



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2004

UJI AKTIVITAS ANALGETIKA-ANTIINFLAMASI EKSTRAK KULIT BATANG AGLAIA ODORATA PADA MENCIT

Peneliti:

Dra. Juni Ekowati, M.Si., Apt.
Dra. Nuzul Wahyuningdyah, M.Si

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi
DIP Nomor : 004/XXIII/1/--/2004 Tanggal 3 Januari 2004
Kontrak Nomor : 108/P2IPT/DPPM/DM, SKW/III/2004
Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 22.

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2004

000806141

- ANALGESIS
UR PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
- ANTI - INFLAMMATORY AGENTS

LP 08/06
Eko
U



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2004

UJI AKTIVITAS ANALGETIKA-ANTIINFLAMASI EKSTRAK KULIT BATANG AGLAIA ODORATA PADA MENCIT

Peneliti:

Dra. Juni Ekowati, M.Si., Apt.
Dra. Nuzul Wahyuningdyah, M.Si

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi

DIP Nomor : 004/XXIII/1/-/2004 Tanggal 3 Januari 2004

Kontrak Nomor : 108/P2IPT/DPPM/DM, SKW/III/2004

Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 22.

000806141

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2004

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA**

1. a. Judul Penelitian	: Uji Aktivitas Analgetika-antiinflamasi Ekstrak Kulit Batang <i>Aglaiia odorata</i> pada mencit
b. Kategori	: I / II / III *)
2. Kepala Proyek Penelitian	:
a. Nama Lengkap dan Gelar	: Dra. Juni Ekowati, MSi.
b. Jenis Kelamin	: Perempuan
c. Pangkat/Gol. dan NIP	: Penata Tk. I/IIIId. NIP 132 009 462
d. Jabatan Fungsional	: Staf Dosen / Lektor
e. Fakultas/Jurusan	: Farmasi/ Jurusan Kimia Farmasi
f. Univ. / Inst./ Akademi	: Airlangga
g. Bidang Ilmu yang diteliti	: Farmasi
3. Jumlah Tim Peneliti	: Dua orang
4. Lokasi Penelitian	: Lab. Sintesis Farmasi Fak. Farmasi Unair
5. Bila Penelitian ini merupakan peningkatan kerja sama kelembagaan, sebutkan :	
a. Nama Instansi	: --
b. Alamat	: --
6. Masa Penelitian	: 5 (lima) bulan
7. Biaya yang diperlukan	: Rp. 6.000.000,-

Surabaya, 22-9-2004

Mengetahui :

Dekan Fakultas Farmasi Unair

Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini
NIP. 130355372

Ketua Peneliti

Dra. Juni Ekowati, MSi.
NIP. 132009462



Menyetujui :
Ketua Lembaga Penelitian Unair,

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.
NIP. 130701125

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul :
Uji Aktivitas Analgetika-antiinflamasi ekstrak kulit batang *Aglaia odorata* pada mencit.

Pada kesempatan ini Tim Peneliti menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga
2. Kepala Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan Ditjen Dikti, Depdiknas
3. Kepala Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
4. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
5. Kepala Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Unair
6. Semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini kurang sempurna, oleh sebab itu tim peneliti mengharapkan kritik dan saran agar karya ilmiah ini menjadi lebih sempurna dan bermanfaat bagi ilmu pengetahuan, khususnya di negeri tercinta Indonesia..

Surabaya, September 2004

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	halaman
ATA PENGANTAR.....	iii
AFTAR ISI.....	iv
AFTAR TABEL.....	v
AFTAR GAMBAR.....	vi
AFTAR LAMPIRAN.....	vii
INGKASAN.....	viii
UMMARY.....	x
BSTRACT	xii
AB I PENDAHULUAN	
1 Latar belakang masalah.....	1
2 Rumusan Masalah.....	2
3 Hipotesis Penelitian.....	3
4 Tujuan Penelitian.....	3
5 Manfaat Penelitian.....	3
AB II TINJAUAN PUSTAKA	
1 Tinjauan tentang <i>Aglaia odorata</i>	4
2 Tinjauan tentang Nyeri.....	5
3 Tinjauan tentang Analgetika.....	6
4 Tinjauan tentang Mekanisme Kerja Obat Analgesik-antiinflamasi.....	7
5 Tinjauan tentang metode pengujian analgesik.....	10
AB III METODE PENELITIAN	
1 Bahan Penelitian.....	15
2 Alat-alat.....	15
3 Metode Penelitian.....	16
4 Uji aktivitas Analgesik-antiinflamasi.....	16
AB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
1 Identifikasi Ekstrak.....	20
2 Uji Aktivitas Analgesik-antiinflamasi	22
AB V KESIMPULAN DAN SARAN	
1 Kesimpulan.....	26
2 Saran.....	26
AFTAR PUSTAKA.....	27
LAMPIRAN.....	30

DAFTAR TABEL

	Halaman
abel 4.1. Hasil Pemeriksaan Ekstrak dengan reaksi kimia.....	21
abel 4.2. Hasil Uji KLT	21
abel 4.3. Frekuensi konsdtruksi abdominal pada kelompok dosis ekstrak uji dan kelompok kontrol.....	23
abel 4.4. Hasil perhitungan prosentase hambatan nyeri pada kelompok yang diberi Ekstrak uji.....	24
abel 4.5. Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Batang Aglaia odorata.....	25

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Biosintesis Prostaglandin	9
Gambar 4.1. Kurva hubungan Dosis vs. % Hambatan Nyeri.....	24

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Surat Keterangan Identifikasi	29
Lampiran 2	Perhitungan Anova Antar Dosis Ekstrak kulit batang <i>Aglaia odorata</i>	31
Lampiran 3	Hasil Perhitungan ED ₅₀	32
Lampiran 4	Analisa Probit LD ₅₀ Ekstrak kulit batang <i>Aglaia odorata</i>	33

RINGKASAN

UJI AKTIVITAS ANALGETIKA-ANTIINFLAMASI EKSTRAK KULIT BATANG *AGLAIA ODORATA* PADA MENCIT

(Juni Ekowati, Nuzul Wahyuning Diyah, 2004, 34 halaman)

Aglaiia odorata adalah tumbuhan yang banyak terdapat di Indonesia, dan secara tradisional sering digunakan untuk pengobatan nyeri. Adanya kandungan triterpen pada daun yang diketahui mempunyai aktivitas antiinflamasi, mendorong peneliti untuk mengetahui aktivitas analgetika-antiinflamasi dari ekstrak kulit batang *Aglaiia odorata*. Sehingga tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas analgesik-antiinflamasi ekstrak tersebut, yang dinyatakan dengan ED_{50} dan toksisitas akutnya yang dinyatakan dengan LD_{50} .

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara perkolasi serbuk kering kulit batang *Aglaiia odorata* dalam pelarut metanol, pada temperatur kamar. Setelah pelarut diuapkan, ekstrak dikeringkan pada temperatur kamar, kemudian dilakukan beberapa spot tes untuk skrining kandungan ekstrak tersebut. Tes yang dilakukan adalah reaksi Liebermann-Burchard, Dragendorff, Wagner dan tes pengocokan. Dari spot tes yang dilakukan diduga adanya senyawa triterpen, alkaloid dan saponin. Dari skrining tersebut memperkuat dugaan bahwa ekstrak kulit batang *Aglaiia odorata* memiliki aktivitas analgetika antiinflamasi.

Uji aktivitas dilakukan dengan *writhing test*, dengan hewan coba mencit menggunakan 5 kelompok dosis (1000, 2000, 4000, 8000 dan 10000 mg/kg bb) dan 1 kelompok kontrol. Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa adanya ekstrak kulit batang *Aglaiia odorata* mempunyai aktivitas analgetika-antiinflamasi, dan diketahui ED_{50} ekstrak = 4013 mg/kg ; sedang LD_{50} ekstrak = 5917.10 mg/kg bb.

Untuk mengetahui mekanisme kerja aktivitas tersebut disarankan perlu dilakukan penelitian lanjutan aktivitas ekstrak tersebut dalam menghambat enzim siklooksigenase, maupun kooksigenase.

Kelompok Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian : 032/P4T/DPPM/PDM/III/2004, Nomor kontrak 37, Tgl 28 Maret 2004)

SUMMARY

**THE ANALGESIC-ANTIINFLAMATORY ACTIVITY TEST OF THE BARK
*AGLAIA ODORATA***

(Juni Ekowati, Nuzul Wahyuning Diyah, 2004, 35 pages)

Aglaia odorata, Indonesian medicinal plants that leaves contained triterpenes had antiinflammatory activity. The aim of the study was carried out the analgesic-antiinflammatory activity the bark extract of *Aglaia odorata* on mice by writhing test.

The plant samples were cut into small pieces and oven-heated at 60 C for 48 h. The dried materials were grounded into powder. The extract was obtained by extraction with methanol. Extracts were dried by rotary evaporator under reduced pressure and stored in a dry state until use.

In vivo assay of methanol extracts the bark of *Aglaia odorata* on mice by writhing test (1000, 2000, 4000, 8000, 10000 mg/kg w) showed considerable analgesic-antiinflammatory effects. From these results, it was concluded that $ED_{50} = 4013$ mg/kg and $LD_{50} = 5917$ mg/kg. It suggested to isolated the compounds from the bark of *Aglaia odorata* and tested the inhibitory enzym cyclooxygenase and lipoxygenase.

