

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Studi ini dirancang agar dilakukan secara *in vitro*. Pada uji *in vitro*, aktivitas penghambatan α -glukosidase ekstrak dan fraksi daun Cep-Cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A. DC) diukur melalui metode maserasi, dengan acarbose digunakan sebagai kontrol positif.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Beberapa alat digunakan adalah maserator, *rotary evaporator*, *waterbath*, neraca, analitik digital (*Shimadzu type ATY-224R*), gelas ukur (*pirex*), tabung reaksi (*pirex*), pipet tetes, kertas saring, mikro pipet, pipet volum, batang pengaduk, erlenmeyer, beaker, cawan penguap, reservoir, mikropipet 1000 μ L dan 100 μ L, vortex, sentrifus, *multichannel pipettor* 200 μ L, *microplate reader*, Tips 1000 μ L dan 200 μ L, tabung sentrifus 15 mL dan 50 mL, 96 *well plate*, *microtube* 1,5 mL.

3.2.2 Bahan

Bahan utama pada penelitian ini adalah Daun Cep Cepan yang didapatkan dari Kecamatan Pancur Batu, Provinsi Sumatera Utara yang kemudian dibawa ke Laboratorium Pusat Universitas Buana Perjuangan Karawang. Sampel yang digunakan adalah N-heksana, Etil Asetat, Etanol dan Air. Enzim α -Glukosidase yang digunakan berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* Type I (*Sigma Aldrich* G5003-100UN-PW), *Phosphate Buffer Saline* 0.1 M (pH 6.9), Glukosidase, 4- Nitrophenyl α -D-glucopyranoside, Natrium Karbonat dan acarbose 50 mg (PT. Dextra Medica) sebagai pembanding inhibitor α -Glukosidase.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Klasifikasi Variabel

a. Variabel Bebas

Pada penelitian ini digunakan ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari simplisia daun Cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A. DC) dari beberapa konsentrasi yang berbeda.

b. Variabel Terikat

Pada penelitian ini, variabel terikatnya adalah penapisan fitokimia dan aktivitas antidiabetes ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari simplisia daun Cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A. DC) melalui penghambatan enzim alpha glukosidase dengan parameter nilai IC_{50} .

c. Variabel Terkendali

Pada penelitian ini, variabel terkendalinya adalah control positif acarbose, konsentrasi ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari simplisia daun Cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A. DC), dan enzim alpha glukosidase.

3.3.2 Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari simplisia daun Cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A. DC) yang diperoleh dari ekstraksi dengan metode maserasi
- b. Enzim α -glukosidase yang digunakan berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* Type I (Sigma Aldrich G5003-100UN-PW)
- c. Uji aktivitas penghambatan enzim alpha glukosidase ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari simplisia daun Cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A. DC) dilakukan hingga dapat dihitung persen (%) penghambatannya
- d. Aktivitas antidiabetes ditunjukkan dengan parameter nilai IC_{50} yang merupakan konsentrasi efektif ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari simplisia daun cep-cepan dalam menghambat 50% enzim α -glukosidase

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengumpulan dan Determinasi Tanaman

Daun cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC) diperoleh di Kecamatan Pancur Batu, Provinsi Sumatera Utara. Setelah itu simplisia daun cep-cepan dideterminasi.

3.4.2 Proses Ekstraksi

Simplisia daun cep-cepan dimaserasi dalam etanol 70% selama (3x24 jam). Setelah maserat terkumpul, *rotary evaporator* digunakan untuk menguapkan pelarut hingga menjadi kental. Kemudian dipanaskan kembali dalam penagas air hingga suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak kental. Lalu dihitung rendemen ekstrak :

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat Ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\%$$

