

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental laboratorium. Daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) yang telah di ekstrak dengan pelarut etanol 96% kemudian dibuat nanopartikel dengan metode gelas ionik menggunakan kitosan. Kemudian di uji aktivitasnya sebagai penurun kadar glukosa dengan menggunakan metode *Nelson-Somogyi* dan dibaca absorbansinya dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.

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

##### 1. Lokasi penelitian

- a. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- b. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro (UNDIP) untuk mengetahui kebenaran labu kuning (*Cucurbita maxima* D.).
- c. Uji kualitatif dan kuantitatif flavonoid dan penentuan kadar flavonoid total dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Univeristas Ngudi Waluyo.

- d. Pembuatan ekstrak nanopartikel daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- e. Uji *in vitro* penurunan kadar glukosa nanopartikel ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) dengan metode *Nelson-Somogyi* di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

### **C. Subjek Penelitian**

Subjek dalam penelitian ini menggunakan daging buah labu kuning yang diambil dari daerah Kopeng, Salatiga. Karakteristik pemilihan buah yang digunakan yaitu memiliki kulit yang berwarna kuning kecoklatan, daging buah berwarna orange, biji berbentuk pipih, tekstur daging keras dan sedikit berair.

### **D. Variabel Penelitian**

#### 1. Variabel Bebas

Konsentrasi nanopartikel ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) 60, 80, 100, 120, 140 dan 160 ppm yang digunakan.

#### 2. Variabel Tergantung

Penurunan kadar glukosa nanopartikel ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) yang diukur dengan reagen Nelson Somogyi.

#### 3. Variabel Terkendali

Simplisia daging buah labu kuning yang diambil dari daerah Kopeng, Salatiga yang sudah siap panen, yaitu sekitar umur 50-60 hari dan cara pembuatan ekstrak daging buah labu kuning.

## E. Pengumpulan Data

### 1. Pengumpulan Bahan

Buah labu kuning (*Cucurbita Maxima D*) yang digunakan pada penelitian ini diambil dari daerah Kopeng, Salatiga.

### 2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro (UNDIP) untuk mengetahui kebenaran labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) yang akan digunakan pada penelitian dan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan utama penelitian dan mencegah kemungkinan tercampur dengan tanaman lain.

### 3. Penyiapan Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, baskom, blender, timbangan, kain flanel, batang pengaduk, ayakan no 30, gelas ukur, waterbath, mikropipet, spektrofotometer, *magnetic stirrer*, PSA (*particle size analyzer*), mikroskop, rotary evaporator, labu takar, tabung reaksi, mikropipet BioHit 1000 $\mu$ L, pipet ukur, spatula, vial, dan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV Mini 1240.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*), etanol teknis 96%, aquades, n-heksana dari (Bratachem), etil asetat (Merck®), NaOH (Merck®), NaCl 10% (Merck®), FeCl<sub>3</sub> 1% (Merck®), pereaksi dragendorff, mayer, HCl p.a (Merck®), HCl 2 N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Pekat (Merck®), kloroform (Merck®), asam

asetat glasial, Sodium Tripolifosfat (STPP) foodgrade, kitosan, reagen Nelson, reagen arsenomolibdat.

