

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari sampai dengan bulan Mei 2017. Adapun pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Riset, Laboratorium Kimia Instrumen, Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia; Laboratorium Proses Material Departemen Teknik Fisika Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Bandung; Laboratorium Pusat Penelitian Nanosains dan Nano Teknologi Institut Teknologi Bandung; Laboratorium Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Garut.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi dan sintesis meliputi alat-alat gelas, satu set *rotary evaporator vacuum*, pompa vakum, *ultrasonic*, *ultrasonic processor (UP50H)-homogenizer*, neraca analitik, corong *Buchner*, *freeze dryer*, *stirrer*, *magnetic stirrer*, spatula, kaca arloji, corong kaca, pipet tetes, *sentrifuge* dan oven. Pada tahap karakterisasi, instrumen yang digunakan adalah spektrometer FTIR Shimadzu 8400, *Scanning Electron Microscopy (SEM)*, *Transmission Electron Microscopy (TEM)*.

3.2.2 Bahan

Pada penelitian ini, bahan yang digunakan adalah biji kara benguk (*Mucuna pruriens* Linn) yang diperoleh dari Bantul, Yogyakarta. Bahan kimia yang digunakan pada ekstraksi daging biji kara benguk dan sintesis FeMpn dan ZnMpn meliputi aqua dm, etanol 96% teknis, asam sitrat p.a, FeCl₃ p.a, zink asetat dihidrat p.a dan kertas saring Whatman No.42. Sedangkan pada uji katalepsi, hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan usia tiga bulan dengan

berat badan sebesar 18-30 gram sebanyak 30 ekor, pakan mencit CP 551, Haloperidol, PGA (*Poly Glutamic Acid*) dan L-DOPA standar.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahap meliputi ekstraksi sampel; sintesis magnetit dan zink nanopartikel; karakterisasi magnetit dan zink nanopartikel dengan *Scanning Electron Microscopy–Energy Dispersive X-Ray* (SEM-EDX), spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR), *Transmission Electron Microscopy* (TEM); serta uji katalepsi. Bagan alir penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada gambar 3.1.

3.3.1 Ekstraksi Sampel

Serbuk daging biji kara benguk diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol-air (perbandingan volume 1:1) dan ditambahkan asam sitrat hingga pH 3. Filtrat hasil ekstraksi diuapkan sampai kering pada suhu 40°C di bawah tekanan rendah dalam *rotary vacuum evaporator*. Ekstrak daging biji kara benguk dikeringkan menggunakan *freeze dryer* dan hasilnya disimpan dalam wadah dengan kondisi vakum.

3.3.2 Sintesis Fe-MPn dan Zn-MPn

Larutan ekstrak daging biji kara benguk konsentrasi 50.000 ppm dipreparasi dengan melarutkan 5 gram serbuk ekstrak daging biji kara benguk dalam 100 ml akuades diaduk dan diultrasonikasi selama 15 menit.

Magnetite-nanopartikel dipreparasi dengan menambahkan larutan ekstrak daging biji kara benguk konsentrasi 50.000 ppm tetes demi tetes ke dalam larutan FeCl_3 0,08 M dengan perbandingan volume 1:1. Campuran tersebut disonikasi selama 20 menit kemudian diaduk dan diultrasonikasi selama 20 menit kemudian didiamkan dalam suhu ruangan selama 24 jam. Perubahan warna larutan dari coklat ke hitam koloid mengindikasikan pembentukan Fe-MPn. Suspensi yang dihasilkan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm dan dicuci beberapa kali menggunakan aqua dm dan dikeringkan dalam suhu ruang.

