

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian yang berjudul penentuan kadar total fenolik dan flavonoid fraksi batang pucuk idat (*Cratoxylum glaucum*) sebagai antioksidan dan antidiabetes. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium MIPA Dasar Fakultas Perikanan, Pertanian dan Biologi (FPPB) Universitas Bangka Belitung. Waktu dalam penelitian ini dimulai pada bulan Februari sampai bulan Agustus 2020.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah toples, botol sampel, serut kayu, spatula, pipet tetes, pipet volum, gelas kimia, gelas ukur, tabung reaksi, batang pengaduk, labu ukur, corong pisah, neraca analitik, vortex, *rotary evaporator* (IKA RV 20 Basic) dan spektrofotometer UV-Vis (1800 Brand Shimadzu).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah ekstrak batang pucuk idat, aseton (C_3H_6O), etanol (C_2H_6O), metanol (CH_3OH), etil asetat ($C_4H_8O_2$), kloroform ($CHCl_3$), n-heksan (C_6H_{14}), $FeCl_3$, padatan magnesium, amil alkohol (campuran HCl 37% dan etanol 95%), Na_2CO_3 , akuades, reagen Folin-Ciocalteu, padatan asam galat, $AlCl_3$, natrium asetat ($NaCH_3COO$), padatan kuersetin, larutan DPPH, Padatan NaH_2PO_4 , padatan *p*-nitrofenil- \Rightarrow -D-glukopiranosida (pNPG) dan larutan enzim \Rightarrow -glukosidase.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini ada beberapa tahapan kerja yang dilakukan. Berikut ini masing-masing tahapan kerja.

3.3.1 Penyiapan Sampel Uji

Tumbuhan idat (*cratoxylum glaucum*) diambil dalam keadaan segar yang

diperoleh dari daerah Lubuk Besar, Kabupaten Bangka Tengah, Kepulauan Bangka Belitung. Sampel kemudian dikeringkan pada ruangan terbuka yang terlindungi dari sinar matahari. Sampel yang telah kering dilakukan penghalusan menggunakan serut kayu sehingga menghasilkan serbuk kering.

3.3.2 Pembuatan Ekstrak

Serbuk kering pucuk idat ± 2 kg direndam dengan menggunakan pelarut aseton selama 1x24 jam dengan perbandingan 1:10 sampel dan pelarut yang ditempatkan pada suhu kamar. Setelah hasil perendaman diambil filtrat dari residu yang disaring. kemudian filtrat yang didapatkan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* (Dungir dkk., 2012).

3.3.3 Fraksinasi Ekstrak Batang Pucuk Idat

Fraksinasi dilakukan dengan teknik fraksi cair-cair dengan corong pisah. Proses fraksi cair-cair menimbang 50 gram ekstrak batang pucuk idat dilarutkan dengan pelarut metanol:air (2:1) sebanyak 200 mL Pelarut. Kemudian diekstraksi cair-cair dengan n-heksan 4 kali sebanyak 200 mL pelarut. Fraksi n-heksan terletak fasa atas dan fraksi metanol:air terletak fasa bawah. Kemudian dipisahkan dan diambil fraksi n-heksan. Fraksi n-heksan dipekatkan engan evaporator sehingga mendapatkan fraksi kental n-heksan. Kemudian fraksi metanol:air dilanjutkan dengan ekstraksi cair-cair kembali dengan etil asetat 4 kali sebanyak 200 mL. Fraksi etil asetat berada di fasa atas dan fraksi metanol:air berada di fasa bawah. Kemudian dipisahkan dan diambil masing-masing fraksi. Hasil fraksi etil asetat dan fraksi metanol:air dipekatkan menggunakan evaporator.

3.3.4 Uji Fitokimia Metabolit Sekunder

Uji fitokimia dilakukan secara kualitatif di Laboratorium Kimia Fakultas Perikanan, Pertanian dan Biologi (FPPB), Universitas Bangka Belitung.

3.3.4.1 Uji Fenolik

Sampel dimasukkan ke dalam tabung ditetesi dengan FeCl_3 5%. Uji positif menunjukkan warna larutan menjadi hijau tua (Pane, 2013).

3.3.4.2 Uji Flavonoid

Sampel dimasukkan ke tabung reaksi yang ditambahkan padatan magnesium 0,1 mg dan 0,4 mL amil alkohol dari (campuran HCl 37% dan etanol 95%). Kemudian ditambahkan 4 mL alkohol. Uji positif jika terbentuknya warna kuning, merah atau jingga pada lapisan amil alkohol (Pane, 2013).