#### 4. Penyiapan Simplisia

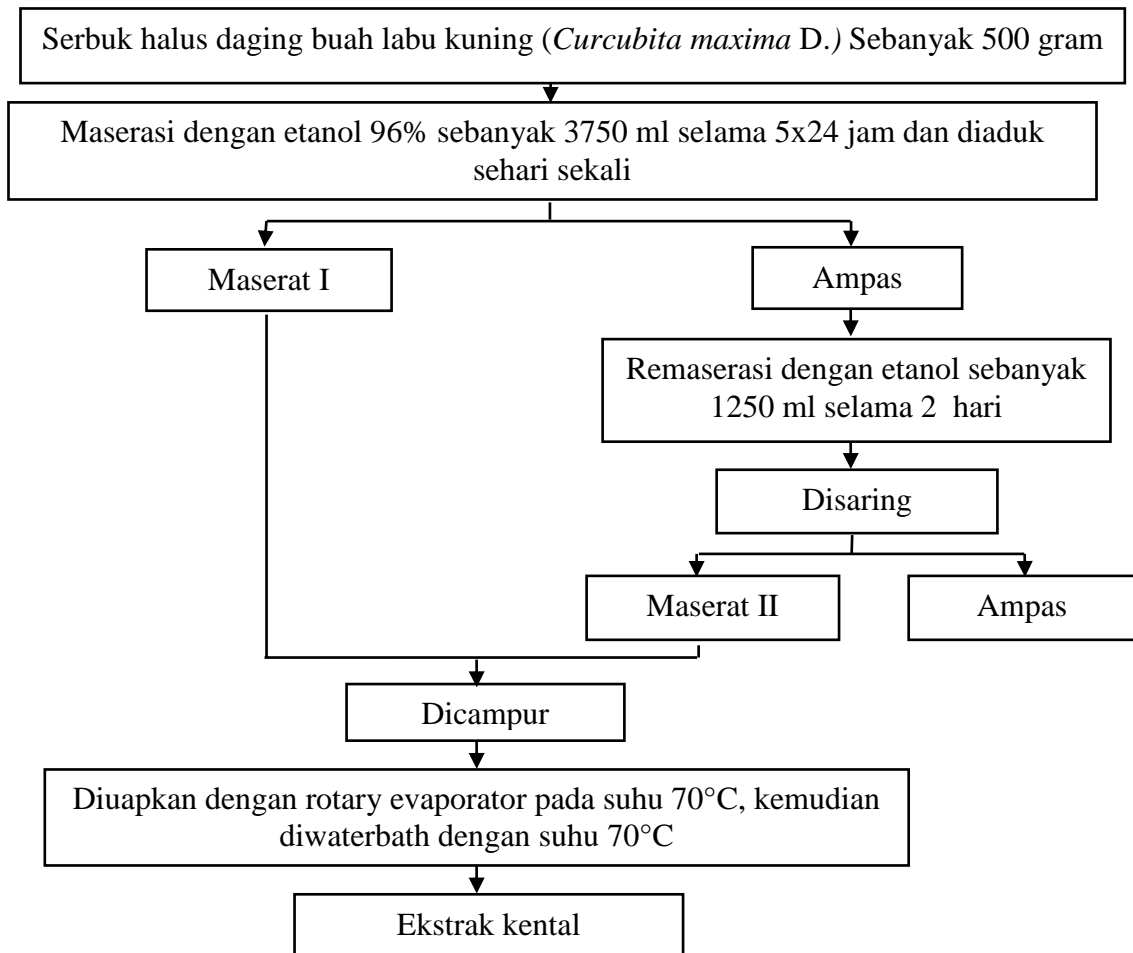
Buah Labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) diperoleh dari daerah Kopeng Salatiga. Kemudian Buah labu kuning yang masih segar dicuci bersih dengan air yang mengalir, kemudian dilakukan pengupasan kulit buah dan dipotong menjadi beberapa bagian. Daging buah yang akan digunakan dalam penelitian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Selanjutnya dilakukan pencucian kembali untuk menghilangkan kotoran yang mungkin masih melekat pada daging buah labu kuning. Daging buah kemudian diiris tipis-tipis dan dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung dengan ditutupi kain hitam. Setelah kering, dilakukan sortasi kering, kemudian daging buah labu kering dibuat serbuk dengan cara diblender sampai halus dan diayak dengan ayakan no. 30 mesh.

