

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Sampel dan Lokasi Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar landep (*Barleria prionitis*) yang berasal dari Kebun Percobaan Manoko, Lembang. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset, Laboratorium Kimia Instrumen (LKI) Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.1.2 Alat

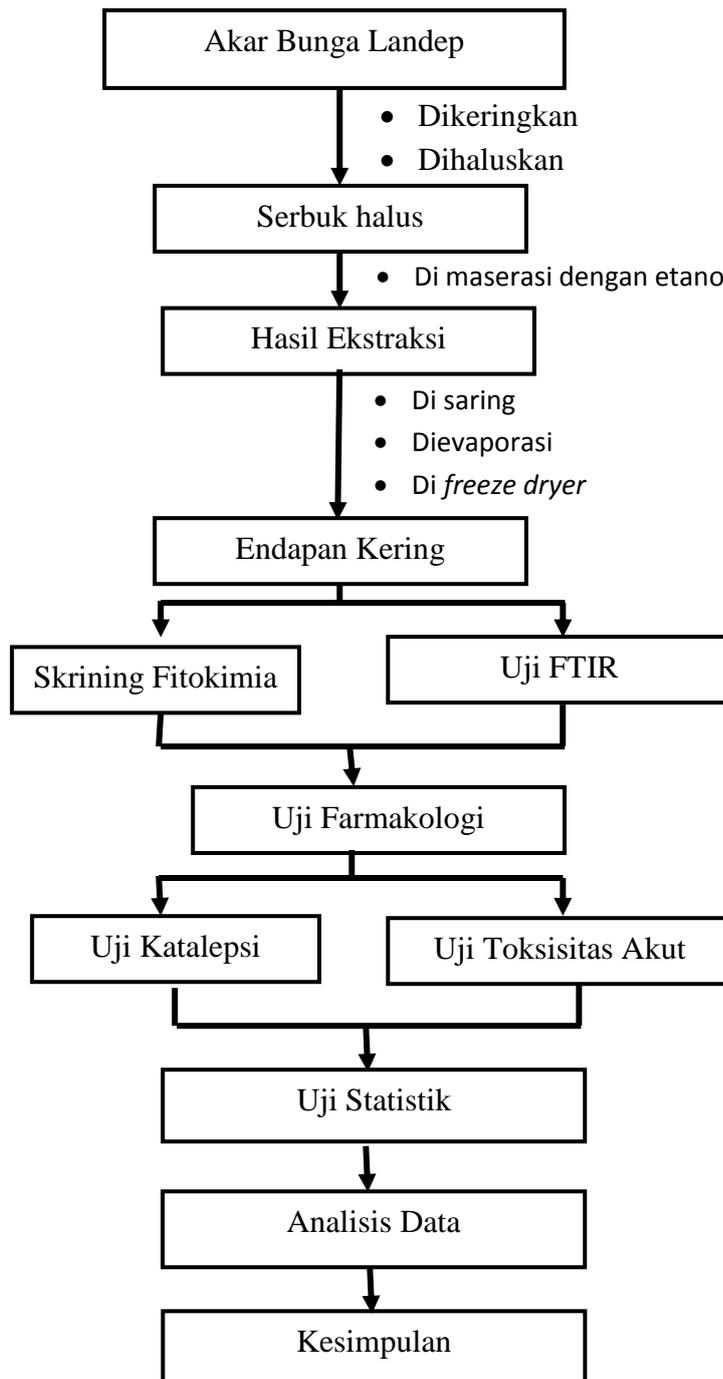
Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi meliputi alat-alat gelas, *rotatory evaporator vaccum*, pompa vakum, neraca analitik, corong *Buchner*, dan *freeze dryer*. Pada tahap karakterisasi, instrumen yang digunakan adalah spektrometer FTIR Shimadzu 8400. Sedangkan pada tahap uji farmakologi peralatan yang digunakan diantaranya sonde, suntikan, spet 3 mL, neraca Ohaus, labu ukur, lumpang, alu, botol vial, gelas ukur, kandang *polypropylene*.

3.1.2 Bahan

Pada penelitian ini bahan yang digunakan adalah akar landep. Sedangkan bahan kimia yang digunakan meliputi etanol teknis 70 %, H_3PO_4 p.a, Metanol p.a, KI, $HgCl_2$ p.a, HCl pekat, serbuk Mg p.a, CH_3COOH glasial, H_2SO_4 pekat, $FeCl_3$ p.a, aquades, kertas saring SIGMA. Sedangkan pada uji farmakologi bahan yang digunakan adalah mencit jantan dan betina usia tiga bulan dengan berat badan sebesar 20-30 gram sebanyak 30 ekor yang diperoleh dari Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) ITB, pakan mencit berupa PC 551, Haloperidol, PGA (*Poly Gtutamic Acid*) 1% dan L-Dopa standar (*3,4-Dihydrocxy-L-phenylalanine*).

