

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Bahan dan Alat

3.1.1. Bahan

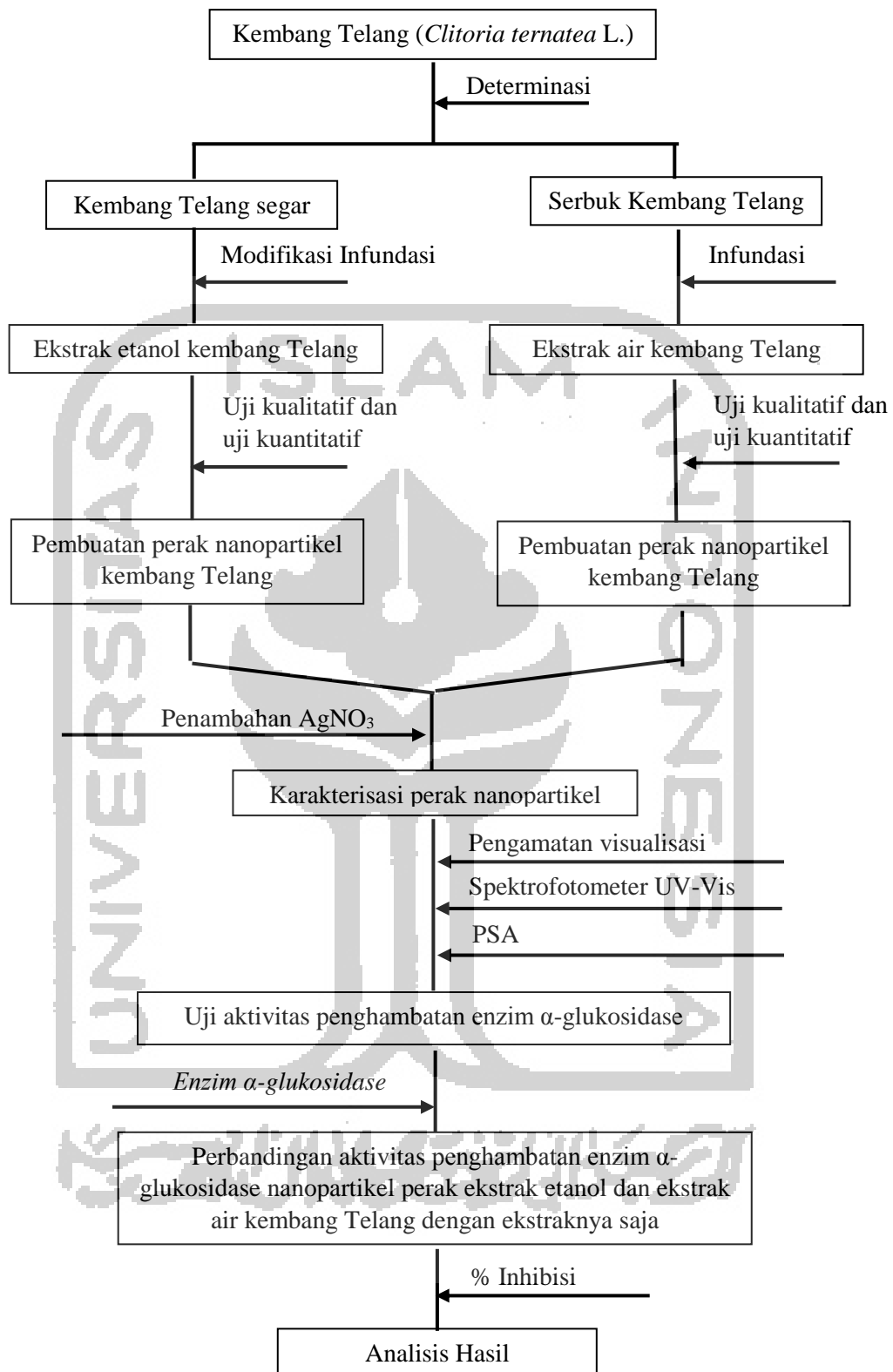
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kembang Telang (*Clitoria ternatea* L.) yang diperoleh dari daerah Prambanan, Yogyakarta, Indonesia pada bulan Juli 2019, *blue tip*, *yellow tip*, mikrotube, *aquades*, *aluminium foil*, etanol, akarbosa (Glukobay), enzim α -glukosidase dari *Saccharomyces cerevisiae* G5003 (Sigma-Aldrich), *p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside* N1337 (Sigma-Aldrich), natrium hidroksida (NaOH), kalium fosfat, FeCl₃, HCl, logam Mg, perak nitrat (AgNO₃), natrium karbonat (Na₂CO₃) dan *water for injection* (WFI)