#### 5. Pembuatan ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.)

Ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) dibuat dengan metode maserasi. Tahap pertama dilakukan dengan cara menimbang 500 gram serbuk simplisia. Pelarut ditambahkan dengan perbandingan 1:10 yaitu 500 gram simplisia: 5000 mL etanol 96%. Pelarut pertama 3750 mL sisanya 1250 mL untuk remaserasi. Ekstraksi dilakukan selama 5x24 jam dengan dilakukan pengadukan setiap hari sehari sekali dalam ruangan yang terlindung dari sinar matahari kemudian

aduk hingga seluruh serbuk kasar terbasahi merata dengan pelarut. Kemudian ekstrak yang diperoleh dari maserat pertama disaring menggunakan kain flannel. Setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dilakukan remaserasi. Remaserasi menggunakan sisa dari pelarut etanol 96% 1250 mL, kemudian maserat dipindah dalam bejana tertutup dibiarkan di tempat sejuk dan terlindung dari sinar matahari selama 2 hari dengan dilakukan pengadukan sehari sekali. Maserat pertama dan maserat kedua yang telah dikumpulkan dan selanjutnya diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 70°C dan dipekatkan dengan waterbath suhu 70°C hingga diperoleh ekstrak kental dan hitung rendemennya. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak pekat (g)}}{\text{bobot bahan sampel (g)}} \times 100\%$$



**Gambar 3.1 Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Daging Buah Labu kuning (*Cucurbita maxima* D.)**

## 6. Skrining Fitokimia

Uji flavonoid dan terpenoid dengan Kromatografi Lapis Tipis

### a) Uji Flavonoid

Uji Flavonoid dengan penyiapan fase diam Silica gel GF 254/plat KLT terlebih dahulu diaktifkan dengan oven pada suhu 105°C selama 10 menit sebelum dilakukan penotolan sampel. Fase gerak butanol - asam asetat glacial - air (2:1:1), dengan penampak

noda uap ammonia. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna kuning coklat setelah diuapi ammonia pada pengamatan dengan sinar tampak dan berwarna biru pada UV 366 nm dan 264 nm serta nilai RF 0,54 – 0,92 menegaskan adanya kandungan flavonoid (Marliana, Venty, & Suyono, 2005)

b) Uji Terpenoid/Steroid

Fase gerak yang digunakan adalah kloroform-metanol (9:1) dengan penampak noda pereaksi Liberman-Buchard disertai dengan pemanasan pada suhu 105°C selama 5 menit. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya noda berwarna hijau-biru pada sinar tampak 264 nm dan 366 nm serta nilai RF 0,39-0,96 (Yuda, Erna, & Ni Luh, 2017)

7. Pembuatan Nanopartikel

a. Pembuatan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Daging Buah Labu Kuning (*Cucurbita maxima* D.) (Ningsih, Yasni, & Yuliani, 2017).

1. Pembuatan larutan asam asetat glacial 1% v/v, yaitu dengan mengukur 1 ml asam asetat glacial p.a dimasukkan dalam labu ukur kemudian ditambahkan aquabidest ad 100 ml.
2. Pembuatan larutan kitosan 0,2% yaitu dengan menimbang 200 mg kitosan dan dilarutkan dengan larutan asam asetat glacial 1% sampai volume 100 ml dan distirer  $\pm$  20 menit sampai kitosan benar-benar larut.

3. Pembuatan larutan STPP 0,1% yaitu dengan menimbang STPP sebanyak 100 mg dan dilarutkan dalam aquades sebanyak 100 ml, distirer  $\pm$  20 menit hingga benar-benar terlarut.
  4. Pembuatan larutan ekstrak etanol daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) yaitu dengan menimbang 0,2 gram ekstrak dan dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 50 ml, distirer  $\pm$  20 menit hingga benar-benar terlarut kemudian disaring
  5. Pembuatan sediaan nanopartikel yaitu dengan mencampur larutan kitosan sebanyak 50 ml dan larutan ekstrak 25 ml dengan distirer  $\pm$  20 menit, kemudian secara bertahap dalam pencampuran tersebut ditambahkan larutan STPP 25 ml sedikit demi sedikit sambil distirer dengan kecepatan 400 rpm selama 20 menit pada suhu 60°C sampai terbentuk koloid nanopartikel.
- b. Karakteristik Nanopartikel Kitosan Ekstrak Daging Buah Labu Kuning (*Cucurbita maxima* D.)
1. Perhitungan Persen Transmittan (%T)

