck*), etanol 96%, kloroform (*Merck*), metanol p.a (*Merck*), kalium persulfat ($K_2S_2O_8$) (Merck), Natrium hidroksida (*Merck*), vitamin C (*Merck*), dapar fosfat, kalium ferrisianida, ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-asam sulfonat).

F. Jalannya Penelitian

1. Persiapan serbuk bunga telang

Bunga telang yang digunakan adalah bunga telang yang berwarna ungu sebanyak 600 g. Bunga telang dibersihkan dan dikeringkan dengan kain hitam. Bunga telang yang sudah kering lalu digiling dan diayak dengan ayakan 40 mesh lalu serbuk disimpan diwadah kering, terhindar dari sinar matahari dan tertutup.

2. Pembuatan ekstrak etanol bunga telang

Serbuk bunga telang (*Clitoria ternatea L*) direndam dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Serbuk bunga telang sebanyak 200 gram ditambahkan etanol 96% 1,5 liter (1:7,5) di dalam bejana maserasi yang tertutup rapat dan dibiarkan selama 3 hari pada temperatur kamar, terlindung dari sinar matahari langsung sambil sesekali diaduk setiap hari, setelah 3 hari disaring sehingga diperoleh filtrat dan ditampung dalam wadah penampung (botol maserasi). Ampas direndam kembali dengan etanol 96% sebanyak 0,50 liter (1:2,5) dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali di aduk. Seluruh filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak diuapkan diatas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak yang lebih kental (Ningsih *et al*., 2013). Pada tahapan ekstraksi melewati dua mekanisme dasar yaitu, disolusi merupakan proses terendamnya senyawa oleh solven dan difusi merupakan proses terbawanya senyawa-senyawa oleh solven keluar sel.

3. Pembuatan Fraksi bunga telang

a. Pembuatan fraksi n-heksan

Ekstrak etanol bunga telang yang telah dipekatkan ditimbang seksama 50,0 gram, dilarutkan dalam air hangat 50,0 mL sampai larut dan difraksinasi dengan n-heksan sebanyak 50,0 mL, fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali menggunakan corong pisah. Filtrat n-heksan dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* kecepatan 200 rpm dengan suhu 40°C, filtrat diuapkan diatas waterbath. Filtrat n-heksan yang sudah dipekatkan disebut fraksi n-heksan (Maravirnadita, 2019).

b. Pembuatan fraksi etil asetat

Residu fraksinasi n-heksan ditambahkan etil asetat dengan perbandingan (1:1) menggunakan corong pisah, fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali. Filtrat etil asetat dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* kecepatan 200 rpm dengan suhu 40°C, filtrat diuapkan diatas waterbath. Filtrat etil asetat yang sudah dipekatkan disebut fraksi etil asetat. Residu fraksinasi etil asetat disebut dengan fraksi air (Maravirnadita, 2019).

4. Skrining fitokimia

a. Identifikasi Polifenol

1 ml ekstrak dan fraksi tanaman ditambahkan 5 tetes besi (III) klorida, senyawa fenol memberikan warna hijau hingga biru hitam dalam air atau etanol (Hanani, 2017).

b. Identifikasi Flavonoid

Sebanyak 40 mg ekstrak dan fraksi ditambahkan dengan 100 ml air panas, kemudian didihkan selama 5 menit, dan selanjutnya disaring. Filtrat

diambil sebanyak 5 ml kemudian ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, selanjutnya dikocok kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan larutan menjadi warna merah, kuning atau jingga (Wijaya *et al*.,2014).

c. Identifikasi Tanin

Larutan fraksi dan ekstrak etanol kurang lebih 1 ml ditambah 10 ml akuadest lalu disaring dan filtrat ditambahkan 3 tetes $FeCl_3$ 1%. Warna biru tua sampai hitam menunjukkan adanya tanin (Aryantini *et al*., 2017).

d. Identifikasi Saponin

Sebanyak 40 mg ekstrak dan fraksi ditambahkan dengan 10 ml air, kemudian dikocok selama 1 menit, selanjutnya ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Bila busa yang terbentuk tetap stabil ± 7 menit, maka ekstrak menunjukkan hasil positif mengandung saponin (Wijaya *et al*., 2014).

e. Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 40 mg ekstrak dan fraksi ditambahkan beberapa tetes HCl 1% , setelah larut kemudian ditambahkan 1 ml pereaksi mayer. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya endapan atau larutan yang berubah menjadi keruh (Sudjarwo, 2017).

f. Identifikasi Steroid/Triterpenoid

Sebanyak 100 mg ekstrak dan fraksi ditimbang kemudian dilarutkan dengan menggunakan air sebanyak 10,0 ml. Selanjutnya ekstrak yang sudah larut diambil sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan dengan 3

tetes HCl pekat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau ungu (Septianingsih *et al*., 2014).

5. Penentuan aktivitas antioksidan

a. Pembuatan larutan induk kuersetin

10,0 mg serbuk kuersetin ditimbang, dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml dilarutkan dengan metanol lalu volumenya dicukupkan dengan metanol p.a sampai tanda batas labu ukur 10,0 mL, kemudian dibuat larutan intermediet 100 ppm dengan mengencerkan larutan baku induk 1000 ppm. Larutan baku kerja kuersetin dibuat dari larutan intermediet 100 ppm dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm atau dipipet masing-masing sebanyak 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, 1 mL dan 1,25 mL dimasukkan kedalam labu ukur 5,0 mL, ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas (Pulungan, 2018).

b. Pembuatan larutan

1) Larutan radikal ABTS : 5,0 mL larutan ABTS ditambahkan 5,0 mL larutan kalium persulfat, diinkubasi dalam ruang gelap suhu 22-24^{0}C selama 12-16 jam sebelum digunakan, dihasilkan ABTS dengan warna biru gelap.
2) Larutan ABTS : Ditimbang 18,0 mg ABTS (7 mM) dilarutkan kedalam aqua deionisasi dalam labu ukur 5,0 mL.
3) Larutan $K_2S_2O_8$: Ditimbang 14,0 mg kalium persulfat (2,45 mM) dilarutkan kedalam aqua deionisasi ditambahkan sampai tanda batas 20,0 mL (Rosidah *et al*., 2008).

4) Larutan PBS pH 7,4 : Natrium klorida ditimbang seksama 8,0 g, 0,2 g kalium klorida, 1,42 g natrium hidogen fosfat, 0,24 kalium dihidrogen fosfat dilarutkan dalam akuades sampai 1,0 L.

c. Penentuan *Operating Time*

Larutan baku kerja kuersetin 15 ppm, dipipet sebanyak 0,1 mL larutan ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS diukur pada panjang gelombang 600-800 nm, panjang gelombang maksimum teoritis 734 nm dengan interval waktu 1 menit hingga diperoleh absorbansi stabil. *Operating Time* tercapai pada waktu dihasilkan absorbansi yang stabil (Rosidah *et al*., 2008).

d. Pengukuran panjang gelombang maksimum dengan metode ABTS

Larutan radikal ABTS dipipet sebanyak 1,0 mL dan dicukupkan volumenya sampai 25,0 mL dengan PBS pH 7,4 dalam labu ukur. Larutan ini kemudian diukur pada panjang gelombang 700-750 nm, sehingga diperoleh panjang gelombang maksimal untuk pengukuran aktivitas antioksidan.

e. Pengukuran aktivitas antioksidan metode ABTS dengan kuersetin

Larutan baku kerja kuersetin dibuat dari larutan intermediet 100 ppm dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm atau dipipet masing-masing sebanyak 250 μl, 500 μl, 1000 μl, 1250 μl dan 1500 μl kedalam labu ukur 5,0 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas dan dipipet sebanyak 0,1 mL larutan ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama *Operating Time* yang

diperoleh dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 734 nm (Faisal, 2019).

f. Pengukuran aktivitas antioksidan

1) Pengukuran aktivitas ekstrak etanol dengan metode ABTS

Ekstrak etanol ditimbang seksama sebanyak 50,0 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 50,0 mL, sebagai larutan baku induk 1000 ppm. Larutan baku kerja dibuat dari larutan intermediet 100 ppm dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm atau dipipet masing-masing sebanyak 250 μl, 500 μl, 1000 μl, 1250 μl dan 1500 μl kedalam labu ukur 5,0 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas dan masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,1 mL ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama *Operating Time* yang diperoleh dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal radikal ABTS (Faisal, 2019), dilakukan sebanyak triplo.