3.1.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, mikropipet, panci, penangas air, *particle size analyzer/PSA* (Horiba Scientific, Nano Particle Analyzer SZ-100), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi), timbangan analitik, pH meter, termometer, sonikator, *waterbath*

3.2. Skema Penelitian

Sistematika (**Gambar 3.1.**) penelitian diawali dari pengumpulan kembang Telang (*Clitoria ternatea* L.) kemudian dilakukan pembuatan ekstrak etanol kembang Telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan proses modifikasi infundasi dan ekstrak air kembang Telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan proses infundasi, proses selanjutnya dilakukan pembuatan nanopartikel perak dari ekstrak etanol dan ekstrak air kembang Telang (*Clitoria ternatea* L.). Tahap selanjutnya adalah pengujian aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase oleh nanopartikel perak ekstrak kembang Telang (*Clitoria ternatea* L.) dan ekstraknya saja yang kemudian diamati daya hambatnya dan dihitung persentase inhibitor dilanjutkan dengan analisis variasi dengan *oneway* ANOVA.



Gambar 3.1. Skema Penelitian

3.3. Cara Penelitian

3.3.1. Pengumpulan Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*)

Pengumpulan tanaman Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*) diperoleh dari daerah Prambanan, Yogyakarta. Kembang telang (*Clitoria ternatea L.*) dipanen pada umur 2 bulan pada pagi hari. Kembang telang (*Clitoria ternatea L.*) yang telah didapatkan dipilih kemudian dideterminasi di Laboratorium Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada (UGM).

3.3.2. Pembuatan ekstrak etanol kelopak Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*)

Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*) dikumpulkan dan dicuci bersih dengan air suling. Setelah dicuci, dilakukan ekstraksi dengan infundasi termodifikasi. Ditimbang 2,85 gram kelopak dari Kembang Telang kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 100 ml pada suhu 58°C selama 15 menit. Kemudian larutan disaring menggunakan kertas saring watman.

3.3.3. Pembuatan ekstrak air kelopak Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*)

Ditimbang 5,8 gram serbuk kelopak Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*) ditambahkan aquades 100 ml. Kemudian proses infundasi dilakukan pada suhu 90°C selama 15 menit. Larutan disaring menggunakan kertas saring watman.

3.3.4. Pengujian kualitatif senyawa flavonoid ekstrak kelopak Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*)

Dilakukan pengujian kualitatif kandungan ekstrak etanol dan ekstrak air kelopak Kembang Telang dengan menggunakan pereaksi tabung. Pengujian dilakukan dengan melihat perubahan warna yang terjadi pada ekstrak kelopak Kembang Telang yang bereaksi dengan logam Mg kemudian ditetesi HCl pekat serta direaksikan dengan FeCl₃.