Sebelum dilakukan analisis terhadap larutan sampel (larutan hasil nano ekstrak daging buah labu kuning), dilakukan pemindaian serapan pada panjang gelombang 650 nm larutan nano ekstrak daging buah labu kuning (*Curcubita maxima* D.) pada instrument UV-Vis dengan menggunakan blanko (Yasin, 2013). Setelah itu, dilakukan pemindaian larutan sampel pada rentang panjang gelombang yang sama. Dari hasil pengukuran



spektrofotometri didapatkan nilai persen transmittan yang menandakan pembentukan nanopartikel yang baik dilihat dengan % transmittan yang >95%.

## 2. Ukuran dan Distribusi Ukuran Nanopartikel

Ukuran dan distribusi nanopartikel diukur menggunakan Particle Size Analyzer (PSA) menggunakan prinsip Photon Correlation Spectroscopy dan Electrophoretic Light Scattering. Rentang pengukuran dengan alat ini yaitu 0,6  $\mu\text{m}$  – 7 nm (Coulter, 2008). Konsepnya bahwa partikel kecil dalam suspensi bergerak dengan pola secara acak, kemudian sinar laser menyinarinya. Semakin besar ukuran partikel, semakin lambat Gerak Brown.

### c. Uji Flavonoid Total

Uji flavonoid total dilakukan dengan cara menentukan panjang gelombang maksimum kuersetin yang digunakan, selanjutnya dilakukan penentuan Operating time kuersetin. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh. Setelah itu menentukan kurva baku kuersetin yang hasilnya dibaca pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Langkah terakhir yaitu menentukan kadar flavonoid total dari nanopartikel ekstrak daging buah labu kuning.

## 8. Uji Antidiabetes In Vitro Metode Nelson somogyi

### a. Pembuatan larutan baku glukosa 40 ppm

Baku D-glukosa anhidrat ditimbang sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 100 ml akuades sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm, kemudian dipipet 4 ml dari larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

### b. Pengukuran Uji Antidiabetes secara In Vitro

#### 1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Dipipet 1 mL dari larutan baku 40 ppm tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1 mL reagen nelson dan ditutup dengan kapas, kemudian dipanaskan di atas air mendidih selama 10 menit. Larutan didinginkan selama 5 menit lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL secara kuantitatif, kemudian ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat ke dalam labu tersebut lalu diencerkan dengan akuades sampai batas, dikocok dan didiamkan selama waktu inkubasi. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-780 nm.

#### 2) Penentuan *Operating Time*

*Operating time* adalah waktu yang dibutuhkan untuk bereaksi hingga membentuk produk yang stabil. Sebanyak 5 mL larutan baku glukosa 80 ppm dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu diencerkan sampai batas, kemudian dipipet 1 mL dari

