

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium, dengan tujuan utama untuk mengetahui aktivitas ekstrak buah labu kuning terhadap penurunan kadar gula darah secara *in vitro* dengan Metode Nelson Somogyi.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### 1. Lokasi

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Uji KLT dan pembuatan ekstrak buah labu kuning di Laboratorium Fitokimia dan Instrument Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
- c. Uji penurunan kadar glukosa dilakukan di Laboratorium Biologi dan Instrument Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

##### 2. Waktu : Bulan Januari 2020

#### **C. Prosedur penelitian**

Pembuatan simplisia buah labu kuning ini mengacu pada penelitian (Apriliani, 2019) mengenai uji aktivitas ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning terhadap penurunan kadar asam urat tikus putih jantan galur wistar.

### 1. Pengumpulan Bahan

Bahan buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) dengan spesifikasi berwarna orange yang berasal dari Kopeng Salatiga yang sebelumnya telah diterminasi di Laboratorium Biologi-MIPA Universitas Diponegoro. Buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) yang digunakan pada penelitian ini dikumpulkan pada bulan Oktober 2019.

### 2. Determinasi tanaman

Determinasi buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) dilaksanakan di laboratorium ekologi dan biositematik fakultas MIPA jurusan biologi Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran bahan yang digunakan.

### 3. Pembuatan simplisia buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*)

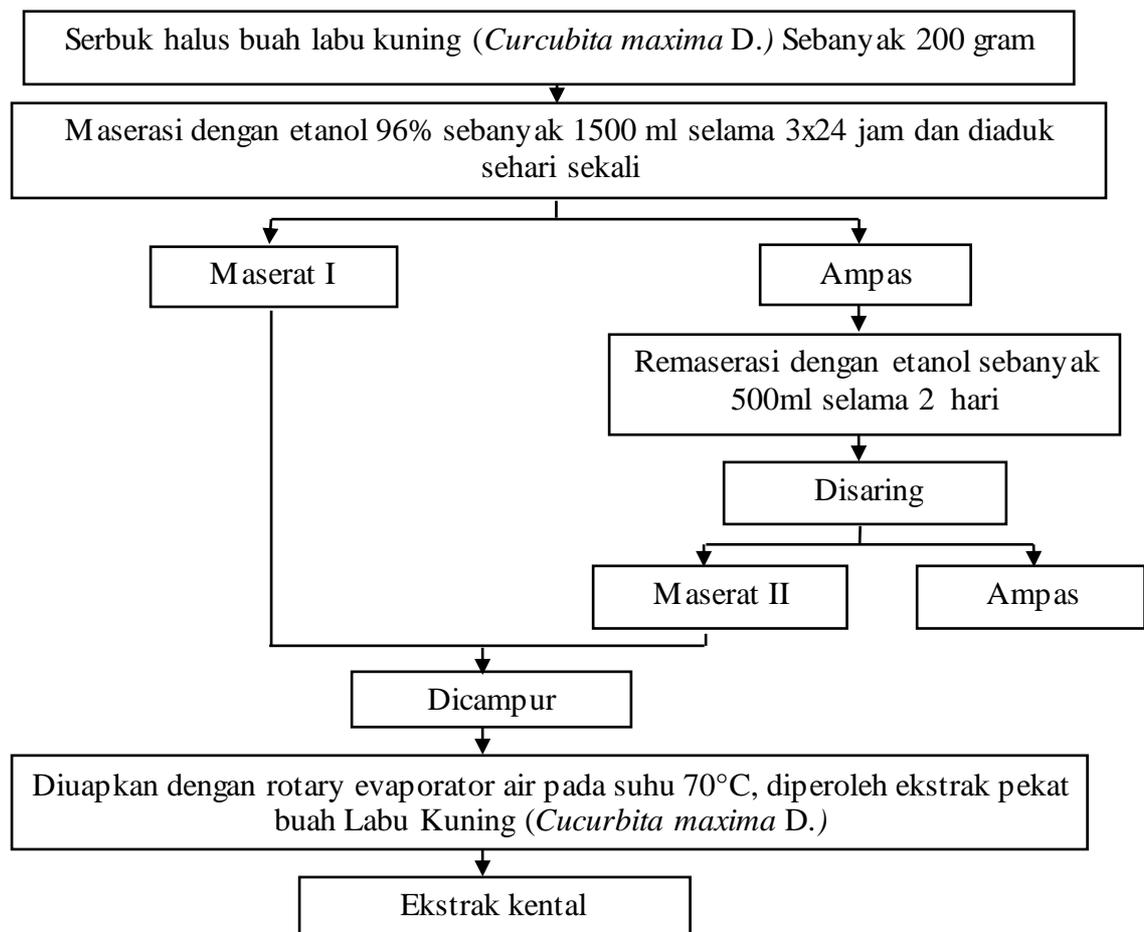
Buah Labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) yang diperoleh masih segar dicuci bersih dengan air yang mengalir, kemudian dilakukan pengupasan kulit buah dan dipotong menjadi beberapa bagian. Daging buah yang akan digunakan dalam penelitian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan 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.

