

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Sampel dan Lokasi Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang berasal dari Yogyakarta, Indonesia.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati, Laboratorium Kimia Instrumen Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran Kampus Jatinangor.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, maserator, penguap putar bervakum (*vaccum rotatory evaporator*), pompa vakum, corong *Buchner*, dan *freeze dryer*. Alat instrumen yang digunakan untuk karakterisasi yaitu FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) Shimadzu 8400. Sedangkan untuk pengujian hayati antiparkinson digunakan beberapa peralatan meliputi kandang polipropilen, alat uji katalepsi, spuit 27 G 1cc, dan spuit sonde 1 cc.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji jintan hitam yang telah dipreparasi menjadi simplisia dengan cara digrinding. Bahan kimia yang digunakan meliputi etanol teknis 70%, akuades, kertas saring, L-Dopa (L-3,4-Dihidroksifenilalanin) SIGMA, Haloperidol, PGA (*Pulvis Gummni Arabicum*). Pada pengujian toksisitas akut digunakan mencit betina 15 ekor dengan berat 20-30g . Sedangkan pada uji hayati antiparkinson digunakan mencit

jantan dengan berat 20-30 g sebanyak 20 ekor. Seluruh hewan uji diperoleh dari Sekolah Tinggi Ilmu Hayati (STIH) ITB dan diberi pakan pelet P551.

