

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental secara *in vitro* dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% daun Karamunting (*M. malabathricum* L.) dalam menurunkan kadar glukosa secara *In vitro*.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dimulai dari bulan November 2023 hingga Mei 2024. Tempat yang digunakan untuk penelitian adalah Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Borneo Lestari.

3.3. Populasi dan Sampel

a. Populasi :

Untuk populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah Tumbuhan Karamunting (*M. malabathricum* L.) yang tumbuh di provinsi Kalimantan Selatan.

b. Sampel :

Untuk sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun Karamunting (*M. malabathricum* L.) yang masih segar dan berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak juga terlalu muda.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Pada penelitian ini yang menjadi variabel bebas adalah ekstrak etanol 96% daun Karamunting (*M. malabathricum* L.).

3.4.2. Variabel Terikat

Pada penelitian ini variabel terikatnya adalah Nilai Absorbansi ekstrak etanol 96% daun Karamunting (*M. malabathricum* L.) terhadap penurunan kadar glukosa.

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah aluminium foil (IKRF10[®]), batang pengaduk, beaker gelas (Pyrex[®]), blender, cawan penguap, corong kaca (Pyrex[®]), gelas ukur (Pyrex[®]), kertas saring, kuvet, labu ukur (Pyrex[®]), mikropipet (TopPette Pipettor), pipet tetes, penjepit, pengayak (*standard sleeves*), rak tabung reaksi, *rotary evaporator* (IKRF10[®]), seperangkat alat maserasi, seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis (PG Instrument[®]), tabung reaksi (Pyrex[®]), timbangan analitik (Fujitsu[®]), *waterbath* (Memmert[®]).

3.5.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah *aquadest*, amil alkohol, asam asetat anhidrat (Merck), *Dragendorff*, ekstrak etanol 96%

daun Karamunting (*M. malabathricum* L.), Etanol 96% (*bramatachem*[®]), (Merck), FeCl₃ (Merck), HCl 2 N (Merck), Mayer, magnesium, larutan induk glukosa, *Lieberman Burchard*, reagen arsenomolibdat, reagen *Nelson-Somogyi, Wagner*.

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengumpulan Bahan

Bagian yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun (*folium*) yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda. Daun Karamunting yang diambil untuk penelitian ini adalah daun yang dikumpulkan pada bulan November di Desa Pematang Danau Kec. Mataraman Kab. Banjar, Kalimantan Selatan.

3.6.2. Determinasi

Determinasi sampel menggunakan bagian tumbuhan berupa akar, batang, bunga, buah dan daun Karamunting. Determinasi tumbuhan dilakukan ke Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru.

3.6.3. Pengolahan Simplisia

Cara pengolahan simplisia diawali dengan pengumpulan bahan sebanyak 3,5 kg, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, penyerbukan, penyimpanan dan kemudian terakhir pewadahan. Langkah- langkah dalam pembuatan simplisia daun karamunting melalui beberapa tahap, dimulai dengan sortasi basah, selanjutnya bahan dicuci dengan air mengalir untuk

menghilangkan pengotor yang tersisa pada sampel. Kemudian dilakukan perajangan sebelum dilakukan proses pengeringan dengan tujuan mengurangi kadar air dari simplisia sehingga jamur tidak dapat tumbuh. Daun karamunting dikeringkan menggunakan metode pengeringan kering angin. Terakhir, sortasi kering bertujuan untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan atau kotoran yang tertinggal pada simplisia kering. Setelah simplisia dipastikan benar-benar kering dilakukan penyerbukan dengan menggunakan *blender* (Roni *et al.*, 2018). Pembuatan serbuk simplisia dilakukan dengan derajat kehalusan serbuk kasar menggunakan *mesh* no. 20 (Kemenkes RI, 2017). Untuk menghitung persentase rendemen dapat digunakan rumus :

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot simplisia}}{\text{bobot bahan baku}} \times 100\%$$

3.6.4. Pembuatan Ekstrak

Serbuk daun karamunting diambil sebanyak 200 g dan dimaserasi dalam larutan etanol 96% sebanyak 1,4 L pada suhu ruang dan jauh dari sinar matahari (Deniansyah & Pujiastuti, 2022). Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, lalu diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara penyaringan. Ulangi proses penyarian sebanyak dua kali dengan pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Filtrat yang dihasilkan dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* (Kemenkes RI, 2017).