#### 4. Pembuatan ekstrak kasar labu kuning.

Ekstrak buah labu kuning (*Cucurbita maxima* D.) dibuat dengan metode maserasi. Tahap pertama dilakukan dengan cara menimbang 200 gram serbuk simplisia. Pelarut ditambahkan dengan perbandingan 1:10 yaitu 200 gram simplisia: 2000 mL etanol 96%. Pelarut pertama 1500mL sisanya 500mL untuk remaserasi. Ekstraksi dilakukan selama 5x24 jam dengan pengadukan selama 6 jam 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% 500 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 di rotary evaporator pada suhu 70°C dan dipekatkan dengan waterbath suhu 70°C hingga diperoleh ekstrak kental dan hitung rendemennya

Kemudian 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.*)**

#### D. Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat didalam sampel kubis dan tomat serta berpotensi sebagai antidiabetes.

Uji fitokimia yang dilakukan meliputi, uji flavonoid, uji triterpenoid.

### 1. Uji Terpenoid

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, 2017).

### 2. Uji Flavonoid

Fase gerak asam asetat glacial : butanol : air (1:3:1), 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 nilai RF 0,54 – 0,92 menegaskan adanya kandungan flavonoid (Marliana, 2005).

## **E. Uji Antidiabetes In Vitro dengan Metode Nelson**

Uji aktivitas penurunan kadar glukosa dilakukan secara in vitro dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi. Metode Nelson-Somogyi dipilih karena lebih spesifik jika digunakan dalam penetapan kadar gula pereduksi pada sampel yang memiliki senyawa gula campuran didalamnya.

Penambahan reagen Nelson bertujuan untuk mereduksi kupri oksida menjadi kupro oksida yang mana K-Na-tartrat yang terkandung dalam reagen Nelson berfungsi untuk mencegah terjadinya pengendapan kupri oksida. Setelah ditambahkan reagen Nelson, larutan yang berwarna biru kehijauan tersebut dipanaskan 10 menit, tujuan dari pemanasan ini adalah untuk

mempercepat proses reduksi kupri oksida menjadi kupro oksida. Selanjutnya larutan didinginkan supaya reaksi berjalan stabil, karena apabila terlalu panas kemungkinan akan ada komponen senyawa yang rusak atau menguap. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat, penambahan reagen arsenomolibdat ini bertujuan agar bisa bereaksi dengan endapan kupro oksida. Pada peristiwa ini kupro oksida akan mereduksi kembali arsenomolibdat menjadi molibdene blue yang berwarna biru kehijauan yang nanti diukur absorbansinya dengan spektrofotometer.

a. Pembuatan larutan baku glukosa 40 ppm

Baku D-glukosa anhidrat ditimbang sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 100 mL aquadest sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm, kemudian dipipet 4 mL dari larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL kemudian ditambahkan aquadest sampai tanda batas dan dihomogenkan sehingga diperoleh larutan standar D-glukosa 40 ppm.