3.3.5 Karakterisasi secara Spektroskopi

Senyawa yang diperoleh dari hasil fraksi dianalisis menggunakan metode spektrofotometri IR untuk melihat keberadaan gugus fungsi.

3.3.6 Penentuan Kadar Total Fenolik

Penentuan kadar total fenolik untuk mengetahui besaran kandungan yang terdapat dalam ekstrak batang pucuk idat. Analisa total fenolik dilakukan secara spektrofotometri berdasarkan metode Ismail dkk, (2012) dapat mengoksidasi gugus fenol hidroksil dengan perubahan warnanya dari hijau kekuningan menjadi warna biru.

3.3.6.1 Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan mula-mula dilakukan dengan pembuatan larutan Na_2CO_3 7,5%. Padatan Na_2CO_3 sebanyak 3,5 gram dilarutkan dengan akuades dalam volume 50 mL hingga sampai tanda batas. Kemudian reagen Folin diambil sebanyak 10 mL Folin dilarutkan dengan 50 mL akuades dan 50 mL metanol hingga dengan volume 100 mL sampai tanda batas. Sampel ekstrak dan fraksi dibuat sebanyak 10 mg dilarutkan dengan metanol dalam 10 mL hingga tanda batas. Masing-masing bahan yang telah disiapkan akan diuji kandungan total fenolik.

3.3.6.2 Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

Asam galat dibuat dengan cara menimbang 10 mg dilarutkan dengan metanol 10 mL. Pembuatan larutan standar asam galat dengan 1000 ppm. Kemudian larutan asam galat dibuat sebanyak masing-masing konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, dan 250 ppm. Larutan stok asam galat dari masing-

masing konsentrasi yang telah dibuat kemudian dipipet 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,5, 2,0 dan 2,5 mL dilarutkan dengan metanol sebanyak 10 mL hingga tanda batas (Nur, 2019).

3.3.6.3 Uji Total Fenolik

a) Uji Larutan Standar Asam Galat

Larutan standar dari masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan dengan 0,5 mL Folin Ciocalteu kemudian di vortex selama 30 detik. Setelah itu ditambahkan dengan larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 7,5% sebanyak 2,5 mL. Larutan divortex kembali selama 30 detik. kemudian di diamkan selama 30 menit. Setelah itu absorbansi diukur dengan panjang gelombang 760 nm. (Nur, 2019).

b) Uji Larutan Sampel

Larutan sampel dari masing-masing dipipet sebanyak 0,5 mL ditambahkan dengan 0,5 mL Folin-Ciocalteu di vortex selama 30 detik. Setelah itu ditambahkan larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 7,5% sebanyak 2,5 mL. Larutan tersebut divortex kembali selama 30 detik. kemudian di diamkan \ selama 30 menit. Setelah itu absorbansi diukur dengan panjang gelombang 760 nm (Nur, 2019).

3.3.7 Penentuan Kadar Total Flavonoid

Analisis kadar total flavonoid dilakukan secara spektrofotometri dengan menggunakan aluminium klorida (AlCl_3) dan kuersetin sebagai larutan standar (Chotimah, 2019).

3.3.7.1 Penyiapan Bahan

Persiapan bahan pertama-tama dilakukan pembuatan AlCl_3 10%. Larutan AlCl_3 diambil sebanyak 10 mL dilarutkan dengan 100 mL akuades hingga tanda batas. Kemudian pembuatan larutan natrium asetat (NaCH_3COO) 1M. Selanjutnya disiapkan 50 mL metanol p.a dan 50 mL akuades. Sampel ekstrak dan fraksi sebanyak 10 mg dilarutkan dengan metanol dalam 10 mL hingga tanda batas.

3.3.7.2 Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Pembuatan larutan standar kuersetin 1000 ppm ditimbang sebanyak 10 mg kuersetin dilarutkan dengan 10 mL metanol hingga tanda batas. kemudian larutan standar kuersetin dibuat konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Larutan stok kuersetin masing-masing konsentrasi yang telah dibuat selanjutnya dipipet 0, 0,2 0,4, 0,6, 0,8 dan 1 mL diencerkan dengan 10 mL metanol sampai tanda batas.