THE ANALGESIC-ANTIINFLAMATORY TEST BARK EXTRACT OF *AGLAIA ODORATA* ON MICE

(Juni Ekowati, Nuzul Wahyuning Diyah)

ABSTRACT

Aglaia odorata, Indonesian medicinal plants that leaves contained tetracyclic triterpenes and antiinflammatory activity. The aim of the study was carried out the analgesic-antiinflammatory activity the bark extract of *Aglaia odorata* on mice by writhing test. In vivo assay of methanol extracts the bark of *Aglaia odorata* on mice by writhing test (1000, 2000, 4000, 8000, 10000 mg/kg w) showed considerable analgesic-antiinflammatory effects. From these results, it was concluded that $ED_{50} = 4013$ mg/kg and $LD_{50} = 5917$ mg/kg. It suggested to isolated the compounds from the bark of *Aglaia odorata* and studied the mechanism analgesic-antiinflammatory activity by inhibitory test the enzym cyclooxygenase and lipoxygenase.

Keywords : *Aglaia odorata*, analgesic, antiinflammatory

x

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat di Indonesia telah dilakukan sejak lama terutama sebagai bahan obat tradisional. Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat tradisional menunjukkan kecenderungan yang meningkat. Bahkan di negara Barat tumbuhan tetap menjadi bahan dasar obat yang penting. Beberapa alasan yang mendasari terus berlangsungnya pemakaian bahan obat dari alam, adalah pertama secara umum bahan alam memiliki efek samping yang lebih kecil karena bahan alam bekerja melalui beberapa mekanisme yang diaktivasi oleh sejumlah senyawa yang berbeda sehingga hasil totalnya secara signifikan memiliki efek samping yang minimal. Alasan kedua adalah karena kerjanya yang lebih "lunak", maka penggunaan obat dari tumbuhan dapat menjadi pilihan sendiri. Alasan ketiga adalah sifat kemanfaatannya yang spesifik dan belum terdapat pada obat sintetik (Tyler, 1999).

Tumbuhan dapat mengandung bahan berkhasiat dan tidak berkhasiat. Di antara khasiat tumbuhan yang sering dicari hingga saat ini adalah tumbuhan yang mengandung bahan berkhasiat analgesik-antiinflamasi.

Analgetika adalah zat-zat yang memiliki efek mengurangi atau melenyapkan rasa nyeri tanpa menghilangkan kesadaran. Rasa nyeri tersebut dalam kebanyakan hal hanya merupakan suatu gejala, yang fungsinya adalah melindungi dan memberikan tanda bahaya tentang adanya gangguan-gangguan di dalam tubuh seperti peradangan (rematik, encok), infeksi mikroba atau kejang otot (Tjay dan Raharja, 1978). Masalah timbul bila nyeri menjadi berkepanjangan dan merugikan penderita. Oleh karena itu, berbagai upaya telah dilakukan oleh manusia untuk menekan atau meringankan rasa nyeri tersebut bahkan sampai hari ini pengaruh nyeri atau rasa sakit ini adalah penyebab utama pasien menemui dokternya untuk meminta pengobatan. Selain menggunakan pengobatan secara modern, pengobatan radang berupa nyeri sendi atau yang dikenal awam dengan sebutan *linu* juga menggunakan bahan yang berasal dari alam.

Aglaia odorata dari famili Meliaceae, adalah salah satu tanaman asli Indonesia (Nugroho *et al*, 1999), yang dikenal dengan nama pacar cina. Secara tradisional telah digunakan sebagai antihipertensi, ekspektoran, antiinflamasi, dan insektisida (Janprasert *et al*, 1993). Ekstrak daunnya digunakan sebagai afrodisiaka pada ramuan obat Cina. Aktivitasnya sebagai insektisida *Spodoptera littoralis* berhubungan dengan bahan aktif rokaglamid dan metil rokaglat (Erdelen *et al*, 1999). Dari daun tanaman ini telah diisolasi rokaglamid dan odorinol yang dilaporkan mempunyai aktivitas sebagai antitumor (Ohse *et al*, 1996).

Dari kulit batang species *Aglaia* yang lain, yaitu *Aglaia argentea* yang diperoleh dari Malaysia, telah diisolasi tetrasiklik triterpen yang mempunyai aktivitas sebagai anti tumor (Mohamad *et al*, 1999). Dilaporkan bahwa senyawa pentasiklik triterpen dari asam betulinat selain mempunyai aktivitas antitumor juga mempunyai aktivitas sebagai anti inflamasi (del Carmen Recio *et al*, 1995; Safayhi & Sailer, 1997).

Sejalan dengan usaha untuk memperoleh obat analgetika-antiinflamasi yang efektif dan relatif aman, maka pada penelitian ini digunakan ekstrak dari kulit batang *Aglaia odorata* yang diduga juga mengandung senyawa triterpen., untuk diuji aktivitas analgesik – antiinflamasi terhadap ekstrak metanol dari kulit batang *Aglaia odorata* dengan menggunakan hewan coba mencit secara *in vivo*.

Untuk mengetahui efek analgesik-antiinflamasi dapat digunakan hewan coba mencit atau tikus yang diberi perlakuan secara kimiawi dengan senyawa penginduksi nyeri. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode *writhing test* pada hewan mencit karena metode ini sederhana, mudah pelaksanaan dan pengamatannya. Senyawa yang dapat digunakan sebagai penginduksi nyeri adalah fenilkinon, bradikinin, larutan KCl 2 %, larutan asam asetat dan histamin (Turner, 1965). Diyah *et al* (2002) menggunakan larutan asam asetat 0,6% dengan volume 0,01 ml/g bb secara intraperitoneal. Pada penelitian ini digunakan larutan asam asetat 0,6 % karena nyeri yang terjadi akibat induksi kimiawi bahan ini berhubungan dengan faktor inflamasi. Respon nyeri yang tampak akibat rangsangan kimiawi adalah menggeliatnya mencit setelah pemberian senyawa penginduksi nyeri.

Dengan diketahuinya aktivitas analgesik - antiinflamasi ekstrak dari kulit batang *Aglaia odorata* terhadap mencit secara in vivo, dapat menjadi landasan ilmiah pemakaian bahan tersebut sebagai obat tradisional.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

- (1) Apakah ekstrak kulit batang *Aglaia odorata* mempunyai aktivitas analgesik-antiinflamasi terhadap mencit secara in vivo ?
- (2) Bila ya, berapakah ED_{50} dan LD_{50} ekstrak tersebut ?

1.3. Hipotesis Penelitian

Ekstrak dari kulit batang *Aglaia odorata* mempunyai aktivitas analgesik - antiinflamasi terhadap mencit secara in vivo.

1.4. Tujuan Penelitian

- (1) Menentukan ED_{50} aktivitas analgesik ekstrak kulit batang *Aglaia odorata* secara oral pada mencit dengan metode *writhing test*.
- (2) Menentukan LD_{50} aktivitas analgesik ekstrak kulit batang *Aglaia odorata* secara oral pada mencit dengan metode *writhing test*.

1.5. Manfaat Penelitian :

- Dapat diperolehnya informasi aktivitas analgesik - antiinflamasi ekstrak kulit batang *Aglaia odorata* , sehingga dapat dijadikan landasan ilmiah pemakaian bahan tersebut sebagai obat tradisional.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang *Aglaia odorata*

Aglaia odorata Lour. termasuk familia Meliaceae, adalah pohon yang tersebar dan terdistribusi di hutan tropis di Asia (Fuzzati *et al*, 1996). Di Indonesia tanaman ini dikenal dengan nama pacar cina, yang berbau harum.

Tumbuhan ini merupakan perdu, tinggi 2-5m, batangnya berkayu, bulat kasar, bercabang, putih kotor. Daun tumbuhan ini majemuk, menyirip gasal, anak daun 3-5, bulat telur, tepi rata, ujung runcing, pangkal tumpul, panjang 3-6 cm, lebar 1-3,5 cm, pertulangan menyirip, tangkal panjang \pm 3mm, hijau. Bunganya majemuk, bentuk tandan, di ujung cabang, kelopak kecil, berbagi lima, kuning kehijauan, benang sari kecil, kuning, putik berbentuk bintang, mahkota lima, bentuk elips, bulat telur, kuning. Buahnya termasuk buah buni, kecil, bulat, berbulu, panjang 6-7 mm, merah hitam, bijinya kecil, bulat kuning kehijauan. Akarnya termasuk akar tunggang, kuning kotor. Secara tradisional tanaman ini digunakan dalam pengobatan inflamasi (Janaki *et al*, 1999), daun *Aglaia odorata* berkhasiat sebagai afrodisiaka, penghilang bau badan, obat mencret dan obat luka. Kandungan kimia daun *Aglaia odorata*, adalah saponin, alkaloida, flavonoida, tanin dan minyak atsiri. Selain itu, dari daun tanaman ini dapat diisolasi senyawa yang poten menghambat sintesis protein, yaitu aglaiastatin (Ohse *et al*, 1996). Peneliti ini juga melaporkan bahwa rocaglamida dan odorinol menunjukkan aktivitas antitumor.

Dilaporkan bahwa ekstrak daun dari *A. roxburghiana* var *bedomei* berkhasiat sebagai antiinflamasi. Senyawa yang berperan adalah triterpena roxburghiadiol A dan B. Efek penurunan degranulasi mast cell dari senyawa ini sebanding dengan disodium cromoglikate (Janaki *et al*, 1999).

Dari tanaman *Aglaia odorata* juga ditemukan adanya odorine dan odorinol yang menghambat inisiasi dan promosi pada proses karsinogenesis kulit (Inod *et al*, 2001; Xu *et al*, 2000).

Dari kulit batang tanaman ini juga telah diisolasi rocaglamida yang berpotensi sebagai insektisida (Molleyres *et al*, Hiort *et al*, 1999, Chaidir *et al*, 1999).