2) Pengukuran aktivitas fraksi n-heksan dengan Metode ABTS

Fraksi n-heksan ditimbang seksama sebanyak 50,0 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 50,0 mL sebagai larutan baku induk 1000 ppm. Larutan baku kerja dibuat dari larutan intermediet 100 ppm dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm atau dipipet sebanyak masing-masing 250 μl, 500 μl, 1000 μl, 1250 μl dan 1500 μl kedalam labu ukur 5,0 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas dan masing-masing

dipipet sebanyak 0,1 mL ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama *Operating Time* yang diperoleh dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal radikal ABTS (Faisal, 2019), dilakukan sebanyak triplo.

3) Pengukuran aktivitas fraksi etil asetat dengan Metode ABTS

Fraksi etil asetat ditimbang seksama sebanyak 50,0 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 50,0 mL sebagai larutan baku induk 1000 ppm. Larutan baku kerja dibuat dari larutan intermediet 100 ppm dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm atau dipipet sebanyak masing-masing 250 μl, 500 μl, 1000 μl, 1250 μl dan 1500 μl kedalam labu ukur 5,0 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas dan masing-masing dipipet sebanyak 0,1 mL ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama *Operating Time* yang diperoleh dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal radikal ABTS (Faisal,2019), dilakukan sebanyak triplo.

4) Pengukuran aktivitas fraksi etanol-air dengan Metode ABTS

Fraksi etanol-air ditimbang seksama sebanyak 50,0 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 50,0 mL sebagai larutan baku induk 1000 ppm. Larutan baku kerja dibuat dari larutan intermediet 100 ppm dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm atau dipipet sebanyak masing-masing 250 μl, 500 μl, 1000 μl, 1250 μl dan 1500 μl kedalam labu ukur 5,0 mL, kemudian

ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas dan masing-masing dipipet sebanyak 0,1 mL ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama *Operating Time* yang diperoleh dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal radikal ABTS (Faisal,2019), dilakukan sebanyak triplo.

G. Analisis Hasil

1. Perhitungan rendemen

Ekstrak dan fraksi kental yang diperoleh kemudian dihitung rendemennya dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot yang diperoleh}}{\text{bobot bahan awal}} \times 100\%$$

2. 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 (Cholisoh, 2008).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{serapan\ radikal\ ABTS - serapan\ radikal\ sisa}{Serapan\ radikal\ ABTS} \text{ x } 100\ \%$$

3. Perhitungan nilai IC_{50}

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

$$Y = Bx + A$$

$$50 = Bx + A$$

$$X = \frac{50-A}{B} = IC_{50}$$

Antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} <50 µg/ml, kuat jika IC_{50} 50-100 µg/ml, sedang jika nilai IC_{50} 100-150 µg/ml dan lemah jika IC_{50} 151-200 µg/ml (Molyneux, 2004).