3.4.3 Proses Fraksinasi

Ekstrak etanol dari simplisia daun cep-cepan difraksinasi cair-cair menggunakan pelarut dengan berbagai polaritas. Pelarut yang digunakan berturut-turut yaitu pelarut nonpolar (N-heksana), pelarut semipolar (etil asetat), dan pelarut polar (air). Ekstrak etanol simplisia daun cep-cepan ditimbang sebanyak 250 gram dan dilarutkan dalam pelarut etanol lalu ditambahkan pelarut air dan n-heksana dalam corong pisah. Lalu dilakukan pengocokan. Setelah itu didiamkan hingga terpisah. Hal ini diulangi hingga diperoleh lapisan n-heksana transparan. Fraksi n-heksana kemudian dikeluarkan dan dikumpulkan. Fraksi air yang dihasilkan disimpan dalam pelarut etil asetat untuk fraksinasi. Fraksi air dimasukkan kembali kedalam corong dan ditambahkan pelarut etil asetat dan dilakukan pengocokan, didiamkan untuk memperoleh lapisan etil asetat. Hal ini kemudian diulangi sampai diperoleh lapisan etil asetat bening dan kemudian dipisahkan. Selanjutnya, semua bagian yang telah ditampung diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga menjadi bagian yang kental. Hitung persentase rendemen fraksi:

$$\% \text{ Rendemen Fraksi} = \frac{\text{Berat fraksi yang diperoleh}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

3.4.4 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia ekstrak etanol dan fraksi Daun Cep Cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A. DC) sebagai berikut:

1. Pemeriksaan Alkaloid

Setelah sampel menjadi basa dengan amonia, kloroform ditambahkan dan digiling dengan kuat. Lapisan dari kloroform dipipet, disaring, kemudian ditambahkan asam klorida 2N. Larutan dikocok hingga terbentuk dua lapisan.

Lapisan asam dikeluarkan dengan pipet, dan bagian pertama digunakan sebagai referensi, dan bagian kedua dicampur dengan pereaksi Mayer. Jika terjadi kekeruhan atau pengendapan putih, itu menunjukkan adanya alkaloid. Jika terjadi kekeruhan atau pengendapan kuning sampai jingga, tambahkan reagen Dragendoroff ke bagian ketiga (Farnsworth, 1966).

2. Pemeriksaan Flavonoid

Setelah campuran air ditambahkan, campuran dipanaskan lalu disaring. Filtrat yang didapatkan ditambahkan dengan serbuk magnesium dan asam klorida 5 N, lalu dikocok kuat sebelum ditambahkan amil alkohol. Setelah itu, lapisan amil alkohol terbentuk diamati. Amil alkohol dapat menarik senyawa flavonoid yang berwarna kuning hingga merah (Farnsworth, 1966).

3. Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Sambil digerus, rumput dicampur dengan eter. Setelah dikocok dan diamkan, rumput dipipet dan disaring. Setelah filtrat diuapkan di eternya, residunya dicampur dengan pereaksi Lieberman-Bouchard, dan warna diamati. Steroid memiliki warna biru hingga hijau, sedangkan triterpenoid memiliki warna ungu (Farnsworth, 1966).

4. Pemeriksaan Saponin

Setelah dimasukkan kedalam tabung reaksi, sampel lalu dipanaskan pada penangas air selama 15 menit, lalu saring dan pengampunan. Setelah dingin, kocok filtrat dengan kuat selama 30 detik. Terbentuknya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang menunjukkan senyawa saponin. Busa ini tetap ada selama beberapa menit dan tidak hilang setelah ditambahkan asam klorida atau setelah diamkan selama 20 menit (Farnsworth, 1966).

5. Pemeriksaan Tanin

Setelah dimasukkan ke dalam tabung reaksi, sampel dipanaskan dalam penagas air selama lima belas menit, kemudian saring dengan air panas. Air suling digunakan untuk mengecerkan filter sampai tidak berwarna lagi. Setelah dua mililiter larutan diambil, satu atau dua tetes pereaksi besi (III) klorida 1% ditambahkan. Warna biru, kehitaman, atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin. (Farnsworth, 1966).