2.2. Tinjauan Tentang Nyeri

Rasa nyeri merupakan suatu gejala, yang fungsinya adalah melindungi dan memberikan tanda bahaya tentang adanya gangguan-gangguan di tubuh seperti peradangan (rematik, encok), infeksi-infeksi kuman atau kejang-kejang otot (Tjay dan Rahardja, 1978).

Sebab-sebab rasa nyeri adalah rangsangan mekanis atau kimiawi (kalor atau listrik), yang dapat menimbulkan kerusakan-kerusakan pada jaringan dan melepaskan zat-zat tertentu yang disebut mediator-mediator nyeri (perantara). Zat-zat ini lalu merangsang reseptor-reseptor nyeri yang terletak pada ujung-ujung saraf bebas di kulit, selaput lendir dan jaringan-jaringan (organ-organ) lain. Dari tempat ini rangsangan dialirkan melalui saraf-saraf sensoris ke Sistem Saraf Pusat (SSP): melalui sumsum tulang belakang ke thalamus dan kemudian ke pusat nyeri di dalam otak besar, dimana rangsangan dinyatakan sebagai nyeri (Tjay dan Rahardja, 1978).

Mediator-mediator nyeri yang terpenting adalah histamin, serotonin (5-hidroksitriptamin), bradikinin dan prostaglandin juga ion-ion kalium. Zat-zat ini menyebabkan reaksi-reaksi radang dan kejang-kejang dari jaringan otot, yang selanjutnya mengaktivasi reseptor-reseptor nyeri (Tjay dan Rahardja, 1978). Prostaglandin hanya berperan pada nyeri yang berkaitan dengan kerusakan jaringan atau inflamasi. Penelitian telah membuktikan bahwa prostaglandin menyebabkan sensitisasi reseptor nyeri terhadap stimulasi mekanik dan kimiawi. Jadi prostaglandin menimbulkan keadaan hiperalgesia, kemudian mediator kimiawi seperti bradikinin dan histamin merangsangnya dan menimbulkan nyeri yang nyata (Gan, 1999).

Berdasarkan proses terjadinya nyeri tersebut diatas, maka rasa nyeri dapat dilawan dengan beberapa cara, yakni dengan: (Tjay dan Rahardja, 1978)

- (1) Merintang pembentukan rangsangan dalam reseptor-reseptor nyeri perifer, oleh analgetika perifer.
- (2) Merintang penyaluran rangsangan nyeri dalam saraf-saraf sensoris, misalnya dengan anestetika lokal.
- (3) Blokade dari pusat nyeri dalam SSP dengan analgetika sentral (narkotika) atau dengan anestetika umum.

Pengobatan rasa nyeri dengan analgetika tergantung dari jenis nyeri, yaitu:

- (1) Nyeri yang ringan, seperti sakit gigi, kepala, otot-otot pada infeksi virus, nyeri selama haid, bila keseleo dan sebagainya. Yang digunakan untuk ini adalah analgetika perifer, misalnya asetosal atau parasetamol.
- (2) Nyeri ringan yang menahun, seperti rematik dan artrosis, digunakan analgetika atau zat-zat lain yang berkhasiat anti radang, antara lain asetosal, ibuprofen, indometasin.
- (3) Nyeri yang hebat, seperti nyeri organ-organ dalam (lambung, usus) antara lain akibat kolik (kejang) pada serangan-serangan penyakit batu ginjal dan batu empedu. Dalam hal ini digunakan analgetika sentral (narkotik).
- (4) Nyeri hebat yang menahun, misalnya kanker, atau kadang-kadang rematik dan neuralgia, digunakan obat-obat yang berkhasiat kuat seperti analgetika narkotik antara lain fentanil, dekstromoramida atau bezitramida (Tjay dan Rahardja, 1998).

2.3 Tinjauan Tentang Analgetika

Analgetika adalah senyawa yang dapat menekan fungsi sistem saraf pusat secara selektif, digunakan untuk menghilangkan rasa sakit tanpa mempengaruhi kesadaran.

Berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekul, analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgetika narkotik dan analgetika non narkotik (analgetik-antipiretik) (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Analgetika non narkotik sering pula disebut analgetik-antipiretik dan antiinflamasi non steroid (AINS). Analgetika non narkotik bekerja pada perifer dan sistem saraf pusat. Obat golongan ini digunakan untuk mengurangi rasa sakit yang ringan sampai sedang, untuk menurunkan suhu badan pada keadaan panas badan tinggi dan sebagai anti radang untuk pengobatan rematik. Analgetika-antipiretika digunakan untuk pengobatan simptomatik, yaitu hanya meringankan gejala penyakit, tidak menyembuhkan atau menghilangkan penyebab penyakit. (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Struktur kimia obat AINS yang sangat berguna mempunyai ciri-ciri umum yaitu: mempunyai dua cincin yang berhubungan langsung atau melalui "jembatan" atom/gugus pendek. Salah satu cincin bertindak sebagai pengemban bagian hidrovobik molekul, pada umumnya berupa cincin aromatik atau siklo alkana yang dapat disubstitusi dengan alkil

atau radikal apolar lainnya. Pada beberapa senyawa bagian ini dapat berupa rantai hidrokarbon. Cincin kedua adalah aromatik atau heterosiklik dan mempunyai gugus anionik yang umumnya adalah gugus karboksilat (Diyah *et al.*, 2002). Senyawa yang paling dikenal dan banyak digunakan adalah dari turunan salisilat. Aspirin (asam asetilsalisilat) merupakan prototipe analgetika antiinflamasi. Hingga kini obat-obat AINS masih dinilai dengan membandingkannya terhadap aspirin dan aspirin adalah obat pilihan pertama untuk keadaan rematik (Gringauz, 1997).

Analgetika non narkotik menimbulkan efek analgesik dengan cara menghambat secara langsung dan selektif enzim-enzim pada sistem saraf pusat yang mengkatalisis biosintesis prostaglandin, seperti siklooksigenase, sehingga mencegah sensitisasi reseptor rasa sakit (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Aktivitas analgesik jauh lebih lama dibanding golongan analgetika narkotika, tetapi tidak menimbulkan ketagihan dan tidak menimbulkan efek samping sentral yang merugikan (Gan, 1999).

2.4 Tinjauan Tentang Mekanisme Kerja Obat Analgesik-Antiinflamasi

Efek terapi maupun efek samping obat antiinflamasi nonsteroid (AINS) sebagian besar tergantung dari penghambatan biosintesis prostaglandin. Mekanisme kerja yang berhubungan dengan sistem sintesis prostaglandin ini mulai dilaporkan mulai tahun 1971 oleh Vane dan kawan-kawan yang memperlihatkan secara *in vitro* bahwa dosis rendah aspirin dan indometasin menghambat produksi prostaglandin. Penelitian lanjutan telah membuktikan bahwa prostaglandin akan dilepas bilamana sel mengalami kerusakan. Selain itu obat antiinflamasi nonsteroid (AINS) secara umum tidak menghambat biosintesis leukotrien, yang diketahui ikut berperan dalam inflamasi (Gan, 1999).

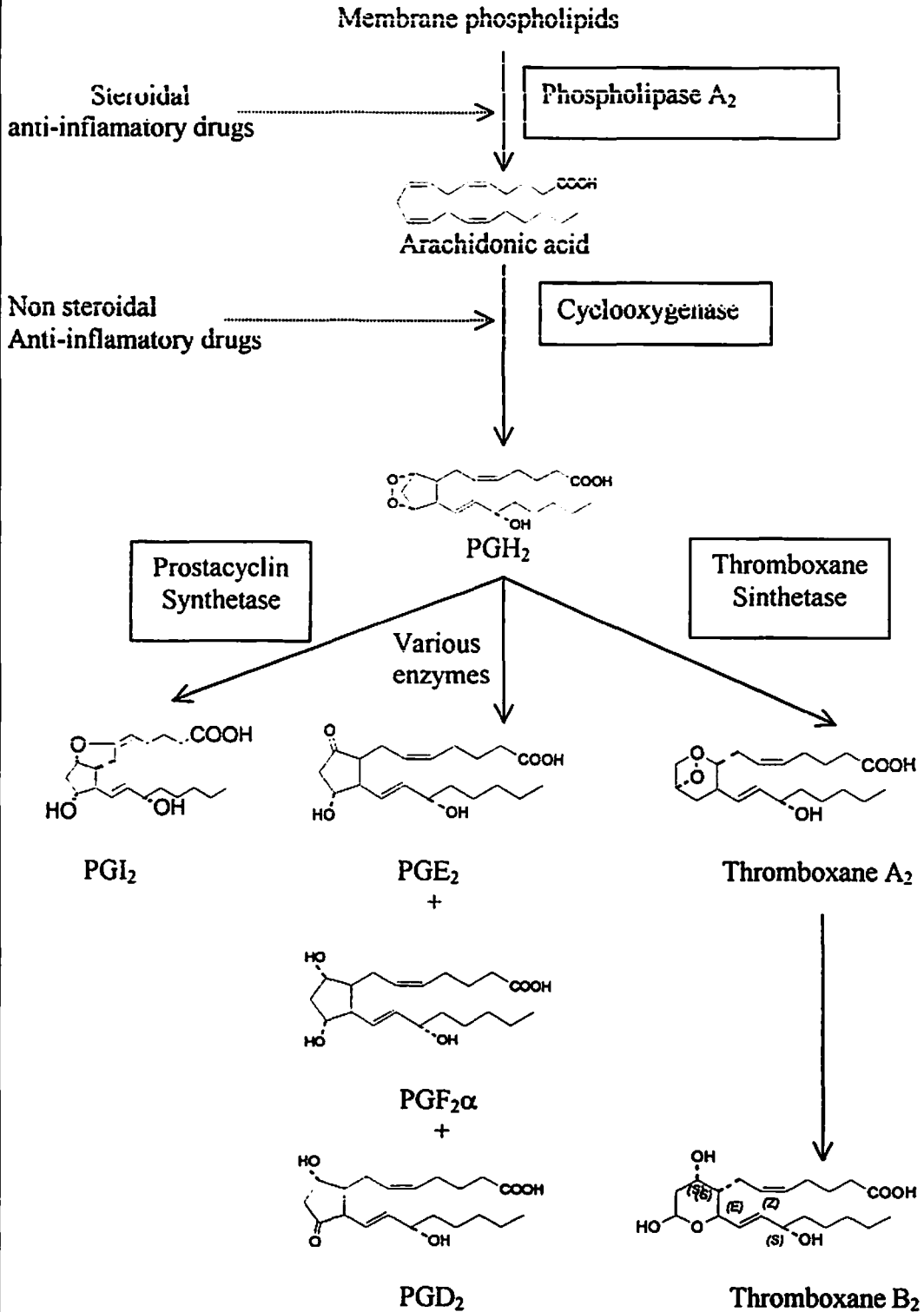
Semua obat golongan AINS mempunyai kemampuan menghambat sintesis prostaglandin dan enzim siklooksigenase. Siklooksigenase adalah tipe enzim oksigenase yang terdapat pada sebagian besar jaringan mamalia. Fungsi enzim ini adalah sebagai katalis untuk proses siklooksigenase, yaitu masuknya oksigen pada substrat sampai terbentuknya derivat siklooksigenase dan untuk melakukan fungsinya tersebut enzim ini membutuhkan haem.