3.3.5. Pengujian kuantitatif senyawa antosianin ekstrak kelopak Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*)

Pengujian kuantitatif kandungan antosianin dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi, Universitas Islam Indonesia. Ditimbang 0,3 gram ekstrak kental, dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml, tambahkan 24 ml campuran etanol 95%

dan asam klorida 1 N dengan perbandingan 85 : 15, digojog kemudian diuji pH hingga 1 dengan penambahan asam klorida 4 N. Digojog selama 15 menit, lalu disaring menggunakan penyaring membran dengan porositas 0,45 μm . Dimasukkan filtrat ke dalam labu ukur 50 ml, diadd dengan campuran etanol 95% dan asam klorida 1 N dengan perbandingan 85 : 15 sampai tanda batas. Larutan diukur serapan pada panjang gelombang maksimum 535 nm menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Campuran etanol 95% dan asam klorida 1 N dengan perbandingan 85 : 15 digunakan sebagai blanko. Kadar antosianin dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Depkes RI, 2008):

$$C = \left(\frac{A}{\epsilon}\right) \times \left(\frac{V}{1000}\right) \times \frac{BM}{w} \times 10^6$$

3.3.6. Pembuatan AgNO_3 1 mM dan AgNO_3 2 mM

Pembuatan AgNO_3 1 mM yaitu ditimbang 0,008 gram perak nitrat (AgNO_3), kemudian ditambahkan 50 ml *water for injection* (WFI). Kemudian dimasukkan dalam botol gelap.

Pembuatan AgNO_3 2 mM yaitu ditimbang 0,016 gram perak nitrat (AgNO_3), kemudian ditambahkan 50 ml *water for injection* (WFI). Kemudian dimasukkan dalam botol gelap. Larutan AgNO_3 selanjutnya disimpan dalam suhu ruang.

3.3.7. Pembuatan nanopartikel perak ekstrak etanol kelopak Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*)

Preparasi formulasi dilakukan dengan menyiapkan *vial* yang telah dilapisi dengan *aluminium foil* agar terhindar dari paparan cahaya. Dimasukkan AgNO_3 10^{-3} M pada masing-masing *vial* dan ditambahkan ekstrak etanol kelopak Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*), kemudian dilakukan sonikasi dengan *ultrasonic homogenizer* (Biologic. Inc) dengan kekuatan pulser 30 selama 3 menit. Diberi label.

Tabel 3.1. Formulasi Nanopartikel Perak Ekstrak Etanol Kembang Telang

Ekstrak Etanol 2,85 %	AgNO ₃ 10 ⁻³ M	Pulser (%)	Waktu
50 µl	1000 µl	30	3 menit

Keterangan : pulser adalah kekuatan getaran sonikator

3.3.8. Pembuatan nanopartikel perak ekstrak air kelopak Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*)

Preparasi formulasi dilakukan dengan menyiapkan *vial* yang telah dilapisi dengan aluminium foil agar terhindar dari paparan cahaya. Dimasukkan ekstrak air kelopak Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*) dan ditambahkan AgNO₃ 2x10⁻³ M pada masing-masing *vial*, kemudian dilakukan sonikasi dengan *ultrasonic homogenizer (Biologic. Inc)* dengan kekuatan pulser 30 selama 4 menit. Diberi label.

Tabel 3.2. Formulasi Nanopartikel Silver Ekstrak Air Kembang Telang

Ekstrak air 5,8 %	AgNO ₃ 2x10 ⁻³ M	Pulser (%)	Waktu
90 µl	1000 µl	30	4 menit

Keterangan : pulser adalah kekuatan getaran sonikator

3.3.9. Karakterisasi nanopartikel perak ekstrak etanol dan ekstrak air Kembang Telang (*Clitoria ternatea L.*)

Karakterisasi Nanopartikel perak ekstrak etanol dan ekstrak air Kembang Telang dilakukan dengan pengamatan secara visualisasi, pengujian spektrofotometer UV-Vis, dan PSA.

3.3.9.1. Pengamatan secara visual nanopartikel perak ekstrak etanol Kembang Telang

Pengamatan secara visual pada nanopartikel perak ekstrak etanol Kembang Telang dilakukan pada jam ke-0, jam ke-12 serta jam ke-24 untuk melihat terbentuknya perak nanopartikel dengan mengamati perubahan warna menjadi kuning hingga kecoklatan . Pengamatan secara visual pada nanopartikel perak ekstrak air Kembang Telang dilakukan pada jam ke-0, jam ke-24 serta jam ke-48 untuk melihat terbentuknya perak nanopartikel dengan mengamati perubahan warna menjadi kuning hingga kecoklatan (Balan et al., 2016).

