

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan dan Alat Penelitian

4.1.1 Bahan Tanaman

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman cabe jawa. Tanaman tersebut diperoleh dari Bilitro (Balai Penelitian Tanaman dan Rempah dan Obat).

4.1.2 Bahan kimia dan bahan lain

Bahan kimia yang digunakan untuk penelitian ini adalah Etanol Absolut, Fosfatidilkolin, Sildenafil dan Piperin.

4.1.3 Alat-alat

Alat - alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Microwave Sharp R230-R(S), Ultra-turrax [Ika T-25 ULTRA-TURRAX Digital Homogenizer 230 vac (T-25)], Differential Thermo Analysis (DTA), Handycam Sony DCR-SX44, Densitometer.

4.2 Metode Penelitian

4.2.1 Hewan Coba

Untuk uji aktifitas perilaku seksual digunakan mencit putih (*Mus musculus*), jenis kelamin jantan dan betina dengan berat badan 20-30 gram yang diperoleh dari laboratorium hewan Departemen Farmakognosi dan Fitokimia. Mencit diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama 1 minggu dan diberi makan standard.

Untuk mengetahui jumlah banyaknya mencit yang digunakan dalam satu kelompok dapat dilakukan dengan menggunakan perhitungan sebagai berikut:

$$n = \frac{2\sigma^2 \left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta} \right)^2}{\left(\mu_1 - \mu_2 \right)^2}$$

dengan masukan data sebagai berikut :

Level of Significance (%)	$\alpha = 5$
Power of the test (%)	$1 - \beta = 80$
Population SD	$\sigma = 2,6$
Population variance	$\sigma^2 = 6,76$
Test value of the population mean	$\mu_1 = 61,4$
Anticipate population mean	$\mu_2 = 57,0$
Sample size	$n = 6$

(Cung *et al.*, 2007).

4.2.2 Pembuatan Ekstrak Cabe Jawa

Serbuk simplisia cabe jawa ditimbang sebanyak 100 g lalu diekstraksi dengan (Etanol absolut) dengan cara maserasi yang dilakukan dalam 4 tahap :

- Etanol absolut sebanyak 300 ml dimicrowave selama 3×10 detik, disaring dengan corong buchner. Ekstrak yang diperoleh ditampung dan residu dilanjutkan untuk tahap berikutnya.

- b) Residu dimaserasi dengan 250 ml etanol absolut dimicrowave selama 3x10 detik, disaring dengan corong Buchner. Ekstrak yang diperoleh ditampung dan residu dilanjutkan untuk tahap berikutnya.
- c) Residu dimaserasi dengan 225 ml etanol absolut dimicrowave selama 3x10 detik, disaring dengan corong Buchner. Ekstrak yang diperoleh ditampung dan residu dilanjutkan untuk tahap berikutnya.
- d) Residu dimaserasi dengan 225 ml etanol absolut dimicrowave selama 3x10 detik, disaring dengan corong Buchner. Ekstrak yang diperoleh ditampung dan residu dilanjutkan untuk tahap berikutnya.
- Ekstrak yang diperoleh dari keempat tahap tersebut dipekatkan dengan rotavapour dengan suhu 50°C. Hasil pemekatan dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C sampai kering dan bobotnya konstan.

4.2.3 Penentuan Kadar Air

Tujuannya yaitu memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air didalam bahan. Cara kerja menggunakan metode gravimetri yaitu masukan kurang lebih 10 gram ekstrak dan timbang seksama dalam waddah yang ditara. Keringkan pada suhu 105 °C selama 5 jam dan ditimbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang setelah 1 jam sampai perbedaan (selisih) antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Farmakope Herbal, 2009).

4.2.4 Penetapan Kadar Piperin pada Ekstrak Cabe Jawa

4.2.4.1 Pembuatan Larutan Standard Piperin

Tabel 4.1 Preparasi pembuatan kurva baku

Berat piperin dalam labu ukur 10,0 mL	Volume larutan yang ditotolkan
4,0 mg	0,5 μ L
5,0 mg	0,5 μ L
6,0 mg	0,5 μ L
7,0 mg	0,5 μ L
8,0 mg	0,5 μ L

a) Preparasi pembuatan kurva kalibrasi standart piperin

Piperin ditimbang sebanyak 5 kali dengan berat serbuk yang sesuai pada tabel 4.3. Kemudian masing – masing piperin yang sudah ditimbang sesuai tabel 4.3 dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 mL tambahkan methanol p.a 3 ml lalu dimicrowave selama 10 x 2 detik lalu tambahkan methanol p.a ad garis tanda atau 10 ml.

b) Preparasi sampel

- Membuat larutan sampel ekstrak cabe jawa

Diambil ekstrak sebanyak 1ml = 5 mg ekstrak kemudian dimasukkan ke labu ukur 5ml kemudian tambahkan pelarut methanol p.a 3ml lalu dimicrowave setelah itu ditambahkan methanol ad 5ml.

