

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Januari sampai Juli 2018 dan dilakukan di Laboratorium Riset, Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Universitas Pendidikan Indonesia, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada, Laboratorium Kimia Analitik Institut Teknologi Bandung serta Peternakan Tikus Anak Mami D45 Cimahi.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi dan sintesis diantaranya, alat-alat gelas, satu set *rotary evaporator vacuum*, pompa vakum, *ultrasonic cleaner*, *waterbath with shaker*, neraca analitik, corong *Buchner*, *freeze dryer*, *digital mechanical overhead stirrer*, *magnetic stirrer*, *vortex mixer*, pH meter, spatula, pipet tetes, tabung sentrifuse dan *centrifuge*. Pada tahap karakterisasi instrument yang digunakan diantaranya, *Scanning Electron Microscope-Energy Dispersion X-Ray (SEM-EDX) JSM-6510LA*, *Fourier Transform Infra Red (FTIR) Thermo Scientefic Nicolest iS10* dan FTIR Prestidge 21 Shimadzu. Pada tahap uji aktivitas antiparkinson alat yang digunakan yaitu alat-alat gelas, mortir, sonde, spet 1 mL, kandang mencit, neraca dan besi berdiameter 0,5 cm sebagai alat uji.

3.2.2 Bahan

Pada penelitian ini, bahan yang digunakan adalah biji karabenguk (*Mucuna pruriens*) yang diperoleh dari Bantul, Yogyakarta. Bahan-bahan kimia yang digunakan diantaranya, etanol teknis 96%, asam sitrat, serbuk kitosan, natrium tripolifosfat (Na-TPP), asam asetat glassial, aquades, aqua demineralisasi, dan kertas saring Whatman No. 42. Pada uji katalepsi, hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan usia tiga bulan dengan berat sebesar 23-36 gram sebanyak 27 ekor, pakan mencit PC 551, Haloperidol, PGA (*Pulvis Gummi Arabicum*), dan L-dopa standar.

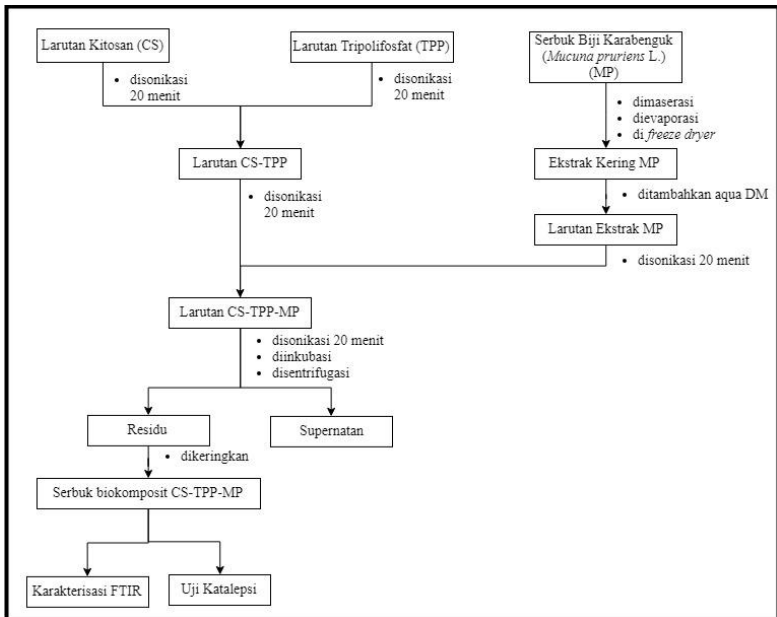
Milantika Dyah Puspitasari, 2018

AKTIVITAS ANTIPARKINSON BLOKOMPOSIT KITOSAN-TRIPOLIFOSFAT-EKSTRAK BIJI KARABENGUK (*Mucuna pruriens* L.) (CS-TPP-MP) PADA MENCIT

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap meliputi ekstraksi biji karabenguk, sintesis biokomposit CS-TPP-MP, Karakterisasi biokomposit CS-TPP-MP dan uji farmakologi aktivitas antiparkinson. Bagan alir metode penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan Alir Metode Penelitian

3.2.1 Ekstraksi Biji Karabenguk

Biji karabenguk (*Mucuna pruriens*) dipisahkan dari kulitnya dan dikeringkan dibawah sinar matahari. Setelah itu, biji karabenguk (*Mucuna pruriens*) dihancurkan hingga menjadi bubuk. Serbuk biji karabenguk (*Mucuna pruriens*) dimaserasi selama 3 hari dalam pelarut air : etanol (1:1) dengan penambahan asam sitrat sampai pH 3. Selama proses ekstraksi, pelarut diganti setiap 24 jam kemudian

