

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan (April 2020 – Oktober 2020 di Laboratorium Kimia, Fakultas Pertanian Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah baskom, toples, batang pengaduk, blender, gelas ukur, gelas kimia, pipet tetes, corong pisah, corong biasa, tabung reaksi, botol vial 20 mL, botol semprot, labu erlenmeyer, alumunium foil, kertas saring, kertas Ph, neraca analitik, *rotary evaporator vakum IKA RV 20 Basic*, *homogenizer HG-15D-SET/korea*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *Particle Size Analyzer (PSA) HORIBA SZ-100*, pH meter, piknometer, sentrifugasi, spektrofotometer UV-Vis 1800 *Brand Shimadzu*.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah akuades, aseton teknis MKR Chemicals, DMSO, enzim *α -glukosidase*, etil-asetat teknis MKR Chemicals, kalium bromida, kuersetin, metanol Pa Merck, Na_2HPO_4 , natrium bikarbonat, *n*-heksana teknis MKR Chemicals, *P-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNP)*, tween 80 teknis MKR Chemicals, dan *Virgin Coconut Oil (VCO)*.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Sampel

Sampel daun tanaman pelawan (*Tristanopsis merguensis*) dilakukan pengeringan di dalam ruangan dan terlindungi dari sinar matahari langsung, setelah itu sampel dihaluskan dengan menggunakan blender sampai diperoleh serbuk halus. Serbuk daun pelawan kemudian disaring dengan menggunakan ayakan ukuran 100 mesh.

3.3.2 Ekstraksi

Serbuk daun pelawan yang telah diayak ditimbang sebanyak 500 g. Selanjutnya serbuk di maserasi dengan 5 L pelarut aseton disimpan dalam botol dan didiamkan selama 3x24 jam pada suhu ruang. Ekstrak yang diperoleh disaring dan didapat filtrat/ekstrak cair aseton dan residunya. Filtrat kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat aseton daun pelawan.

3.3.3 Fraksinasi

Ekstrak pekat daun pelawan ditimbang sebanyak 30 g difraksinasi dengan ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah. Dilakukan penambahan MeOH:H₂O (3:2) sebanyak 247 mL untuk melarutkan ekstrak pekat daun pelawan. Setelah itu dilakukan partisi 2 kali penambahan pelarut *n*-heksana sebanyak 800 mL. Hasil partisi *n*-heksana yang diperoleh terdiri dari 2 fasa, yaitu fasa *n*-heksana dan fasa air. Fasa air dipartisi cair-cair lebih lanjut menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 2x800 mL. Hasil dari partisi diperoleh fasa etil asetat dan fasa air dan dipisahkan dengan menggunakan corong pisah. Ketiga fraksi tersebut kemudian ditampung secara terpisah dan dipekatkan untuk menghilangkan kandungan pelarut didalamnya menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh fraksi kental ekstrak daun pelawan. Hasil fraksinasi dilakukan analisis data fraksi dan dilanjutkan dengan pembuatan nanoemulsi fraksi daun pelawan.

3.3.4 Uji Fitokimia

3.3.4.1 Uji Alkaloid

a). Pereaksi Mayer

Masing-masing fraksi kental dan ekstrak dimasukan ke dalam tabung reaksi berbeda, kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi mayer. Uji positif apabila terbentuk endapan putih kekuningan (Pane, 2013).

b). Pereaksi Wagner

Masukan masing-masing sampel ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan masing-masing sampel dengan H₂SO₄ 2 N dan pereaksi wagner

tetes demi tetes. Uji positif apabila terjadi perubahan warna jingga (Pane, 2013).

3.3.4.2 Uji Steroid

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchard. Apabila warna larutan menjadi putih menunjukkan hasil uji positif (Pane, 2013).

3.3.4.3 Uji Saponin

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi setelah ditambahkan air panas. Uji positif apabila terbentuk busa dan tidak hilang jika ditambahkan HCl 2 N (Pane, 2013).

3.3.4.4 Uji Flavonoid

Sampel ekstrak dan fraksi kental yang telah dilarutkan dengan masing-masing pelarut dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan magnesium 0,1 mg dan 0,4 mg amil alkohol (campuran HCl 37% dan etanol 95%). Selanjutnya ditambahkan alkohol sebanyak 4 ml. Jika terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada campuran menunjukkan uji positif (Pane, 2013).

3.3.4.5 Uji Fenolik

Ekstrak kental dan masing-masing dari fraksi dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambah tetes demi tetes FeCl_3 5 %. Hasil uji positif ditandai dengan warna larutan menjadi hijau tua (Pane, 2013).

3.3.5 Karakterisasi Menggunakan FT-IR

Untuk melihat keberadaan gugus fungsi pada senyawa yang terkandung pada ekstrak kental dan fraksi dianalisis menggunakan alat spektroskopi IR.