3. Pembuatan Pereaksi Nelson Somogyi

a. Larutan Nelson A

Dilarutkan 12,5 g natrium karbonat anhidrat, 12,5 g kalium tatarat, 10 g natrium bikarbonat, dan 100 g natrium sulfat anhidrat dalam 350 ml aquadest. Kemudian diencerkan sampai 500 ml.

b. Larutan Nelson B

Dilarutkan 7,5 g tembaga (II) sulfat penta hidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) dalam 50 ml akuades dan ditambahkan 1 tetes asam sulfat (pekat).

- c. Pereaksi Nelson dibuat dengan cara mencampurkan 25 ml bagian larutan Nelson A dan 1 mL bagian larutan Nelson B. Pencampuran dilakukan pada setiap hari akan digunakan.

#### 4. Pengukuran Uji Antidiabetes secara In Vitro

##### a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebanyak 1 mL dari larutan 40 ppm 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 aquadest sampai batas, dikocok dan didiamkan selama waktu inkubasi. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 700-780 nm (Ayuningtias 2019)

##### b. Penentuan Operating Time

Operating time adalah waktu yang dibutuhkan untuk bereaksi hingga membentuk produk yang stabil. Sebanyak 1 mL larutan baku glukosa 40 ppm dipipet dan 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 aquadest sampai batas,

dikocok. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum pada 5, 10, 15, 20, 25, 30, menit.

c. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Deret standar glukosa 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm dari larutan 1000 ppm. Sebanyak 1, 2, 3, 4 dan 5 mL larutan glukosa 1000 ppm dipipet ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian dipipet 1 mL dari 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 di encerkan dengan aquadest sampai batas, dikocok dan didiamkan selama waktu inkubasi. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

d. Pengukuran Kadar Glukosa

Pengukuran kadar glukosa darah mengacu pada penelitian (Saputra, 2019) mengenai aktivitas antihiperglikemia kombinasi ekstrak daun ashitaba dan daun sukun secara *in vitro*. Ekstrak buah labu kuning dibuat larutan stok sebanyak 1000 ppm, sebanyak 100 mg ekstrak buah labu kuning dilarutkan kedalam labu 100 mL dengan aquadest sampai tanda batas, kemudian dibuat seri konsentrasi 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm. Seri larutan diambil 3 mL dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 3 mL baku glukosa dengan konsentrasi 40 ppm

dalam aquadest, 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 aquadest sampai tanda batas. Larutan selanjutnya digojog perlahan dan didiamkan selama waktu inkubasi. Pengujian dilakukan pada kisaran panjang gelombang 700-780 nm.

#### F. Analisis Data

Pengukuran keefektifan 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:

$$\text{Persentase penurunan kadar} : \frac{\text{kadar baku} - \text{kadar sampel}}{\text{kadar baku}} \times 100\%$$

Hasil kadar recovery glukosa dari masing-masing konsentrasi kemudian dilanjutkan dengan perhitungan regresi linear untuk mendapatkan nilai  $EC_{50}$  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%.