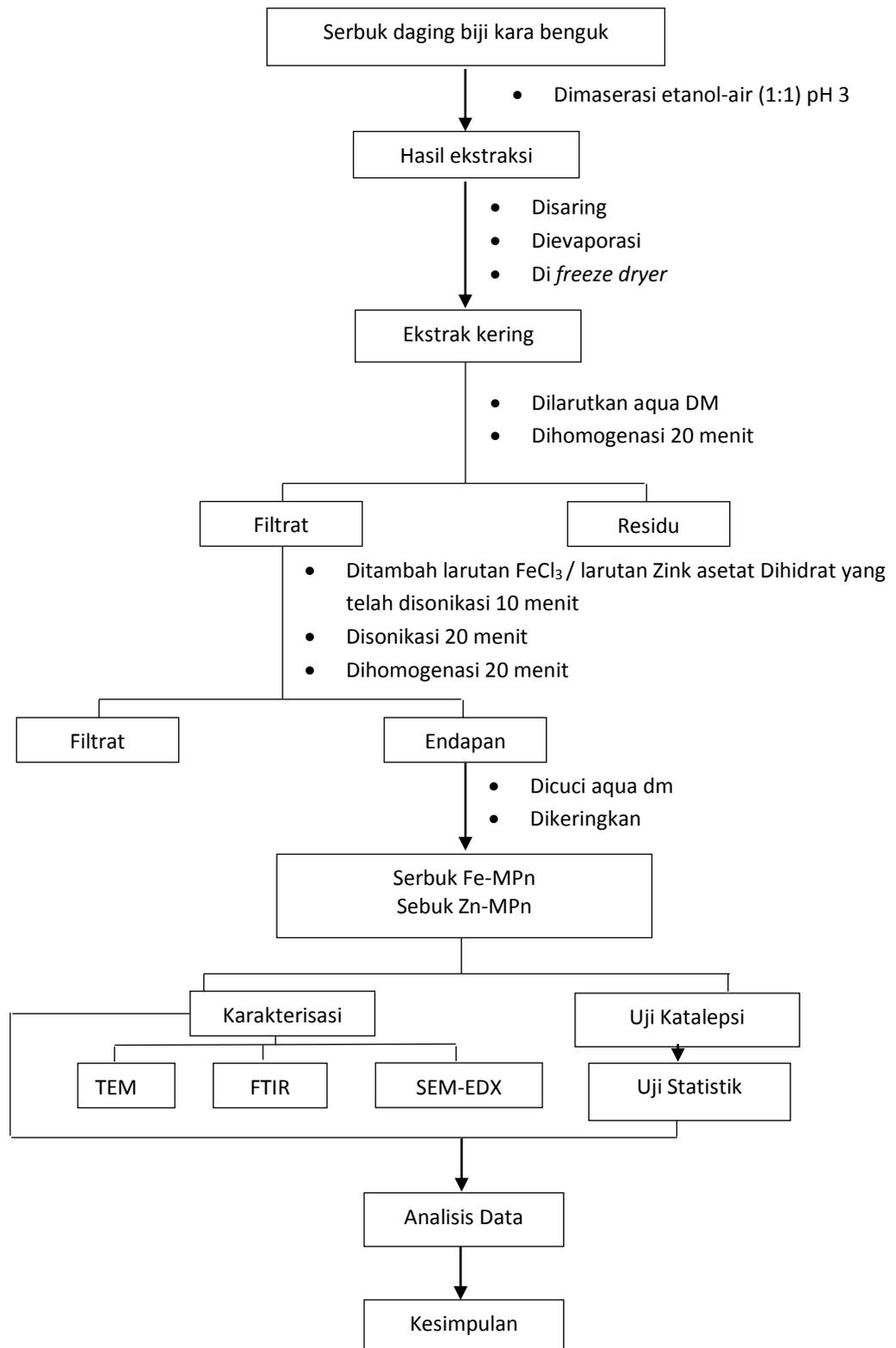
Zink-nanopartikel dipreparasi dengan menambahkan larutan ekstrak daging biji kara benguk konsentrasi 50.000 ppm tetes demi tetes ke dalam larutan $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,04 M dengan masing-masing perbandingan volume 1:1. Campuran tersebut disonikasi selama 20 menit kemudian diaduk dan diultrasonikasi selama 20 menit kemudian didiamkan dalam suhu ruangan selama 24 jam. Perubahan warna larutan dari coklat ke hitam mengindikasikan pembentukan Fe-MPn dan Zn-MPn. Suspensi yang dihasilkan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm dan dicuci beberapa kali menggunakan aqua dm dan dikeringkan dalam suhu ruang.

3.3.3 Karakterisasi Fe-MPn dan Zn-MPn

3.3.3.1 *Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray (SEM-EDX)*

Karakterisasi menggunakan *Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray (SEM-EDX)* dilakukan untuk mengetahui bentuk, ukuran dan sebaran unsur Fe-MPn dan Zn-MPn yang terbentuk. Proses ini terdiri atas preparasi dan pengamatan struktur mikro. Pada tahapan preparasi untuk karakterisasi SEM terdiri atas persiapan sampel dan *coating* (pelapisan emas). Persiapan sampel merupakan tahapan awal dalam preparasi SEM. Proses ini dilakukan dengan cara menyiapkan serbuk Fe-MPn dan Zn-MPn yang akan dikarakterisasi dan kedua sampel tersebut diletakkan pada *double tape* karbon yang menempel pada *stub* atau pemegang cuplikan dengan menggunakan pinset sehingga tangan tidak menyentuh permukaan sampel secara langsung.