3.3.6 Pembuatan Nanoemulsi

Pembuatan nanoemulsi menggunakan teknik emulsifikasi spontan. Sistem emulsi terdiri dari fase organik (ekstrak fraksi daun pelawan dan *virgin coconut oil*) dan fase air (air 18,5ml dan Tween 80 10 ml). *Virgin Coconut Oil* 2,5 ml dimasukkan ke dalam gelas beaker dan dicampur dari setiap fraksi ekstrak daun pelawan masing masing 0,1 gram menggunakan magnetic stirrer selama 10 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Campurkan seluruh bahan kemudian dihomogenkan

dengan menggunakan homogenizer dengan kecepatan 8.000 rpm selama 30 menit (Budiputra dkk., 2014)

3.3.7 Karakterisasi dan kestabilan nanoemulsi

a. Uji Ukuran Partikel

Uji ukuran partikel bertujuan untuk menentukan ukuran partikel nanoemulsi menggunakan prinsip kerja *PSA* dari cahaya terhambur yang diakibatkan oleh sinar *laser diffraction*. Pengukuran partikel nanoemulsi diukur dengan menggunakan instrumen Delsa™ *nano C Partikel Size Analyzer* (PSA) (Hendrasi dkk, 2012).

b. Uji pH Nanoemulsi

Pengujian pH sediaan nanoemulsi fraksi ekstrak daun pelawan dengan menggunakan pH meter. pH meter di kalibrasi atau diverifikasi menggunakan larutan pH standar dapar pH. Setelah pH yang tertera pada layar sesuai dengan pH standar dan stabil, elektroda dicelupkan kedalam nanoemulsi. Nilai pH nanoemulsi akan tertera pada layar. Nilai pH berdasarkan penelitian yang dilakukan Lucida dkk (2007) nilai pH sediaan untuk mulut umumnya antara 4,5 hingga 10.

c. Uji Bobot Jenis

Pengujian bobot jenis nanoemulsi fraksi ekstrak daun pelawan dilakukan dengan menggunakan piknometer.

$$\text{bobot jenis} = \frac{(\text{berat pikometer} + \text{nanoemulsi}) - (\text{berat pikometer kosong})}{(\text{Berat pikometer} + \text{air}) - (\text{berat jenis pikometer kosong})}$$

(Nilamsari, 2019).

d. Uji Transmitan

Pengujian transmitan dilakukan untuk mengamati kejernihan nanoemulsi dengan menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm dengan larutan blanko akuades. Kejernihan nanoemulsi dikatakan baik apabila memiliki nilai transmitan mendekati 100% yang secara visual larutan tampak transparansi pada sistem emulsi (Bali dkk., 2010).

e. Uji stabilitas fisik

Pengujian stabilitas fisik pada nanoemulsi dilakukan dengan menggunakan alat sentrifugasi selama 2 jam dengan kecepatan 3750 rpm. Nanoemulsi dikatakan stabil apabila pada larutan nanoemulsi tidak terjadi pemisahan (Pratiwi dkk., 2016).

3.3.8. Uji aktivitas inhibisi α -glukosidase

Pengujian aktivitas antidiabetes nanoemulsi fraksi ekstrak daun pelawan dilakukan di Laboratorium Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) berdasarkan reaksi enzimatik secara *in vitro* menggunakan enzim α -glukosidase kuersetin sebagai kontrol (Dewi dkk., 2014).

3.3.8.1 Penyiapan Pereaksi

a) Buffer Fosfat pH 7,0

Na_2HPO_4 sebanyak 3,59 g dilarutkan dalam 100 mL aquades (Larutan A) dan Na_2HPO_4 sebanyak 1,39 g dilarutkan dalam 100 mL aquades (Larutan B). Larutan A ditambahkan dengan larutan B hingga mencapai pH 7,0 kemudian ditambahkan dengan aquades sehingga volume menjadi 200 mL.

b) *P*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNP) 20 mM

P-nitrofenil- α -D-glukopiranosida sebanyak 150,65 mg dilarutkan dalam 25 mL buffer fosfat pH 7,0. Larutan substrat diencerkan hingga menjadi 5mM.

c) Enzim α -glukosidase

Enzim α -glukosidase sebanyak 1,0 mg (62 unit/mg) dilarutkan dalam 100 ml buffer fosfat pH 7,0 yang mengandung 200 mg bovin serum albumin. Untuk pengujian stok enzim diencerkan 10x dengan buffer fosfat pH 7,0.

d) Na_2CO_3 0,2 M

Natrium bikarbonat sebanyak 2,12 g dilarutkan dalam 100 mL aquades.

3.3.8.2 Penyiapan Larutan Uji

Contoh berbentuk cair dianggap sebagai larutan induk, kemudian dilakukan pengenceran dengan DMSO sebanyak $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, dan $\frac{1}{8}$ dari larutan induk. Di dapat variasi konsentrasi sampel pada pengukuran 2,52; 1,26; 0,63 dan 0,315 mg/mL.

3.3.8.3 Pengukuran inhibisi Aktivitas α -Glukosidase

Larutan *P*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida 5 mM sebanyak 250 μ L dan buffer fosfat pH 7 0,1 M sebanyak 495/490 μ L ditambahkan kedalam tabung reaksi yang berisi 5 μ L (larutan standar)/ 10 μ L (larutan contoh) dalam DMSO dengan variasi konsentrasi 2,52; 1,26; 0,63 dan 0,315 mg/mL. Campuran larutan tersebut homogen dan kemudian dipreinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C, reaksi dimulai pada saat penambahan 250 μ L larutan α -glukosidase (0,062 unit), dan dilanjutkan inkubasi selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan larutan Na₂CO₃ 0,2 M sebanyak 1 mL. Aktivitas enzim diukur berdasarkan pembacaan serapan *P*-nitrofenol yang terbentuk pada panjang gelombang 400 nm. Quersetin digunakan sebagai baku pembandingan.

Presentasi aktivitas penghambatan diukur dengan menggunakan persamaan :

$$\%inhibisi = \frac{(C - S)}{C} \times 100$$

C = Absorban blanko (DMSO)

S = Absorban sampel (selisih absorben dengan dan tanpa enzim)