

BAB 3

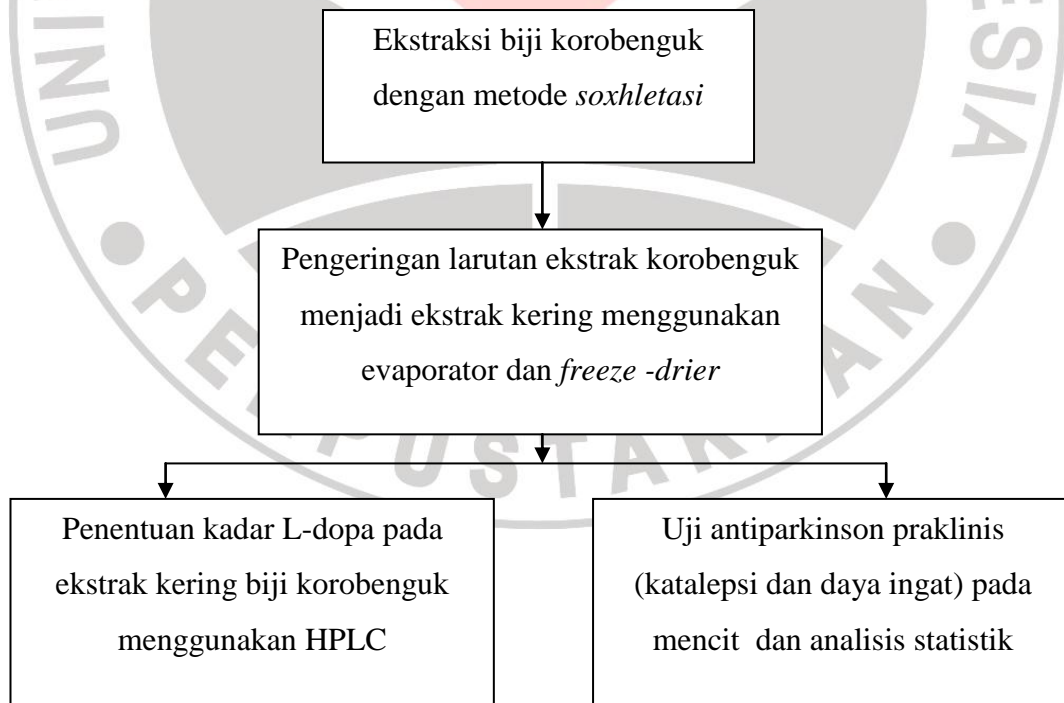
METODE PENELITIAN

A. Lokasi dan subjek sampel penelitian

Pelaksanaan penelitian dimulai sejak bulan Agustus 2012 hingga Maret 2013 di Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Analitik Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

Sampel yang digunakan adalah biji korobenguk utuh yang berasal dari kota Bantul Yogyakarta. Biji korobenguk yang digunakan pada penelitian dalam kondisi yang telah kering, berwarna putih dengan bitik-bintik hitam, berukuran sekitar 1 cm sampai 1,5 cm dengan ketebalan ± 5 mm.

B. Alur penelitian



Gambar 3. 1. Diagram alir penelitian

C. Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Analitik Instrumen Universitas Pendidikan Indonesia Kota Bandung.

Berikut adalah alat-alat yang digunakan selama proses penelitian. Pada proses penyiapan sampel di gunakan alat penghalus biji korobenguk berupa lumpang alu dan Blender. Kemudian pada proses soxhletasi digunakan alat-alat seperti badan soxhlet, labu dasar bulat 500 ml, dan kondensor spiral yang di pasang dua selang air berbahan plastik, kemudian alat-alat tersebut diset diatas pemanas listrik dengan penyangga berupa statif dan klem seperti yang dapat dilihat pada Gambar.2.4. Untuk pengujian kadar L-dopa dalam sampel dilakukan pembuatan larutan L-dopa menggunakan alat HPLC. Pada tahap aplikasi digunakan beberapa alat yaitu badan suntik, sonde, jarum suntik, kandang mencit beserta tempat minum mencit, labirin, dan tempat uji katalepsi.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji korobenguk yang telah dihaluskan, pelarut etanol 96%, pakan mencit, dan air mineral untuk minum mencit. sedangkan dalam proses penentuan kadar L-dopa dalam ekstrak menggunakan HPLC membutuhkan beberapa bahan seperti aqua bides, aquades, metanol, dan asam fosfat.