Proses selanjutnya setelah sampel selesai dipersiapkan yaitu *coating*. Proses *coating* ini dilakukan pada sampel yang tidak bersifat konduktif. Proses *coating* dilakukan dengan cara meletakkan *stub* yang berisi sampel ke dalam DC *sputtering*. Pada proses ini sampel dilapisi dengan emas dengan tujuan agar struktur mikro sampel mampu teridentifikasi ketika dikarakterisasi karena emas bersifat konduktif.



Gambar 3. 1
Alur Metode Penelitian

Setelah sampel selesai dipersiapkan maka sampel telah siap untuk dikarakterisasi dengan alat SEM yang dilengkapi dengan EDS merek HITACHI seri SU3500. Adapun hal pertama yang dilakukan dalam melakukan karakterisasi dengan menggunakan alat SEM yaitu memasukkan sampel ke dalam alat SEM yang telah divakumkan sebelumnya. Selanjutnya, dilakukan pengaturan tegangan dan skala perbesaran sesuai dengan yang diinginkan. Kemudian dilakukan penentuan fokus dan daerah yang akan dilakukan pengujian. Setelah proses selesai maka hasil foto siap untuk dicetak

3.3.3.2 *Transmission Electron Microscopy (TEM)*

Karakterisasi menggunakan *Transmission Electron Microscopy (TEM)* dilakukan untuk mengetahui ukuran Fe-MPn dan Zn-MPn yang terbentuk. Proses karakterisasi diawali dengan mencampurkan sampel dengan dispersan. Fe-MPn dan Zn-MPn didispersikan pada media dispersi yang sesuai. Selanjutnya, sampel diletakkan pada grid atau substrat yang diketahui memiliki lubang-lubang tak kasat mata. Setelah sampel selesai dipersiapkan maka sampel telah siap untuk dikarakterisasi dengan alat TEM merek Hitachi. Mula-mula sampel dimasukkan ke dalam alat TEM yang telah divakumkan sebelumnya. Kemudian dilakukan pengaturan tegangan sehingga elektron mampu menembus daerah terang atau lubang-lubang tak kasat mata pada grid. Kemampuan elektron tersebut yang selanjutnya digunakan untuk menunjukkan daerah sampel. Setelah itu, dilakukan penentuan fokus dan daerah yang akan dilakukan pengujian sehingga diperoleh hasil foto dengan skala pengukuran tertentu.

3.3.3.3 *Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR)*

Karakterisasi gugus fungsi senyawa yang terkandung dalam ekstrak daging biji kara benguk, FeMPn dan ZnMPn dilakukan dengan spektroskopi FTIR. Penentuan gugus-gugus fungsi ini dilakukan menggunakan spektroskopi FTIR Shimadzu 8400 dengan *range* 4000-400 cm^{-1} . Fe-MPn dan Zn-MPn serbuk dibuat pelet, kemudian dianalisis.

3.3.4 Uji Katalepsi

3.3.4.1 Preparasi Hewan Uji

Mencit yang digunakan adalah mencit jantan usia tiga bulan dengan berat badan berkisar 18-30 gram. Mencit dijaga dalam kondisi standar $\pm 22^{\circ}\text{C}$, dalam kandang polipropilen selama kurang lebih satu minggu untuk beradaptasi dengan kondisi laboratorium. Mencit diberi pakan CP 551 dan minum air mineral. Mencit didistribusikan ke dalam tujuh kelompok yang berbeda dengan masing-masing kelompok terdiri dari tiga ekor mencit.