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahap meliputi penyiapan sampel, skrining fitokimia, uji FTIR, uji farmakologi yaitu uji toksisitas dan uji katalepsi pada mencit. Bagan alir penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada gambar 3.1.



3.3.1 Proses ekstraksi

Tahap awal penelitian ini dimulai dari pengambilan sampel akar landep dari Kebun Percobaan Manoko, Lembang. Akar landep yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu lalu dikeringkan dengan bantuan sinar matahari sampai kering. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling sampai berbentuk serbuk. Serbuk akar landep tersebut kemudian di maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Sampel dimaserasi dalam pelarut selama 3 x 24 jam. Ekstrak akar landep hasil proses maserasi kemudian dihilangkan pelarutnya dengan menggunakan alat *roratory evaporator vaccum*. Ekstrak cair akar landep hasil proses evaporasi kemudian dikeringkan dengan menggunakan alat *freeze dryer*.

3.3.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak akar landep. Ekstrak yang diperoleh diidentifikasi komponen fitokimianya dengan menggunakan metode pereaksi warna. Senyawa yang diperiksa adalah senyawa golongan alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, steroid dan flavonoid. Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

1. Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram ekstrak 1 mL kloroform dan beberapa tetes Pereaksi Wagner. Terbentuknya endapan coklat menunjukkan adanya alkaloid.

Pembuatan pereaksi Wagner yaitu 1 gram KI dilarutkan dalam 20 mL aquades sampai semuanya melarut.

2. Pemeriksaan Tanin

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara menimbang ekstrak sebanyak 0,1 gram dan dilarutkan dalam 2 mL air, kemudian ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya senyawa tanin.

3. Pemeriksaan Saponin

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 3 mL air, kemudian dikocok dengan kuat selama 10 menit. Timbulnya buih atau busa menunjukkan adanya saponin.

4. Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Pemeriksaan terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 1 mL air, kemudian ditambahkan 1 mL CH_3COOH glasial dan H_2SO_4 pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

5. Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 3 mL air kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

3.3.3 Karakterisasi Gugus Fungsi

Karakterisasi gugus fungsi senyawa yang terkandung dalam ekstrak dilakukan dengan spektroskopi FTIR untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa ekstrak akar landep. Penentuan gugus-gugus fungsi inidilakukan dengan menggunakan spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) Shimadzu 8400.

3.3.4 Uji Farmakologi Antiparkinson

3.3.4.1 Preparasi Hewan Uji

Mencit yang digunakan adalah mencit jantan dan betina usia tiga bulan dengan berat badan sebesat 20-30 gram. Mencit dijaga dalam kondisi standar ± 22 °C, dalam kandang *polypropylene* dan ditempatkan selama kurang lebih satu minggu untuk beradaptasi dengan kondisi laboratorium. Mencit diberi makan PC551 dan air mineral. Untuk uji toksisitas akut mencit didistribusikan secara acak menjadi 2 kelompok yang berbeda dengan 5 ekor mencit dalam setiap kelompok. Sedangkan untuk pengujian katalepsi mencit didistribusikan secara

acak menjadi 5 kelompok yang berbeda dengan 4 ekor mencit dalam setiap kelompok dengan kondisi yang sama pada seluruh percobaan.

3.3.4.2 Preparasi Pemberian dosis

Pada uji toksisitas dosis yang digunakan adalah dosis 2000 mg/kg dan 4000 mg/kg berat badan. Sedangkan pada uji katalepsi dosis yang digunakan adalah dosis 200 mg/kg dan 400 mg/kg berat badan.

