

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari sampai dengan Juni 2017. Adapun pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati, Laboratorium Kimia Instrumen (LKI), Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia (LKOB) Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia; *Laboratorium Advance Material Processing* (Labtek VI) Fakultas Teknik Fisika Institut Teknologi Bandung; Laboratorium SEM dan TEM *Research Center for Nanosciences and Nanotechnology* Institut Teknologi Bandung; dan Laboratorium Tugas Akhir Sekolah Farmasi Universitas Garut.

#### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi dan sintesis meliputi alat-alat gelas, timbangan, pompa vakum, corong Buchner, neraca analitik, pH meter, *rotary evaporator*, *freeze dryer*, *stirrer*, *magnetic stirrer*, sonikator 251 Branson, *ultra sonic processor* UP50H, tabung sentrifuse, sentrifuse. Pada tahap karakterisasi, instrumen yang digunakan adalah spektrometer *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) Shimadzu 8400, *Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-ray* (SEM-EDX) Hitachi SU3500, *cotting ion sputter* Hitachi MC1000, *Transmission Electron Microscopy* (TEM) Hitachi HT7700. Pada tahap uji aktivitas antidiabetes meliputi alat-alat gelas, neraca analitik, labu ukur, lumpang dan alu, kandang polipropilen, suntikan, sonde, gunting, dan glukometer.

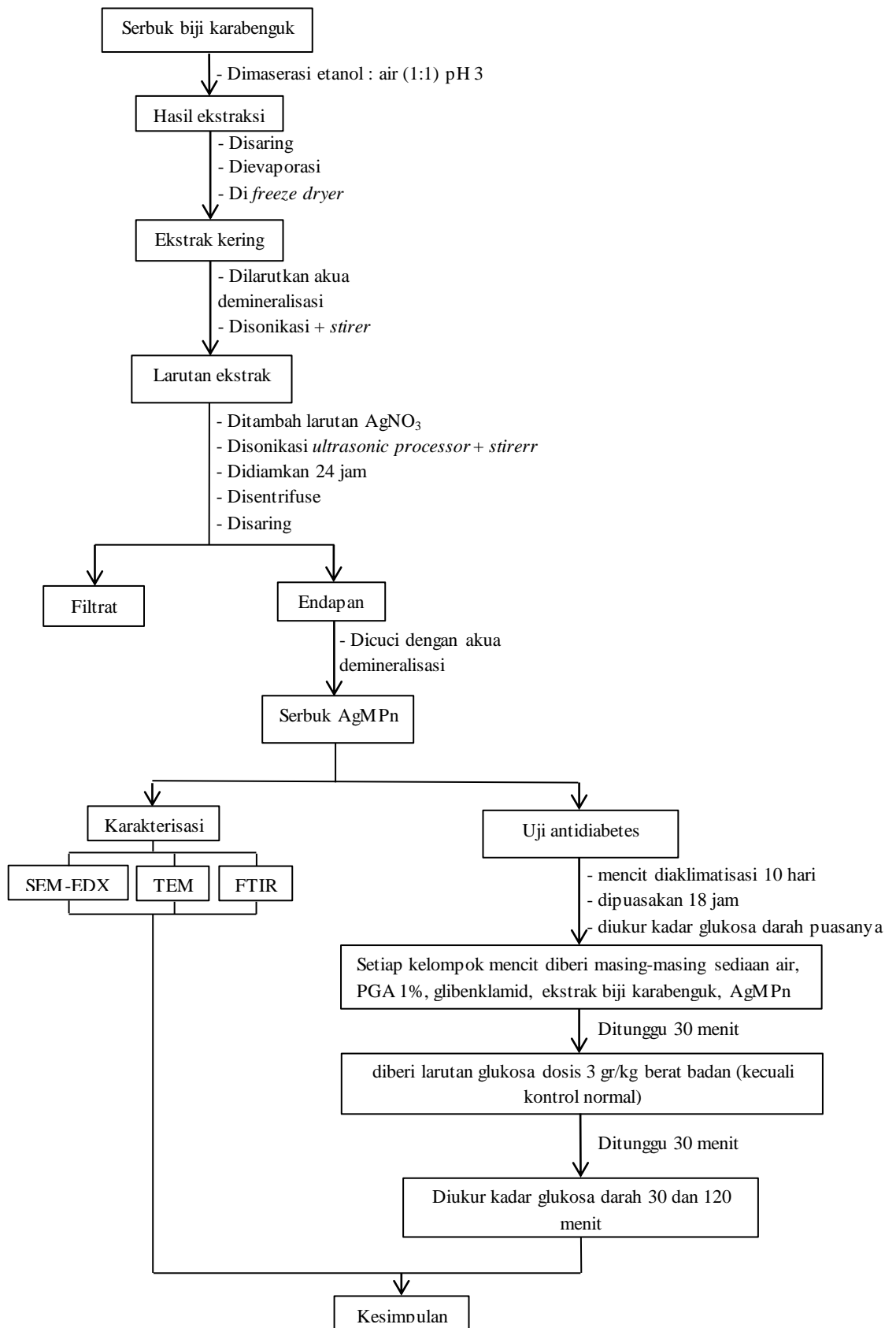
##### 3.2.1 Bahan

Pada penelitian ini bahan yang digunakan adalah biji karabenguk (*M. pruriens*) yang diperoleh dari Bantul Yogyakarta, Indonesia. Bahan kimia yang digunakan pada ekstraksi biji karabenguk dan sintesis biji karabenguk

