

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1 Penyiapan Bahan dan Determinasi

Tumbuhan kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) diperoleh dari Perkebunan Manoko daerah Lembang di Kota Bandung, kemudian dideterminasi di Hebarium Universitas Padjajaran. Pengolahan dilakukan pada kulit batang kemuning selama 6 (hari) dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sehingga menjadi simplisia.

4.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Batang Kemuning (*Murraya paniculata* .L.)

Ekstrak kulit batang kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) sebanyak 1 kg diperoleh dengan cara kulit batang kemuning dipisahkan dari tumbuhannya, kemudian dicuci dengan bersih, lalu dilakukan maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk. Maserat yang diperoleh dipisahkan menggunakan kertas saring. Tiap 24 jam dilakukan penampungan maserat dan penggantian pelarut baru. Semua maserat yang diperoleh dikumpulkan. Maserat kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40 °C sampai diperoleh ekstrak kental kulit batang kemuning (BPOM, 2004).

4.3 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap simplisia daun uji yaitu simplisia kulit batang kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) untuk mengetahui adanya golongan senyawa alkaloid, polifenolat, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, steroid dan triterpenoid, monoterpen/sesquiterpen yang terkandung di dalamnya.

4.3.1 Flavonoid

Simplisia ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air 5-10 ml, kemudian dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2N, campur larutan dan panaskan diatas penangas air selama 5-10 menit kemudian disaring. Filtrat yang didapat ditambahkan amil alkohol lalu dikocok kuat-kuat. Apabila timbul warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menandakan positif flavonoid (Farnsworth,1966:263).

4.3.2 Alkaloid

Simplisia ditempatkan pada tabung reaksi lalu diasamkan dengan asam klorida 2N, lalu disaring. Filtrat dibasakan dengan larutan amonia 10%, kemudian ditambahkan kloroform dan dikocok kuat-kuat. Lapisan kloroform disaring, kemudian ditambahkan asam klorida 2N lalu dikocok kuat-kuat sampai terdapat dua lapisan kembali. Lapisan asam dipipet dan dibagi kedalam tiga tabung, pada tabung 1 ditambahkan pereaksi Mayer apabila timbul endapan putih atau kekeruhan menandakan positif alkaloid, pada tabung 2 ditambahkan pereaksi Dragendorff apabila timbul endapan jingga-kuning atau kekeruhan menandakan positif alkaloid, dan tabung 3 digunakan sebagai blangko (Farnsworth,1966:253).

4.3.3. Polifenolat

Simplisia daun uji ditempatkan dalam tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Larutan pereaksi besi (III) klorida ditambahkan ke dalam filtrat dan timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966: 225).

4.3.4. Tanin

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia daun uji ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi dua. Pertama, filtrat ditambahkan dengan FeCl₃ akan terbentuk warna hijau, violet, atau hitam (tanin positif). Kedua, filtrate ditambahkan dengan gelatin 1% terbentuk endapan maka tanin positif (Farnsworth, 1966: 264).

4.3.5. Saponin

Sejumlah kecil simplisia ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air 5-10 ml, kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 30 menit, lalu disaring. Filtrat dibiarkan sampai dingin, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik dengan arah vertikal. Apabila muncul busa setinggi ± 1 cm yang bertahan selama 10 menit dan busa tersebut masih bertahan (tidak hilang) setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida maka menandakan positif saponin (Farnsworth, 1966: 256).

4.3.6. Kuinon

Sebanyak 1 gram serbuk simpilisia ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 100 ml air panas, didihkan 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan larutan NaOH 5% apabila membentuk warna jingga menandakan positif kuinon (Farnsworth,1966:256).

4.3.7. Triterpenoid dan Steroid

Simplisia ditambahkan eter kemudian digerus dan disaring hingga halus. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan pereaksi Liebermann Burchard. Apabila timbul warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau-biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth,1966:259).

4.3.8. Monoterpen dan Sesquiterpen

Sejumlah serbuk simplisia atau ekstrak digerus dengan eter, kemudian dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, ditambahkan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat. Warna-warna yang timbul menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Depkes RI, 1977: 132).

4.4 Pembuatan Sediaan

4.4.1 Pembuatan Suspensi Ekstrak Kulit Batang Kemuning

Dosis ekstrak uji yang digunakan dalam pengujian ini terdiri dari tiga variasi dosis yaitu 150 mg/kg BB, dosis 300 mg/kg BB dan dosis 600 mg/kg BB mencit. Ketiga dosis tersebut dibuat suspensi menggunakan CMC Na 1% dengan

konsentrasi 6 mg/ml, 12 mg/ml dan 24 mg/ml. Kemudian ketiga suspensi diberikan kepada masing-masing kelompok dengan volume pemberian 0,5 ml/20 gr BB mencit secara per oral.