1. Pembuatan sediaan dosis 4000 mg/kg berat badan :
Ekstrak akar landep sebanyak 4 gram dan PGA sebanyak 100 mg ditimbang, dan dicampur dengan menggunakan mortir sambil ditambah air sedikit demi sedikit lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml, kemudian ditambah air sampai tanda batas dan dihomogenkan.
2. Pembuatan sediaan dosis 2000 mg/kg berat badan :
Dosis ekstrak landep 4000 mg/kg diambil sebanyak 5 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur labu ukur 10 ml dan diencerkan dengan air sampai tanda batas kemudian dihomogenkan.
3. Pembuatan sediaan dosis 400 mg/kg berat badan :
Ekstrak akar landep sebanyak 400 mg dan PGA sebanyak 100 mg ditimbang dan dicampur dengan menggunakan mortir sambil ditambah air sedikit demi sedikit lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml, kemudian ditambah air sampai tanda batas dan dihomogenkan.
4. Pembuatan sediaan dosis 200 mg/kg berat badan :
Dosis ekstrak landep 400 mg/kg diambil sebanyak 5 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur labu ukur 10 ml dan diencerkan dengan menggunakan air.
5. Pembuatan sediaan haloperidol dosis 5 mg/kg berat badan :
Haloperidol sebanyak 5 mg dan PGA sebanyak 100 mg ditimbang dan dicampur dengan menggunakan mortir sambil ditambah air sedikit demi

sedikit lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml, kemudian ditambah air sampai tanda batas dan dihomogenkan.

6. Pembuatan sediaan PGA 1% :

PGA sebanyak 100 mg ditimbang dan digerus dalam mortir sambil di tambah air sedikit demi sedikit kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml, dan ditambah air sampai tanda batas dan dihomogenkan.

7. Pembuatan sediaan L-DOPA dosis 10mg/kg berat badan :

L-dopa sebanyak 10 mg dan PGA sebanyak 100 mg ditimbang dicampur dengan menggunakan mortir sambil ditambah air sedikit demi sedikit lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml, kemudian ditambah air sampai tanda batas dan dihomogenkan.

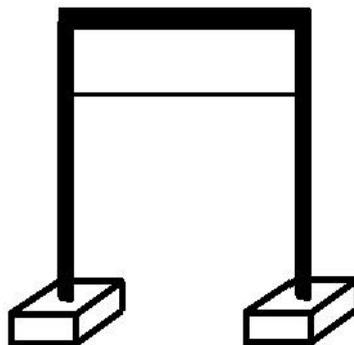
3.3.4.3 Pengujian Toksisitas

Pengujian toksisitas akut dilakukan dengan cara membagi mencit kedalam 2 kelompok dan masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor. Mencit terlebih dahulu tidak diberi pakan selama satu malam dan hanya diberi air. Masing-masing kelompok diberikan suspensi dosis ekstrak akar landep sebesar 4000 mg/kg berat badan dan 2000 mg/kg berat badan secara oral. Kemudian diamati keadaan mencit setelah 24 jam pemberian ekstrak apabila terdapat mencit yang mati, maka dapat dikatakan bahwa pada dosis yang diberikan pada kelompok tersebut merupakan dosis toksisitas akut dari ekstrak akar landep.

3.3.4.4 Pengujian Katalepsi

Pengujian katalepsi dilakukan dengan cara membagi mencit menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol normal (mencit sehat), kelompok kontrol negatif (mencit yang diinduksi haloperidol), kelompok kontrol positif (mencit yang diberi L-dopa 5 mg/kg), kelompok uji dosis 1 (mencit yang diberi ekstrak akar landep dosis 200 mg/kg) dan kelompok uji dosis 2 (mencit yang diberi ekstrak akar landep dosis 400 mg/kg). Pengamatan katalepsi dilakukan

berdasarkan metode Costall dan Olley (1971). Intensitas katalepsi diukur sebagai lamanya waktu mencit menggantung dengan kedua kaki depan memegang kawat berdiameter 0,5 cm dengan tinggi 15 cm tanpa melakukan pergerakan. Pengamatan katalepsi dilakukan setelah 30 menit pemberian suspensi haloperidol. Haloperidol (5 mg/kg berat badan) diberikan pada mencit dengan secara intraperitoneal 30 menit setelah pemberian suspensi pembawa (PGA 1%) atau ekstrak akar landep dosis 200 mg/kg, 400 mg/kg berat badan dan l-dopa dosis 10 mg yang diberikan secara intraperitoneal juga. Skema pengujian katalepsi ditunjukkan pada gambar 3.2.



Gambar 3.2. Skema Pengujian Katalepsi

3.3.5 Analisis Data

Data hasil uji pengujian katalepsi pada mencit kemudian diolah secara statistik menggunakan *one way* ANOVA metode Dunnet. Data tersebut dianalisis dengan menggunakan bantuan software SPSS 22. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk melihat signifikansi dari data hasil pengujian katalepsi.