

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Metode desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental, dengan tujuan untuk memberikan informasi mengenai senyawa flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan dalam ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dalam sediaan nanopartikel. Penelitian eksperimental merupakan suatu penelitian dengan melakukan kegiatan percobaan yang memiliki tujuan untuk mengetahui pengaruh atau gejala yang ditimbulkan, disebabkan akibat dari perlakuan tertentu atau eksperimen tersebut (Notoatmodjo, 2010).

#### **B. Lokasi Penelitian**

##### 1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Juli 2021.

##### 2. Lokasi Penelitian

- a. Lokasi Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi FSM Universitas Diponegoro.
- b. Lokasi penelitian pengujian skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Lokasi penelitian pengujian aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Instrumen Fakultas Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

## **C. Alat dan Bahan**

### **1. Alat yang digunakan dalam penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ayakan 40, Blender Cosmos, Batang Pengaduk, neraca analitik OHAUS, Tabung Reaksi IWAKI, Pipet tetes, Corong kaca IWAKI, Gelas Beaker HERMA, *chamber wet dispersion*, labu ukur IWAKI, pipet ukur 10 ml IWAKI, pipet ukur 1 ml PYREX, Evaporator Rotary HOT PLATE MASPION, magnetic stirrer CIMAREC, *Particle Size Analyzer* (PSA) Malvern, *Moisture Analyzer* OHAUS, cuvet HELMA, spektrofotometri UV-VIS Shimadzu, rubber bulb D&N, kertas saring, serbet, tissue, dan spatula.

### **2. Bahan yang digunakan dalam penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun insulin (*Tithonia diversifolia*), etanol 96% (Nissichem), Kitosan (Aldrich), Asam Askorbat (Emsure), NaTPP (Natrium Tripolifosfat) (Carfosel), Aquades (Shagufta), asam klorida (Emsure), asam klorida 2N (Emsure), HCL 2N (Emsure), pereaksi Dragendorff dan Mayer (Emsure), NaCl 10% (Emsure), FeCl<sub>3</sub> 1% (Emsure), asam asetat glacial 5% (Emsure), serbuk DPPH (Aldrich).

## **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 hasil dari ekstrak daun insulin dengan ekstrak daun insulin dari tumbuhan yang 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**

Daun insulin dipetik dalam kondisi segar, berwarna hijau dan belum terdapat bagian yang kering, setelah itu dilakukan sortasi basah. Kemudian daun insulin dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan airnya ditiriskan. Daun insulin (*Tithonia diversifolia*), kemudian dikeringkan/dijemur di bawah sinar matahari secara tidak langsung dengan cara ditutup dengan kain hitam, kemudian disortasi kering. Daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang sudah kering diserbuk dengan cara di blender sampai halus. Serbuk diayak menggunakan ayakan dengan derajat kehalusan 40 mesh agar memperoleh serbuk daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang lebih halus (Ningsih *et al*, 2017).

### **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 6000 ml (1 : 3). Proses perolehan filtrat dilakukan dengan metode refluks dengan waktu 4 jam selama 5 hari, dengan suhu 80°C. Pemilihan metode refluks dikarenakan oleh metode refluks menghasilkan rendemen yang lebih besar (Apriliana *et al.*, 2019) Ekstrak diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40-60°C dan di lanjutkan dengan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental (Ningsih *et al.*, 2017).

### **F. Uji Kandungan Kimia Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)**

Pengujian kandungan kimia daun insulin meliputi identifikasi uji flavonoid, saponin, alkaloid, tannin dan fenolik (Tarigan *et al.*, 2008).

#### **1. Uji Flavonoid**

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

#### **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, dan akan terbentuk buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 30 menit, dan buih tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin.

### **3. Uji Alkaloid**

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

### **4. Uji Tanin**

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) masing-masing ditimbang 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas lalu ditetesi larutan NaCl 10% 5 tetes. Campuran dipisah menjadi 2 tabung reaksi, tabung pertama sebagai kontrol dan tabung kedua ditambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  1% 3 tetes. Hasil positif terhadap tanin apabila terbentuk warna biru atau biru hitam.

### **5. Uji Fenolik**

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) masing-masing ditimbang 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas dan ditetesi larutan NaCl 10% sebanyak 5 tetes. Campuran dibagi menjadi 2 tabung reaksi, tabung pertama sebagai kontrol dan tabung kedua ditambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  1%

3 tetes. Hasil positif terhadap fenolik apabila terbentuk warna biru atau biru hitam.

#### **G. Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)**

##### **1. Pembuatan Larutan Kitosan 0,08% (Ningsih *et al.*, 2012).**

Sebanyak 0,08 gram serbuk kitosan yang dilarutkan dalam 100 mL larutan asam asetat glacial 5% dan di aduk dengan magnetik stirrer hingga kitosan larut.