Milantika Dyah Puspitasari, 2018

AKTIVITAS ANTIPARKINSON BIOKOMPOSIT KITOSAN-TRIPOLIFOSFAT-EKSTRAK BIJI KARABENGGUK (*Mucuna pruriens* L.) (CS-TPP-MP) PADA MENCIT

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

ekstrak dipisahkan dari pelarut organik menggunakan *rotatory vacuum evaporator* pada suhu 60°C. Residu berair dengan warna hitam kecoklatan diperoleh dan dikeringkan menggunakan *freeze dryer*. Ekstrak kering disimpan dalam desikator.

3.2.2 Sintesis Biokomposit CS-TPP-MP

Kitosan (CS) sebanyak 0,2 gram dilarutkan dalam 100 mL asam asetat 2% hingga diperoleh konsentrasi kitosan 0,2% (b/v). Campuran diaduk dengan *digital mechanical overhead stirrer* untuk mempercepat pelarutan. Sebanyak 16 ml larutan tripolifosfat (TPP) 0,07% (b/v) dan 15 ml larutan kitosan disonikasi selama 20 menit kemudian dicampurkan dan disonikasi kembali selama 20 menit.

Larutan ekstrak biji karabenguk (*Mucuna pruriens*) konsentrasi 10.000 ppm disiapkan dengan cara mencampurkan 0,1 gram serbuk biji karabenguk (*Mucuna pruriens*) dengan 10 mL aqua demineralisasi dan disonikasi selama 20 menit. Larutan ekstrak dicampurkan kedalam 5 mL larutan campuran CS-TPP dan disonikasi selama 20 menit kemudian diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 25°C selama 12-15 jam. Larutan CS-TPP-MP disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 80 menit. Residu yang terbentuk dicuci dengan aqua demineralisasi dan dikeringkan pada suhu kamar kemudian disimpan dalam desikator.

3.2.3 Karakterisasi Biokomposit CS-TPP-MP

3.3.3.1. *Scanning Electron Microscope-Energy Dispersion X-Ray (SEM-EDX)*

Karakterisasi menggunakan SEM-EDX digunakan untuk menganalisis permukaan dari objek (padatan) secara langsung guna mengetahui informasi topografi, morfologi, dan komposisi dari suatu sampel. Biokomposit CS-TPP-MP merupakan sampel yang tidak mengandung logam sehingga perlu dilakukan *sputter coating* untuk membungkus sampel dengan material yang dapat menghantarkan listrik seperti emas (Au). Untuk proses pengambilan gambar (*image*) dan data komposisi sampel teroksidasi, sampel diletakkan dan ditempelkan diatas SEM *specimen holder* dengan menggunakan *carbon double tape* dengan bagian penampang lintang (*cross section*) mengarah vertikal ke atas atau ke lensa obyektif agar susunan lapisan matriks bahan dengan lapisan oksida terlihat jelas. *Double tape* terbuat dari bahan karbon yang konduktif di dua sisi yang berfungsi

menghantarkan semua elektron masuk kedalam sampel keluar melalui *grounding*. Ruang sampel divakum hingga 10^{-6} torr untuk menjamin bahwa kolom SEM bebas dari molekul udara. Detektor yang digunakan yaitu *Energy Dispersion X-Ray* (EDX).

3.3.3.2. *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Karakterisasi menggunakan FTIR digunakan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa. Sebanyak 100 mg KBr, 20 mg kitosan; 3,7 mg ekstrak *Mucuna pruriens* dan 4 mg sampel CS-TPP-MP hasil sintesis masing-masing digerus. Kemudian masing-masing dimasukkan ke *sample holder*, dibuat pelet dengan *press* (tekanan setara dengan 2 ton) dan ditunggu selama satu menit. Pellet yang terbentuk diukur menggunakan instrument spektroskopi FTIR dengan jangkauan bilangan gelombang antara $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Hasil spektrum yang diperoleh kemudian dibandingkan untuk melihat interaksi yang terjadi antara kitosan-TPP dengan senyawa aktif pada ekstrak biji karabenguk.

3.2.4 Uji Farmakologi Aktivitas Antiparkinson

3.3.4.1. Preparasi Hewan Uji

Mencit yang digunakan adalah mencit jantan usia tiga bulan dengan berat badan berkisar 23-36 gram. Mencit diberi pakan PC 551. Mencit didistribusikan ke dalam sembilan kelompok yang berbeda dengan masing-masing kelompok terdiri dari tiga ekor mencit.

