

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Sampel dan Lokasi Penelitian

Sampel atau bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji Karabenguk (*Mucuna pruriens* var. *utilis* (L.) DC) yang berasal dari Bantul, Yogyakarta.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset (LKR), Laboratorium Kimia Organik dan Bahan Alam (LKOB), Laboratorium Kimia Instrumen (LKI), Laboratorium Kimia MIPA-B Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) dan Laboratorium Farmakologi Farmasi UNPAD (Universitas Padjajaran).

#### 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 berputar vakum (*vaccum rotary evaporator*), pompa vakum, corong *Buchner*, *ultrasonic vibrator* dan *Freeze drier*. Sedangkan alat instrumen yang digunakan untuk karakterisasi adalah HPLC Shimadzu. Sedangkan untuk pengujian hayati menggunakan sonde, spet 3 ml, kandang *polypropylene*.

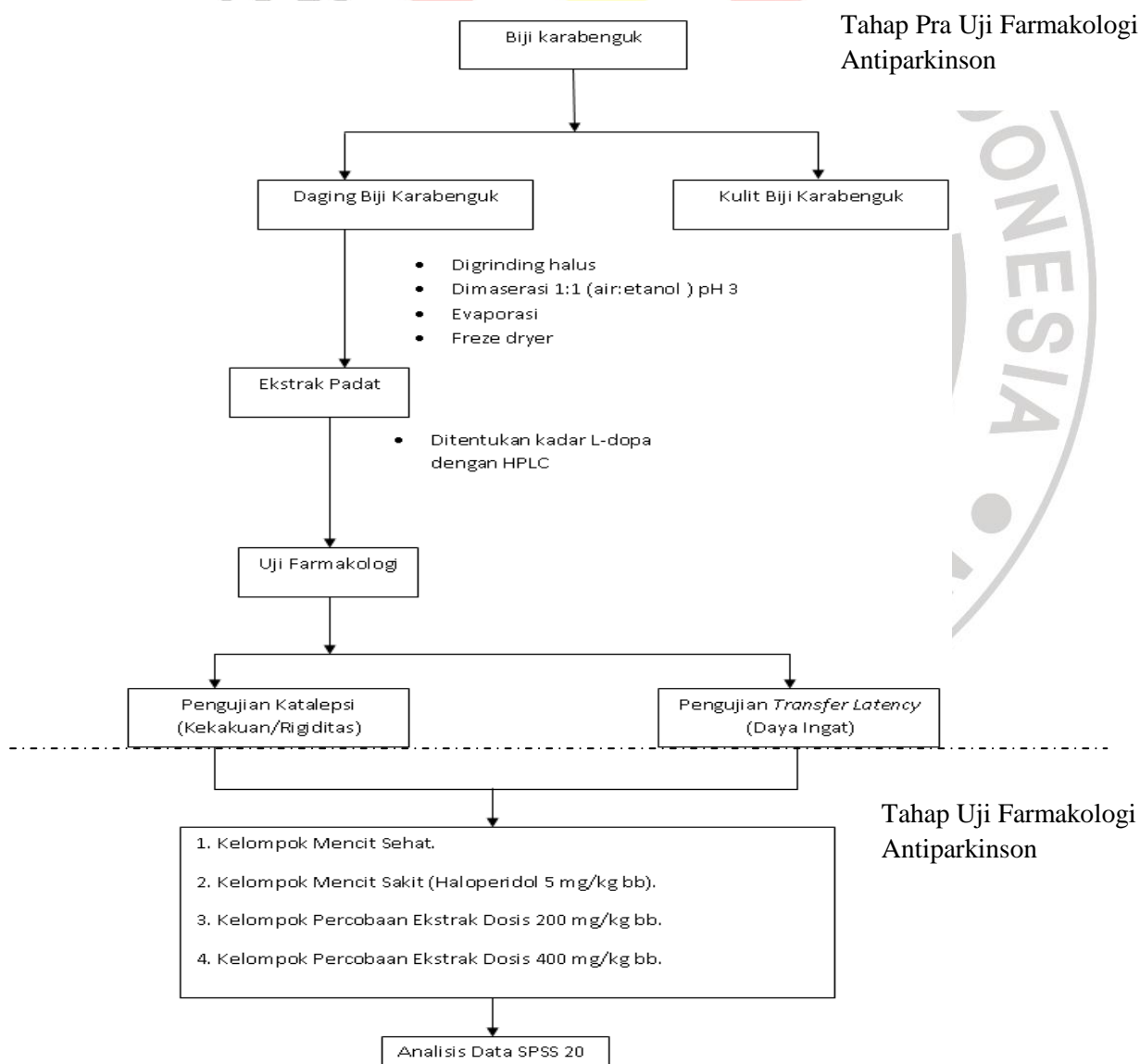
##### 3.2.2. Bahan

Pada penelitian ini, bahan utama yang digunakan adalah biji Karabenguk yang telah dibersihkan, dipisahkan kulit dan dagingnya, yang diuji adalah daging biji Karabenguk yang dikeringkan dan digrinding. Sedangkan bahan kimia yang digunakan meliputi etanol teknis 98%, asam sitrat teknis, aquabides,  $H_3PO_4$  p.a,