- 1) Pada tahap ini dilakukan penentuan fase gerak, penentuan konsentrasi sampel, penentuan jumlah larutan sampel yang ditotolkan dan penentuan panjang gelombang pada analisis menggunakan densitometri. Larutan sampel ditotolkan menggunakan Linomat-5 pada plat KLT silika gel 60 F254. Setelah totolan kering plat KLT dieluasi menggunakan ADC-2. Noda yang diperoleh diamati di *TLC Scanner-3* pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Fase gerak yang terpilih adalah fase gerak yang dapat memisahkan peak terpilih dengan peak lain, dengan pemisahan paling baik berdasarkan nilai resolusi $> 1,5-2$ dan peak purity dari peak piperin $> 0,9900$.
- 2) Totolkan 5 level konsentrasi standart yaitu, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm dan 800 ppm. Kemudian totolkan larutan sampel ekstrak cabe jawa sebanyak sejumlah sampel pada plat KLT kemudian dieluasi dengan menggunakan fase gerak terpilih, hasil eluasi kemudian discan pada panjang gelombang maksimum senyawa piperin. Kemudian dilakukan perhitungan regresi linier antara konsentrasi standart dengan area yang didapatkan. Dari perhitungan tersebut akan didapatkan nilai r , sdv , $Vx0$, dan persamaan regresi. Nilai r yang diterima adalah $\geq 0,9900$, $sdv < 5$, $Vx0 < 5\%$. Kemudian area dari peak piperin pada sampel ekstrak cabe jawa dimasukkan kedalam persamaan regresi larutan standart piperin, setelah itu akan didapatkan kadar piperin dari ekstrak cabe jawa.

4.2.5 Pembuatan Fitosom Ekstrak Cabe Jawa

- a) *Phosphatidicoline* (fosfolipid) dicampur dengan etanol absolut lalu diaduk dengan magnetic stirer hingga jernih sambil dipanaskan diatas hot plate (larutan fosfolipid).
- b) Larutan fosfolipid dicampur dengan ekstrak cabe jawa menggunakan rotavapor tanpa pemanasan dan *vacum* selama 15 menit lalu diaduk menggunakan ultraturax dengan kecepatan 8000 rpm.
- c) Cab-o-sil ditambahkan kedalam campuran larutan fosfolipid dan ekstrak cabe jawa sampai kering.
- d) Campuran fosfolipid dan ekstrak cabe jawa yang telah dicampur cab-o-sil selanjutnya dikeringkan.

4.2.6 Pembuatan Fitosom Piperin

- a) Piperin dilarutkan dengan etanol absolut dengan cara diaduk menggunakan magnetic stirer sambil dipanaskan diatas hot plate (larutan piperin).
- b) *Phosphatidicoline* (fosfolipid) dicampur dengan etanol absolut lalu diaduk dengan magnetic stirer hingga jernih sambil dipanaskan diatas hot plate (larutan fosfolipid).
- c) Larutan fosfolipid dicampur dengan larutan piperin menggunakan rotavapor tanpa pemanasan dan *vacum* selama 15 menit lalu diaduk menggunakan ultraturax dengan kecepatan 8000 rpm.
- d) Cab-o-sil ditambahkan kedalam campuran larutan fosfolipid dan larutan piperin.

- e) Campuran fosfolipid dan piperin yang telah dicampur cabo-sil selanjutnya dikeringkan.

4.3 Pengujian Bioaktivitas Afrodisiak

4.3.1 Penentuan Dosis.

Semua dosis dihitung dengan mengkonversikan dari dosis manusia 70 kg ke mencit 20 g dengan angka konversi sebesar 0,0026 dan hasilnya adalah sebagai berikut :

- a) Bahan untuk control (+)
- Sildenafilfil (mencit jantan) 50 mg/70 kg BB
 $50\text{mg} \times 0,0026 = 0,13 \text{ mg}/20 \text{ g BB}$
- b) Sampel
- Dosis ekstrak cabe jawa didasarkan pada berat ekstrak cabe jawa 100 mg/70 kg BB.
 $100 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,26 \text{ mg}/20 \text{ g BB}$
 - Dosis fitosom ekstrak cabe jawa didasarkan pada berat ekstrak cabe jawa 100 mg/70 kg BB.
 $100 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,26 \text{ mg}/20 \text{ g BB}$
 - Dosis piperin didasarkan pada berat piperin 13 mg/70 kg BB.
 $13 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,034 \text{ mg}/20 \text{ g BB}$
 - Dosis fitosom piperin didasarkan pada berat piperin 13 mg/70 kg BB.
 $13 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,034 \text{ mg}/20 \text{ g BB}$

4.3.2 Penyiapan Sediaan Uji

Masing-masing ekstrak sejumlah dosis yang telah ditentukan, disuspensikan ke dalam CMC Na 0,5%.