Sayangnya, hambatan sintesis prostaglandin dalam mukosa lambung seringkali mengakibatkan kerusakan gastrointestinal. Efek samping yang lebih serius meliputi

perdarahan gastrointestinal dan perforasi (Neal, 1992). Setiap obat menghambat siklooksigenase dengan cara yang berbeda. Khusus parasetamol hambatan prostaglandin terjadi bila lingkungannya rendah kadar peroksid seperti di hipotalamus. Lokasi inflamasi biasanya mengandung banyak peroksid yang yang dihasilkan oleh leukosit. Ini menjelaskan mengapa efek antiinflamasi parasetamol tidak ada. Aspirin sendiri menghambat dengan mengasetilasi gugus aktif serin dari enzim ini. Trombosit sangat rentan terhadap penghambatan ini karena sel ini tidak mampu mengadakan regenerasi enzimnya sehingga dosis aspirin 40 mg sehari telah cukup untuk menghambat siklooksigenase trombosit manusia selama masa hidup trombosit yaitu 8-11 hari (Gan, 1999).

Fenomena inflamasi meliputi kerusakan mikrovaskuler, meningkatnya permeabilitas kapiler dan migrasi leukosit ke jaringan radang. Selama berlangsungnya fenomena inflamasi banyak mediator kimiawi yang dilepaskan secara lokal antara lain histamin, 5-hidroksitriptamin (5-HT), faktor kemotaktik, bradikinin, leukotrien dan prostaglandin. Obat mirip aspirin tidak berefek terhadap mediator-mediator kimiawi tersebut kecuali prostaglandin. Prostaglandin hanya berperan pada nyeri yang berkaitan dengan kerusakan jaringan atau inflamasi. Penelitian menunjukkan bahwa prostaglandin menyebabkan sensitisasi reseptor nyeri terhadap stimulasi mekanik dan kimiawi. Jadi prostaglandin menimbulkan keadaan hiperalgesia, kemudian mediator kimiawi seperti bradikinin dan histamin merangsangnya dan menimbulkan nyeri yang nyata. Obat mirip aspirin tidak mempengaruhi hiperalgesia atau nyeri yang ditimbulkan oleh efek langsung prostaglandin. Ini menunjukkan bahwa sintesis prostaglandin yang dihambat oleh golongan obat ini dan bukannya blokade langsung. Obat mirip aspirin menekan efek zat pirogen endogen dengan menghambat sintesis prostaglandin (Gan, 1999).

Selain enzim siklooksigenase terdapat tipe enzim oksigenase yang lain, yaitu lipooksigenase. Lipooksigenase adalah enzim tipe oksigenase yang terdapat pada tanaman maupun hewan. Enzim ini juga berfungsi memasukkan oksigen dan membutuhkan haem untuk fungsinya tersebut. Aspirin dan endometasin tidak menghambat aktivitas lipooksigenase, tetapi obat antiinflamasi golongan steroid dapat menghambat kedua enzim tersebut. (Halliwell & Guteridge, 1985).



Gambar 2.1 Biosintesis Prostaglandin.

2.5. Tinjauan Tentang Metode Pengujian Aktivitas Analgesik

Metode-metode pengujian aktivitas analgesik dilakukan dengan menilai kemampuan zat uji untuk menekan atau menghilangkan rasa nyeri yang diinduksi pada hewan coba (mencit, tikus, marmot), yang meliputi induksi secara mekanik, teknik, elektrik dan secara kimia. Pada umumnya daya kerja analgesik pada hewan dinilai dengan :

- (1) Mengukur besarnya peningkatan stimulus nyeri yang harus diberikan sampai ada respon nyeri
- (2) Jangka waktu ketahanan hewan terhadap stimulus nyeri
- (3) Peranan frekuensi respon nyeri.

2.5.1 Metode Stimulasi Panas

Penggunaan stimulasi rangsangan panas diberikan secara radiasi dengan intensitas tetap. Metode ini dikenal dengan *tail flick* dari D'amour-Smith. Sebagai sumber radiasi digunakan tegangan 6-8 volt yang dilengkapi satu refraktor untuk memfokuskan radiasi panas lampu melalui suatu lensa menuju ujung ekor tikus yang terletak 6 inci dibawah lampu.

Jenis uji yang lain yang mirip dengan prinsip diatas adalah metode yang digunakan oleh Bass dan Van Der brook dengan perbedaan yaitu lampu yang digunakan 100 watt, lama penyinaran direkam secara otomatis pada pencatat waktu. Metode ini lebih memudahkan pengamatan respon hewan dengan pemakaian stop watch dibandingkan dengan panas radiasi pada *tail flick* dari D'amour-Smith yang sangat melelahkan mata.

Stimulus panas dapat juga diberikan secara konduksi, dikenal sebagai metode *Hot Plate Test* dari Wolf dan Mc.Donald. Hewan percobaan (mencit) diamati waktu reaksinya setelah diletakkan diatas *Hot Plate*. Pada temperature dibawah 50° C mencit memberikan reaksi yang tidak teratur. Pada suhu 55° C waktu reaksinya 30 detik, dan pada suhu 60° C waktu reaksinya 20 detik. Reaksi atau respon yang ditunjukkan antara lain: menjilat kaki, mengangkat kaki, mencondang kaki atau meloncat keluar dari silinder. Mencit akan menunjukkan reaksi-reaksi tersebut jika dikenakan pada kondisi-kondisi yang tidak menyenangkan (Domer, 1971).

Keuntungan:

- (1) rangsangannya alami
- (2) mudah dikontrol
- (3) tidak menyebabkan kerusakan jaringan walaupun rangsangan untuk menimbulkan rasa sakit dilakukan berkali-kali
- (4) dapat digunakan pada subyek yang bergerak ataupun tidak bergerak (Lineberry, 1981).

2.5.2 Metode Stimulasi Listrik.

Stimulasi listrik dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain:

- (1) melalui jaringan listrik pada lantai
- (2) dengan elektrode yang ditempelkan pada kulit
- (3) dengan elektrode yang ditanam pada ganglia sensoris atau pada tempat susunan saraf pusat (Lineberry, 1981).

Pada metode ini digunakan binatang besar seperti kera *Macaca mulata*. Elektroda aliran listrik dipasang di *ganglion gaseri* atau telinga. Kemudian kera dilatih dengan memberi arus tertentu. Apabila kera merasa kesakitan dan dapat menyentuh level tertentu yang tersedia maka arus akan turun satu tingkat secara otomatis. Dengan demikian akan dapat diukur ambang rasa sakitnya. Kemudian setelah perlakuan, percobaan diulang kembali. Bila ambang rasa sakit meningkat setelah perlakuan, maka dapat disimpulkan bahwa obat tersebut memiliki efek analgetika. Metode ini memerlukan perlengkapan khusus yang rumit.

Metode yang lain adalah metode pulpa gigi, tetapi hal ini sulit dilakukan karena memerlukan ketrampilan yang tinggi (Domer, 1971).

Keuntungan:

- (1) dapat dikontrol dengan mudah dengan menggunakan stimulator arus listrik yang dipertahankan konstan walaupun terjadi fluktuasi daya tahan subyek
- (2) dapat digunakan dan diukur dengan mudah
- (3) dapat menghasilkan tingkatan-tingkatan sakit yang tinggi tanpa merusak jaringan
- (4) dapat diulang dengan interval yang sangat pendek

- (5) onsetnya cepat
- (6) dapat digunakan pada segala macam spesies (Lineberry, 1981).

2.5.3 Metode Stimulasi dengan Tekanan.

Tekanan diberikan pada ekor tikus menggunakan suatu alat syringe yang merupakan suatu rangkaian tertutup yang terdiri dari suatu minyak mineral yang dihubungkan melalui pipa T dengan syringe lain. Peningkatan besar tekanan akan menyebabkan tikus berontak berusaha melepaskan diri atau mencicit. Hasil percobaan ini akan bernilai kualitatif saja dan tidak dapat diulang-ulang karena ekor tikus menjadi cedera akibat penekanan sehingga mempengaruhi hasil percobaan selanjutnya (Domer, 1971).