4. Presisi

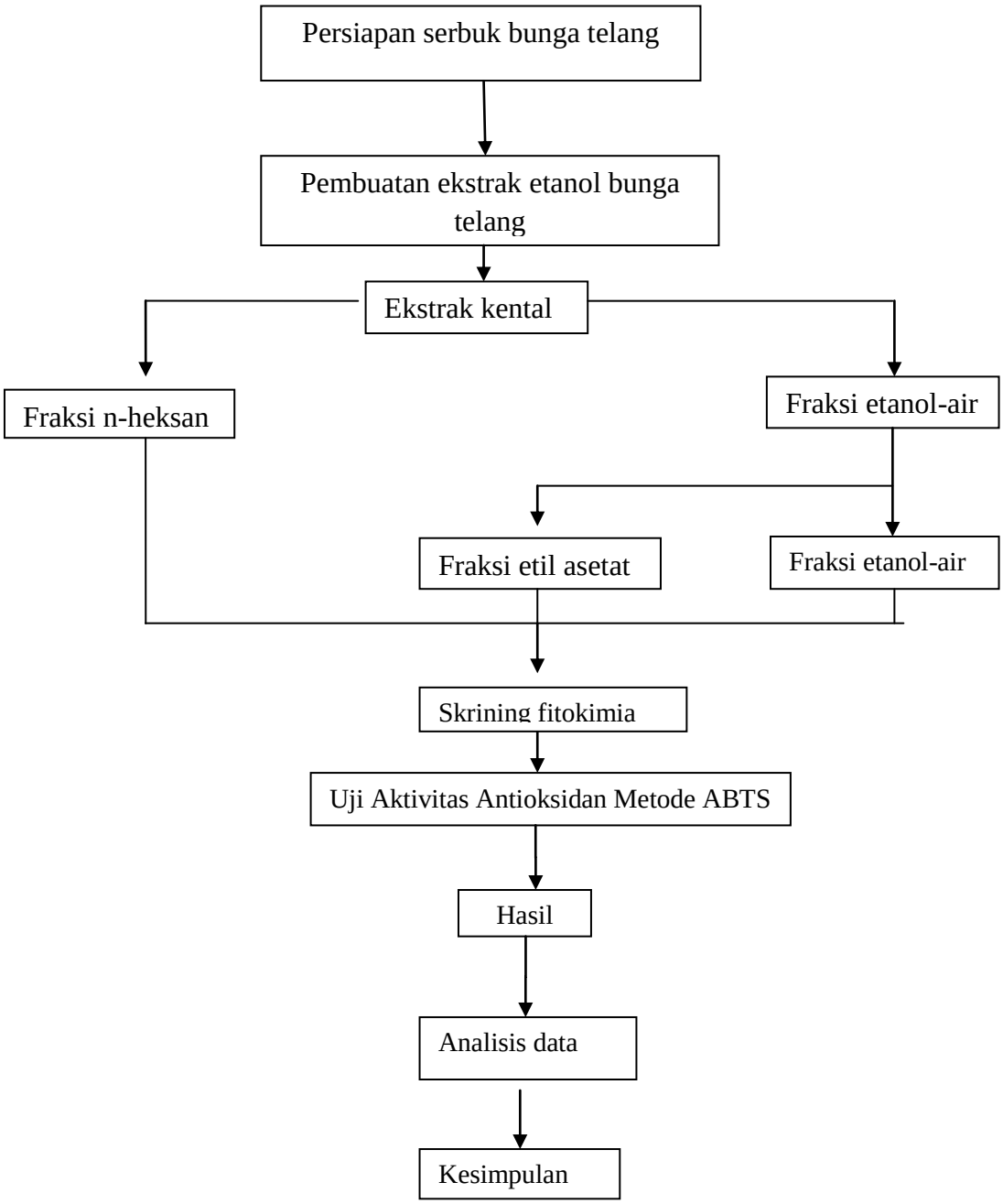
Data penetapan kadar tiap replikasi pada masing-masing proses ekstraksi dan fraksinasi dihitung nilai koefisien variasi. Koefisien variasi (KV) digunakan untuk mengetahui kesesuaian analisis satu dengan hasil analisis lain dari suatu seri pengukuran yang diperoleh dari sampling acak secara berulang dari sampel homogennya, koefisien variasi yang baik adalah kurang dari 2% (Harmita, 2004).

$$KV = \frac{Standar\ Deviasi\ (SD)}{Rata-rata\ kadar\ sampel} \times 100\ \%$$

5. Kruskal-Wallish Test

Data hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol bunga telang, fraksi-fraksinya dapat dianalisis dengan kruskal-wallish untuk analisis komparatif untuk menguji lebih dari 2 sampel independen (bebas) dengan ketentuan jumlah sampel tidak sama dan antara sampel tidak mempengaruhi (Siregar, 2013). Uji ini digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan diantara sampel, kriteria pengujian diambil berdasarkan nilai probabilitas (Sig) > 0,05 maka Ho diterima, jika probabilitas (Sig) < 0,05 maka Ho ditolak.

