

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental, dengan tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas dari ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) sebagai penurun kadar kolesterol secara in vitro dalam sediaan nanopartikel. Penelitian eksperimental adalah suatu penelitian dengan melakukan kegiatan percobaan yang memiliki tujuan untuk mengetahui gejala atau pengaruh yang ditimbulkan, sebagai akibat dari perlakuan tertentu atau eksperimen tersebut (Notoatmodjo, 2012).

B. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Instrumen Farmasi dan Laboratorium Farmasetika Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo pada bulan April-Juli 2021.

C. Alat dan Bahan

1. Alat yang digunakan dalam penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Blender, Seperangkat alat Refluks, Ayakan 40, Batang Pengaduk, neraca analitik, Tabung Reaksi, Pipet, Corong, Gelas Beaker, chamber wet dispersion, labu ukur, labu takar, Evaporator Rotary, magnetic stirrer,

spektrofotometri UV-VIS, Particle Size Analyzer (PSA), vortex, aluminium foil, kertas saring, serbet, tissue, dan spatula.

2. Bahan yang digunakan dalam penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ekstrak daun insulin (*Tithonia Diversifolia*), etanol 96%, Kitosan, NaTPP (Natrium Tripolifosfat), Aquades, asam klorida, magnesium, asam klorida 2 N, kloroform, pereaksi Dragendorff dan Mayer, NaCl 10%, FeCl₃ 1%, serbuk kolesterol, asam asetat anhidrat 2,0 ml dan 0,1 ml H₂SO₄.

D. Penyiapan sampel

Penyiapan sampel meliputi pengambilan sampel, determinasi tumbuhan, dan pengolahan sampel.

1. Pengambilan sampel

Daun Insulin (*Tithonia Diversifolia*) diperoleh dari daerah Magelang, Provinsi Jawa Tengah. Pengambilan tumbuhan dilakukan dengan cara sengaja (purposif) dan tidak membandingkan dengan tumbuhan sama yang berasal dari daerah lain.

2. Determinasi tumbuhan

Determinasi bahan tumbuhan daun insulin (*Tithonia Diversifolia*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi FSM Universitas Diponegoro, Semarang.

3. Pengolahan Sampel

Pilih daun insulin hijau segar tanpa bagian kering, lalu lakukan sortasi basah. Kemudian bilas daun insulin dengan air mengalir sampai bersih dan tiriskan airnya. Daun insulin (*Tithonia diversifolia*) kemudian ditutup dengan kain hitam dan dikeringkan/dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung, kemudian disortir dan dikeringkan. Giling daun insulin kering (*Tithonia diversifolia*) dengan blender hingga halus. Gunakan ayakan ukuran 40 mesh untuk mengayak serbuk agar diperoleh serbuk daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang lebih halus (Notoatmodjo, 2012).

E. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Serbuk daun insulin sebanyak 1800 gram yang telah diblender dan diayak, dilarutkan dalam etanol 96%. Pelarut yang digunakan sebanyak 5.400 mL (1 : 3). Refluks dilakukan 4 jam selama 5 hari, dengan suhu 80 °C, Ekstrak cair hasil refluks yang diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40-60 °C hingga diperoleh ekstrak (Notoatmodjo, 2012).

F. Penetapan Kadar Air

Dilakukan dengan menggunakan alat *moister balance*. Sebanyak 3 gram serbuk tanaman insulin dan 3 gram ekstrak kental daun insulin ditimbang dengan seksama, dimasukkan kedalam alat *moister balance* yang sebelumnya sudah disetarakan. Setelah itu, baca hasil yang terdapat pada layar (Jamaliah, 2011).

G. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan menambahkan 5 tetes H₂SO₄ pekat dan 2 ml larutan kalium dikromat, adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan adanya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Jamaliah, 2011).

H. Uji Kandungan Kimia Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Pengujian kandungan kimia daun insulin meliputi identifikasi uji flavonoid, saponin, alkaloid, tannin dan fenolik (Tarigan *et al*, 2018).

1. Uji Flavonoid

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg, ditambahkan 20 mL etanol dan dipipet 10 mL ke dalam tabung reaksi lain. Campuran ditambahkan 10 tetes asam klorida pekat, 3-4 butir magnesium. Tabung reaksi dikocok beberapa saat dan diamati terjadinya perubahan. Apabila terjadi pembentukan atau perubahan warna merah, kuning atau jingga menunjukkan reaksi positif terhadap flavonoid (Sekhon, 2012).

2. Uji Saponin

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas. Selanjutnya di kocok kuat selama 10 detik, akan terbentuk buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 30 menit, dan tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Sekhon, 2012).

3. Uji Alkaloid

Masing-masing ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) ditimbang 10 mg kemudian ditambahkan 10 mL kloroform diaduk rata. Campuran disaring ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 mL HCl 2N dan dikocok baik-baik, dibiarkan beberapa saat. Lapisan yang terbentuk diuji dengan pereaksi Dragendorff dan Mayer. Hasil positif apabila terbentuk endapan kuning jingga (orange) atau merah dengan pereaksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Mayer (Sekhon, 2012).

4. Uji Tanin

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) ditimbang 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas dan 5 tetes larutan NaCl 10%. Campuran dibagi menjadi 2 tabung reaksi, tabung pertama sebagai kontrol dan tabung kedua ditambahkan larutan FeCl₃ 1% 3 tetes. Hasil positif apabila terbentuk warna biru atau biru hitam (Sekhon, 2012).