3.3.9.2. Pengamatan berdasarkan panjang gelombang serapan uv-vis nanopartikel perak

Panjang gelombang yang terlihat pada spektrofotometer UV-Vis menunjukkan adanya resonansi permukaan plasmon. Nanopartikel perak memiliki panjang gelombang pada rentang 400 nm sampai 450 nm pada spektrofotometer UV-Vis (Oktaviani, 2015). Pengamatan panjang gelombang nanopartikel perak ekstrak etanol Kembang Telang dilakukan pada jam ke-0, jam ke-12 serta jam ke-24. Pengamatan panjang gelombang nanopartikel perak ekstrak air Kembang Telang dilakukan pada jam ke-0, jam ke-24 serta jam ke-48.

3.3.9.3. Pengukuran partikel nano dengan menggunakan PSA

Ukuran partikel diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA). Pengukuran bertujuan untuk mengetahui ukuran partikel hasil preparasi nanopartikel perak. Ukuran partikel nanopartikel yang baik yaitu 2 -100 nm (Mittal et al., 2013).

3.3.10. Pengujian aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase

Pengujian aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase dimodifikasi dari metode Anam *et al* dan Kim *et al*. Pengujian nanopartikel perak yang diuji yaitu akar bosa sebagai kontrol positif, nanopartikel perak ekstrak etanol kelopak Kembang Telang, nanopartikel perak ekstrak air kelopak Kembang Telang, ekstrak etanol kelopak Kembang Telang, ekstrak air kelopak Kembang Telang, pelarut etanol dan AgNO₃, serta pelarut air dan AgNO₃ (**Tabel 3.3.**).

Tabel 3.3. Sampel yang digunakan pada inhibisi enzim α -glukosidase

Kelompok perlakuan	Sampel
Perlakuan A	Nanopartikel perak ekstrak etanol
Perlakuan B	Nanopartikel perak ekstrak air
Perlakuan C	Ekstrak etanol kembang Telang
Perlakuan D	Ekstrak air kembang Telang
Perlakuan E	Pelarut etanol dan AgNO ₃
Perlakuan F	Pelarut air dan AgNO ₃
Kontrol positif	Akar bosa

3.3.10.1. Penyiapan bahan

1. Pembuatan Larutan Enzim α -Glukosidase

Larutan enzim α -glukosidase dibuat dengan menimbang 1 mg enzim α -glukosidase (100 U/ 8 mg) dan dilarutkan dalam 8 ml *water for injection* (WFI) dalam kondisi dingin. Larutan induk enzim diambil 4 μ l untuk digunakan pada reaksi sehingga diperoleh larutan enzim setara dengan 0,05 U (**Lampiran 8**).

2. Pembuatan Larutan Substrat *p*-nitrophenyl- α -D-glucoopyranoside (*p*-NPG) 3 mM

Larutan substrat *p*-NPG 3 mM dibuat dengan menimbang 7,23 mg substrat *p*-NPG dan dilarutkan dalam 1 ml *water for injection* (WFI) dalam kondisi dingin (**Lampiran 8**) (Kim et al., 2011).

3. Pembuatan Larutan Akarbosa

Larutan akarbosa dibuat dengan menimbang 200 mg serbuk dari tablet akarbosa (Glukobay) yang telah digerus. Kemudian dilarutkan dalam 10 ml *water for injection* (WFI). Selanjutnya disentrifugasi hingga diperoleh konsentrasi larutan standar 20 mg/ml.

4. Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 6,8

Larutan dapat fosfat pH 6,8 dibuat dengan memasukkan 50 ml kalium fosfat monobasa 0,2 M ke dalam labu ukur 200 ml. Kemudian ditambahkan 22,4 ml natrium hidroksida (NaOH) 0,2 M. Tambahkan aquades hingga tanda batas (**Lampiran 8**) (Anonim, 2014).