4.4.2 Pembuatan Suspensi Pembeding dan Suspensi Induksi

Dalam penelitian ini suspensi pembeding menggunakan diazepam dengan dosis (pada manusia) 2 mg dan untuk suspensi induksi digunakan diazepam dengan dosis (pada manusia) 4 mg. Kemudian dosis tersebut dikonversikan dari dosis manusia ke dosis pada mencit yaitu 0,0026 (Laurence dan Bacharach, 1964). Sehingga dosis diazepam sebagai induktor adalah 0,01 mg/20 gr BB mencit dan dosis diazepam sebagai pembeding adalah 0,005 mg/20 gr BB mencit. Sejumlah serbuk tablet diazepam setara dosis tersebut digerus halus dalam mortar kemudian dibuat suspensi menggunakan CMC Na 1%. Volume suspensi yang diberikan pada kelompok perlakuan diberikan 0,5 ml/20 gr BB.

4.5 Orientasi Induksi Diazepam

Penelitian, dilakukan uji orientasi induksi diazepam terhadap 1 ekor mencit. Uji orientasi ini dilakukan untuk melihat efektivitas tidur dari diazepam dengan dosis induksi diatas.

4.6 Pengujian Efek Depresan

4.6.1 Pengamatan Efek Sedatif-Hipnotik

Pengujian ini menggunakan mencit jantan sebanyak 25 ekor yang masing-masing mempunyai bobot badan rata-rata antara 20-25 gram sebagai hewan uji

yang dibagi menjadi 5 kelompok terdiri dari kelompok kontrol positif diberi suspensi CMC Na 1%, kelompok pembanding diberi suspensi diazepam dosis 0,005 mg/20gr BB mencit, Kelompok Uji 1 diberi suspensi ekstrak kulit batang kemuning 150 mg/kg BB, Uji 2 diberi suspensi ekstrak kulit batang kemuning 300 mg/kg BB dan Uji 3 diberi suspensi ekstrak kulit batang kemuning 600 mg/kg BB. Dosis ekstrak kulit batang kemuning mengadopsi dari dosis penelitian sebelumnya yang menggunakan ekstrak herba putri malu, ekstrak herba putri malu 100 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB mencit. (Haq, A.S.2009:abstrak).

Semua mencit dipuasakan dahulu selama ± 18 jam, kemudian masing-masing mencit ditimbang bobot badannya hasilnya kemudian dirata-ratakan setiap kelompok. Setelah itu diamati uji efek depresan dengan tiga parameter diantaranya onset sedatif, onset hipnotik dan durasi tidur.

Setelah 45 menit kemudian semua kelompok perlakuan diberi induksi dengan suspensi diazepam dosis 0,01 mg/20 gr BB mencit secara per oral. Kemudian amati waktu onset sedatif, onset hipnotik dan durasi tidur dari setiap masing-masing kelompok. Waktu efek sedatif dilihat dari mencit pada saat ptosis dan penurunan aktivitas sedangkan efek hipnotik diamati saat hilangnya refleks membalik (*righting reflex*) dan waktu durasi tidur di hitung saat hilangnya refleks membalik (*righting reflex*) sampai timbul kembali refleks membalik (*righting reflex*).

4.6.2 Pengamatan Aktivitas Motorik

Setelah uji efek hipnotik-sedatif dilakukan *wash out* selama 10 hari kemudian dilakukan pengamatan aktivitas motorik pada hari pengamatan diberi dosis ekstrak uji yang sama dengan dosis sebelumnya tetapi tidak diberi induksi, kemudian dilakukan pengamatan penurunan aktivitas motorik meliputi jumlah jengukan, jumlah melintasi garis tengah, sikap tubuh reestablishment, ptosis, righting refleks. Kemudian hasil ditabulasi untuk memperoleh data kuantitatif (jumlah jengukan, dan melintasi garis tengah) dan data kualitatif (normal tidaknya sikap tubuh reestablishment, ptosis, righting refleks) semua kelompok sehingga dapat dibandingkan efek yang terjadi antar kelompok.

4.7 Analisa Data

Untuk melihat dan membuktikan ada tidaknya perbedaan yang bermakna dari efek depresan antara kelompok uji dengan kelompok kontrol, maka digunakan evaluasi data secara statistika menggunakan analisis metode *one way* ANAVA pada $\alpha = 0,05$ dan analisa dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (LSD).

Untuk uji aktivitas motorik dilakukan perhitungan rata-rata jumlah jengukan dan melintasi garis tengah serta persentase hewan yang menunjukkan sikap tubuh, reestablishment, menggelayung, ptosis, righting refleks normal dan hasilnya dibandingkan antar kelompok.