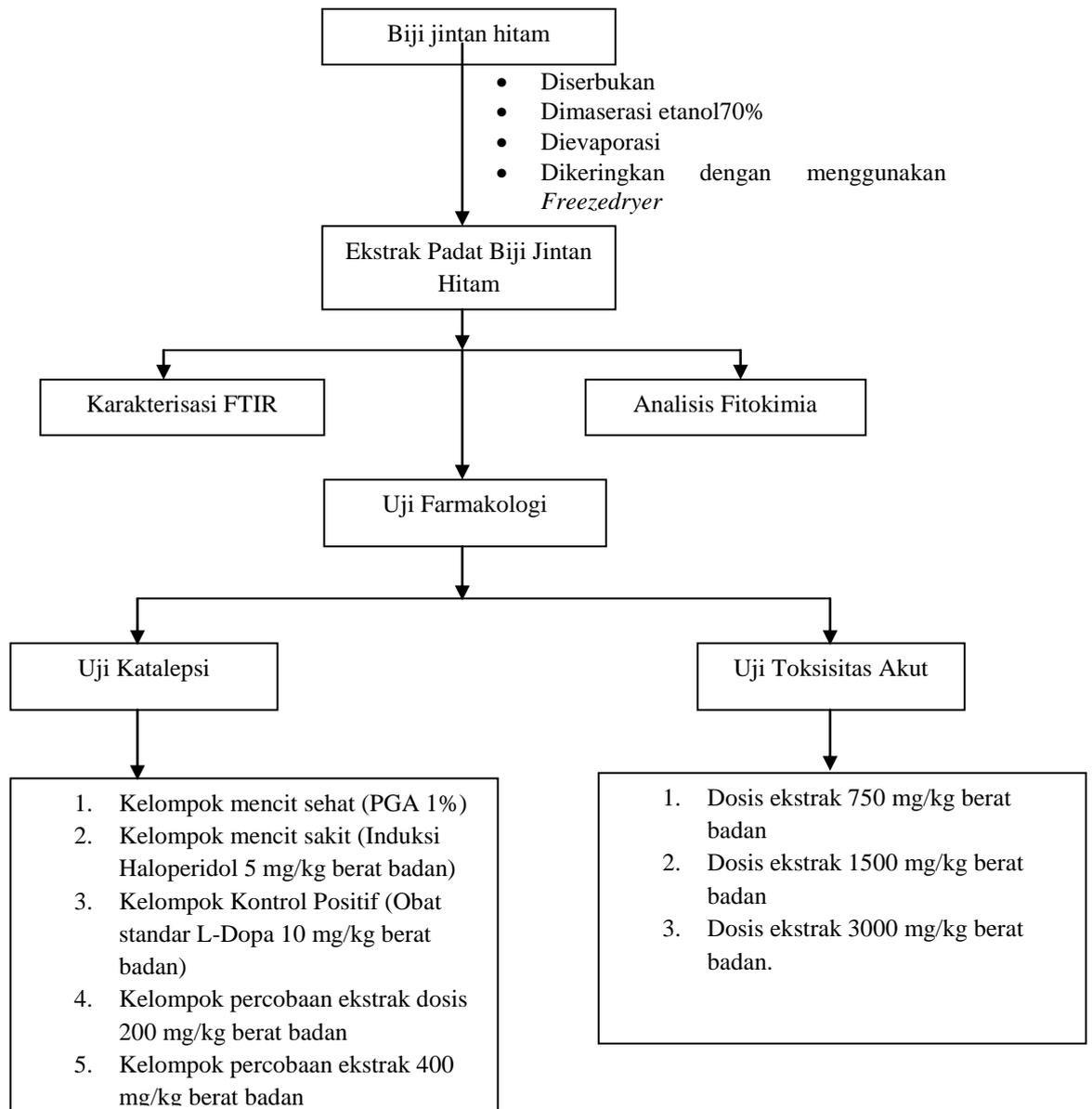
Fajri Nur Adrianto, 2014

Uji potensiekstrak biji jintan hitam (nigella sativa L.) asal Indonesia sebagai obat antiparkinson

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.3 Metodologi Penelitian

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini ditunjukkan pada bagan alir penelitian (Gambar 3.1)



Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Tahap Pra Uji Farmakologi

Pada tahap awal penelitian, dilakukan preparasi terhadap biji jintan hitam dengan cara disortir, kemudian dilakukan penggilingan menggunakan mesin penggiling hingga berbentuk serbuk. Biji jintan hitam yang telah menjadi simplisia kemudian ditimbang untuk memperoleh berat simplisia yang akan di ekstraksi.

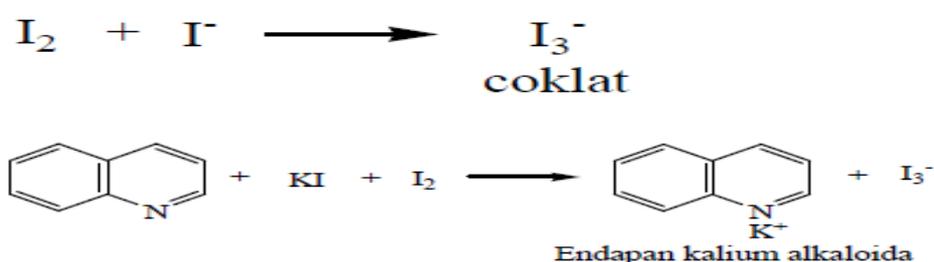
Ekstraksi biji jintan hitam dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Maserasi dilakukan selama satu minggu dengan penggantian pelarut sebanyak tiga kali. Hasil maserasi kemudian dihilangkan pelarutnya dengan cara evaporasi menggunakan penguap berputar vakum. Ekstrak hasil evaporasi yang berbentuk cair kemudian dikeringkan dengan menggunakan freeze dryer.

Ekstrak biji jintan hitam yang telah dikeringkan kemudian di uji fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa-senyawa yang terkandung pada ekstrak. Beberapa uji fitokimia yang dilakukan diantaranya uji kandungan senyawa alkaloid, kuinon, flavonoid, dan senyawa golongan terpen serta steroid. Prosedur kerja uji fitokimia yaitu sebagai berikut :

1. Uji Alkaloid

Ekstrak biji jintan hitam sebanyak 0,5 g ditambahkan kloroform sebanyak ± 2 ml kemudian diaduk dan ditambahkan H_2SO_4 beberapa tetes hingga terbentuk dua lapisan. Kemudian ditambahkan pereaksi Wagner yang mengandung Kalium Iodida (KI) dan I_2 hingga terlihat terbentuk endapan coklat yang menandakan uji positif mengandung alkaloid.

Reaksi yang terjadi yaitu :



Gambar 3.2. Reaksi uji fitokimia alkaloid.

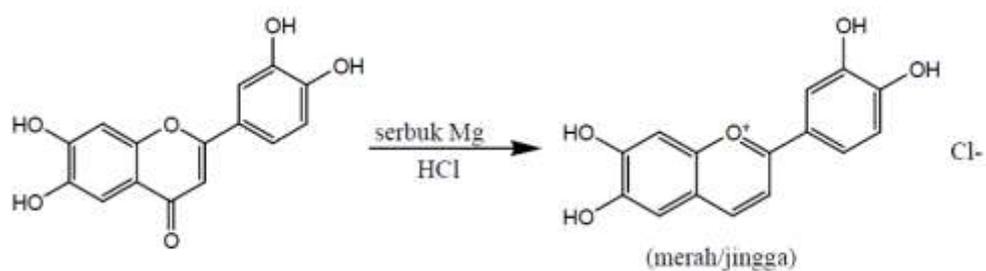
2. Uji Kuinon

Ekstrak biji jintan hitam ditambahkan sedikit akuades, kemudian ditambahkan NaOH 2N dan dikocok. Ekstrak mengandung kuinon apabila hasil pengujian ditandai dengan berubahnya warna larutan menjadi sedikit merah.

