

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Pengumpulan Tanaman Uji dan Determinasi

Tanaman uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kacang hijau (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) yang diperoleh dari daerah Kalijati, Sumedang. Determinasi tanaman uji dilakukan di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Prodi Biologi, Universitas Padjajaran.

4.2. Pembuatan Simplisia

Pembuatan simplisia dilakukan dengan cara mengumpulkan biji kacang hijau terlebih dahulu. Kemudian, dilakukan pencucian menggunakan air mengalir sampai bersih dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Lalu, dilakukan kembali sortasi kering untuk membersihkan pengotor lain yang mungkin tidak hilang saat pencucian. Tahap selanjutnya, biji kacang hijau dihaluskan dengan *blender* dan disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat.

4.3. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia merupakan tahapan awal untuk mengidentifikasi kandungan kimia yang terdapat dalam biji kacang hijau (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). Penapisan yang dilakukan terdiri dari pengujian golongan senyawa

alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, polifenol, tannin, monoterpen dan sesquiterpen, triterpenoid dan steroid.

4.3.1. Golongan alkaloid

Simplisia atau ekstrak ditempatkan dalam mortar, ditambahkan larutan amoniak 25% yang kemudian digerus, lalu ditambahkan 20 ml CHCl_3 , dan digerus kembali dengan kuat. Lapisan kloroform disaring dan diambil filtratnya (larutan 1). Larutan 1 tersebut ditambahkan dengan HCl 10% hingga terbentuk dua fasa, kemudian fasa air dipisahkan (larutan 2). Larutan 1 diteteskan pada kertas saring, lalu disemprotkan pereaksi *Dragendorff*. Apabila terbentuk warna merah jingga maka positif alkaloid. Lalu, larutan 2 dibagi menjadi 2 bagian dalam tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan pereaksi *Dragendorff* dan jika terbentuk endapan merah bata maka positif alkaloid. Sedangkan tabung kedua ditambahkan pereaksi *Mayer* dan jika menunjukkan endapan putih maka positif alkaloid (Farnsworth, 1966:247-255).

4.3.2. Golongan flavonoid

Simplisia atau ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan serbuk magnesium, 1 ml asam klorida 2 N dan 8 tetes amil alkohol, lalu dikocok kuat. Timbulnya warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol yang menandakan positif flavonoid (Farnsworth, 1966:263).

4.3.3. Golongan saponin

Simplisia atau ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquadest secukupnya, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Filtrat yang diperoleh dibiarkan sampai dingin, kemudian dikocok kuat-

kuat selama 10 detik dengan arah vertikal, terjadinya busa setinggi ± 1 cm yang bertahan selama 10 menit dan jika busa tersebut masih bertahan setelah penambahan beberapa tetes HCl menandakan positif saponin (Farnsworth, 1966:257).

4.3.4. Golongan kuinon

Simplisia atau ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan aquadest secukupnya, dipanaskan di atas penangas air dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan beberapa tetes larutan KOH 5% dan apabila timbul warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265-266).

4.3.5. Golongan polifenolat

Simplisia atau ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan aquadest secukupnya dan dipanaskan di atas penangas air. Kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida. Apabila timbul warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru hitam sampai hitam, maka menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966:265).

4.3.6. Golongan tanin

Simplisia atau ekstrak dimasukkan ke dalam gelas kimia, ditambahkan aquadest dan dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit kemudian didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi 3 bagian dan masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan larutan gelatin 1 % dan adanya endapan putih menandakan

positif tanin. Tabung kedua ditambahkan FeCl_3 1%, apabila terbentuk warna biru tua/hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin. Tabung ketiga ditambahkan larutan *Steasny*, endapan merah bata menunjukkan tanin (Farnsworth, 1966:264).

4.3.7. Golongan monoterpen dan sesquiterpen

Simplisia atau ekstrak digerus dengan eter, kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap hingga kering. Kemudian ditambahkan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat dan apabila timbul warna-warna menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Depkes RI, 1977:132).

4.3.8. Golongan triterpenoid dan steroid

Simplisia atau ekstrak sebanyak digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering. Lalu, ditambahkan 3-4 tetes larutan pereaksi *Liebermann Burchard* dan apabila terbentuk warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau-biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966:259-260).

4.4. Pembuatan Ekstrak

4.4.1. Pembuatan ekstrak etanol biji kacang hijau (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek)

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 95% dalam suhu kamar. Sebanyak 1,5 kg simplisia biji kacang hijau dimasukkan ke dalam maserator, kemudian ditambahkan pelarut 6 L etanol 95% (1:4) hingga seluruh simplisia terendam, lalu dibiarkan selama 3x24 jam dengan sesekali

pengadukan. Setelah itu, maserat yang diperoleh dipisahkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C-45°C hingga diperoleh ekstrak agak pekat. Kemudian, pemekatan dilanjutkan menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak pekat. Lalu, ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang (Sutisna, 2013).