Untuk memekatkan simplisia menjadi campuran yang lebih kental, sisa filtrat diuapkan dalam penangas bersuhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental, lalu ekstrak tersebut ditimbang sampai dapat bobot tetap dari ekstrak tersebut. Ekstrak kental yang diperoleh dari daun karamunting kemudian dihitung % rendemen ekstraknya (Deniansyah & Pujiastuti, 2022). Rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

3.6.5. Skrining Fitokimia

Untuk melakukan skrining fitokimia, terlebih dahulu larutan sampel dibuat dengan perbandingan (1: 1), untuk membentuk larutan sampel, terlebih dahulu ditimbang 10 mg ekstrak kental, kemudian dilarutkan dengan 10 mL etanol 96% di dalam *beaker glass* lalu dilakukan identifikasi (Kasitowati *et al.*, 2017)

a. Alkaloid

Larutan sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL HCl 2 N. Kemudian dipanaskan diatas *waterbath* selama 2 menit dan dinginkan. Pada tabung reaksi pertama sampel ekstrak selanjutnya disaring dan ditambahkan 3-5 tetes pereaksi *Dragendorff*. Akan terbentuk endapan merah jika positif alkaloid. Pada tabung kedua sampel ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi *Mayer*, akan terbentuk endapan berwarna putih.

Pada tabung ke tiga sampel ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi *Wagner* dan akan terbentuk endapan berwarna coklat atau jingga kecoklatan (Putri & Lubis, 2020).

b. Fenol

Larutan sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 1 mL FeCl_3 1%. Endapan hijau kehitaman mengindikasikan adanya senyawa fenol (Yuliani *et al.*, 2022).

c. Flavonoid

Larutan sampel diambil 1 mL, kemudian ditambahkan 0,2 g magnesium dan ditetesi dengan HCl pekat serta amil alkohol di dalam tabung reaksi. Hasil positif senyawa flavonoid jika berubah warna menjadi kuning sampai dengan merah (Najmudin *et al.*, 2023).

d. Saponin

Larutan sampel sebanyak 2 mL dikocok dengan 2 mL air panas. Jika buih putih yang muncul bertahan selama 10 menit menandakan hasil positif senyawa saponin (Kasitowati *et al.*, 2017).

e. Steroid/Triterpenoid

Larutan sampel diambil sebanyak 1 mL, lalu ditambahkan pereaksi *Liebermann-Burchard* (CH_3COOH anhidrat: H_2SO_4 pekat). Adanya steroid ditunjukkan oleh warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Noviyanty & Linda, 2020).

f. Tanin

Larutan sampel diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan 1 mL larutan gelatin 1% yang mengandung NaCl. Endapan berwarna putih menandakan adanya senyawa tanin (Ikalinus *et al.*, 2015).

3.6.6. Uji Aktivitas Antidiabetes

a. Pembuatan Larutan Glukosa

1. Pembuatan larutan baku induk glukosa 1000 ppm

Larutan baku induk glukosa 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 0,01 g glukosa anhidrat kemudian dilarutkan dengan *aquadest* dalam labu ukur 10 mL hingga tanda pada labu ukur (Anggaraini *et al.*, 2022).

2. Pembuatan larutan kerja glukosa 50 ppm

Pembuatan larutan glukosa 50 ppm dilakukan dengan mengambil 0,5 mL larutan baku induk glukosa 1000 ppm menggunakan pipet, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 10

mL, kemudian tambahkan *aquadest* hingga mencapai tanda batas pada labu ukur (Anggaraini *et al.*, 2022).

b. Pembuatan Pereaksi *Nelson-Somogyi*

Pereaksi *Nelson-Somogyi* dibuat dengan mencampur 25 bagian Nelson A dan 1 bagian Nelson B, atau 25 mL larutan Nelson A dan 1 mL larutan Nelson B (Amanah, 2022).

c. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko dibuat dengan mengambil 1 mL pereaksi *Nelson-Somogyi* ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 1 mL *aquadest*, kemudian tutup tabung reaksi dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit. Kemudian dinginkan larutan selama 5 menit, sampel dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan tambahkan reagen arsenomolibdat ke dalam labu ukur sebanyak 1 mL, encerkan dengan *aquadest* hingga tanda batas, homogenkan dan ukur dengan spektrofotometer UV-Vis (Anggaraini *et al.*, 2022).