5. Uji Fenolik

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) ditimbang 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas dan 5 tetes larutan NaCl 10%. Campuran dibagi menjadi 2 tabung reaksi, tabung pertama sebagai kontrol dan tabung kedua ditambahkan larutan FeCl₃ 1% 3 tetes. Hasil positif apabila terbentuk warna biru atau biru hitam (Sekhon, 2012).

I. Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia Diversifolia*)

1. Pembuatan Larutan Kitosan 0,8%

Sebanyak 0,8 gram kitosan dilarutkan dalam 100 mL asam asetat glacial 5% dan di aduk dengan magnetik stirrer hingga kitosan larut (Rismana, 2014).

2. Pembuatan Larutan Natrium Tripolifosfat 0,1%

Sebanyak 0,035 gram natrium tripolifosfat dilarutkan dalam 350 mL aquades dan diaduk dengan magnetik stirrer hingga larut (Rismana, 2014).

3. Pembuatan nanopartikel ekstrak etanol daun insulin (*Tithonia diversifolia*)

Pembuatan nanopartikel ekstrak etanol daun insulin dengan menimbang 0.1 g ekstrak etanol daun insulin. Ekstrak etanol daun insulin kemudian dilarutkan dalam etanol 96% 5 mL dalam gelas beaker dan ditambahkan dengan larutan kitosan 0.8% dengan volume 100 mL. Kemudian secara bertahap kedalam campuran tersebut ditambahkan natrium tripolifosfat 0.01% dengan volume 350 mL disertai pengadukan menggunakan magnetik stirrer dengan kecepatan 1.500 rpm selama 2 jam. Kemudian nanopartikel ekstrak etanol daun insulin disaring menggunakan kertas saring. Kemudian diukur pada spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang 650 nm. Supernatan yang diperoleh berupa suspensi nanopartikel ekstrak etanol daun insulin kemudian dilakukan karakterisasi PSA dan % trasmitan (Rismana, 2014).

J. Karakterisasi Nanopartikel Daun Insulin

1. Ukuran dan Distribusi Partikel

Sampel nanopartikel ekstrak etanol daun insulin dilakukan pengukuran *Full range* menggunakan alat PSA (*Particel size analyzer*) dengan cara dimasukkan ke dalam cuvet hingga terisi 2/3 cuvet kemudian dilakukan pengecekan.

2. Persen Transmittan (% Transmittan)

Sebanyak 1 ml nanopartikel ekstrak daun insulin ditambahkan aquades hingga volume akhir 50 mL. Homogenisasi dilakukan dengan bantuan *magnetic stirrer* selama 30 detik. Nanopartikel ekstrak daun insulin kemudian diukur transmittannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm (Rismana, 2014).

K. Uji In Vitro Penurunan Kadar Kolesterol

1. Pembuatan Larutan Baku Kolesterol

Larutan induk kolesterol dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm yaitu dengan melarutkan 100 mg serbuk kolesterol dalam 100 ml etanol pa 96% pada suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ diatas waterbath, sesekali diaduk hingga larut.

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Kolesterol

Larutan standar kolesterol dengan konsentrasi 100 ppm, lapisan luar tabung ditutup dengan alumunium foil untuk melindungi dari cahaya, kemudian direaksikan dengan asam asetat anhidrat 2,0 ml dan 0,1 ml H_2SO_4 . Kemudian didiamkan selama 15 menit. Dilakukan pengukuran

menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 400-800 nm.

3. Penentuan Operating Time

Larutan induk kolesterol 1000 ppm sebanyak 0,5 ml dimasukkan dalam labu ukur 5 ml, dan dicukupkan dengan etanol 96%, kemudian direaksikan dengan asam asetat anhidrat 2,0 ml dan 0,1 ml H₂SO₄. Diukur tiap 2 menit mulai dari menit ke 10 sampai 30 menggunakan panjang gelombang maksimal.

4. Pembuatan Kurva Standar

Larutan induk kolesterol konsentrasi 1000 ppm dibuat menjadi 7 seri konsentrasi yaitu 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm. Masing-masing larutan tersebut ditambahkan asam asetat anhidrat 2,0 ml dan 0,1 ml H₂SO₄. Kemudian dihomogenkan dengan vortex, lapisan luar tabung ditutup menggunakan aluminium foil dan didiamkan selama 15 menit dan diukur absorbansinya menggunakan panjang gelombang maksimum.

5. Penentuan Aktivitas Penurun Kadar Kolesterol

Dari konsentrasi 1000 ppm nanopartikel ekstrak daun insulin dibuat seri konsentrasi 50, 70, 100, 125, dan 150 ppm. Masing-masing konsentrasi diambil 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml baku kolesterol dengan konsentrasi 200 ppm dalam etanol 96%. Diambil 5 ml dari campuran tersebut, divortex selama 2 menit kemudian ditambahkan 2 ml asam asetat anhidrat dan 0,1 ml H₂SO₄ pekat. Larutan didiamkan di tempat gelap selama 15 menit hingga terbentuk

perubahan warna menjadi hijau. Hasil warna yang diperoleh dibaca dengan spektrofotometer uv-vis.