

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Buah Parijoto (*Medinilla speciosa Blume*) yang diekstrak dengan pelarut etanol 70% dan etanol 96% kemudian di uji aktivitas penurunan kadar glukosa dengan metode Nelson Somogyi dan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Juli 2021

2. Lokasi

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang
- b. Pembuatan ekstrak dan uji KLT buah parijoto dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo
- c. Uji aktivitas penurunan kadar glukosa ekstrak etanol buah parijoto dilakukan di Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini yaitu buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*) asal daerah Bandungan sedangkan sampel dari penelitian ini yaitu ekstrak etanol 70% dan 96% buah parijoto.

D. Definisi Operasional

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yaitu konsentrasi ekstrak etanol 70% dan 96% buah parijoto yang digunakan sebagai penurun kadar glukosa sebesar 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung yaitu persen penurunan kadar glukosa ekstrak etanol 70% dan 96% buah parijoto dengan metode Nelson Somogyi.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali yaitu lama dan suhu, *operating time* dan panjang gelombang uji aktivitas penurunan kadar glukosa.

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Bahan

Buah Parijoto, Etanol 70% (Teknis), Etanol 96% (Teknis), Etanol p.a (Merck), Kuersetin (Sigma), Rutin (Chemcruz), Ammonia (Merck), *n*-Butanol (Merck), Asam Asetat Glasial (Merck), Aquadest, Glukosa

Anhidrat (Merck), Reagen Nelson A, Reagen Nelson B, Reagen Arsenomolibdat.

2. Alat

Bejana maserasi, Oven (Memmert), *Rotary Evaporator* (RE 100-Pro), Lempeng KLT (Merck), Labu Ukur 5, 10, 50, dan 100 mL (Iwaki), Pipet Ukur 1, 5, dan 10 mL (Iwaki), Pipet Volume 1 dan 2 mL (Iwaki), Mikropipet 10-100 μL (Socorex), Mikropipet 1000 μL (Socorex), Pipet Tetes, Bulb (D&N), *Beaker glass* 100, 200, dan 500 mL (Iwaki), Erlenmayer 250 mL (Iwaki), Erlenmayer Bertutup 250 mL (Iwaki), Corong Gelas (Iwaki), *Waterbath* (Memmert), Cawan Porselin, Chamber, Kertas Saring, Timbangan Analitik (Ohaus), Tabung Reaksi (Iwaki), Rak Tabung, Penjepit Tabung, Spatula, Batang Pengaduk, Aluminium Foil (Klin Pak), Kapas (Lydia), Thermometer, *Blender* (Philips), Kompor Listrik (Maspion), Lampu UV₂₅₄ dan Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800).

F. Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan Bahan dan Determinasi tanaman

Buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*) didapatkan dari Bandungan pada bulan Mei 2021. Determinasi buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*) untuk membuktikan kebenaran simplisia adalah parijoto, maka dilakukan determinasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik

Fakultas Sains dan Matematika Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