H. Alur penelitian



Gambar 7. Alur penelitian

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1.. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air menghasilkan IC_{50} berturut-turut sebesar 19,9741 ± 0,0181, 30,1265 ± 0,0503, 17,8659 ± 0,0196 dan 26,4522 ± 0,3914

2. Uji aktivitas antioksidan yang paling baik adalah fraksi etil asetat

3. Aktivitas antioksidan antara ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air didapatkan hasil sangat kuat berasarkan hasil IC_{50} yang didapatkan.

B. Saran

Dilakukan lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat yang terdapat dalam bunga telang untuk pembuatan sediaan.

DAFTAR PUSTAKA

Andriani, D. dan Murtisiwi. L. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Bunga Telang (Clitoria ternatea L.) dengan Spektofotometri UV Vis. *Cendekia Journal of Pharmacy 2 (1). 2018. 32-38*

Anthika, B., P, S., Kusumocahyo, & Sutatanto, H. (2015). Ultrasonic approach in Clitoria ternatea (bufferfly pea) extraction in water and extract sterilization by ultrafiltration for eye drop active ingredient. *Procedia Chemistry, 16(6), 237-244.*

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M. & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry. 85(5): 957998

Aryantini, 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Aktif Terstandar Flavonoid Dari Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa blimbi L.,). *Jurnal Wiyata, Vol 4 No. 2*

Dalimartha, S. 2008. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid I*. Jakarta : Trubus Agriwidya

Dalimunthe, C.I., Yan R.V.S., Mochlisin A., Tumpal H.S., Hilda S.D. dan Diana A.B. 2016. Identifikasi dan Uji Metabolit Sekunder Bangun-bangun (Coleus amboinicus) Terhadap Penyakit Jamur Akar Putih (Rigiporus microporus) di Laboratorium. *Jurnal Penelitian Karet. 34(2): 189-200.*

Day, Jr. dan Underwood. 2002. *Analisa Kimia Kuantitatif*. Diterjemahkan oleh Pudjaatmaka. Edisi V. Jakarta: Erlangga

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Faisal, Hendri, 2019, Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Buah Okra (Abelmoschus esculentus L., Moench) Dengan Metode DPPH dan Metode ABTS, *Jurnal Regional Development Industry & Health Science, Technology and Art of Life*.

Gandjar, I.G dan Rahman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar: Yogyakarta. hal.220-296.

Hermani dan Rahardjo M. 2006. *Tanaman Antioksidan*. Jakarta: Penerbit Swadaya

Illing, I., Wulan S. dan Erfiana. 2017. Uji Fitokimia Ekstrak Buah Dengen. Jurnal Dinamika. *8(10): 66-84*

Gandjar,L.G. & Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Yogyakarta: pustaka Pelajar

Gandjar,L.G. & Rohman, A., 2007, *Analisis Obat secara Spektrofotometri dan Kromatografi*, Pustaka Belajar : Yogykarta.

Harborne.,J.B. 2006. *Metode Fitokimia*. Bandung: Penerbit ITB. hal.47, 69.

Imrawati, Mus.S,Gani.S.A, Bubua K.I, 2017, Antioxidant Activity of Ethyl Acetate Fraction of Muntingia calaburo L., Leaves, *Jurnal of Pharmaceutical and Medicinal Science.*

Kazuma K, Noda N, Suzuki M., (2003*). Flavonoid Composition Related To Petal Color In Different Lines of Clitoria ternatea, Phytoche*m. 64(6):1133-1139

Khaira, K. 2010. *Menangkal Radikal Bebas dengan Anti-Oksidan. Jurnal* Saintek. 11(2): 183-187. Khopkar, S.M. 2008. Konsep Dasar Kimia Analitik. Jakarta: UI Press.