3.4.5 Uji Aktivitas Enzim Alfa-Glukosidase

1. Pembuatan Reagen

a. *Phosphate buffer saline* pH 6.9

Siapkan 1 M *phosphate monobasic* (Larutan A). Lalu timbang *phosphate monobasic* sebanyak 6.899 gram dan dilarutkan kedalam 50 mL air, homogenkan. Siapkan 1 M *phosphate dibasic* (Larutan B) Timbang *phosphate dibasic* sebanyak 7.098 gram dan dilarutkan kedalam 50 mL air, homogenkan. Campurkan 4.97 mL larutan A dengan 5.03 mL larutan B dan tambahkan air hingga 100 mL, homogenkan.

b. Enzim glukosidase (stok 1000 ppm)

Diencerkan menggunakan phosphate buffer saline 0.1 M (pH 6.9) ke konsentrasi 1 ppm (larutan harus selalu dalam keadaan dingin di dalam es dan gelap, jika tidak enzim akan rusak dan tidak bisa berkerja).

c. 5 mM 4-NPP (4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside)

Timbang sebanyak 75.3125 mg, lalu larutkan dalam 50 mL *phosphate buffer saline* 0.1 M (pH 6.9). Homogenkan larutan

d. 0.1 M Sodium Karbonat (Na_2CO_3)

Timbang sebanyak 530 mg. Larutkan dalam 50 mL air dan homogenkan larutan.

2. Pembuatan Larutan Standar

a. Larutan Acarbose (1.000 ppm)

Timbang acarbose sebanyak 10 mg. Larutkan dengan 10 mL aquadest. Homogenkan larutan dan simpan pada freezer jika belum digunakan.

b. Larutan serial Acarbose

Pipet larutan Acarbose 1000 ppm kedalam microtube 1,5 mL. Lakukan serial dilution menggunakan *phosphate buffer saline* 0.1 M (pH 6.9) dan homogenkan (dilakukan serial dilution).

3. Pembuatan Larutan Sampel

a. Preparasi Sampel (100.000 ppm)

Sampel ditimbang 100 mg. Sampel dilarutkan dengan pelarut universal (DMSO) sebanyak 1 mL. Campuran dihomogenkan dengan

vortex. Umumnya pelarut yang digunakan adalah DMSO namun dapat menggunakan pelarut lain seperti aquadest, etanol maupun methanol.