3. Uji Flavonoid

Sedikit ekstrak biji jintan hitam dimasukan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa miligram serbuk magnesium dan ditambahkan \pm 4 ml campuran HCl 37 % dengan alkohol 96%. Campuran kemudian dikocok, apabila terbentuk warna merah, kuning, atau jingga maka pada sampel positif mengandung senyawa flavonoid.

Reaksi yang terjadi yaitu :

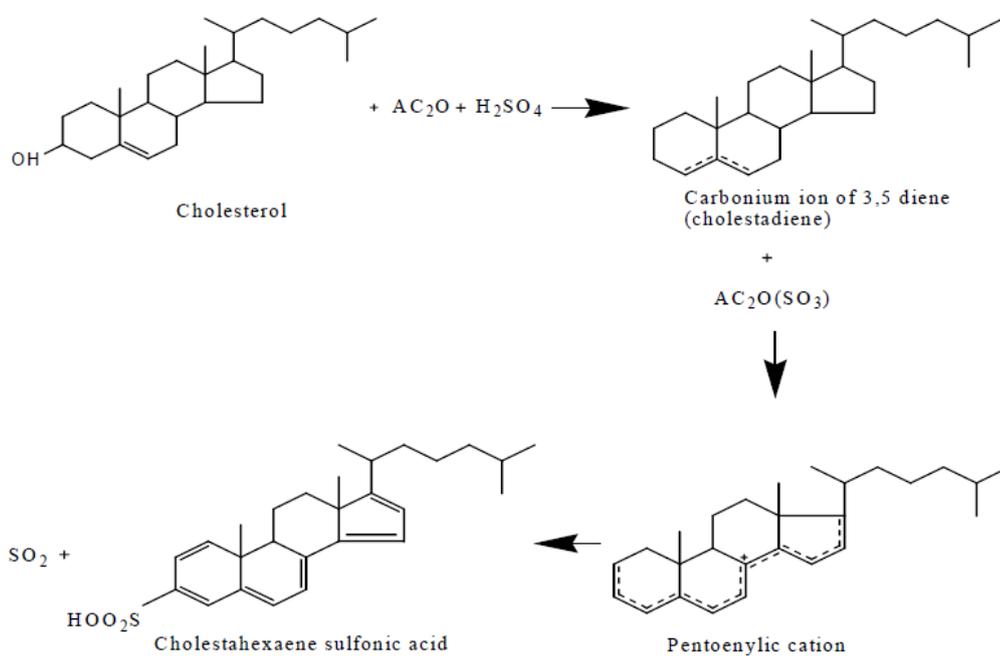


Gambar 3.3. Reaksi uji fitokimia flavonoid

4. Uji Steroid

Sebanyak beberapa miligram sampel ditambahkan sedikit asam asetat glasial, setelah itu ditambahkan beberapa tetes H₂SO₄ pekat. Apabila terbentuk warna biru maka sampel positif mengandung steroid.

Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4. Reaksi uji fitokimia steroid

Setelah uji fitokimia dilakukan, kemudian ekstrak padat biji jintan hitam dianalisis menggunakan instrumen FTIR untuk mengetahui keberadaan jenis gugus fungsi dari senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak.

3.3.2 Uji Farmakologi Antiparkinson

Uji farmakologi antiparkinson yang dilakukan mencakup pengujian toksisitas akut dan pengujian katalepsi. Pengujian toksisitas akut dilakukan untuk mengetahui tingkat keracunan dari ekstrak biji jintan hitam pada rentang

Fajri Nur Adrianto, 2014

Uji potensiekstrak biji jintan hitam (nigella sativa L.) asal Indonesia sebagai obat antiparkinson