Keuntungan:

- (1) rangsangannya alami
- (2) dapat digunakan dengan mudah tanpa peralatan mekanik atau elektronik yang mahal.

Kendala penggunaan metode ini antara lain:

- (1) meskipun stimulasi tekanan adalah stimulasi alami yang digunakan, kontrol dan ukuran parameter stimulus yang baik sulit dicapai tanpa peralatan mekanik dan elektronik yang mahal
- (2) metode ini hanya dapat digunakan jika hewan coba telah dibius karena akan terjadi kesulitan pada kontrol dan pengukuran jika digunakan pada hewan coba yang bergerak

2.5.4 Metode Stimulus Kimiawi.

Stimulasi kimiawi yang diterapkan pada hewan kecil berupa *Mus musculus* adalah berupa penyuntikan secara intraperitoneal bahan-bahan yang dapat menimbulkan respon karakteristik seperti menggeliat, meregang, atau kontraksi otot-otot abdomen. Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Siegmund *et al.*, menggunakan fenilkinon 0,02 % sebanyak 0,25 ml. Nickander *et al.*, berhasil menggunakan larutan asetat 0,6 % sebanyak

10 ml/kg BB yang diinjeksikan secara intraperitoneal. Koster *et al.*, menggunakan 16 mg/kg BB. Bahan kimia yang digunakan sebagai bahan penginduksi nyeri yang lain yaitu bradikinin, larutan KCl 2 % dan histamin (Turner, 1965).

Pemilihan metode pengujian aktivitas analgesik tidak hanya pengukuran intensitas, tetapi juga lama kerja obat untuk menghindari kerusakan permanen suatu jaringan akibat observasi berulang. Metode uji aktivitas yang memberikan hubungan bertingkat antara intensitas rangsangan nyeri dan dosis analgetika yang dibutuhkan untuk menahan rangsangan rasa nyeri. Cara ini lebih disukai karena dapat diperoleh perkiraan kuantitas aktivitas analgetika.

Sebagai catatan efektivitas analgetika tidak dapat dinilai dengan menggunakan obyek sehat. Eksperimen menggunakan obyek sehat berguna untuk penilaian ada tidaknya efek serta potensi analgetika suatu bahan. Sedangkan pengukuran pada subyek sakit berguna untuk menentukan efektivitas bahan pada keadaan yang paling sesuai untuk keadaan klinis (Turner, 1965).

Pada metode ini aktivitas analgesik ditentukan dengan mengamati frekuensi konstiksi abdominal (geliat) pada kelompok hewan yang diberi senyawa uji dibandingkan dengan frekuensi konstiksi abdominal pada kelompok yang tidak diberi senyawa uji (kontrol). Frekuensi konstiksi yang terjadi selama periode waktu tertentu menunjukkan derajat nyeri yang dirasakan hewan coba. Penurunan frekuensi konstiksi abdominal karena adanya senyawa analgesik menggambarkan kemampuan senyawa meningkatkan "ambang nyeri" (Diyah *et al*, 2002).

2.6. Penentuan ED₅₀ Dengan Analisis Regresi

Variasi biologis dalam aktivitas obat merupakan alasan penting mengapa pengobatan harus individualistik dan perlu diatur sesuai kebutuhan individu pasien. Hal ini juga menjelaskan bahwa tidak ada generalisasi tentang keefektifan dan keamanan obat yang dapat disimpulkan atas dasar uji coba klinik dengan sejumlah sampel yang kecil.

ED₅₀ adalah dosis yang menimbulkan efek hambatan 50 % berdasarkan kurva hubungan antara dosis dengan % hambatan / aktivitas. Dosis yang digunakan pada umumnya merupakan kelipatan dua (misal 50, 100, 200 mg / Kg BB dst). Nilai ED₅₀

berbeda-beda untuk setiap cara pemberian. Bila respon adalah kematian maka ED_{50} menjadi LD_{50} (Median Letal Dose) atau dosis kematian untuk 50 % hewan coba.

Nilai ED_{50} dan LD_{50} dapat dihitung dengan menggunakan metode grafik. Kurva hubungan dosis dengan respon biologis pada umumnya memberikan gambaran yang sigmoid, sehingga agar menjadi garis lurus perlu dilakukan analisis regresi dengan menjadikan nilai x logaritmik / probit. Litchfied dan fertig (1941) telah memperkenalkan cara grafik untuk menggambarkan kurva-dosis efek yang kemudian disederhanakan dan digunakan oleh Miller dan Trainler (1944) untuk menghitung perkiraan nilai ED_{50} atau LD_{50} dengan menggunakan kertas grafik log probit. Efek transformasi grafik adalah meregangkan akhir kurva sigmoid yang diperoleh dengan memplot respon terhadap logaritma dosis sehingga menjadi garis lurus. Untuk menghitung ED_{50} dapat digunakan komputer program SPSS (Lien, 1978).

BAB III

BAHAN, ALAT, DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan-bahan Penelitian

3.1.1. Bahan Kimia

- (1) Asam asetat glasial p.a (Merck)
- (2) Metanol p.a (Merck)
- (3) Air suling

3.1.2. Bahan Tumbuhan

3.1.2.1. Pengumpulan sampel

Pengumpulan sampel dilakukan di Taman Purwadadi Batu Malang, pada bulan April 2004.

3.1.2.2. Identifikasi sampel

Identifikasi sampel dilakukan berdasarkan buku *Flora of Java*, karangan C.A. Backer, Vol II (1965) dan *The Standard Cyclopedia of Horticulture*, karangan L.H.Bailey, julid III (1953).

3.2 Alat-alat

- (1) Neraca analitik (Sartorius 2472)
- (2) Alat gelas
- (3) Jarum suntik dan spuit
- (4) Alat pengukur waktu

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Metode ekstraksi :

Batang *Aglaia odorata* dibersihkan, dipotong kecil-kecil, dikeringkan kemudian dipisahkan antara bagian kulit batang dengan kayu. Setelah kulit batang kering, dibuat serbuk dan ditimbang. Kemudian dilakukan ekstraksi pada temperatur kamar, menggunakan pelarut metanol. Ekstraksi dihentikan bila telah didapat ekstrak sejumlah

6x berat serbuk. Ekstrak metanol yang didapat diuapkan sampai hampir kering menggunakan evaporator dan diuapkan sampai kering pada temperatur kamar di dalam lemari asam. Ekstrak kering disimpan di lemari eksikator. (Janaki, 1999).

3.3.2. Pemeriksaan Organoleptis

Setelah diperoleh ekstrak kering, dilakukan pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, rasa, warna dan bau.

3.3.3. Pemeriksaan kualitatif

Pemeriksaan kualitatif meliputi :

a. reaksi warna :

- Liebermann-Burchard, Wagner, Dragendorf

b. KLT

Fase diam = Silika Gel GF₂₅₄

Fase gerak = petroleum eter : etil asetat (1:1), *n*-heksana : etil asetat (4:2); *n*-heksana : kloroform : etil asetat (5:4:1)

Penampak noda = pereaksi Stahl, Liebermann-Burchard, Wagner, dan Dragendorf .

3.4. Uji Aktivitas

3.4.1. Hewan Coba :

Digunakan mencit putih *Mus musculus* strain BALB C jantan dewasa dengan berat badan 20-30 gram, umur 2-3 bulan, sehat tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuhnya. Mencit dibagi dalam 6 kelompok (5 kelompok dosis, 1 kelompok kontrol) dan masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor untuk satu macam dosis. Sebelum diberi perlakuan terhadap mencit dilakukan adaptasi dengan lingkungannya selama 1 minggu dan diberi pakan standar, minum *ad libitum*.

3.4.2. Pembuatan larutan asam asetat 0,6%

Sejumlah 0,6 ml asam asetat glasial diencerkan dengan air suling steril hingga diperoleh volume 100 ml.

3.4.3. Pembuatan sediaan uji

Sediaan uji yang dibuat meliputi larutan ekstrak kulit batang *Aglaiia odorata* dalam air. Larutan senyawa uji dibuat segera sebelum uji aktivitas dilakukan dan tidak dapat disimpan untuk digunakan diwaktu yang lain.

a. Perhitungan dosis untuk mencit 30 g :

- dosis 1000 mg/kg bb

30 g mencit memperoleh ekstrak : $1000/1000 \times 30 \text{ g} = 30 \text{ mg}$

- dosis 2000 mg/kg bb

30 g mencit memperoleh ekstrak : $2000/1000 \times 30 \text{ g} = 60 \text{ mg}$

- dosis 4000 mg/kg bb

30 g mencit memperoleh ekstrak : $4000/1000 \times 30 \text{ g} = 120 \text{ mg}$

- dosis 8000 mg/kg bb

30 g mencit memperoleh ekstrak : $8000/1000 \times 30 \text{ g} = 240 \text{ mg}$

- dosis 10000 mg/kg bb

30 g mencit memperoleh ekstrak : $10000/1000 \times 30 \text{ g} = 300 \text{ mg}$

Dosis tersebut diberikan dalam 1 ml sediaan

b. Untuk membuat sediaan 25 ml, ekstrak yang diperlukan untuk masing-masing dosis :

- dosis 1000 mg/kg bb, diperlukan ekstrak sebanyak

$$30/1 \times 25 = 750 \text{ mg}$$

- dosis 2000 mg/kg bb, diperlukan ekstrak sebanyak

$$60/1 \times 25 = 1500 \text{ mg}$$

- dosis 4000 mg/kg bb, diperlukan ekstrak sebanyak

$$120/1 \times 25 = 3000 \text{ mg}$$

- dosis 8000 mg/kg bb, diperlukan ekstrak sebanyak

$$240/1 \times 25 = 6000 \text{ mg}$$

- dosis 10000 mg/kg bb, diperlukan ekstrak sebanyak

$$300/1 \times 25 = 7500 \text{ mg}$$

c. Pembuatan sediaan uji ekstrak kulit batang *Aglaia odorata* :

dosis 1000 mg/kg bb : ditimbang ekstrak sebanyak 750 mg ditambah aqua sampai 25 ml, dikocok sampai homogen.

dosis 2000 mg/kg bb : ditimbang ekstrak sebanyak 1500 mg ditambah aqua sampai 25 ml, dikocok sampai homogen.

dosis 4000 mg/kg bb : ditimbang ekstrak sebanyak 3000 mg ditambah aqua sampai 25 ml, dikocok sampai homogen.

dosis 8000 mg/kg bb : ditimbang ekstrak sebanyak 6000 mg ditambah aqua sampai 25 ml, dikocok sampai homogen.

dosis 10000 mg/kg bb : ditimbang ekstrak sebanyak 7500 mg ditambah aqua sampai 25 ml, dikocok sampai homogen.