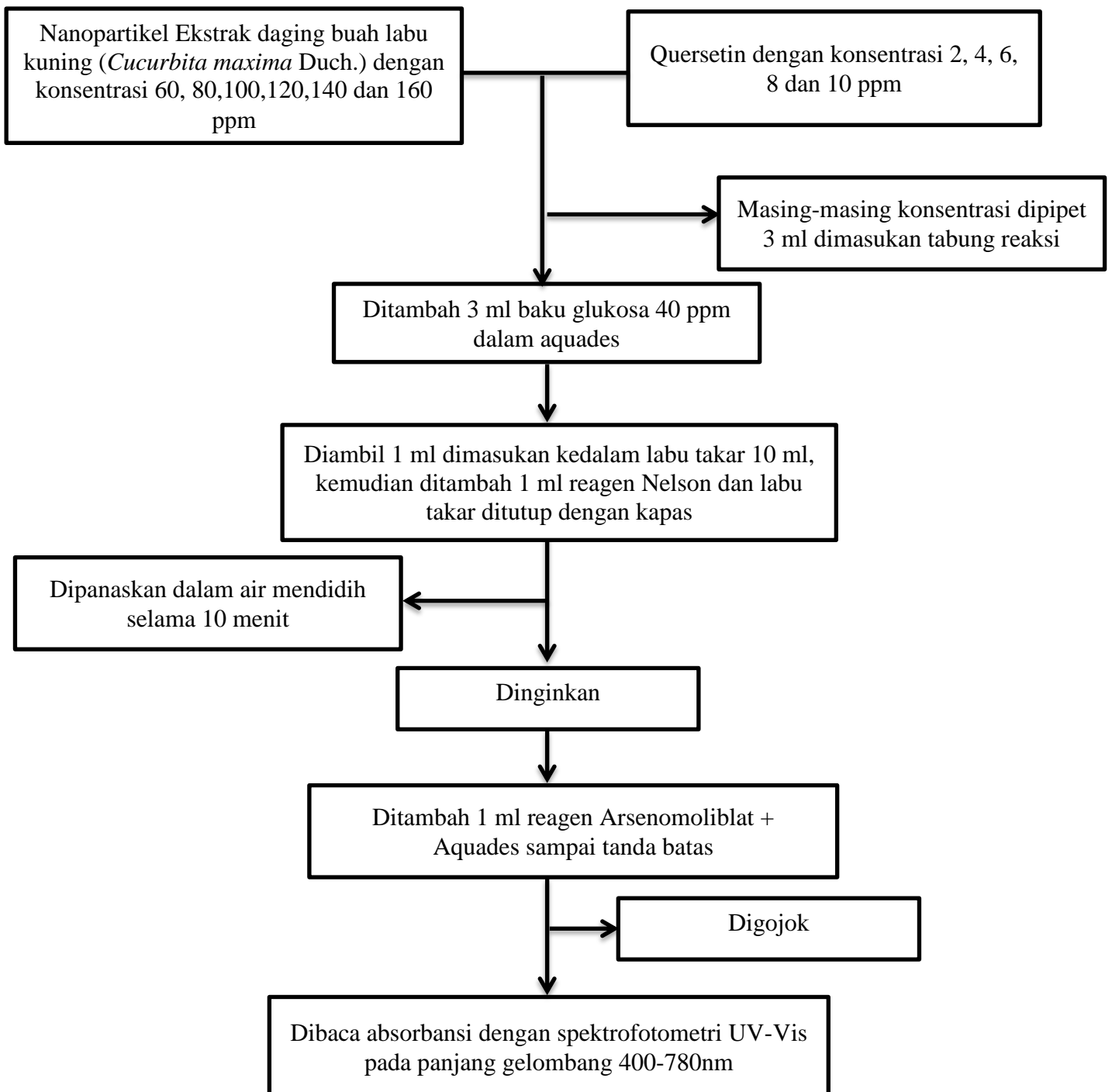
larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1 mL reagen Nelson. Selanjutnya ditutup dengan kapas, kemudian dipanaskan di atas air mendidih selama 10 menit. Larutan didinginkan selama 5 menit lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL secara kuantitatif, kemudian ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat ke dalam labu tersebut lalu diencerkan dengan akuades sampai batas, dikocok. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum pada 1-30 menit sehingga didapat waktu optimum yang stabil.