##### **2. Pembuatan Larutan Natrium Tripolifosfat 0,01% (Ningsih *et al.*, 2012).**

Sebanyak 0,035 gram serbuk NaTPP (natrium tripolifosfat) dilarutkan dalam 350 mL aquades dan dihomogenkan dengan magnetik stirrer hingga larut.

##### **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 0.08% 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 1500 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 % transmittan.

## H. Karakterisasi Nanopartikel Daun Insulin

### 1. Ukuran dan Distribusi Partikel

Sampel nanopartikel ekstrak etanol daun insulin dilakukan pengukuran *Full range* dengan cara dimasukkan ke dalam *chamber wet dispersion* unit yang berisi aquades hingga warna indikator pada PC menunjukkan warna hijau pada rentang skala 10-12 secara stabil dan ditunggu beberapa menit selama proses berlangsung.

### 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 (Nurtiyani dan Ratna, 2017).

## I. Pembuatan DPPH (0,04 mM)

### 1. Penimbangan

Molaritas DPPH yang dibutuhkan adalah  $0,04 \text{ mM} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

BM (Berat Molekul) DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 ml = 0,1 liter

Penimbangan DPPH = BM DPPH x Vol larutan x Molaritas DPPH

=  $394,32 \text{ g/mol} \times 0,1 \text{ L} \times 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

$$= 15,8 \times 10^{-3} \text{ g} \rightarrow 15,8 \text{ mg}$$

## 2. Cara pembuatan larutan DPPH

Ditimbang serbuk DPPH dengan seksama sebanyak 15,8 mg, dimasukkan dalam labu takar 100 ml, dilarutkan dengan etanol sampai tepat 100 ml gojog ad homogen sehingga didapatkan konsentrasi 0,4 mM (Prasditya, 2017).

## J. Pengujian DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil*)

### 1. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Sebanyak 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM, ditambahkan dengan 4,0 mL etanol p.a sampai batas pada labu ukur 5 ml lalu didiamkan selama menit tertentu ditempat yang gelap, absorbansi diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450-550 nm untuk memperoleh absorbansi  $\pm 0,2-0,8$ . Panjang gelombang yang memperoleh absorbansi paling tinggi merupakan panjang gelombang yang maksimal (Molyneux, 2004).

### 2. Penentuan operating time DPPH

Penentuan operating time dilakukan dengan cara 1 ml larutan DPPH 0,4 mM 1 mL larutan standar vitamin C 6 ppm ditambahkan dengan etanol pa sampai tanda batas pada labu ukur 5 ml. Larutan tersebut kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang paling stabil (Bakti *et al.*, 2017).

### 3. Pembuatan larutan vitamin C sebagai pembanding

Larutan seri kadar dibuat dengan menggunakan vitamin C sebagai baku standar dengan kadar 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Sebanyak 1 ml larutan standar 0,4 mM, ditambahkan 1 ml larutan standar vitamin C kemudian diadkan dengan etanol pa sampai tanda batas pada labu ukur 5 ml, lalu didiamkan pada tempat yang terlindung dari cahaya selama operating time yang telah diperoleh. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Bakti *et al.*, 2017).

### K. Penentuan aktivitas antioksidan nanopartikel ekstrak daun insulin

Ekstrak etanol 96% nanopartikel ekstrak daun insulin 10 mg dilarutkan dalam etanol p.a 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm (Prasditya, 2017). Larutan nanopartikel ekstrak 1000 ppm dibuat konsentrasi dengan kadar seri 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm (Bakti *et al.*, 2017). Dari masing-masing konsentrasi diambil 1 ml ditambahkan sebanyak 1 ml larutan DPPH 0,4 mM ditambahkan dengan etanol pa dalam labu takar 5 ml. Larutan didiamkan pada tempat yang terlindung dari cahaya selama operating time yang diperoleh. Larutan dibaca absorbansi pada panjang gelombang yang diperoleh (Prasditya, 2017).

Perhitungan potensi antioksidan dengan pereaksi DPPH dilakukan dengan menghitung  $IC_{50}$  untuk masing-masing sampel dengan menggunakan rumus persamaan garis regresi linear yang hasilnya diperoleh dari grafik hubungan antara konsentrasi dengan % perendaman DPPH ekstrak etanol.

$$\% \text{ peredaman DPPH} = \frac{(\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban sampel})}{\text{Absorban kontrol}} \times 100\%$$

**Keterangan :****Absorbansi Kontrol : absorbansi DPPH****Absorbansi Sampel : absorbansi nanopartikel ekstrak daun insulin dan pembanding quersetin.**

Setelah didapatkan persentase inhibisi ( $IC_{50}$ ) dari masing-masing konsentrasi yang telah diperoleh, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai  $IC_{50}$  dimana x sebagai konsentrasi (ppm) dan y sebagai persentase inhibisi (%).  $IC_{50}$  sampel dan pembanding diperoleh dengan rumus ;  $Y = B x + A$

Dari data presentase peredaman penangkapan radikal bebas dihitung persamaan regresinya untuk mendapatkan nilai  $IC_{50}$ .