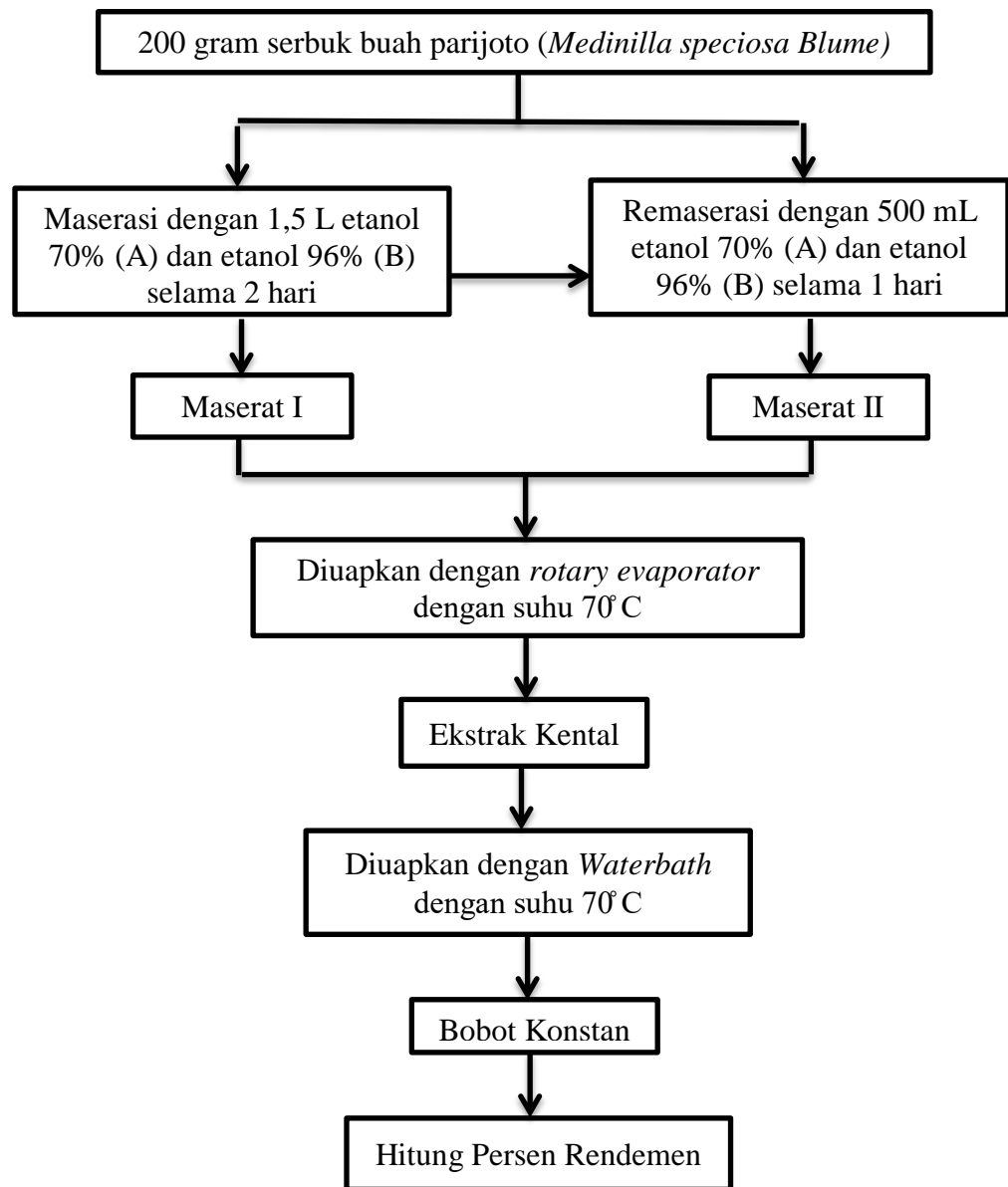
2. Pembuatan simplisia buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*)

Buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*) segar dicuci bersih dengan air mengalir dan dibersihkan dari kotoran atau bahan asing yang terdapat pada bahan uji lalu dikeringanginkan selama beberapa hari hingga buah sudah mengkerut kemudian di oven dengan suhu 40° C selama beberapa hari hingga buah kering. Buah parijoto digiling menggunakan *blender* menjadi serbuk simplisia halus.

3. Pembuatan ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*)

Serbuk simplisia buah parijoto sebanyak 200 gram dimaserasi dengan 2 L etanol 70% dan etanol 96% (1:10). Maserasi dilakukan dengan 1,5 L etanol 70% (A) dan etanol 96% (B) di dalam wadah terhindar cahaya selama 2 hari diaduk 1 x 24 jam lalu maserat yang didapat disaring dan diremaserasi dengan 500 mL etanol 70% (A) dan etanol 96% (B) selama 1 hari. Maserat yang didapatkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* suhu 70° C hingga ekstrak kental, lalu dilanjutkan dengan *waterbath* dengan suhu 70° C hingga bobot konstan dan hitung rendemennya. Pembuatan ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*) menggunakan metode yang telah dimodifikasi (Luhurningtyas, 2020).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Bobot sampel yang diekstraksi (g)}} \times 100\%$$



Gambar 3.1. Skema Pembuatan Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa Blume*)

4. Identifikasi Flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang telah dimodifikasi menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-bunatol : asam asetat glasial : aquadest (4:1:5) dengan baku pembanding kuersetin dan rutin. Penampakan bercak dengan uap ammonia yang terbentuk warna coklat dan kuning kehijauan pada sinar UV₂₅₄ menunjukkan adanya kandungan flavonoid pada buah parijoto (Vifta & Advistasari, 2018a).

5. Uji aktivitas penurunan kadar glukosa dengan metode Nelson Somogyi

a. Pembuatan Larutan Baku Glukosa 1000 ppm

Ditimbang seksama 50 mg glukosa anhidrat dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, lalu diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas.

b. Pembuatan Larutan Baku Glukosa 30 ppm

Dipipet sebanyak 300 μ L larutan baku glukosa 1000 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas.

c. Penentuan *Operating Time*

Dipipet 1 mL larutan baku glukosa 30 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan ditutup dengan kapas, dipanaskan di atas air mendidih menggunakan wadah besi dan ditutup dengan alumunium foil selama 10 menit suhu 96° C, didinginkan selama 5 menit (direndam dalam air). Lalu dipindahkan

ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat ke dalam labu tersebut dan diencerkan dengan aquadest hingga tanda batas, dikocok. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum selama 30 menit dengan interval waktu tiap 1 menit, sehingga didapat waktu optimum yang stabil. Penentuan *operating time* menggunakan metode yang telah dimodifikasi (Luhurningtyas, 2020).