(*M. pruriens*)-perak-nanopartikel (AgMPn) meliputi akuades, akua demineralisasi, etanol 96% teknis, asam sitrat p.a, NaOH p.a, AgNO<sub>3</sub> p.a, kertas saring Whatman No.42. Sedangkan pada uji aktivitas antidiabetes, hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan usia tiga bulan dengan berat badan sekitar 20-30 gram sebanyak 36 ekor, pakan mencit CP 551, glukosa p.a, strip glukosa *easy touch*, PGA (*Poly Glutamic Acid*), dan glibenklamid.

### **3.3 Alur penelitian**

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, di antaranya ekstraksi biji karabenguk, sintesis AgMPn, karakterisasi AgMPn, dan uji aktivitas antidiabetes pada mencit. Bagan alir penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



### Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

#### 3.4 Metode Penelitian

##### 3.4.1 Ekstraksi biji karabenguk (*Mucuna pruriens* L.)

Biji karabenguk dikeringkan dengan sinar matahari tidak langsung dan dihancurkan dengan mesin penggiling menjadi serbuk. Sebanyak 1 kg serbuk biji karabenguk dilarutkan dalam 4 L pelarut etanol-air (1:1) yang ditambahkan asam sitrat sebanyak 2 gram sampai pH 3, lalu dimaserasi pada suhu kamar selama 24 jam. Kemudian difiltrasi dan residu yang diperoleh kembali diekstraksi dengan prosedur yang sama hingga tiga kali. Ketiga filtrat yang diperoleh dicampurkan dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh volume filtrat yang lebih pekat. Dengan menggunakan *freeze dryer* filtrat pekat dikeringkan hingga diperoleh ekstrak kering biji karabenguk.

##### 3.4.2 Sintesis AgMPn

Larutan perak nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) 1 gram dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL, kemudian disonikasi selama 10 menit. Ekstrak biji karabenguk supernatan sebanyak 5 gram dilarutkan dalam aqua demineralisasi sebanyak 100 ml, disonikasi dengan *ultrasonic processor homogenizer* pada 0,6 cycles dan persen *amplitude* 62% serta stirer selama 10 menit, kemudian dipipet ke dalam larutan perak nitrat seluruhnya secara perlahan. Campuran disonikasi selama 20 menit dan disonikasi dengan *ultrasonic processor homogenizer* pada 0,6 cycles dan persen *amplitude* 62% serta stirer selama 20 menit. Perubahan warna larutan dari tidak berwarna menjadi koloid hitam menandakan telah terbentuknya AgMPn.

##### 3.4.3 Karakterisasi AgMPn

###### 3.4.3.1 Scanning Electron Microscopic-Energy Dispersive X-ray (SEM-EDX)

Analisis SEM-EDX dipreparasi dengan menempelkan karbon tip pada *sampel holder*, kemudian ditempelkan serbuk AgMPn pada karbon tip.

Sampel terlebih dahulu *cotting* menggunakan logam Au. Selanjutnya sampel dianalisis dengan instrumen SEM-EDX.

#### **3.4.3.2 Transmission Electron Microscopic (TEM)**

Analisis TEM dipreparasi dengan melarutkan serbuk AgMPn dalam aqua demineralisasi 10 ml dan disonikasi 20 menit. Kemudian dipipet  $\pm 2$  ml untuk dilarutkan kembali dengan akuades dan disonikasi 8 menit. Kemudian larutan diteteskan pada *carbon grid* dan ditunggu sampai kering. Selanjutnya dianalisis dengan instrumen TEM.

#### **3.4.3.3 Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR)**

Karakterisasi menggunakan FTIR dilakukan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa ekstrak biji karabenguk dan AgMPn. Menggunakan spektroskopi FTIR Shimadzu 8400 dengan range panjang gelombang  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ . Sampel dihaluskan lalu dipadatkan dan dianalisis dalam bentuk pelet KBr. Hasil spektrum yang diperoleh dibandingkan untuk melihat interaksi yang terjadi antara Ag dengan senyawa aktif pada ekstrak biji karabenguk.

#### **3.4.4 Uji Farmakologi Aktivitas Antidiabetes**

##### **3.4.4.1 Preparasi Hewan Uji**

Mencit yang digunakan adalah mencit jantan usia tiga bulan dengan berat badan sekitar 20-30 gram. Mencit dijaga dalam kondisi standar  $\pm 22^{\circ}\text{C}$ , dalam kandang polipropilen selama kurang lebih sepuluh hari untuk beradaptasi dengan kondisi laboratorium. Mencit diberi pakan CP 551 dan minum air mineral. Mencit didistribusikan ke dalam sembilan kelompok yang berbeda dengan masing-masing kelompok terdiri dari empat ekor mencit.