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dosis tertentu. Dosis yang digunakan pada pengujian toksisitas akut yaitu dosis 750 mg/kg, 1500 mg/kg, dan 3000 mg/kg. Pemilihan dosis tersebut merupakan pengembangan dari penelitian uji toksisitas akut sebelumnya yang menguji toksisitas akut ekstrak biji jintan hitam mulai dosis 5 mg/kg, 50 mg/kg, dan 300 mg/kg hingga 2000 mg/kg. Pemilihan dosis 750 mg/kg, 1500 mg/kg, dan 3000 mg/kg didasarkan pada pedoman penentuan dosis DRF (*Dossage Range Finding*) dengan beberapa faktor pemilihan seperti viskositas ekstrak, rentang dosis kerja pada pengujian katalepsi, serta melihat standar tingkat toksisitas akut secara umum menurut Loomis (1978) (Tabel 2.3) . Pada pengujian katalepsi digunakan dosis 200 mg/kg dan 400 mg/kg. Dosis yang digunakan merujuk pada penelitian yang telah dilakukan Shandu dan Rana (2013) mengenai evaluasi aktivitas ekstrak biji jintan hitam dari India terhadap gejala kekakuan otot yang diinduksi oleh klorpromazin. Pada penelitian ini digunakan sampel biji jintan hitam dari Indonesia yang diduga akan memiliki potensi yang berbeda dengan biji jintan hitam asal India karena kadungan metabolit sekunder yang juga berbeda. Sebagai uji pendahuluan, pemilihan dosis 200 mg/kg dan 400 mg/kg digunakan karena sebelumnya diketahui memiliki aktivitas yang cukup baik.

3.3.2.1 Preparasi Pemberian Dosis

Preparasi dosis dilakukan untuk membuat ukuran dosis dari cuplikan yang akan diberikan pada hewan uji. Dosis yang dibuat digunakan untuk pengujian farmakologi yang meliputi uji toksisitas akut dan uji katalepsi. Volume dosis yang diberikan pada hewan uji disesuaikan dengan berat badan mencit dan dosis dalam satuan mg/1000 g. Apabila mencit yang digunakan memiliki berat 25 g, maka volume pemberian cuplikan yaitu sebanyak 0,25 ml. Berikut adalah prosedur pembuatan dosis cuplikan untuk uji toksisitas akut:

1. Pembuatan suspensi dosis ekstrak 3000 mg/kg dalam PGA 1% (100 mg/10ml)

Ekstrak ditimbang sebanyak 3000 mg kemudian dicampurkan dengan PGA sebanyak 100 mg dan digerus menggunakan lumpang alu hingga homogen. Setelah homogen kemudian ditambahkan akuades sebanyak 10 ml sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga campuran tersuspensi secara sempurna.

2. Pembuatan suspensi dosis ekstrak 1500 mg/kg dalam PGA 1% (100 mg/10ml)
Suspensi dosis 3000 mg/kg diambil sebanyak 5 ml kemudian diencerkan menggunakan akuades hingga volume 10 ml.
3. Pembuatan suspensi dosis ekstrak 750 mg/kg dalam PGA 1% (100 mg/10ml)
Suspensi dosis 1500 mg/kg diambil sebanyak 5 ml kemudian diencerkan menggunakan akuades hingga volume 10 ml.

Sementara prosedur pembuatan cuplikan dosis untuk uji farmakologi katalepsi diuraikan sebagai berikut:

1. Pembuatan suspensi PGA 1%
PGA ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan sedikit demi sedikit menggunakan akuades 10 ml pada media lumpang alu.
2. Pembuatan dosis Haloperidol 5 mg/kg bb
Haloperidol ditimbang sebanyak 7,5 mg kemudian dibuat suspensi dengan PGA 1% (40 mg/4 ml) untuk digunakan pada mencit sebanyak 20 ekor.
3. Pembuatan dosis L-Dopa 10 mg/kg bb
L-Dopa ditimbang sebanyak 10 mg dan dibuat suspensi dengan 10 ml PGA 1% (100 mg/10 ml).
4. Pembuatan dosis ekstrak jintan hitam 400 mg/kg bb.
Ekstrak padat jintan hitam ditimbang sebanyak 400 mg, kemudian dibuat suspensi dalam 10 ml PGA 1% (100 mg/10 ml).

5. Pembuatan dosis ekstrak jintan hitam 200 mg/kg bb

Dosis ekstrak jintan 400 mg/kg diambil sebanyak 5 ml dan diencerkan menggunakan akuades hingga mencapai volume 10 ml.

3.3.2.2 Preparasi Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*). Mencit yang digunakan adalah mencit jantan dan betina dengan berat badan rata-rata antara 20-30 g dan ditempatkan pada kandang polipropilen. Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu mencit diadaptasikan pada kondisi ruang uji dengan suhu kamar ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) dengan kondisi siklus penerangan gelap terang selama 24 jam selama satu minggu. Mencit diberi pakan berupa pelet P551 dan air. Sebelum dilakukan pengujian, mencit terlebih dahulu dipuasakan selama semalam.