3.4.1 Persiapan hewan coba

- (1) Mencit dipuaskan semalam, tetapi tetap diberi minum *ad libitum*.
- (2) Mencit dibagi dalam beberapa kelompok, yaitu 5 kelompok dosis (1000, 2000, 4000, 8000, 10000 mg/kg bb) dan 1 kelompok kontrol, masing-masing terdiri dari 10 ekor.
- (3) Mencit ditimbang untuk menentukan jumlah sediaan yang akan diberikan

3.4.2. Pelaksanaan uji aktivitas

- (1) Mencit pada tiap kelompok dosis diberi larutan sediaan uji sesuai bobot badan dan kelompok kontrol hanya diberi aquades secara oral
- (2) 30 menit setelah pemberian obat atau plasebo secara oral, mencit disuntik dengan larutan asam asetat 0,6% sebanyak 10 ml/kg bb secara intraperitoneal. 5 menit setelah penyuntikan dengan larutan asam asetat (induksi nyeri) mulai diamati respon nyeri selama 30 menit. Respon yang diamati adalah frekuensi nyeri kelompok dosis dan kelompok kontrol
- (3) Aktivitas hambatan nyeri senyawa uji dapat dihitung dengan menggunakan rumus : (Turner, 1965)

$$\% \text{ hambatan} = 100 - \left\{ \frac{(\sum \text{Respon nyeri kelompok uji})}{(\sum \text{Respon nyeri kelompok kontrol})} \times 100 \right\}$$

3.4.3. Penentuan ED_{50}

Aktivitas analgesik dinyatakan dalam ED_{50} hambatan nyeri. ED_{50} hambatan nyeri adalah dosis efektif yang menghasilkan respon nyeri pada 50% hewan coba dalam kelompok. ED_{50} dihitung dengan bantuan analisis regresi antara dosis dan % hambatan nyeri.

3.4.4. Penentuan LD_{50}

Untuk mengetahui efek toksis ekstrak uji dilakukan penentuan jumlah kematian hewan coba setelah pemberian ekstrak uji dan dilakukan pengamatan selama 24 jam. Untuk menentukan harga LD_{50} , maka hewan coba dibagi menjadi 6 kelompok (5 kelompok dosis dan 1 kelompok kontrol) dan diberikan ekstrak uji secara per oral. Dosis yang menyebabkan kematian 50% hewan coba itulah yang disebut LD_{50} .

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. IDENTIFIKASI SENYAWA SECARA KUALITATIF

4.1.1. Identifikasi tumbuhan

Kulit batang tumbuhan diambil dari daerah Purwadadi, Malang dan dilakukan identifikasi yang hasilnya sebagai berikut .

Tumbuhan berupa perdu, tinggi 2-5 m. Batangnya berkayu, bulat, kasar, bercabang, putih kotor. Daunnya majemuk, menyirip gasal, anak daun tiga sampai lima, bulat telur, ujung runcing, tepi rata, pangkal tumpul, pertulangan menyirip, tangkai panjang \pm 3 mm, hijau. Nama daerah/umum : pacar cina.

4.1.2. Hasil ekstraksi

Dari serbuk kulit batang kering (500 g) yang diekstraksi dengan metanol pada temperatur kamar didapat ekstrak metanol sebanyak 3 liter. Setelah dikeringkan diperoleh 43,2 g ekstrak kering, yang selanjutnya dilakukan pengujian kimia dengan reaksi sederhana untuk mengidentifikasi kandungan kimia ekstrak.

4.1.3. Identifikasi Ekstrak Kulit Batang *Aglaiia odorata*

4.1.3.1. Pemeriksaan Organoleptis

Bentuk : serbuk, higroskopis

Warna : hijau

Bau : Tidak berbau

Rasa : Pahit

4.1.3.2. Pemeriksaan dengan reaksi kimia

Sebagai langkah awal dalam penelitian ini dilakukan uji kualitatif yang meliputi pengamatan organoleptis, reaksi kimia dan uji KLT. Langkah ini dilakukan untuk mengetahui identitas ekstrak tersebut sehingga dapat digunakan sebagai bahan penelitian lebih lanjut. Pemeriksaan larutan ekstrak dilakukan dengan reaksi Liebermann-Burchard,

Dragendorf dan Wagner, uji buih. Hasil pemeriksaan tersebut dapat dilihat pada Tabel IV.1.

Tabel IV.1 Hasil Pemeriksaan Ekstrak dengan reaksi kimia

Nomor	Reaksi kimia	Hasil
1	Lieberman Burchard	Ungu
2	Pengocokan	Berbusa
3	Dragendorf	Coklat
4.	Wagner	Coklat

Dari tabel IV.1. terlihat bahwa identifikasi dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang dilakukan dengan cara menambahkan pereaksi ke dalam larutan ekstrak, menunjukkan terbentuknya endapan ungu muda bercampur coklat. Selain itu juga dilakukan KLT dengan fase diam silika GF₂₅₄, fase gerak petroleum eter : etil asetat (1:1) dan heksana : etil asetat (4:2) dan heksana : kloroform : etil asetat (5:4:1), penampak noda pereaksi Stahl, Liebermann-Burchard, Wagner dan Dragendorf. Hasil uji KLT menunjukkan adanya noda berbeda warna seperti terlihat pada Tabel IV.2-4.

Tabel IV.2. Hasil Uji KLT 1

Nomor	Fase Gerak	Jumlah noda	Rf	Warna noda
1	petroleum eter : etil asetat (1:1)	1	0,5	Hijau
2	heksana : etil asetat (4:2)	3	0,5 0,7 0,8	Coklat ungu hijau
3	heksana : kloroform : etil asetat (4:1:2)	3	0,7 0,8 0,9	Coklat Ungu hijau

Fase Diam : Silika Gel GF₂₅₄ Merck

Penampak noda : pereaksi Stahl dan lampu UV 254 nm

Tabel IV.3. Hasil Uji KLT 2

Nomor	Fase Gerak	Jumlah noda	Rf	Warna noda
1	petroleum eter : etil asetat (1:1)	1	0,5	Hijau
2	heksana : etil asetat (4:2)	3	0,5 0,7 0,8	Coklat ungu hijau
3	heksana : kloroform : etil asetat (4:1:2)	3	0,7 0,8 0,9	Coklat Ungu hijau

Fase Diam : Silika Gel GF₂₅₄ Merck

Penampak noda : pereaksi Liebermann-Burchard

Tabel IV.4. Hasil Uji KLT 3

Nomor	Fase Gerak	Jumlah noda	Rf	Warna noda
1	petroleum eter : etil asetat (1:1)	1	0,7	Hijau
2	heksana : etil asetat (4:2)	1	0,5	Coklat
3	heksana : kloroform : etil asetat (4:1:2)	1	0,9	hijau

Fase Diam : Silika Gel GF₂₅₄ Merck

Penampak noda : pereaksi Wagner dan lampu UV 254 nm

Adanya cincin ungu pada tabung reaksi yang berisi larutan ekstrak setelah diberi asam sulfat pekat dan hasil KLT pada Tabel IV.2-4 setelah ditambah penampak noda Liebermann-Burchard, mengindikasikan bahwa pada ekstrak tersebut terdapat senyawa golongan triterpen tetrasiklik atau pentasiklik yang strukturnya menyerupai steroid. Senyawa golongan triterpen merupakan senyawa yang kereaktifannya rendah, tetapi pereaksi Liebermann-Burchard merupakan reaksi yang cukup untuk mendeteksi adanya triterpen terutama golongan tetrasiklik atau pentasiklik pada suatu ekstrak. Selain itu terdapat beberapa noda lain yang belum teridentifikasi. Dari Tabel IV.1. terlihat bahwa

dengan pereaksi Dragendorf dan Wagner, terbentuk endapan coklat yang mengindikasikan adanya senyawa golongan alkaloid.

Di dalam tumbuhan selain sebagai senyawa bebas, triterpen dapat pula terdapat sebagai saponin. Saponin ini terdeteksi dengan terbentuknya buih pada pengocokan pada ekstrak tersebut. Saponin dari saponin kebanyakan berupa senyawa triterpen pentasiklik yang mengikat unit gula melalui atom C nomer tiga. Adanya gula ini dapat dilihat dari ekstrak yang bersifat higroskopis. Seperti pada daun tanaman *Aglaia odorata* ini, pada kulit batang tanaman ini diduga juga terdapat senyawa golongan triterpen yaitu roxburghiadiol A dan B yang telah terbukti mempunyai efek penurunan degranulasi mast cell (Janaki *et al*, 1999). Dugaan adanya triterpen pada ekstrak semakin memperkuat dugaan adanya aktivitas analgesik-antiinflamasi pada ekstrak tersebut.