##### **3.4.4.2 Preparasi Pembuatan Dosis**

Pada uji antidiabetes, dosis ekstrak biji karabenguk yang digunakan adalah dosis 200 mg/kg berat badan. Sedangkan dosis AgMPn yang digunakan adalah dosis 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, dan 25 mg/kg berat badan.

1. Pembuatan sediaan PGA 1 %

PGA sebanyak 3 gram ditimbang dan ditambahkan akuades panas sedikit-demi sedikit sebanyak 300 ml dan dicampur menggunakan mortir hingga homogen.

2. Pembuatan sediaan glukosa dosis 3 gr/kg berat badan

Glukosa sebanyak 12 gram ditimbang dan ditambahkan akuades sedikit sampai seluruh glukosa larut, kemudian ditambahkan larutan PGA 1% sampai 100 ml dan dicampur menggunakan mortir hingga homogen.

3. Pembuatan sediaan glibenklamid dosis 5 mg/kg berat badan

Glibenklamid sebanyak 10 mg (dua tablet) digerus hingga halus kemudian ditambahkan larutan PGA 1 % sebanyak kurang lebih 38,46 ml dan dicampur menggunakan mortir hingga homogen.

4. Pembuatan sediaan ekstrak biji karabenguk dosis 200 mg/kg berat badan

Ekstrak biji karabenguk sebanyak 80 mg ditimbang dan ditambahkan larutan PGA 1 % sebanyak 10 ml sedikit demi sedikit dan dicampur menggunakan mortir hingga homogen.

5. Pembuatan sediaan AgMPn dosis 5 mg/kg berat badan

Ekstrak AgMPn sebanyak 2 mg ditimbang dan ditambahkan larutan PGA 1 % sebanyak 10 ml sedikit demi sedikit dan dicampur menggunakan mortir hingga homogen.

6. Pembuatan sediaan AgMPn dosis 10 mg/kg berat badan

Ekstrak AgMPn sebanyak 4 mg ditimbang dan ditambahkan larutan PGA 1 % sebanyak 10 ml sedikit demi sedikit dan dicampur menggunakan mortir hingga homogen.

7. Pembuatan sediaan AgMPn dosis 15 mg/kg berat badan

Ekstrak AgMPn sebanyak 6 mg ditimbang dan ditambahkan larutan PGA 1 % sebanyak 10 ml sedikit demi sedikit dan dicampur menggunakan mortir hingga homogen.

8. Pembuatan sediaan AgMPn dosis 20 mg/kg berat badan

Ekstrak AgMPn sebanyak 8 mg ditimbang dan ditambahkan larutan PGA 1 % sebanyak 10 ml sedikit demi sedikit dan dicampur menggunakan mortir hingga homogen.

9. Pembuatan sediaan AgMPn dosis 25 mg/kg berat badan

Ekstrak AgMPn sebanyak 10 mg ditimbang dan ditambahkan larutan PGA 1 % sebanyak 10 ml sedikit demi sedikit dan dicampur menggunakan mortir hingga homogen.

#### 3.4.4.3 Tahap Pengujian

Mencit dibagi menjadi sembilan kelompok utama yaitu kelompok 1 kontrol normal (mencit sehat), kelompok 2 kontrol negatif (mencit yang diberi glukosa 3 gr/kg berat badan), kelompok 3 kontrol positif (mencit yang diberi glibenklamid 5 mg/kg berat badan), kelompok 4 uji ekstrak biji karabenguk (mencit yang diberi ekstrak biji karabenguk 200 mg/kg berat badan), kelompok 5 uji AgMPn dosis I (mencit yang diberi AgMPn 5 mg/kg berat badan), kelompok 6 AgMPn uji dosis II (mencit yang diberi AgMPn 10 mg/kg berat badan), kelompok 7 AgMPn uji dosis III (mencit yang diberi AgMPn 15 mg/kg berat badan), kelompok 8 AgMPn uji dosis IV (mencit yang diberi AgMPn 20 mg/kg berat badan), dan kelompok 9 AgMPn uji dosis V (mencit yang diberi AgMPn 25 mg/kg berat badan).

Kadar glukosa darah diukur menggunakan glukometer merk *easy touch*. Pengamatan kadar glukosa darah dilakukan setelah 30 menit pemberian suspensi glukosa. Glukosa diberikan pada mencit secara oral setelah 30 menit pemberian suspensi pembawa (PGA 1 %), glibenklamid dosis 5 mg/kg berat badan, ekstrak biji karabenguk dosis 200 mg/kg berat badan, dan AgMPn dosis 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, dan 25 mg/kg berat badan secara oral juga. Volume dosis yang diberikan disesuaikan dengan massa setiap mencit. Alur metode penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1.

#### 3.4.5 Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk rerata $\pm$ SD. Analisis statistik dilampirkan dengan menggunakan variasi analisis *one way* ANOVA metode Dunnet. Data tersebut dianalisis dengan menggunakan bantuan software SPSS 22. Tujuan dari pengujian ini untuk melihat signifikansi dari data hasil uji aktivitas antidiabetes.