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal Glukosa

Dipipet 1 mL larutan baku glukosa 30 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan ditutup dengan kapas, dipanaskan di atas air mendidih menggunakan wadah besi dan ditutup dengan aluminium foil selama 10 menit suhu 96° C, didinginkan selama 5 menit (direndam dalam air). Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat ke dalam labu tersebut dan diencerkan dengan aquadest hingga tanda batas, dikocok dan didiamkan selama waktu inkubasi (waktu yang didapatkan dari penentuan *operating time*). Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 700-800 nm. Penentuan panjang gelombang maksimal glukosa menggunakan metode yang telah dimodifikasi (Luhurningtyas, 2020).

e. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Deret standar glukosa 2, 9, 16, 23, dan 30 ppm dari larutan 1000 ppm. Sebanyak 20, 90, 160, 230, dan 300 μ L larutan glukosa 1000 ppm dipipet ke dalam labu ukur 10 mL, lalu diencerkan dengan

aquadest sampai batas, kemudian dipipet 1 mL dari larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan ditutup dengan kapas, dipanaskan di atas air mendidih menggunakan wadah besi dan ditutup dengan aluminium foil selama 10 menit suhu 96° C, didinginkan selama 5 menit (direndam dalam air). Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat ke dalam labu tersebut dan diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas, dikocok dan didiamkan selama waktu inkubasi. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pembuatan kurva standar glukosa menggunakan metode yang telah dimodifikasi (Luhurningtyas, 2020).

f. Pembuatan Larutan Kuersetin 1000 ppm

Ditimbang seksama 10 mg kuersetin dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas.

g. Uji Penurunan Kadar Glukosa Senyawa Pembanding Kuersetin

Larutan Kuersetin dibuat seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm dengan cara dipipet sebanyak 20, 40, 60, 80, dan 100 µL larutan kuersetin 1000 ppm dimasukkan ke labu ukur 10 mL lalu diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas.

Diambil masing-masing seri larutan kuersetin 2 mL ditambah 2 mL larutan baku glukosa konsentrasi 30 ppm ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 1 mL dari campuran larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 1 mL reagen Nelson ditutup dengan kapas,

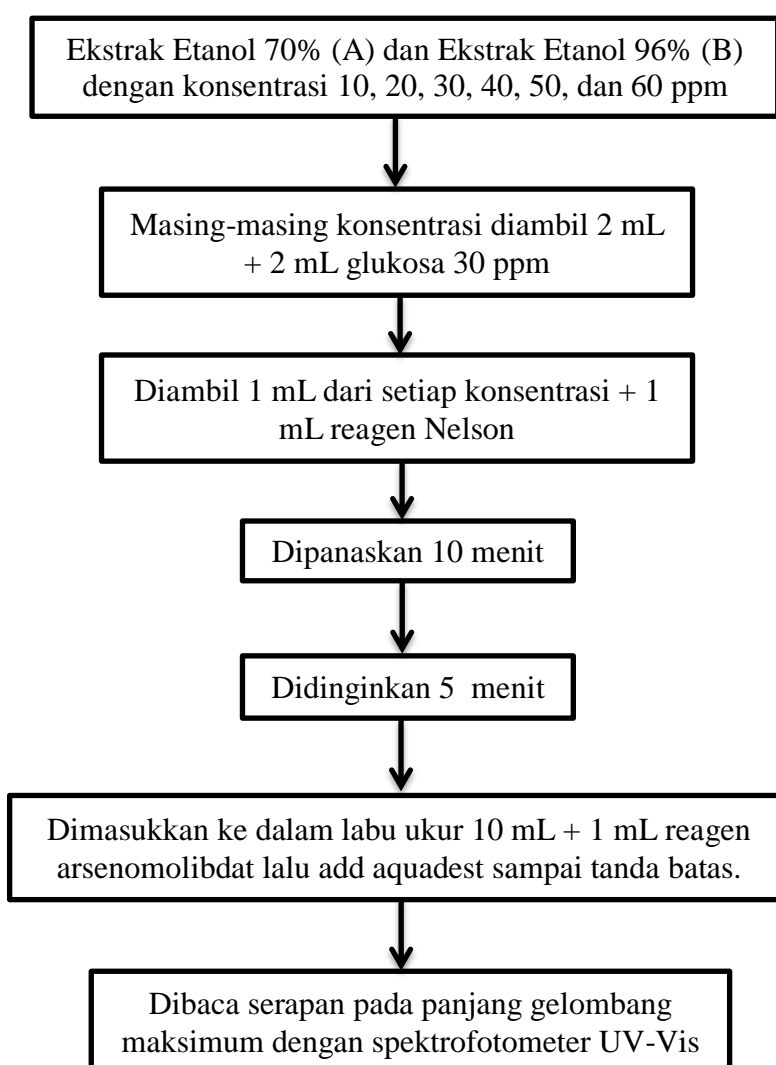
dipanaskan di atas air mendidih menggunakan wadah besi dan ditutup dengan aluminium foil selama 10 menit suhu 96° C, didinginkan selama 5 menit (direndam dalam air). Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambah 1 mL reagen arsenomolibdat ke dalam labu tersebut diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas, dikocok dan didiamkan selama waktu inkubasi. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal. Uji penurunan kadar glukosa senyawa pembanding kuersetin menggunakan metode yang telah dimodifikasi (Luhurningtyas, 2020).