3.3.4.2. Preparasi Pembuatan Dosis

Pada uji katelepsi, dosis ekstrak daging biji karabenguk yang digunakan adalah dosis 200 mg/kg berat badan. Sedangkan dosis biokomposit hasil sintesis 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 ditimbang sebanyak 1 g dan digerus dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan sedikit air hangat. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml, ditambahkan air sampai tanda batas dan dihomogenkan.
2. Pembuatan sediaan haloperidol dosis 5 mg/kg berat badan
Haloperidol ditimbang sebanyak 6,5 mg, digerus dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan sedikit larutan PGA

- 1%. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL, ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
3. Pembuatan sediaan L-dopa dosis 10 mg/kg berat badan
Serbuk L-dopa ditimbang sebanyak 4 mg kemudian dicampur PGA 1% pada labu ukur 10 mL sampai tanda batas dan dihomogenkan.
 4. Pembuatan sediaan ekstrak biji karabenguk dosis 200 mg/kg berat badan
Ekstrak biji karabenguk ditimbang sebanyak 80 mg, digerus dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan sedikit larutan PGA 1%. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
 5. Pembuatan sediaan CS-TPP-MP dosis 5 mg/kg berat badan
Serbuk CS-TPP-MP ditimbang sebanyak 2 mg, digerus dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan sedikit larutan PGA 1%. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
 6. Pembuatan sediaan CS-TPP-MP dosis 10 mg/kg berat badan
Serbuk CS-TPP-MP ditimbang sebanyak 4 mg, digerus dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan sedikit larutan PGA 1%. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
 7. Pembuatan sediaan CS-TPP-MP dosis 15 mg/kg berat badan
Serbuk CS-TPP-MP ditimbang sebanyak 6 mg, digerus dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan sedikit larutan PGA 1%. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
 8. Pembuatan sediaan CS-TPP-MP dosis 20 mg/kg berat badan
Serbuk CS-TPP-MP ditimbang sebanyak 8 mg, digerus dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan sedikit larutan PGA 1%. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
 9. Pembuatan sediaan CS-TPP-MP dosis 25 mg/kg berat badan
Serbuk CS-TPP-MP ditimbang sebanyak 10 mg, digerus dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan sedikit larutan PGA

1%. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.

3.3.4.3. Tahap Pengujian

Mencit dibagi menjadi sembilan kelompok utama yaitu kelompok kontrol normal (mencit sehat), kelompok kontrol negatif (mencit yang diberi haloperidol 5 mg/kg berat badan), kelompok kontrol positif (mencit yang diberi L-dopa 5 mg/kg berat badan), kelompok uji I (mencit yang diberi ekstrak biji karabenguk dosis 200 mg/kg), kelompok uji II (mencit yang diberi CS-TPP-MP dosis 5 mg/kg), kelompok uji III (mencit yang diberi CS-TPP-MP dosis 10 mg/kg), kelompok uji IV (mencit yang diberi CS-TPP-MP dosis 15 mg/kg), kelompok uji V (mencit yang diberi CS-TPP-MP dosis 20 mg/kg), dan kelompok uji VI (mencit yang diberi CS-TPP-MP dosis 25 mg/kg).

Intensitas katelepsi diukur sebagai lamanya waktu mencit menggantung dengan kedua kaki depan memegang kawat berdiameter 0,5 cm dengan tinggi 6 cm tanpa melakukan pergerakan. Pengamatan katelepsi dilakukan setelah 30 menit setelah pemberian suspensi haloperidol. Haloperidol diberikan pada mencit secara *intramuscular* 30 menit setelah pemberian suspensi pembawa (PGA 1%) atau CS-TPP-MP dosis 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, dan 25 mg/kg berat badan, ekstrak biji karabenguk dosis 200 mg/kg berat badan, dan L-dopa dosis 10 mg/kg berat badan yang diberikan secara oral (Costall, Naylor, & Olley, 1972). Volume dosis yang diberikan disesuaikan dengan massa setiap menit.

3.2.5 Analisis Data

Data hasil pengujian katelepsi pada mencit diolah secara statistik menggunakan analisa ragam (*Analysis of variance / ANOVA*) satu arah (*one way*) untuk melihat ada tidaknya perbedaan antar kelompok data. Kemudian dilanjutkan uji *Post Hoc Dunnett* untuk menentukan kelompok mana yang berbeda. Data tersebut dianalisis dengan menggunakan bantuan *software* SPSS 25. Hasil dari pengujian statistika berupa nilai signifikansi (P) hasil perbandingan antar kelompok.