5. Pembuatan Larutan Natrium Karbonat 0,1 M

Larutan natrium karbonat 0,1 M dibuat dengan menimbang 529,95 mg natrium karbonat dan dilarutkan dalam 50 ml *water for injection* (**Lampiran 8**) (Prabandari, 2017).

3.3.10.2. Uji inhibisi enzim α -glukosidase

Enzim α -glukosidase (0,05 U) sebanyak 4 μ l dimasukkan kedalam masing-masing mikrotube. Dipipet sebanyak 35 μ l *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (*p*-NPG) sebagai substrat, kemudian ditambahkan 50 ml buffer fosfat (pH 6,8). Selanjutnya, campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 menit. Kemudian, dimasukkan sampel sebanyak 50 μ l kedalam masing-masing mikrotube.

Selanjutnya, campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian reaksi diakhiri dengan menambahkan natrium karbonat (Na_2CO_3) sebanyak 2 ml. Dilakukan 6x replikasi pada setiap sampel.

Kontrol normal dibuat dengan cara menyampurkan 4 μl enzim α -glukosidase (0,05 U) ke dalam masing-masing mikrotube. Dipipet sebanyak 35 μl *p*-NPG sebagai substrat, kemudian ditambahkan 50 ml buffer fosfat (pH 6,8). Selanjutnya, campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian reaksi diakhiri dengan menambahkan natrium karbonat (Na_2CO_3) sebanyak 2 ml. Dilakukan 6x replikasi.

Kontrol positif dibuat dengan cara menyampurkan enzim α -glukosidase (0,05 U) sebanyak 4 μl dimasukkan kedalam masing-masing mikrotube. Dipipet sebanyak 35 μl *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (*p*-NPG) sebagai substrat, kemudian ditambahkan 50 ml buffer fosfat (pH 6,8). Selanjutnya, campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 menit. Kemudian, dimasukkan akarbosa (Glucobay) sebanyak 50 μl kedalam masing-masing mikrotube. Selanjutnya, campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian reaksi diakhiri dengan menambahkan natrium karbonat (Na_2CO_3) sebanyak 2 ml. Dilakukan 6x replikasi.

Blanko dibuat dengan cara menyampurkan 35 μl *p*-NPG sebagai substrat yang di larutkan dengan 50 μl buffer fosfat (pH 6,8). Dilakukan 6x replikasi.

Tabel 3.4. Penghambatan enzim α -glukosidase

	Blanko	Kontrol Normal	Kontrol Positif	Perlakuan
Enzim α -glukosidase (0,05 U)	-	4 μl	4 μl	4 μl
<i>p</i> -NPG	35 μl	35 μl	35 μl	35 μl
Buffer Fosfat	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 menit				
Sampel / akarbosa	-	-	50 μl	50 μl
Diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit				
Natrium Karbonat	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

Selanjutnya aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase ditentukan dengan mengukur absorbansi pelepasan *p-nitrophenol* dari *p-NPG* yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 403 nm.

3.4. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan cara menghitung persentase inhibisi α -glukosidase. Data yang diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi dapat dihitung menggunakan persamaan :

$$\text{persentase Inhibisi} = \frac{\Delta\text{Abs normal} - \Delta\text{Abs sampel}}{\Delta\text{Abs normal}} \times 100$$

Keterangan :

Δ Absorbansi normal = abs normal – abs blanko

Δ Absorbansi sampel uji = abs sampel – abs blanko

Persentase inhibitor yang diperoleh antar kelompok selanjutnya dilakukan analisis variasi terhadap ekstrak air, ekstrak etanol, nanopartikel perak ekstrak etanol dan nanopartikel perak ekstrak air kembang telang dengan menggunakan *oneway* ANOVA dengan taraf kepercayaan 95 %. Hasil dapat dinyatakan signifikan jika $p < 0,05$ ($\alpha = 0,05$).