4.2 UJI AKTIVITAS ANALGESIK

Pada penelitian ini, uji aktivitas analgesik dilakukan dengan cara penghambatan nyeri akibat induksi kimia. Sebagai induktor nyeri digunakan asam asetat yang diberikan pada mencit secara intraperitoneal. Metode ini digunakan untuk uji aktivitas analgesik senyawa anti inflamasi non steroid (AINS) karena nyeri yang timbul akibat induksi oleh asam asetat dianggap berhubungan dengan pelepasan prostaglandin, salah satu mediator dalam peristiwa inflamasi. Disamping itu, metode ini dipilih karena relatif sederhana dan mudah pelaksanaan serta pengamatannya. Mencit dipuaskan semalam, tetapi tetap diberi minum *ad libitum* kemudian mencit dibagi dalam beberapa kelompok, yaitu 5 kelompok dosis (1000, 2000, 4000, 8000, 10000 mg/kg bb) dan 1 kelompok kontrol, masing-masing terdiri dari 10 ekor. Aktivitas obat analgetika ditentukan dengan cara menilai kemampuannya dalam menekan atau menghilangkan rasa nyeri yang diinduksi secara kimia, yaitu dengan cara mengamati respon nyeri (frekuensi kontriksi abdominal) yang ditunjukkan oleh mencit selama 30 menit setelah dilakukan stimulasi kimia, kemudian dihitung prosentase hambatannya.

4.2.1 Penentuan Aktivitas Penghambatan Nyeri

Hasil pengamatan frekuensi kontriksi abdominal yang terjadi akibat induksi larutan asam asetat untuk tiap kelompok dosis (1000, 2000, 4000, 8000 dan 10000

mg/kg bb) dan tanpa ekstrak uji (kelompok kontrol) dapat dilihat pada Tabel IV.5. Mencit ditimbang untuk menentukan jumlah sediaan yang akan diberikan. Aktivitas obat analgesik dilakukan dengan menilai kemampuannya dalam menekan atau menghilangkan nyeri akibat induksi secara kimia (Lineberry, 1981). Aktivitas hambatan nyeri ditentukan dengan cara mengamati penurunan frekuensi konstiksi abdominal dengan adanya pemberian senyawa analgesik dibandingkan dengan frekuensi konstiksi abdominal tanpa adanya senyawa tersebut. Pengamatan dilakukan selama 30 menit setelah selang lima menit dari induksi kimiawi. Obat diberikan beberapa saat sebelum induksi nyeri dengan harapan pada saat diuji senyawa sudah terabsorpsi dan bekerja pada tempat kerjanya.

Tabel IV.5. Frekuensi konstiksi abdominal pada kelompok dosis ekstrak uji dan kelompok kontrol.

No.	Frekuensi konstiksi abdominal pada tiap kelompok dosis					
	1000 mg/kg	2000 mg/kg	4000 mg/kg	8000 mg/kg	10000 mg/kg	kontrol
1.	50	40	33	18	8	75
2.	48	44	34	24	8	72
3.	50	49	44	21	8	68
4.	52	45	25	23	18	72
5.	53	43	30	19	18	64
6.	49	43	32	17	15	84
7.	53	40	28	23	13	72
8.	48	43	28	25	14	61
9.	50	48	30	25	16	77
10.	46	42	27	21	17	65
Rata-rata	49.9±2.28	43.7±2.98	30.0±2.98	21.6±2.88	13.5±4.12	71.0±6.82

Dari Tabel IV.5 terlihat adanya penurunan frekuensi konstiksi abdominal pada kelompok dosis ekstrak uji dan kelompok kontrol. Untuk mengetahui adanya perbedaan frekuensi konstiksi abdominal yang signifikan antar kelompok dosis (Lampiran 2), data tersebut dianalisis dengan ANOVA. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan frekuensi konstiksi abdominal yang signifikan ($P < 0.05$). Selanjutnya dapat dilakukan perhitungan % hambatan nyeri.

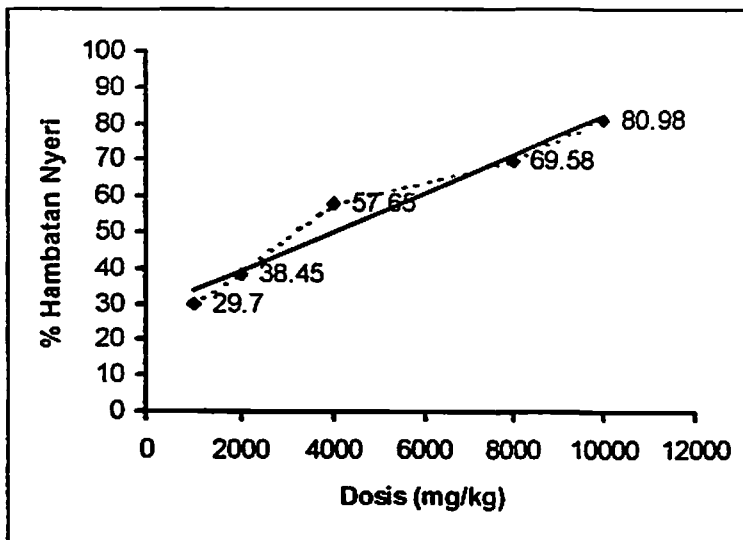
4.2.2 Perhitungan Prosentase Hambatan Nyeri

Hasil perhitungan prosentase hambatan nyeri dapat masing-masing kelompok senyawa uji yang dapat dilihat pada Tabel IV.6.

Tabel IV.6. Hasil perhitungan prosentase hambatan nyeri pada kelompok yang diberi ekstrak uji.

Dosis (mg/kg bb)	Rata-rata respon nyeri	% hambatan nyeri
1000	49.90 ± 2.28	29.70
2000	43.70 ± 2.98	38.45
4000	30.70 ± 2.98	57.65
8000	21.60 ± 2.88	69.58
10000	13.50 ± 4.12	80.98
Kontrol	71.00 ± 6.82	

Berdasarkan data tersebut di atas dapat dibuat kurva hubungan antara Dosis dengan % hambatan nyeri, yang dapat dilihat pada gambar IV.3.



Gambar IV.3. Kurva hubungan Dosis vs. % Hambatan Nyeri

Dari Gambar IV.3. tersebut di atas, kemudian ED_{50} aktivitas analgesik ekstrak dihitung berdasarkan persamaan regresi antara Dosis vs. % Hambatan Nyeri, dan diperoleh persamaan regresi : $Y = 5.362.10^{-3}X + 28.480$. Dari persamaan tersebut dapat dihitung nilai ED_{50} ekstrak tersebut, yaitu = 4013 mg/kg bb.

Mengingat dosis ekstrak yang diberikan cukup besar dan dari pengamatan tampak bahwa semakin besar dosis, mencit terlihat seperti mengantuk dan ototnya lemas, maka perlu diketahui harga LD_{50} nya melalui uji toksisitas akut (kematian) hewan coba. Pada uji toksisitas akut digunakan 5 dosis yaitu 2500, 4000, 5000, 7500 dan 10000 mg/kg. Hasilnya uji toksisitas akut dapat dilihat pada Tabel IV.7.

Tabel IV.7. Hasil uji toksisitas Ekstrak kulit batang *Aglaiia odorata*

Dosis (mg/kg bb)	Jumlah mencit	Mati
2500	10	0
4000	10	1
5000	10	5
7500	10	7
10000	10	10

Dari data pada tabel IV.7 dilakukan Analisis Probit, dan diperoleh harga $LD_{50} = 5917.10$ mg/kg bb (lampiran 4).

Dari penelitian yang dilakukan dengan metode *writhing test*, diketahui bahwa ekstrak kulit batang *Aglaiia odorata* mempunyai aktivitas analgesik-antiinflamasi. Untuk mengetahui apakah golongan senyawa triterpen atau golongan senyawa lain yang mempunyai aktivitas sebagai analgetika-antiinflamasi, perlu dilakukan isolasi bahan-bahan yang diduga memberikan andil pada aktivitas tersebut. Selain itu menarik juga untuk mengetahui mekanisme aktivitas analgetika-antiinflamasi, melalui hambatan enzim siklooksigenase atau lipooksigenase.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

- (1) Berdasarkan metode *writhing test*, ekstrak kulit batang *Aglaia odorata* mempunyai aktivitas analgesik-antiinflamasi
- (2) ED₅₀ ekstrak kulit batang *Aglaia odorata* sebesar 4013 mg/kg , sedangkan toksisitas ekstrak yang dinyatakan dengan LD₅₀ sebesar 5917 mg/ kg.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disarankan :

- (1) Untuk mengetahui apakah golongan senyawa triterpen yang mempunyai aktivitas sebagai analgetika-antiinflamasi, perlu dilakukan isolasi bahan-bahan yang diduga memberikan andil pada aktivitas tersebut.
- (2) Perlu diketahui juga mekanisme aktivitas analgetika-antiinflamasi, melalui hambatan enzim siklooksigenase atau lipooksigenase.