3.3.4.2 Preparasi Pembuatan Dosis

Pada uji katalepsi, dosis ekstrak daging biji kara benguk yang digunakan adalah dosis 200 mg/kg berat badan. Sedangkan dosis nanopartikel magnetite 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 g ditimbang dan dicampur dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air 300 ml kemudian dihomogenkan.
2. Pembuatan sediaan haloperidol dosis 5 mg/kg berat badan
Haloperidol sebanyak 4 tablet (@5mg) ditimbang, di gerus dan dicampur PGA 1% sebanyak 100 ml dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit dan dihomogenkan.
3. Pembuatan sediaan L-DOPA dosis 10 mg/kg berat badan
L-DOPA sebanyak 4 mg dicampur PGA 1% sebanyak 10 ml dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit dan dihomogenkan.
4. Pembuatan sediaan ekstrak biji kara benguk dosis 200 mg/kg berat badan
Ekstrak daging biji kara benguk sebanyak 8 mg di timbang dan dicampur PGA 1% sebanyak 10 ml dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit dan dihomogenkan.
5. Pembuatan sediaan Fe-MPn dan Zn-MPn dosis 25 mg/kg berat badan

Serbuk Fe-MPn dan Zn-MPn sebanyak 10 mg ditimbang dan dicampur PGA 1% sebanyak 10 ml dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit dan dihomogenkan.

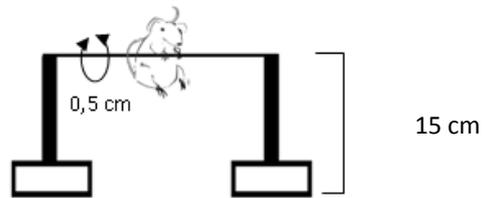
6. Pembuatan sediaan Fe-MPn dan Zn-MPn dosis 20 mg/kg berat badan
Serbuk Fe-MPn dan Zn-MPn sebanyak 8 mg ditimbang dan dicampur PGA 1% sebanyak 10 ml dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit dan dihomogenkan.
7. Pembuatan sediaan Fe-MPn dan Zn-MPn dosis 15 mg/kg berat badan
Serbuk Fe-MPn dan Zn-MPn sebanyak 6 mg ditimbang dan dicampur PGA 1% sebanyak 10 ml dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit dan dihomogenkan.
8. Pembuatan sediaan Fe-MPn dan Zn-MPn dosis 10 mg/kg berat badan
Serbuk Fe-MPn dan Zn-MPn sebanyak 4 mg ditimbang dan dicampur PGA 1% sebanyak 10 ml dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit dan dihomogenkan.
9. Pembuatan sediaan Fe-MPn dan Zn-MPn dosis 5 mg/kg berat badan
Serbuk Fe-MPn dan Zn-MPn sebanyak 2 mg ditimbang dan dicampur PGA 1% sebanyak 10 ml dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit dan dihomogenkan.

3.3.4.3 Tahap Pengujian

Mencit dibagi menjadi tujuh kelompok utama yaitu kelompok kontrol normal (mencit sehat), kelompok kontrol negatif (mencit yang diberi haloperidol 5 mg/kg bb), kelompok pembanding (mencit yang diberi L-DOPA 5 mg/kg bb), kelompok pembanding II (mencit yang diberi ekstrak daging biji kara benguk dosis 200 mg/kg), 2 kelompok uji dosis I (mencit yang diberi Fe-MPn atau Zn-MPn dosis 5 mg/kg), kelompok uji dosis II (mencit yang diberi nanopartikel Fe-MPn atau Zn-MPn dosis 10 mg/kg), kelompok uji dosis III (mencit yang diberi nanopartikel Fe-MPn atau Zn-MPn dosis 15 mg/kg), kelompok uji dosis IV (mencit yang diberi nanopartikel Fe-MPn atau Zn-MPn

dosis 20 mg/kg), dan kelompok uji dosis V (mencit yang diberi nanopartikel Fe-MPn atau Zn-MPn dosis 25 mg/kg),

Intensitas katelepsi diukur sebagai lamanya waktu mencit menggantung dengan kedua kaki depan memegang kawat berdiameter 0,5 cm dengan tinggi 15 cm tanpa melakukan pergerakan. Pengamatan katelepsi dilakukan setelah 30 menit pemberian suspensi haloperidol. Haloperidol diberikan pada mencit secara oral 30 menit setelah pemberian suspensi pembawa (PGA 1%) atau Fe-MPn dan Zn-MPn dosis 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg berat badan, ekstrak daging biji kara benguk dosis 200 mg/kg berat badan, dan L-DOPA dosis 10 mg/kg berat badan yang diberikan secara oral juga (Costall dan Olley, 1971). Volume dosis yang diberikan disesuaikan dengan massa setiap mencit. Skema pengujian katelepsi ditunjukkan pada gambar 3.2.



Gambar 3. 2
Skema Pengujian Katelepsi

3.3.5 Analisis Data

Data hasil uji pengujian katelepsi 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 katelepsi (Ardianti, 2014).