Kokasih, E.N., Setiabudhi, T., dan Heryanto H. 2014. *Peranan Antioksidan pada Lanjut Usia.* Jakarta : Pusat Kajian Nasional Masalah Lanjut Usia

Kumalaningsih, S. 2006. *Antioksidan Alami*. Surabaya: Trubus Agrisarana. Hal 24

Marinova, D., Ribanova, F., Atanassova, M. 2005. Total Phenolics and Total Flavonoids in Bulgarian Fruits and Vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. (40): 255-260

Markham K.R, (1988), Cara Mengidentifikasi Flavonoid, Padmawinata K, penerjemah, Penerbit ITB, Bandung

Mastuti, R. 2013. *Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Celosia*. BioWallacea Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi. 2.(3). Hal.143-148

Mukhriani. 2014. *Ekstraksi, Pemisahan Senyawa Dan Identifikasi Senyawa Aktif.* Jurnal Kesehatan. 7(2):361-362

Nair, I. C., Jayachandran, K., Shashidhar, S. 2008. Biodegradation of Phenol. African Journal of Biotechnology. 7(25): 4951-4958

Prakash, A., Rigelhof, F. dan Miller, E. 2001. *Antioxidant Activity Medallion* Laboratories Analytical Progress. 10(2): 51-112.

Pulungan. 2018. Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan, Etil asetat dan Etanol Daun Mobe (*Artocarpus Lacucha Buch-Ham*) Dengan Metode ABTS.Universitas Sumatra Utara

Roberta, R., Nicoletta, P., Anna, P., Ananth, P., Min, Y.C., Rice, E. 1999. *Antioxidant activity applying an improved ABTS Radical cation decolorization assay. Free radical Biology and Medicine*. 26. pp.1232.

Robinson, T. 1991. Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi. Bandung: Penerbit ITB.

Rohman, A, 2009, Kimia Farmasi Analisis, Pustaka Pelajar; Yogyakarta

Rosidah, Yam, M.F., Sadikun, a., asmawi, M,Z. (2008*). Antioxidant Potential of Gynura procumbens*. Pharmaceutical Biology. 46(9): 616-625.

Sayuti, K., dan Yenrina, R. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Andalas University Press: Padang. hal.10-14.

Sangi, M., M.R.J. Runtuwene., H.E.I. Simbala., V.M.A. Makang. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di kabupaten Minahasa Utara. Chem. Prog. 1(1):47-53

Selawa W, Runtuwene MRJ dan Citraningtyas G. *Kandungan flavonoid dan kapasitas antioksidan total ekstrak etanol daun binahong*. 2013.

Septianingsih, D. 2010. Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus lamk*). Universitas Sebelas Marer Surakarta

Shalaby, E.A., and Shanab, S.M.M. 2013. *Antioxidant Compounds, Assays of Determination and Mode of Action.* AJPP. 7(10). pp.535-537.

Sirait, M. 2007. Penuntun Fitokimia dalam Farmasi. Bandung: Penerbit Institut Teknologi Bandung.

Stevi G.D., Katja G.D., dan Vanda S.,2012, *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fenolik dari Buah Manggi*s (Garcinia mangostana L). Fmipa, Unsrat, Manado

Sudirman, S. "Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Kangkung Air (Ipomoea aquatica Forsk.)". Skripsi. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB. 2011

Sudjarwo, G.W dan Hukmiyah Mas'uliyatul O.M. 2017, Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Rhizopora mucronata L, Universitas Hang Tuah Surabaya.

Suherman, A. 2013. *Daun Ki Pahit (Tithonia diversifolia) sebagai Sumber Antibakteri dan Antioksidan*. Skripsi tidak diterbitkan. Bogor. Fakultas MIPA IPB

Teow, C. C., Van-Den, Truong., McFeeters, R. F., Thompson, R L., Pecota, K, V., Yencho, G. C. 2007. *Antioxidant activities, phenolic and beta carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours*. Food Chemistry. 103: 829-838.

Winarsi,H. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta, 2007.

Wijaya, D.P., Paendong Jessy E., Abidjulu, J. 2014, Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Daun Nasi (Phrynium capitatum) dengan Metode DPPH (1,1difenil-2-pikrilhidrazil), Universitas Sam Ratulangi, Manado, Vol. 3 (1): 11-15

Yu lin,H. Kuo, Y.H.L and Chiang,W, 2009, Antioxidative Effect and Active Components From Leaves of Lotus . journal of Agricultural And Food Chemistry.