DAFTAR PUSTAKA

- Chaidir, Hiort J, Nugroho B, Wray W, Wittle L, Hung, Kiet LC, Sumaryono E, Porksh P. 1999. *New Insecticidal rocaglamide derivatives from flowers of A. duppereana* (Meliaceae). **Phytochemistry** 52 : 837-842.
- Diyah, N.W., Purwanto, B.T., Susilowati, R., 2002. Uji Aktivitas Analgesik Senyawa Asam (4-Butilbenzoil)salisilat Hasil Sintesis Pada Mencit, **Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.**
- Domer, F.R., 1971. **Animal Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment**, th 2003-2004, p.130
- Domer, FR. 1971. **Animal Experimental in Pharmacological analysis.** Charles Thomas Publisher. USA. Hal. 275 – 317.
- Fuzzati N, Dyatmiko W, Rahman A, Fuad A., Hostettmann. 1996. *Triterpenoid, Lignan and Benzofuran Derivative From the Bark of Aglaia Elaeagnoidea.* **Phytochemistry** 42 (5) : 1395-1398
- Gan, S., 1999. **Farmakologi dan Terapi**, Edisi keempat, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Inadonesia, Jakarta.
- Gringauz, A., 1997. **Introduction to Medicinal Chemistry How Drugs Act and Why.** Willey-VCH, p. 141-167.
- Halliwell B & Gutteridge J, MC.1985. **Free radical in Biology and medicine.** Oxford University Press. New York : 268-271, 273-276.
- Inod A, Hishini H, Kuchide M, Takayasu J, Mukainaka T, Nobukuni Y, Okuda M, Tokuda H. 2001. *Cancer chemopreventive activity of odorine and odorinol from Aglaia odorata.* **Biol. Pharm. Bull.**24 (11) : 1282-5.
- Janprasert J, Satasook C, Sukumalanand P *et al.*1993. *Rocaglamide : a natural benzofuran insecticide from Aglaia odorata.* **Phytochemistry.** 32 (1) : 67-9.
- Janaki S, Vijayasekaran V. Viswanathan S, Balakrishna K. 1999. *Anti-inflammatory activity of Aglaia roxburghiana var. beddomei extract and triterpenes roxburghiadiol A and B.* **J. Ethnopharm** 67 : 45-51.

- Kresnamurti A, 2002. Khasiat Analgetika Ekstrak Daun Psidium Guajava L Pada Mencit Dengan Metode Writhing Test, **Jurnal obat Bahan Alam**, Vol. 1, No.1, p. 26-30.
- Khalit M. Martin Marie-Therese, Najdar H., Gaspard C, Sevenet T, Khalijah. 1997. *Argenteanones C-E and Argenteanols B-E, Cytotoxic Cycloartanes from Aglaia argentea* **Bark.J. Nat.Prod.** 60 : 868-872
- Lien, E.J., 1978. **SAR : Side Effect and Drug Design**, Marcel Dekker Inc., Newyork, p. 451-452.
- Linneberry, C.G., 1981. **Laboratory Animal in Pain Research**, Academic Press, Inc., U.S.A., p. 243-248.
- Mohamad K, Martin M-T, Leroy E, Tempete C, Sevenet T, Awang K, Pais M. 1997. *Argentea C-E and Argenteanols B-E, Cytotoxic Cycloartanes from Aglaia argentea*. **J. Nat. Prod.**60 : 81-5.
- Molleyres Louis-Pierre, Winkler T,1999. *Insecticidal Natural Products : New Metabolites from Aglaia roxburghiana* ([http:// www .chemsoc.org /chempest /html/3A-0006.html](http://www.chemsoc.org/chempest/html/3A-0006.html)) diakses tgl 6 Agustus 2004
- Nugroho B.W., Edrada R.A, Wray V., Witte L., Bringmann G., Gehling M and Proksch P. 1999. New insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae). **Phytochemistry** .51.p.367-376
- Ohse T, Ohba S, Yamamoto T, Koyano T and Umezawa K. 1996. Cyclopentabenzofuran Lignan Protein Synthesis Inhibitors from *Aglaia odorata*. **J. Nat. Prod.** 59. p. 650-652.
- Setiawati L, 1998. Studi Hubungan Kuantitatif Sifat Kimia Fisika (Lipofilik, Elektronik, Sterik) dengan Analgetika dari Turunan Asam Salisilat Pada Mencit, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Siswandono, Soekardjo B, 1995. **Kimia Medisinal**, Airlangga University Press, Surabaya, p. 531-541
- Safayhi H and Sailer E-R. 1997. Anti-inflammatory Actions of Penta cyclic Triterpenes. **Planta Medica.**63 . p. 487-493
- Tjay TH, Rahardja K, 1978. **Obat – obat Penting**, edisi ketiga, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, Hal. 200-203.

- Turner, RA. 1965. **Screening Method in Pharmacology**. Vol. I. Academic press. New York. p. 100 – 117.
- Xu Yuan-Jian, Wu Xiao-Hua, Ta BKH, Lai Yee-Hing, Vittal J.J., Imiyabir Z, Madani L, Khozirah, Goh SH. 2000. *Flavonol-Cinnamate cycloadduct & diamide Derivatives from Aglaia laxifloxa*. **J. Nat. Prod.** 63 : 473 : 6.



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
 PUSAT KONSERVASI TUMBUHAN KEBUN RAYA BOGOR
 UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN KEBUN RAYA PURWODADI
 PASURUAN - JAWA TIMUR

POS NO. 104 LAWANG 65201

TELP. /FAX. (0341) 426046

E-MAIL : kriplip@malang.wasantara.net.id

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. /IPH.UPT.03/HM/2004

329e

Kepala Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh :

Dra. JUNI EKOWATI, MSi

Mahasiswa Fakultas Farmasi Unair Surabaya di Surabaya, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 7 April 2004 berdasarkan buku *Flora of Java*, karangan C.A. Backer, Vol II, (1965), hal 128, nama ilmiahnya adalah :

Marga : *Aglaia*
 Jenis : *Aglaia odorata* Lour.

Adapun menurut buku *The Standard Cyclopedia of Horticulture* karangan L.H. Bailey jilid III (1953) halaman 3, klasifikasinya adalah sebagai berikut :

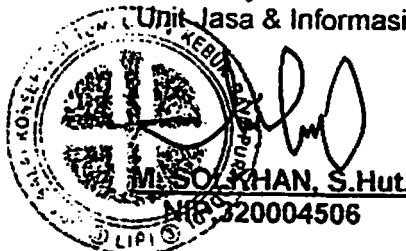
Divisio : Spermatophyta
 Sub Divisio : Angiospermae
 Kelas : Dicotyledoneae
 Ordo / Bangsa : Geraniales
 Family / Suku : Meliaceae

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 08 Mei 2004

An. Kepala
 UPT Balai Konservasi Tumbuhan
 Kebun Raya Purwodadi
 Unit Jasa & Informasi

31



Lampiran 2

Perhitungan Anova Antar Dosis Ekstrak *Aglaia odorata*

Oneway

ANOVA antar dosis

FREKUENS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21958.283	5	4391.657	278.377	.000
Within Groups	851.900	54	15.776		
Total	22810.183	59			

Report

FREKUENS

MG	Mean	N	Std. Deviation
1	71.00	10	6.82
2	49.90	10	2.28
3	43.70	10	2.98
4	30.00	10	2.98
5	21.60	10	2.88
6	13.50	10	4.12
Total	38.28	60	19.66

Lampiran 3

Hasil Perhitungan ED₅₀ Ekstrak

Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	DOSIS ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: HAMBATAN

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.977 ^a	.954	.939	5.2722

a. Predictors: (Constant), DOSIS

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1725.277	1	1725.277	62.069	.004 ^a
	Residual	83.388	3	27.796		
	Total	1808.665	4			

a. Predictors: (Constant), DOSIS

b. Dependent Variable: HAMBATAN

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	28.480	4.140		6.879	.006
	DOSIS	5.362E-03	.001	.977	7.878	.004

a. Dependent Variable: HAMBATAN

Hasil Perhitungan LD₅₀ Ekstrak

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 15 iterations.
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.00054	.00013	4.20880
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-3.19839	.74903	-4.27006

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 3.041 DF = 3 P = .385

Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
2500.00	10.0	.0	.324	-.324	.03237
4000.00	10.0	1.0	1.500	-.500	.15004
5000.00	10.0	5.0	3.100	1.900	.31005
7500.00	10.0	7.0	8.039	-1.039	.80389
10000.00	10.0	10.0	9.863	.137	.98634

Lanjutan Hasil Perhitungan LD₅₀ Ekstrak

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	1613.29687	-1996.62847	3053.12612
.02	2117.61139	-1078.88245	3423.32200
.03	2437.58279	-500.33807	3661.93545
.04	2678.28480	-67.58832	3843.90171
.05	2874.07733	282.52570	3993.81175
.06	3040.72751	578.95535	4122.98110
.07	3186.84713	837.49762	4237.60590
.08	3317.67982	1067.76136	4341.46875
.09	3436.66691	1276.04573	4437.05916
.10	3546.19472	1466.71322	4526.10891
.15	3999.66914	2242.80230	4908.12388
.20	4360.07623	2839.23611	5232.11447
.25	4669.27343	3330.90002	5530.09274
.30	4946.94206	3752.07529	5818.04055
.35	5204.24344	4121.59988	6105.62417
.40	5448.39728	4451.38820	6399.36728
.45	5684.61894	4750.02942	6703.99995
.50	5917.09540	5024.47852	7023.26005
.55	6149.57186	5280.87511	7360.57266
.60	6385.79353	5524.96906	7719.75259
.65	6629.94737	5762.43764	8105.81545
.70	6887.24874	5999.29476	8526.06654
.75	7164.91738	6242.60238	8991.88200
.80	7474.11457	6501.89260	9522.23395
.85	7834.52166	6792.48736	10152.06359
.90	8287.99608	7145.28728	10957.36774
.91	8397.52390	7228.85375	11153.51850
.92	8516.51099	7319.03639	11367.21063
.93	8647.34368	7417.53904	11602.83458
.94	8793.46329	7526.81430	11866.72639
.95	8960.11348	7650.59301	12168.54669
.96	9155.90600	7794.99250	12524.17125
.97	9396.60802	7971.19434	12962.68542
.98	9716.57942	8203.51973	13547.51787
.99	10220.89394	8566.15937	14472.82012