b. Larutan Deret Sampel

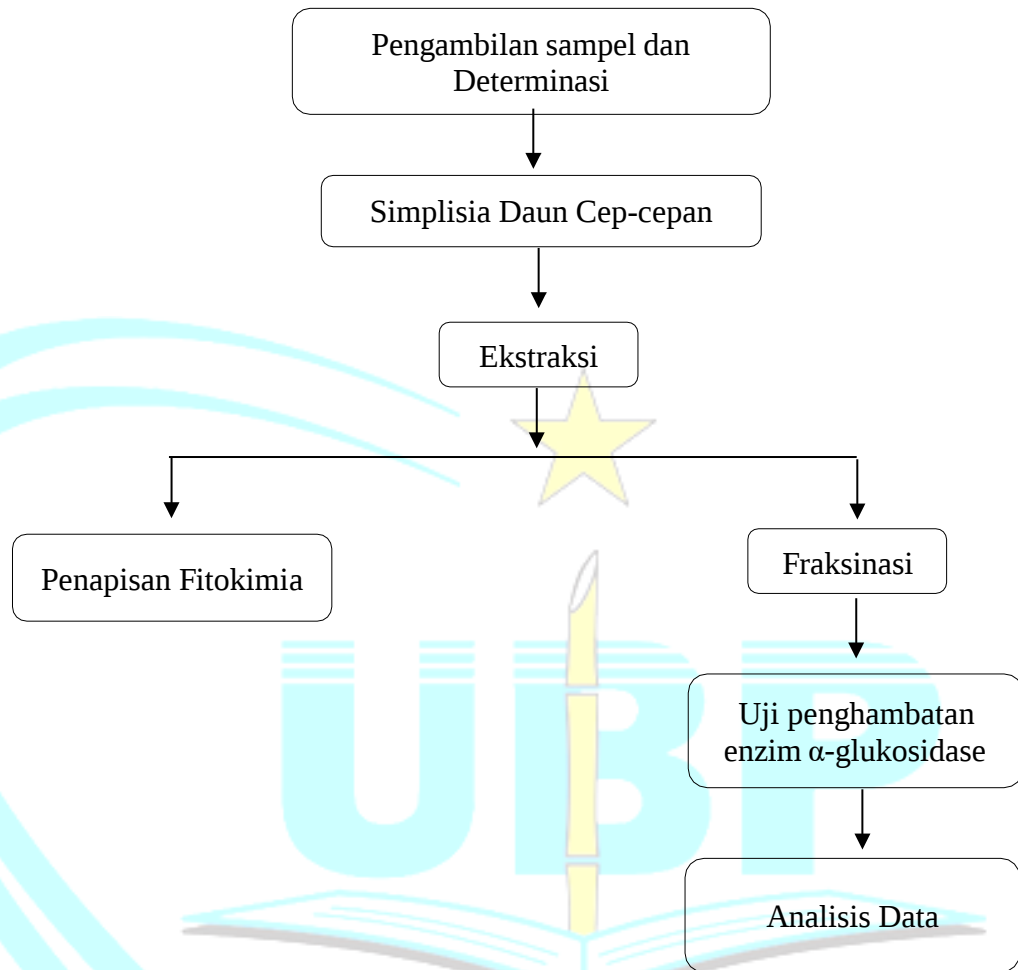
Pipet larutan sampel 100.000 ppm kedalam tabung 1.5 mL. Tambahkan *phosphate buffer saline* 0.1 M (pH 6.9) sesuai volume yang telah di hitung dan homogenkan. Pemipetan larutan sampel 100.000 ppm dan pelarut disesuaikan dengan kebutuhan. Larutan sampel diencerkan hingga diperoleh konsentrasi sampel pembanding acarbose berturut-turut yaitu 0,7813 ppm; 1,5625 ppm; 3,125 ppm; 6,25 ppm; 12,5 ppm; 25 ppm dan 50 ppm. Konsentrasi sampel ekstrak berturut-turut yaitu 31,25 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm dan 1000 ppm. Konsentrasi sampel fraksi etil asetat berturut-turut yaitu 3,13 ppm; 12,5 ppm; 25 ppm; 50 ppm dan 100 ppm. Konsentrasi sampel fraksi N-heksan berturut-turut yaitu 31,25 ppm; 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm dan 1000 ppm. Konsentrasi sampel fraksi air berturut-turut yaitu 0,78 ppm; 1,56 ppm; 3,13 ppm; 12,5 ppm dan 25 ppm.

4. Prosedur Pengujian

Dibuat plate map (skema pengujian). Lalu masukkan 50 μ L *phosphate buffer saline* 0.1 M (pH 6.9) ke dalam plate, lalu tambahkan 10 μ L enzim glukosidase 1 ppm, dan tambahkan sampel atau standar sebanyak 20 μ L. Setiap konsentrasi di masukan ke dalam 3 well (Triplo). Tutup *well-plate* dengan aluminium foil dan inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi 10 menit, tambahkan 20 μ L 4-NPP. Tutup *well-plate* dengan aluminium foil dan inkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi 20 menit, tambahkan 50 μ L 0.1 M Na_2CO_3 untuk penghentian reaksi enzim. Baca pada panjang gelombang 405 nm. Selanjutnya larutan pembanding acarbose digunakan dengan cara yang sama. Persentase aktivitas penghambatan enzim alfa-glukosidase diperoleh:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

3.5 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur penelitian

3.6 Analisis Data

Semua data yang didapatkan dalam penelitian ini dinyatakan dalam bentuk rata-rata $\pm$ SEM (Standar Error Mean). Perbedaan antara parameter yang diukur dibandingkan dengan menggunakan Anova One Way, atau analisis varian satu arah, dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD Post Hoc menggunakan Graphpad prism versi 10 *software*.

3.7 Lokasi Penelitian

Laboratorium Bahan Alam Universitas Buana Perjuangan Karawang akan menjadi lokasi penelitian pada bulan Februari-Juni 2024 dan penelitian secara in vitro akan dilakukan di Biotek Rekayasa Indonesia, Bogor, Jawa Barat pada bulan Juli- Agustus 2024.