3.3.2.3 Pengujian Toksisitas Akut

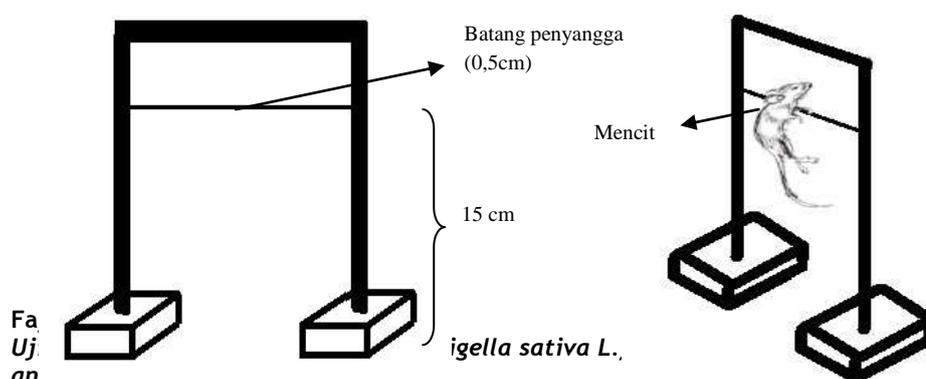
Pada pengujian toksisitas akut, mencit dibagi kedalam 3 kelompok mencit betina masing-masing berjumlah 5 ekor. Mencit terlebih dahulu tidak diberi pakan selama satu malam dan hanya diberi air. Masing-masing kelompok diberikan suspensi dosis ekstrak biji jintan hitam sebesar 750 mg/kg, 1500 mg/kg, dan 3000 mg/kg. Kemudian diamati keadaan mencit setelah 24 jam pengujian apabila terdapat kelompok mencit yang seluruhnya mati, maka dapat dikatakan bahwa pada dosis yang diberikan pada kelompok tersebut merupakan dosis toksisitas akut dari ekstrak biji jintan hitam. Namun apabila pada suatu kelompok hanya terdapat 2 atau 3 ekor yang mati, maka pengujian dapat diulang kembali untuk dosis yang sama.

3.3.2.4 Pengujian Katalepsi

Pada pengujian katalepsi digunakan mencit jantan sebanyak 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 mencit. Kelompok mencit terdiri dari

kontrol normal, yaitu mencit selayaknya mencit normal yang hanya diberikan suspensi PGA 1%. Kontrol negatif, yaitu mencit sakit (diinduksi gejala Parkinson) yang diberikan suspensi haloperidol 5 mg/kg berat badan. Kontrol positif, yaitu kelompok mencit yang diberikan haloperidol dan L-Dopa (Obat standar penyakit Parkinson) 10 mg/kg berat badan. Kelompok dosis ekstrak biji jintan hitam 200 mg/kg dan 400 mg/kg, yaitu kelompok mencit yang diberikan haloperidol dan ekstrak biji jintan hitam dengan dosis masing-masing 200 mg/kg dan 400 mg/kg untuk setiap kelompoknya. Pemberian suspensi haloperidol dilakukan secara intraperitoneal 30 menit setelah pemberian secara intraperitoneal suspensi PGA 1%, L-Dopa, dan ekstrak biji jintan hitam dosis 200 mg/kg dan 400 mg/kg. Pada penelitian sebelumnya, untuk menginduksi kekakuan digunakan obat antipsikosis klorpromazin, sementara pada penelitian yang ini haloperidol digunakan karena memberikan efek katalepsi yang lebih cepat dibandingkan obat lain.

Pengamatan pengujian katalepsi dilakukan berdasarkan metode Costall dan Olley yang diuraikan oleh Subarnas et al. (1993). Metode tersebut digunakan untuk melihat efek ekstrak secara cepat selama dua jam setelah pemberian ekstrak dan haloperidol. Berdasarkan metode tersebut intensitas katalepsi diukur sebagai lamanya waktu mencit menggantung pada sebuah tiang kawat setinggi 15 cm dengan diameter kawat 0,5 cm tanpa melakukan pergerakan (Gambar 3.5). Mencit dikategorikan mengalami gejala katalepsi apabila tetap menggantung tanpa melakukan pergerakan selama lebih dari 15 detik. Pengamatan katalepsi dilakukan 30 menit setelah pemberian suspensi Haloperidol, dan diamati dalam interval waktu 30 menit selama 120 menit.



Gambar 3.5. Skema pengujian katalepsi