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Glukosa

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mengambil 1 mL larutan glukosa 50 ppm ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL pereaksi *Nelson-Somogyi*, kemudian homogenkan larutan lalu tutup tabung reaksi dengan aluminium foil. Panaskan larutan selama 10 menit di atas air mendidih dan biarkan dingin selama 5 menit, kemudian pindahkan

larutan ke dalam labu ukur 10 mL, tambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat ke dalam larutan, kemudian diencerkan dengan *aquadest* sampai tanda batas 10 mL, homogenkan dan diamkan larutan selama *operating time*. Penentuan panjang gelombang maksimum antara 700-780 nm (Anggaraini *et al.*, 2022).

e. Penentuan *Operating Time* (OT)

Pengukuran *operating time* dilakukan dengan mengambil 1 mL larutan baku kerja glukosa 50 ppm kemudian menambahkan 1 mL pereaksi *Nelson-Somogyi* ke dalam tabung reaksi, larutan dihomogenkan, tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil. Kemudian panaskan larutan di atas air mendidih selama 10 menit dan biarkan dingin selama 5 menit, kemudian pindahkan larutan ke dalam labu ukur 10 ml dan tambahkan 1 mL arsenomolibdat ke dalam larutan kemudian diencerkan dengan air *aquadest* hingga mencapai tanda batas 10 mL, homogenkan larutan. Panjang gelombang diukur pada serapan yang telah didapatkan selama 30 menit dengan interval 1 menit, sehingga dapat dihasilkan *operating time* yang stabil (Anggaraini *et al.*, 2022).

f. Penentuan Larutan Kontrol Positif

Pengukuran kontrol positif dilakukan dengan mengambil 1 mL larutan glukosa 50 ppm dengan pipet, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dilanjutkan dengan menambahkan 1 mL pereaksi *Nelson-Somogyi*, larutan kemudian dihomogenkan

kemudian tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil. Kemudian panaskan larutan di atas air mendidih selama 10 menit dan biarkan dingin selama 5 menit. Setelah larutan mendingin, pindahkan larutan ke dalam labu ukur 10 mL dan tambahkan 1 mL larutan arsenomolibdat ke dalam larutan, lalu campur. Encerkan larutan dengan *aquadest* sampai tanda batas kalibrasi labu ukur 10 mL, kemudian homogenkan larutan dan diamkan dengan waktu *operating time* yang sudah didapatkan sebelumnya (Anggaraini *et al.*, 2022).

g. Penentuan Kadar Glukosa Setelah Penambahan Ekstrak Etanol Daun Karamunting

Ekstrak etanol 96% daun karamunting 100 ppm masing-masing dibuat seri konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm dalam 10 mL dipipet sebanyak 5 ml kemudian ditambahkan dengan 5 mL larutan baku glukosa dari konsentrasi 50 ppm, dipipet 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 1 mL pereaksi *Nelson-Somogyi* dan ditutup dengan kapas, kemudian dipanaskan di atas air mendidih selama 10 menit. Larutan tersebut kemudian didinginkan selama 5 menit lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan dengan 1 mL reagen arsenomolibdat ke dalam labu ukur tersebut lalu diencerkan dengan *aquadest* sampai tanda batas, dikocok dan didiamkan selama waktu *operating time*. Hasilnya akan dibaca

menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal kemudian dihitung persentase penurunan kadar glukosa (Nafila *et al.*, 2022).

Absorbansi dari pengukuran ekstrak etanol 96% daun karamunting dikurangi dengan absorbansi kontrol positif. Kemudian masukkan nilai absorbansi ke dalam regresi linier deret baku untuk mengetahui kadar glukosa. Selanjutnya menghitung persentase penurunan kadar glukosa (Amanah, 2022).

3.7. Analisis Data

Absorbansi yang telah diperoleh dan pengukuran sampel akan dibandingkan dengan larutan baku glukosa untuk mengetahui persen kadar penurunan glukosa. Perhitungan persentase kadar penurunan glukosa menurut Anggaraini *et al.* (2022) menggunakan rumus berikut :

$$A = \frac{C-B}{C} \times 100 \%$$

Keterangan :

A = % kadar penurunan glukosa

B = absorbansi glukosa sisa

C = absorbansi kontrol positif (glukosa + *Nelson-Somogyi*)

Besarnya sampel dalam menurunkan kadar glukosa dapat dinyatakan dengan nilai EC₅₀. Dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier yang dimana konsentrasi dari sampel dinyatakan sebagai (x) dan hasil dari persentase penurunan kadar glukosa dinyatakan sebagai (y). Persamaan regresi $y = bx + a$ digunakan untuk menentukan nilai dari EC₅₀ dengan persamaan :