4.3.3 Persiapan Hewan Penelitian

Mencit diadaptasikan dengan lingkungan selama seminggu sebelum pengujian. Sehari sebelum dilakukan pengujian, mencit jantan dan mencit betina dimasukkan ke dalam kandang yang sama dengan diberi pembatas berupa jaring dari kawat.

4.3.4 Perlakuan Hewan

a) Mencit jantan dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok, per kelompok 6 ekor mencit jantan.

dan 30 menit sebelum pengamatan masing-masing diberi :

- Kelompok Kontrol (-) : CMC-Na 0,5%
- Kelompok Kontrol (+) : Sildenafil 0,13 mg/20 g BB
- Kelompok Ekstrak cabe jawa 0,26 mg/20 g BB
- Kelompok Fitosom Ekstrak Cabe Jawa 0,26 mg/20 g BB
- Kelompok Piperin 0,034 mg/20 g BB
- Kelompok Fitosom Piperin 0,034 mg/20 g BB

b) Pengamatan :

Untuk pengamatan dilakukan dengan cara direkam menggunakan handycam, mencit jantan secara individu dimasukkan terlebih dahulu ke dalam kandang kaca, setelah 30 menit aklimatisasi, mencit betina dimasukkan kedalam kandang

kaca yang sama. Setelah 1 jam, mencit betina dipisahkan selama 1 jam lalu dimasukan kembali kekandang kaca yang sama selama 30 menit. Semua percobaan dilakukan antara pukul 09.00 sampai 12.00 jam pada siang hari pada suhu kamar 26-27 ° C. Perlakuan tersebut berlaku untuk semua kelompok kontrol positif, kontrol negatif, ekstrak cabe jawa, fitosom ekstrak cabe jawa, pipein dan fitosom piperin. Lalu dihitung banyaknya Introducing dan mounting dimasing-masing kelompok.

4.3.5 Analisis statistik

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Anova One Way*, yang dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* metode LSD. Dari hasil perhitungan, apabila didapatkan F hitung lebih besar dari F tabel atau signifikansi kurang dari 0,05 maka menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan. Hipotesa yang diajukan adalah sebagai berikut :

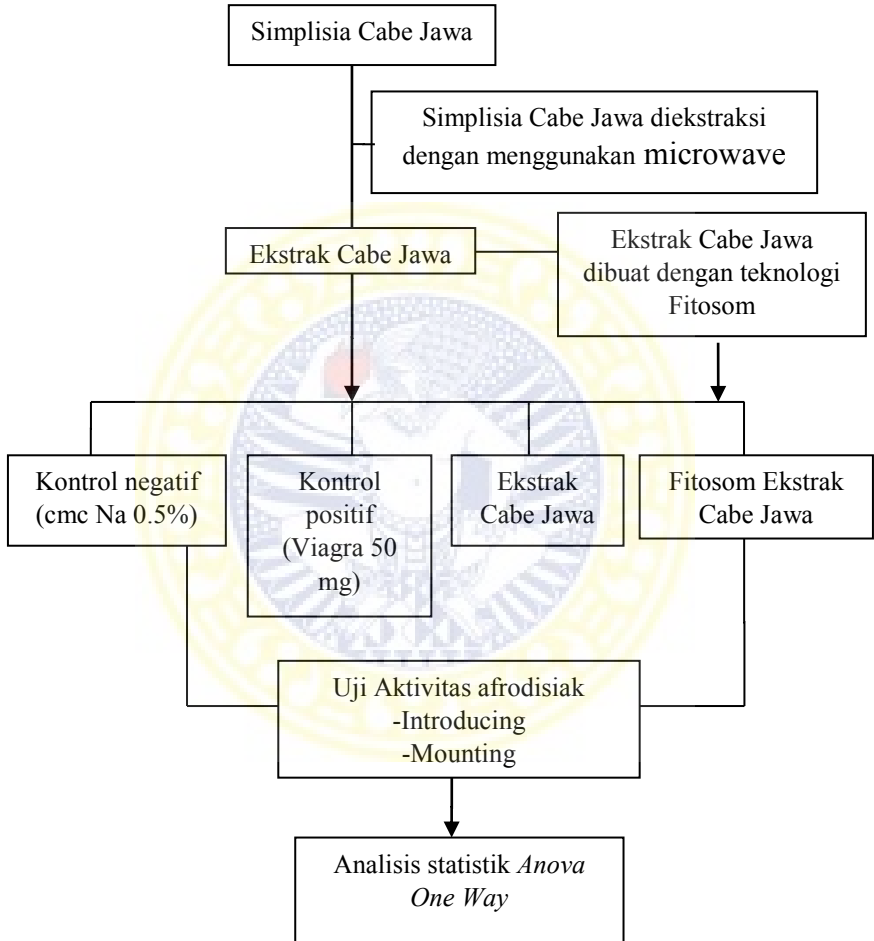
Ho : Tidak terdapat satu pasang kelompok pun yang berbeda

Ha : Minimal ada satu pasang kelompok yang berbeda secara signifikan

Ho ditolak maka Ha diterima



4.4 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