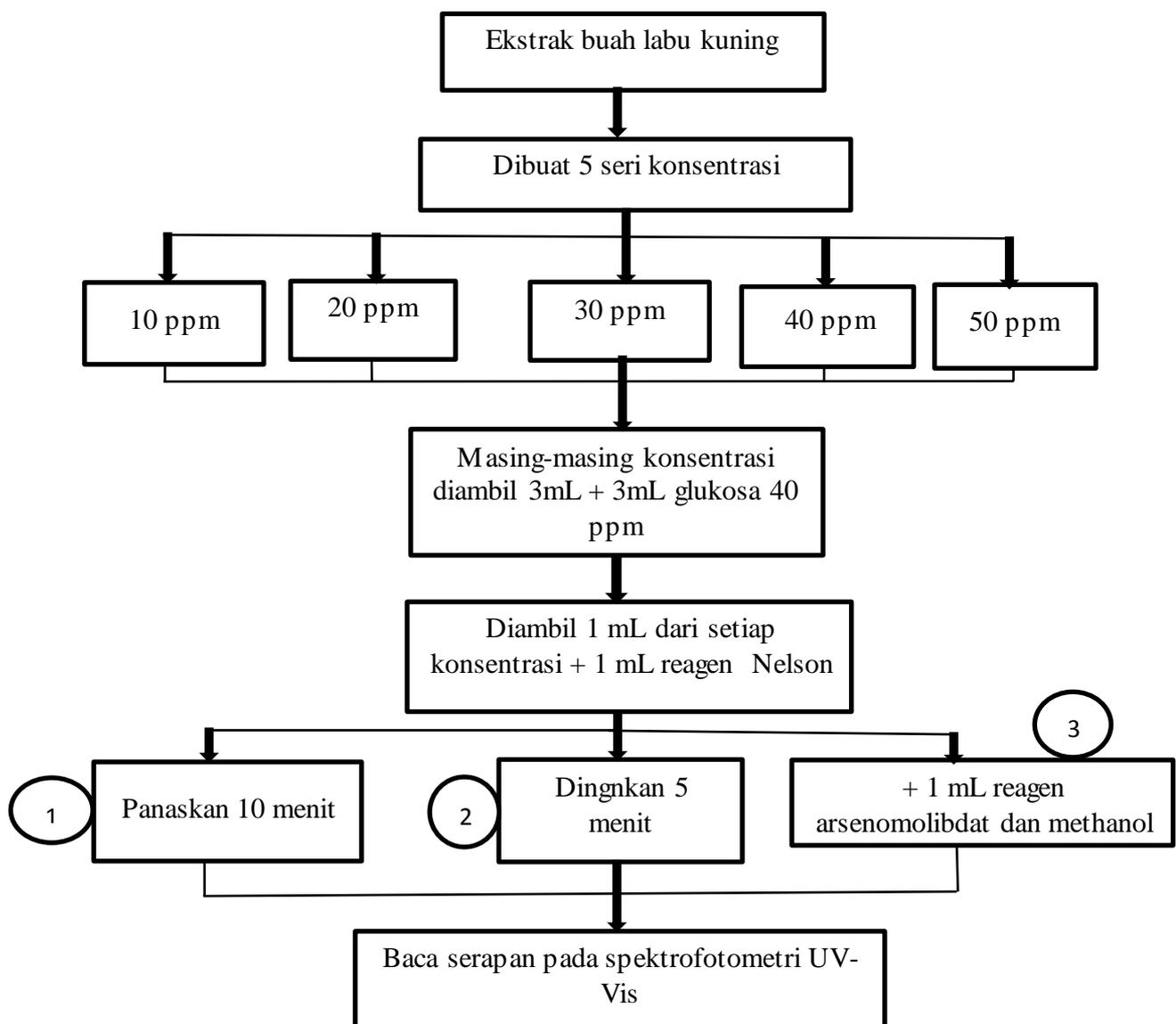
Perhitungan nilai  $EC_{50}$  menggunakan rumus berikut:

$$Y = a + bx$$

$$50 = a + bx$$

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

Setelah didapatkan persentase penurunan kadar dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan regresi linear kembali (x,y) untuk mendapatkan nilai  $EC_{50}$ .  $EC_{50}$  yaitu konsentrasi sampel yang dapat menurunkan kadar glukosa sebanyak 50%. Nilai  $EC_{50}$  didapatkan dari x setelah mengganti y dengan 50.



**Gambar 3.2 Skema Kerja Uji Penurunan Kadar Glukosa Buah Labu Kuning.**