Metanol p.a., aquades, kertas saring, dan L-dopa standar (3,4-*Dihydroxy-L-phenylalanine*) SIGMA. Sedangkan untuk pengujian hayati menggunakan mencit jantan dan betina dengan berat badan sebesar 30-35 g usia tiga bulan sebanyak 21 ekor diperoleh dari Sekolah Tinggi Ilmu Hayati (SITH) ITB, pakan mencit berupa PC 551, Haloperidol, dan suspensi pembawa PGA (*Poly Glutamic Acid*) 1%.

### 3.3. Metodologi Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahapan tersebut ditunjukkan pada bagan alir penelitian (Gambar 3.1)



Estika Herachandra, 2013

Studi Farmakologi Antiparkinson Ekstrak Daging Karangbengut *Mucuna Prorens*.Var Utilis terhadap Menut Mus Muculus

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

### Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

#### 3.3.1 Tahap Pra Uji Farmakologi Antiparkinson

Tahap awal penelitian dimulai dari pengambilan sampel biji Karabenguk dari daerah Bantul, Yogyakarta. Biji Karabenguk dikupas dan pisahkan antara kulit dan dagingnya terlebih dahulu. Setelah itu, daging sebagai sampel dikeringkan dengan sinar matahari sampai kering. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling sampai berbentuk serbuk. Kemudian sampel biji Karabenguk yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui berat dalam kondisi yang telah dikeringkan.

Biji Karabenguk (*Mucuna pruriens*) diekstraksi menggunakan pelarut etanol dan air dengan perbandingan 1:1 dan penambahan asam sitrat sampai pH larutan 3. Teknik ekstraksi yang digunakan ialah ekstraksi cair-padat dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut selama 3 x 24 jam.

Untuk mengetahui kadar L-dopa yang terkandung dalam sampel dilakukan analisis menggunakan metode KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) atau HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

1. Pembuatan Fasa Gerak

Sebanyak 293,8 ml aquabides, 5,87 ml metanol dan ditambahkan  $H_3PO_4$  hingga pH larutan 2 kemudian dihomogenkan dengan bantuan *ultrasonic vibrator* selama 5 menit.

2. Pembuatan Deret Larutan Standar

Larutan induk dibuat terlebih dahulu dengan cara ditimbang sebanyak 12,5 mg L-Dopa standar lalu dilarutkan dalam 25 mL fasa gerak dan didapat larutan induk 500 ppm. Dari larutan induk 500 ppm, dibuat larutan deret standar dengan konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm dan 150 ppm.

### 3. Pembuatan Larutan Sampel

Sampel ekstrak ditimbang sebanyak 12,5 mg dan dilarutkan dalam 10 mL fasa gerak. Kemudian dihomogenkan dengan bantuan ultrasonik selama 10 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam labu 25 mL dan ditandabatkan dengan fasa gerak.

### 3. Pengukuran Standar dan Sampel

Pengukuran deret standar dan sampel dilakukan dengan alat HPLC Shimadzu dengan parameter pengujian yaitu  $\lambda = 280$  nm, laju alir 1 mL/menit dan perbandingan pelarut H<sub>2</sub>O:Metanol:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> yaitu 975,5:19,5:1.

## 3.3.2 Uji Farmakologi Antiparkinson

### 3.3.2.1 Preparasi Pemberian Dosis

Dosis dibuat dengan acuan pada pengujian antiparkinson yaitu katalepsi dan transfer latency. Mencit yang akan diuji ditimbang, diperoleh berat mencit 30-35 g.

#### 1. Pembuatan Larutan PGA (*Poly Glutamic acid*) 1 %

Dibuat 400 ml larutan PGA 1%, timbang 4 g dilarutkan dalam 400 ml aquades.

#### 2. Pembuatan Dosis Haloperidol 5mg/kg

Timbang 15 mg haloperidol, dilarutkan dalam 100 ml PGA 1%.

#### 3. Pembuatan Dosis Ekstrak Daging Biji Karabenguk 400 mg/kg

Timbang 4,8 g ekstrak daging biji Karabenguk dilarutkan dalam 200 ml PGA 1%.

#### 4. Pembuatan Dosis Ekstrak Daging Biji Karabenguk 200 mg/kg

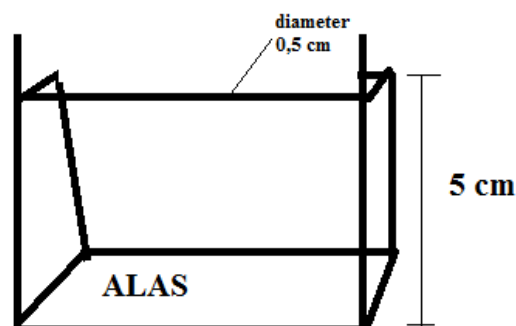
Dibuat 100 ml dosis ekstrak daging biji Karabenguk 200 mg/kg. 50 ml dosis ekstrak daging biji Karabenguk dosis 400mg/kg diencerkan dengan 50 ml PGA 1%.