h. Uji Penurunan Kadar Glukosa Buah Parijoto

Ekstrak etanol buah parijoto masing-masing dibuat seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm dengan cara dipipet sebanyak 100, 200, 300, 400, 500, dan 600 µL larutan ekstrak 1000 ppm dimasukkan ke labu ukur 10 mL lalu diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas.

Diambil masing-masing seri larutan ekstrak 2 mL ditambah 2 mL larutan baku glukosa konsentrasi 30 ppm ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 1 mL dari campuran larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 1 mL reagen Nelson ditutup dengan kapas, dipanaskan di atas air mendidih menggunakan wadah besi dan ditutup dengan aluminium foil selama 10 menit suhu 96° C, didinginkan selama 5 menit (direndam dalam air). Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambah 1 mL reagen arsenomolibdat ke dalam

labu tersebut encerkan dengan aquadest sampai tanda batas, dikocok dan didiamkan selama waktu inkubasi. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal. Uji penurunan kadar glukosa buah parijoto menggunakan metode yang telah dimodifikasi (Luhurningtyas, 2020).



Gambar 3.2. Skema Kerja Uji Penurunan Kadar Glukosa Buah Parijoto (*Medinilla speciosa Blume*)

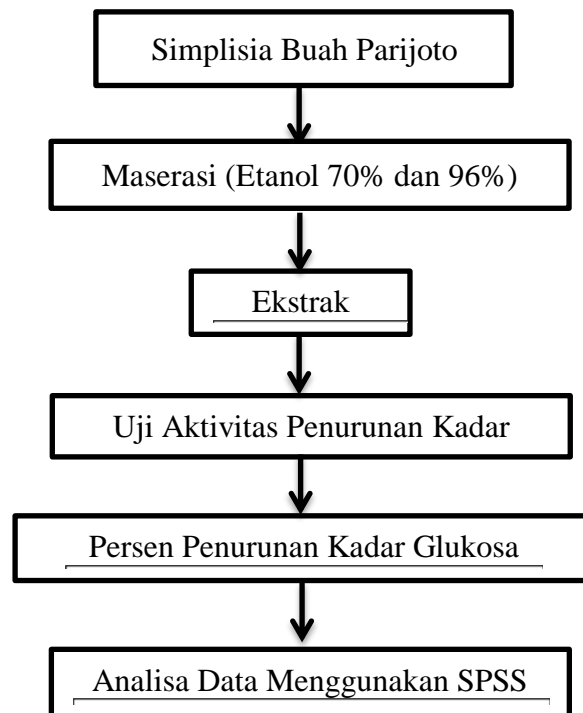
G. Analisis Data

Pengukuran aktivitas penurunan kadar glukosa ekstrak buah pariijoto diamati dengan spektrofotometer UV-Vis, dimana pertama-tama dilakukan pengukuran deret kurva baku glukosa dan didapat nilai absorbansi untuk membuat regresi linier dan mendapatkan persamaan $y = bx + a$. Perhitungan persentase penurunan kadar glukosa menggunakan persamaan

$$\text{Persen Penurunan Kadar Glukosa} = \frac{\text{Kadar Baku} - \text{Kadar Sampel}}{\text{Kadar Baku}} \times 100\%$$

Berdasarkan data penelitian yang diperoleh, kemudian di Uji T Berpasangan dengan SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) Versi 20. Analisa data menggunakan SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) Versi 20 diawali dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Uji normalitas dikatakan data terdistribusi normal jika nilai signifikansi $p > 0,05$. Pada Uji T Berpasangan (*Paired Samples T-Test*) dikatakan adanya perbedaan signifikan jika nilai signifikansi (*2-tailed*) $p < 0,05$. Uji T Berpasangan (*Paired Samples T-Test*) dilakukan untuk membandingkan rata-rata dua variabel dalam suatu grup sampel tunggal (Muhid, 2019).

H. Skema Penelitian



Gambar 3.3. Skema Uji Penurunan Kadar Glukosa Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)