D. Prosedur penelitian

Prosedur penelitian ini meliputi tahapan persiapan, dan tahapan penelitian. Pemaparannya adalah sebagai berikut:

1. Tahap persiapan

a. Preparasi sampel biji korobenguk

Biji korobenguk (*Mucuna pruriens*) yang telah kering, dicuci menggunakan air mengalir untuk dibersihkan dari debu dan kotoran. Kemudian biji korobenguk di keringkan dengan cara diangin-angin hingga benar-benar kering. Biji korobenguk (*Mucuna pruriens*) yang sudah kering, ditumbuk kasar menggunakan

lumpang alu, kemudian dihaluskan menggunakan *blender* hingga benar-benar halus.

Biji korobenguk yang telah halus berwarna putih keabuan diekstraksi menggunakan metoda *soxhletasi*. Biji yang telah halus tersebut sebelumnya ditimbang sebanyak $\pm 25-30$ gram kemudian dibungkus menggunakan kertas saring dan diikat dengan tali kasar kemudian dimasukkan kedalam badan *soxhlet*. Hal tersebut dilakukan agar pada saat ekstraksi, padatan sampel tidak terbawa aliran pelarut. Labu dasar bulat, badan *soxhlet*, kondensor spiral dan selang dipasangkan pada statif dan klem, kemudian diset beserta *electric heater and stirrer* dan wadah penangas menjadi satu set alat *soxhlet*, dimana tiap penghubung alat-alat gelas yang digunakan diberi olesan vaseline tipis-tipis, hal tersebut dilakukan agar setiap penghubungnya dapat terhubung dengan kuat dan tidak mengalami kebocoran pada saat ekstraksi berlangsung. Biji magnet dan pelarut berupa etanol 96% sebanyak ± 150 ml dimasukkan ke dalam labu dasar bulat 500ml, kemudian sampel yang telah ditimbang dan dibungkus, di masukkan ke dalam badan *soxhlet*, kemudian *electric heater and stirrer* dinyalakan pada suhu $\pm 150^{\circ}\text{C}$ menggunakan penangas air. Soxhletasi dihentikan pada saat pelarut yang bercampur dengan ekstrak biji korobenguk yang berwarna kuning bening pada badan *soxhlet* kembali tidak berwarna.

b. Pembuatan kandang hewan uji mencit

Kandang mencit merupakan suatu bak plastik berukuran 26 cm x 30 cm x 12 cm dimana tiap baknya dilengkapi dengan medium tempat hidup berupa serutan kayu dan satu buah tempat minum. Bagian atas kandang ditutup ram kawat yang berfungsi mencegah mencit keluar dari kandang (Utami, 2010).

c. Pembuatan larutan PGA 1% dan larutan Haloperidol

Dilakukan pembuatan larutan PGA1% sebanyak 300 ml dengan melarutkan sebanyak 3 gram padatan serbuk PGA yang ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam aquades sebanyak 300 ml secara kuantitatif kemudian larutan diaduk menggunakan batang pengaduk hingga menjadi cairan tak berwarna sedikit keruh.

Dilakukan pembuatan larutan haloperidol dengan dosis 5 mg/kg berat badan/ekor sebanyak 50 ml. Padatan haloperidol sebanyak 15 mg dilarutkan ke dalam 50 ml larutan PGA 1% yang telah dipersiapkan sebelumnya kemudian diaduk dengan batang pengaduk hingga padatan haloperidol benar-benar larut menjadi larutan putih sedikit keruh.

d. Pembuatan larutan dosis ekstrak biji korobenguk

Dilakukan pengeringan larutan ekstrak biji *Mucuna pruriens* hasil *soxhletasi* dari pelarutnya berupa etanol 96% dengan menggunakan evaporator dan *Freeze drier* untuk menghilangkan kadar airnya. Setelah dikeringkan, ekstrak biji *Mucuna pruriens* memiliki bentuk fisik padatan berwarna hitam sedikit berminyak (wax). Padatan ekstrak kemudian disimpan dalam lemari es dan digunakan sebagai sampel untuk tahapan penelitian selanjutnya.