### 3.3.2.2 Preparasi Hewan Uji

Mencit yang digunakan untuk pengujian adalah mencit jantan dan betina hasil perkawinan antara tikus yang berkerabat dekat. Berat mencit yang digunakan adalah 30-35 g. Tikus dijaga pada kondisi standar yaitu pada suhu kamar  $\pm 22^{\circ}\text{C}$ , dalam kandang *polypropylene*. Mencit diberi makan PC551 dan air mineral. Mencit ditempatkan selama kurang lebih satu minggu di kandang *polypropylene* untuk beradaptasi dengan kondisi laboratorium. Mencit didistribusikan secara acak menjadi 4 kelompok yang berbeda dengan 3 ekor mencit dalam setiap kelompok, dengan kondisi yang sama pada seluruh percobaan.

### 3.3.2.3 Pengujian Katalepsi

HAL (5 mg/kg berat badan) diberikan pada mencit secara intraperitoneal 30 menit setelah pemberian suspensi pembawa (PGA 1%) atau ekstrak daging biji Karabenguk pada dosis 200 mg/kg dan 400 mg/kg berat badan secara oral. Pengamatan katalepsi dilakukan berdasarkan metode Costall dan Olley (1971) yang dimodifikasi. Intensitas katalepsi diukur sebagai lamanya waktu mencit tahan berdiri dengan kedua kaki depan memegang kawat berdiameter 0,5 cm dan kedua kaki belakang berpijak di atas alas kaki (jarak mencit berdiri dari kawat setinggi 5 cm). Mencit dikategorikan katalepsi bila tetap berdiri selama lebih dari 20 detik. Pengamatan dilakukan setiap interval waktu 30 menit selama 120 menit.



**Gambar 3.2** Skema Pengujian Katalepsi

Estika Herachandra, 2013

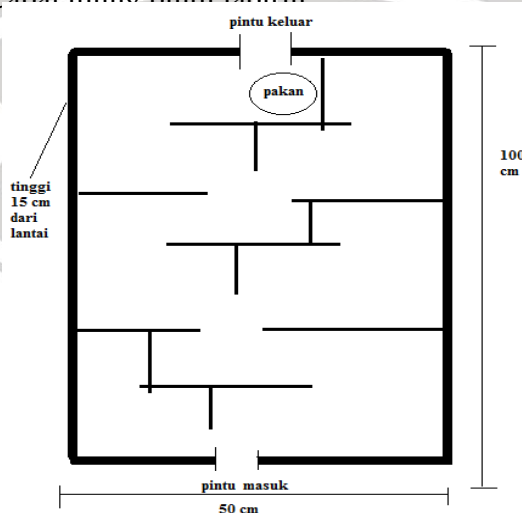
Studi Farmakologi Antiparkinson Ekstrak Daging Karangbengut *Mucuna Prorens*.Var Utilis terhadap Menut *Mus Muculus*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

### 3.3.2.4 Pengujian *Transfer Latency*

HAL (5 mg/kg berat badan) diberikan pada mencit secara intraperitoneal 30 menit setelah pemberian suspensi pembawa (PGA 1%) atau ekstrak daging biji Karabenguk pada dosis 200 mg/kg dan 400 mg/kg berat badan secara oral. Pengujian dilakukan 24 jam setelah pemberian HAL dan ekstrak etanol daging biji Karabenguk.

Pengujian *transfer latency* dilakukan pada labirin yang dimodifikasi. Metode yang digunakan berdasarkan metode Marklund (1974) yang dimodifikasi. *Transfer latency* adalah pengukuran memori spasial jangka panjang dengan menggunakan labirin dengan pengukuran waktu yang diperlukan mencit untuk bergerak dari pintu masuk menuju ujung pintu labirin. Labirin berukuran 100 cm x 50 cm dengan atap terbuka. Labirin memiliki ketinggian 15cm dari lantai. Mencit ditempatkan secara individual pada ujung pintu masuk. Jika mencit tidak bergerak menuju ujung pintu labirin dalam waktu 90 detik, secara hati-hati mencit didorong menuju ujung pintu dan dicatat waktunya sebagai 90 detik. Untuk beradaptasi dengan labirin, maka mencit dibiarkan mengeksplorasi labirin selama 20 detik setelah mencapai ujung pintu labirin



**Gambar 3.3** Skema Labirin *Transfer Latency*



### 3.3.4 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji non parametric ANOVA Dunnet's menggunakan *software* SPSS 20. Grafik menggunakan *software* excel 2009.