4.4.2. Pembuatan infusa biji kacang hijau (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek)

Pembuatan infusa dilakukan dengan cara mencampurkan serbuk simplisia ke dalam panci dan aquadest secukupnya. Panci dipanaskan diatas penangas air selama 15 menit terhitung saat suhu mencapai 90°C sambil sekali-kali diaduk, kemudian diserkai menggunakan kain flanel (Depkes RI, 1995:9). Infusa dibuat sebanyak 3 konsentrasi yaitu, konsentrasi 5%, 10% dan 20%. Infusa dibuat dengan cara yang sama tetapi perbandingan simplisia yang digunakan berbeda.

4.5. Pengujian Daya Ingat Metode Labirin Y

Pengukuran kemampuan daya ingat mencit dilakukan dengan tes mendapatkan makanan menggunakan alat labirin pengujian kemampuan belajar. Labirin diatur dalam bentuk labirin Y yang membentuk sudut 120° serta memiliki tiga saluran dengan panjang 70 cm, lebar 10 cm, dan tinggi 10 cm. Saluran pertama merupakan saluran awal (pintu *start*) dimana mencit mulai ditempatkan dalam alat untuk menemukan makanan, saluran kedua dan ketiga merupakan saluran penunjuk arah mencit untuk merespon makanan yang sengaja ditempatkan pada saluran kedua dan ketiga. Masing-masing sudut pada setiap saluran dipasang pintu yang dapat diatur untuk dibuka dan ditutup, sehingga mencit dapat mendorongnya untuk menemukan tempat penyimpanannya makanan (Fitriyani, 2013).

Bentuk pembelajaran dalam labirin Y dilakukan dengan cara mengadaptasikan mencit terhadap kondisi lingkungan dan alat. Pada saat melakukan adaptasi alat, tiga saluran yang telah disiapkan dibersihkan terlebih dahulu, kemudian mencit diadaptasikan pada labirin Y tanpa menggunakan makanan sebagai umpan untuk melihat respon mencit terhadap arah saluran tempat makanan diletakkan. Setelah itu, dilakukan adaptasi ulang menggunakan makanan sebagai umpan, dimana makanan disimpan pada arah yang berlawanan dengan arah saluran yang telah dicapai mencit sebelumnya. Waktu yang ditempuh mencit (waktu gagal atau waktu tempuh menemukan makanan) dicatat. Pembelajaran mencit dilakukan pada hari ke-0 hingga hari ke-7.

Kemudian, pembelajaran mencit dilanjutkan kembali disertai dengan pemberian sediaan uji selama 10 hari dari hari ke-8 hingga hari ke-17 sesuai dengan pengelompokan hewan uji. Hewan uji dibagi menjadi 7 kelompok, dan masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit yang dipilih secara acak. Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol yang diberikan suspensi CMC-Na. Kelompok 2 merupakan kelompok uji yang diberi suspensi ekstrak etanol biji kacang hijau dengan dosis 0,35g/kg BB mencit. Kelompok 3 merupakan kelompok uji yang diberi suspensi ekstrak etanol biji kacang hijau dosis 0,7g/kg BB mencit. Kelompok 4 merupakan kelompok uji yang diberi suspensi ekstrak etanol biji kacang hijau dosis 1,4g/kg BB mencit. Kelompok 5 merupakan kelompok uji infusa biji kacang hijau 5% yang setara dengan dosis 1,25g/kg BB mencit. Kelompok 6 merupakan kelompok uji infusa biji kacang hijau 10% yang setara dengan dosis 2,5g/kg BB mencit. Kelompok 7 merupakan kelompok uji

infusa biji kacang hijau 20% yang setara dengan dosis 5g/kg BB mencit. Pengujian aktivitas daya ingat dilakukan setelah pemberian sediaan uji dihentikan yakni pada hari ke-18. Pada proses pengujian, semua pintu dipasang dan makanan diletakkan dibalik pintu pada salah satu saluran ujung labirin Y. Data yang diperoleh merupakan respon hewan uji berupa waktu yang diperlukan untuk menemukan makanan.

Waktu pengamatan setiap mencit dibatasi hingga 10 menit. Apabila sampai batas waktu tersebut mencit belum dapat menemukan makanan maka pengamatan dihentikan dan dianggap bahwa waktu yang ditempuh mencit adalah 11 menit (Suwendar dkk, 2012:23).

4.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis berdasarkan uji statistika dengan metode ANOVA, serta uji lanjut LSD menggunakan perangkat lunak *SPSS for windows Release 20.0* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna dari parameter pengamatan pengujian daya ingat antara kelompok kontrol dengan kelompok uji.