Untuk masing-masing dosis, dilakukan pengenceran ekstrak dalam pelarut PGA 1% sebagai berikut:

- 1) 0 mg/kg berat badan, (kontrol negatif) merupakan laruta PGA 1% tanpa ditambah ekstrak biji korobenguk.
- 2) Dosis 100 mg/kg berat badan, dibuat dengan melarutkan 120 mg ekstrak biji korobenguk dalam 20 ml pelarut PGA 1%
- 3) Dosis 200 mg/kg berat badan, dibuat dengan melarutkan 240 mg ekstrak biji korobenguk dilarutkan dalam 20 ml pelarut PGA 1%
- 4) Dosis 300 mg/kg berat badan, dibuat dengan melarutkan 360 mg ekstrak dalam 20 ml pelarut PGA 1%

Dosis lazim maksimal L-dopa adalah 800mg/hari/oral, atau jika dikonversikan ke mencit menjadi 2,08mg/hari (Winarni, 2011)

2. Tahap penelitian

a. Penentuan kadar L-dopa menggunakan HPLC

Untuk mengetahui kadar L-dopa yang terdapat dalam ekstrak korobenguk hasil ekstraksi dengan metode *soxhletasi* dilakukan pengukuran dengan menggunakan instrument HPLC. Dimana sebelumnya dilakukan pembuatan

larutan standar L-dopa dengan melarutkan padatan L-dopa murni dalam larutan fasa gerak berupa aqua bides yang ditambahkan asam fosfat hingga mencapai pH 2,5. Kemudian ekstrak biji korobenguk dilarutkan dalam fasa gerak yang telah dibuat sebelumnya. Luas area L-dopa pada waktu retensi tertentu dihitung konsentrasinya menggunakan persamaan kurva kalibrasi standar L-dopa. Pengukuran deret standar dan sampel dilakukan dengan alat HPLC Shimadzu dengan parameter pengujian yaitu $\lambda = 280 \text{ nm}$, laju alir 1 mL/menit dan perbandingan pelarut H₂O:Metanol:H₃PO₄ yaitu 97:20:1 (Teixera, et al., 2003)

b. Pemeliharaan hewan uji mencit

Hewan uji mencit di pelihara diruang terkondisikan selama tujuh hari pada suhu ruang antar 23⁰-29⁰ C dengan tujuan agar hewan dapat beradaptasi dengan lingkungan yang akan ditempati selama percobaan. Mencit disimpan dalam kandang berukuran 26 cm x 21 cm x 9 cm. Berdasarkan jenis perlakuan maka masing-masing kandang diisi oleh tiga ekor mencit.

3. Tahap aplikasi

a. Induksi haloperidol dan pemberian dosis ekstrak biji korobenguk pada mencit
Larutan haloperidol sebanyak 0,5 ml diberikan dengan cara disuntikan menggunakan jarum suntik ke dalam rongga perut mencit kemudian dilanjutkan dengan pemberian ekstrak biji korobenguk yang sudah di larutkan dalam pelarut PGA1% dalam berbagai dosis tertentu, diberikan kepada mencit dengan cara *peroral disonde* sebanyak 0,5 ml/ ekor.

b. Pengujian katalepsi dan daya ingat mencit

Pengujian katalepsi mencit dilakukan setelah 24 jam semenjak dilakukan pemberian haloperidol dan larutan ekstrak korobenguk. Pengujian dilakukan dalam sebuah kotak kardus berukuran 13cm x12cm x10cm yang dipasang kawat besi berdiameter 2 mm secara melintang. Kawat tersebut berfungsi sebagai tempat menggantungnya kaki depan mencit. Kaki depan mencit digantungkan pada kawat yang telah dipasang kemudian dihitung waktu yang diperlukan untuk mencit dari mulai kaki depan menggantung di kawat hingga pegangan kaki depan mencit

lepas dari kawat. Pengujian tersebut dilakukan terhadap semua mencit. Waktu yang diperoleh kemudian dicatat sebagai data penelitian.

Untuk menguji daya ingat mencit, disiapkan labirin berukuran 30 cm x 20 cm x 15 cm. Labirin terdiri dari enam pintu dalam dan satu pintu masuk dan satu pintu keluar yang bisa dibuka dan ditutup dengan bagian atas labirin terbuka. Dilakukan perhitungan waktu mencit pada saat proses adaptasi dalam labirin. Proses adaptasi dan pengujian mencit terhadap labirin dimulai dari ujung pintu masuk hingga mencapai ujung pintu keluar labirin. Di pintu keluar labirin, disimpan sejumlah pakan mencit dengan tujuan agar mencit mau menyusuri labirin dari pintu masuk hingga pintu keluar. Waktu yang diperlukan oleh mencit untuk menyusuri labirin dari pintu masuk hingga pintu keluar baik pada saat adaptasi ataupun pada saat pengujian dihitung menggunakan *stopwatch* kemudian dicatat waktunya sebagai data penelitian.

4. Tahap Analisis Data Penelitian

Dilakukan uji normalitas dan uji hipotesis data penelitian secara statistik parametrik yaitu analisis varian (ANOVA *one-way*) dan *t-independent test* menggunakan *Software SPSS 20 for windows*.