### 3) Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Deret standar glukosa 10, 20, 30, 40, 50 ppm dari larutan 1000 ppm. Sebanyak 1, 2, 3, 4, 5 mL larutan glukosa 1000 ppm dipipet ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian dipipet 1 mL dari masing-masing larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan ditutup dengan kapas, kemudian dipanaskan di atas air mendidih selama 10 menit. Larutan didinginkan selama 5 menit lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL secara kuantitatif, kemudian ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat ke dalam labu tersebut lalu diencerkan dengan akuades sampai batas, dikocok dan didiamkan selama waktu inkubasi. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

#### 4) Pengukuran Kadar Glukosa

Nanopartikel ekstrak daging buah labu kuning dibuat larutan stok sebanyak 1000 ppm, sebanyak 100 mg nanopartikel ekstrak daging buah labu kuning dilarutkan kedalam labu 100 ml dengan akuades sampai tanda batas, kemudian dibuat seri konsentrasi 60, 80, 100, 120, 140 dan 160 ppm (Vifta & Advistasari, 2018). Masing-masing seri larutan diambil 3 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 3 mL baku glukosa dengan konsentrasi 40 ppm dalam akuades. Larutan diambil 1 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, dan ditambah 1 mL reagen *Nelson*. Selanjutnya, ditutup dengan kapas dan dipanaskan di atas air mendidih selama 10 menit. Larutan didinginkan selama 5 menit, ditambah 1 mL reagen Arsenomolibdat, dan ditambah akuades sampai tanda batas. Larutan selanjutnya digojog perlahan dan didiamkan selama waktu inkubasi. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometri UV-Vis dan *operating time* yang sesuai panjang gelombang maksimum. Untuk pembandingnya menggunakan quersetin dengan seri konsentrasi 2,4,6,8 dan 10 ppm (Maulidya, 2019).



**Gambar 3.2 Skema Kerja Uji Penurunan Kadar Glukosa**

## 9. Perhitungan

Pengukuran keefektifan nanopartikel ekstrak daging buah labu kuning terhadap kadar glukosa akan dibandingkan dengan larutan baku flavonoid yaitu kuersetin. Pengukuran akan dimulai dengan menghitung kadar recovery glukosa pada masing-masing konsentrasi.

Perhitungan kadar recovery glukosa menggunakan rumus berikut:

$$\text{kadar recovery} : \frac{\text{kadar glukosa} - \text{kadar glukosa bebas}}{\text{kadar glukosa}} \times 100\%$$

Hasil kadar recovery glukosa dari masing-masing konsentrasi kemudian dilanjutkan dengan perhitungan regresi linier untuk mendapatkan nilai  $EC_{50}$  (Effective Concentration) dan digunakan untuk pengujian statistika. Nilai  $EC_{50}$  merupakan konsentrasi sampel yang dapat mengikat glukosa sebanyak 50%. Tujuan penentuan  $EC_{50}$  untuk menentukan konsentrasi dari sediaan yang diharapkan menghasilkan efek pengikatan glukosa sebesar 50%.

Perhitungan nilai  $EC_{50}$  menggunakan rumus berikut:

$$Y = a + bx$$

$$50 = a + bx$$

$$(x) EC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

Dari data yang diperoleh, kemudian diuji menggunakan uji probit antara intersep (a), slope (b), log konsentrasi larutan uji (x) dengan kadar recovery glukosa (y) sehingga diperoleh nilai  $EC_{50}$ .

## **F. Analisis Data**

Pengujian statistika menggunakan data hasil kadar recovery glukosa diuji menggunakan uji anova 1 jalan dengan program SPSS (Statistical Product and Service Solutions) versi 20. Analisis didahului dengan uji normalitas menggunakan rumus dari *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan rumus dari *Lavene Test* selanjutnya dilakukan Uji Tukey. Uji normalitas dan uji homogenitas nilai signifikansi lebih besar dari 0,05. Uji normalitas digunakan untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak, sedangkan uji homogenitas digunakan untuk mengetahui ragam antar perlakuan homogen atau tidak. Uji Tukey digunakan untuk membandingkan seluruh pasangan rata-rata perlakuan setelah uji analisis ragam dilakukan