3.3.7.3 Uji Total Flavonoid

a) Uji Larutan Standar Kuersetin

Larutan standar kuersetin masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,5 mL ditambahkan dengan 0,1 mL aluminium klorida ($AlCl_3$) kemudian ditambahkan 1,5 metanol p.a dan 0,1 mL natrium asetat ($NaCH_3COO$) 1M, lalu ditambahkan 2,8 mL akuades. Larutan tersebut divortex selama 30 detik. Kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Setelah itu konsentrasi diukur absorbansi pada panjang gelombang 420 nm (Chotimah, 2019).

b) Uji Larutan Sampel

Larutan sampel masing-masing dipipet 0,5 mL ditambahkan dengan 0,1 mL aluminium klorida ($AlCl_3$) kemudian ditambahkan 1,5 metanol p.a dan 0,1 mL natrium asetat ($NaCH_3COO$) 1M, lalu ditambahkan 2,8 mL akuades. Larutan tersebut divortex selama 30 detik. Kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Setelah itu diukur absorbansi pada panjang gelombang 420 nm (Chotimah, 2019).

3.3.8 Uji Antioksidan

Prinsip metode uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan secara analisis kuantitatif dengan tujuan untuk mengetahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas. Sampel dibuat dalam konsentrasi 5, 10, 20, dan 50 $\mu g/mL$. Larutan dalam konsentrasi tersebut masing-masing dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 1 mL. Kemudian larutan DPPH sebanyak 1 mL dan ditambahkan dengan metanol p.a sebanyak 2 mL. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu $37^{\circ}C$. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 516 nm (Mahardika, 2018).

3.3.9 Uji Antidiabetes

Uji antidiabetes dilakukan secara *in-vitro* dengan menggunakan metode inhibisi α -glukosidase yang dilakukan di LIPI Kimia.

3.3.9.1 Penyiapan Bahan

a) Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 7

Padatan Na_2HPO_4 sebanyak 3,59 g dilarutkan dalam 100 mL aquades (larutan A) dan NaH_2PO_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) Pembuatan *p*-nitrofenil- \Rightarrow -D- glukopiranosida (PNP) 20 mM

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

c) Penyiapan Larutan Enzim α -glukosidase

Pembuatan larutan enzim \Rightarrow -glukosidase sebanyak 1,0 mg dilarutkan dalam 100 ml buffer fosfat pH 7 yang mengandung 200 mg bovin serum albumin. Pengujian stok enzim diencerkan 10x dengan buffer fosfat pH 7.

d) Penyiapan larutan Na_2CO_3 0,2 M

Pembuatan natrium bikarbonat yaitu sebanyak 2,12 gram dilarutkan 100 mL aquades dalam labu ukur sampai tanda batas.

3.3.9.2 Pengukuran Inhibisi Aktivitas α -Glukosidase

Larutan *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida 5 mM sebanyak 250 μL dan buffer fosfat pH 7 0,1 M sebanyak 495/490 μL ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 μL (larutan standar) dalam DMSO dengan variasi konsentrasi. Setelah homogen larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C , reaksi dimulai dengan penambahan 250 μL larutan α -glukosidase. Inkubasi dilanjutkan selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml Na_2CO_3 0.2 M. Aktivitas enzim diukur berdasarkan pembacaan serapan *p*-nitrofenol yang terbentuk pada panjang gelombang 400 nm. Kuersetin digunakan sebagai baku pembanding (Dewi dkk., 2014).

3.3.10 Analisis Data

3.3.10.1 Analisis Data Uji Aktivitas Antioksidan

Nilai inhibisi ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH. Persen penghambatan masing-masing larutan dihitung dengan rumus dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

Nilai absorbansi larutan blanko dan larutan uji digunakan untuk menghitung IC_{50} sebagai konsentrasi larutan uji dibutuhkan untuk menghambat 50% yang menangkap aktivitas radikal dari DPPH. Nilai IC_{50} yang dapat diperoleh menggunakan persamaan regresi linier $y = ax + b$ (Mahardika, dkk 2018).

3.3.10.2 Analisis Data Uji inhibisi α -glukosidase

Hasil pengukuran absorbansi dapat ditentukan nilai persen penghambatan α -glukosidase melalui perhitungan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko (DMSO)} - \text{Absorbansi Sampel uji}}{\text{Absorbansi blanko (DMSO)}} \times 100\%$$

Perhitungan IC_{50} dengan cara menggunakan persamaan regresi linier $y = ax + b$. Konsentrasi sampel sebagai sumbu x sedangkan % inhibisi sebagai sumbu. Persamaan $y = ax + b$ dapat dihitung nilai IC_{50} menggunakan rumus: (Meila, 2017).

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$