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

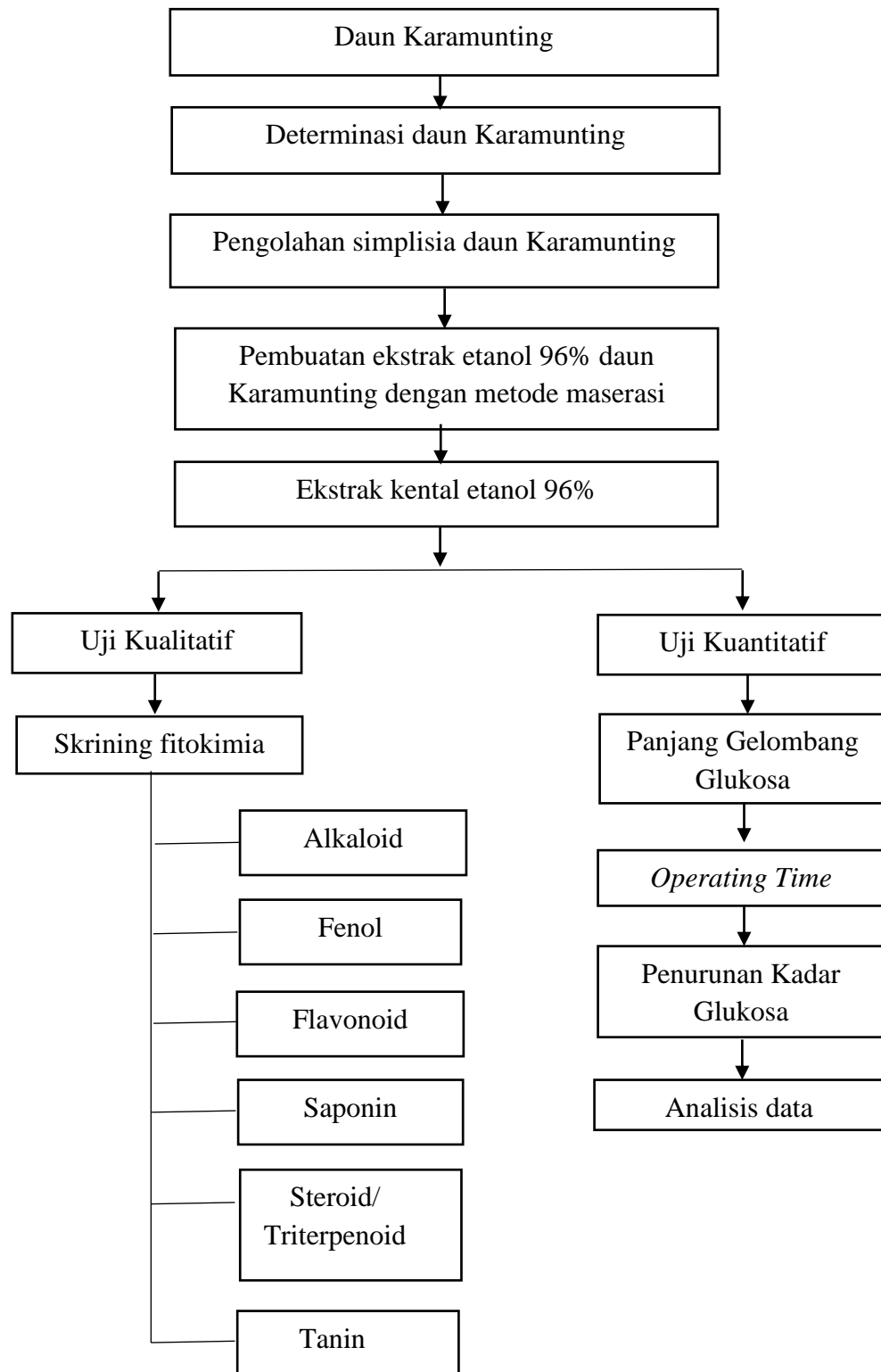
Keterangan :

EC_{50} = Nilai yang dapat memberikan efektivitas dalam menurunkan kadar dari glukosa yaitu sebesar 50%

a = *intercept*

b = *slope*/harga kemiringan kurva

3.8. Kerangka Penelitian



Gambar 11. Kerangka Penelitian