

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah penangas air, mortir dan stamper, corong, Erlenmeyer, *aluminium foil*, autoklaf (*GEA*[®]), inkubator (*Memmert*[®]), laminar air flow (*ERSA Scientific*[®]), lemari pendingin (*Midea*[®]), *micropipette* (*Scilogex*[®]), cawan petri (*Normax*[®]), cawan penguap, tabung reaksi, labu ukur, kawat Ose, jangka sorong, pisau, *homogenizer* (*Heidolph*[®]), neraca analitik (*Ohaus*[®]), kertas saring, *hot plate*, pembakar spiritus, spektrofotometer UV-Visibel (*Shimadzu*[®]), viskometer (*RionLV-04F*[®]), pH meter (Metler Toledo[®]), dan alat-alat gelas yang biasa digunakan dalam Laboratorium.

3.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah Jeruk Nipis *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle diperoleh dari Desa Cibodas, Kecamatan Lembang.

Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah Etanol 70%, kloroform, akuades, HCl (Asam klorida) 2N, ammonia, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, serbuk magnesium, amil alkohol, gelatin, FeCl₃ (feri klorida), eter, vanili 10%, H₂SO₄p (Asam sulfat pekat), pereaksi Lieberman Burchard, KOH 5%, karbopol (teknis), trietanolamin (teknis), propilen glikol (teknis).

Bahan yang digunakan untuk uji bakteri adalah biakan murni *Staphylococcus aureus*, akuades steril, alkohol 70 %, media nutrient agar (*Oxoid*[®]), media nutrient broth (Himedia[®]), dan antibiotik gentamisin.

3.3 Metodologi Penelitian

Metodologi penelitian meliputi determinasi tanaman, persiapan bahan baku, pembuatan perasan jeruk nipis, skrining fitokimia, uji kadar hambat minimum (KHM) perasan jeruk nipis, formulasi *spray gel*, dan evaluasi sediaan *spray gel*.

3.3.1 Pengumpulan Bahan Baku dan Determinasi Tanaman

Bahan baku penelitian berupa jeruk nipis *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle yang diperoleh dari Desa Cibodas, Kecamatan Lembang. Determinasi dilakukan pada tanaman jeruk nipis *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle di Laboratorium Taksonomi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Padjadjaran untuk membuktikan kebenaran tanaman tersebut adalah tanaman jeruk nipis.

3.3.2 Pembuatan Perasan Jeruk Nipis

Pembuatan jeruk nipis dilakukan secara aseptis. Jeruk nipis dicuci untuk menghilangkan kotoran. Jeruk nipis dipotong menjadi 4 bagian, diperas, dan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer steril. Perasan jeruk nipis dalam erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil* steril dan disimpan pada suhu 4-8°C (Ibukun, *et al.*, 2007).

3.3.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk membuktikan kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada perasan jeruk nipis.

A. Alkaloid

Sampel perasan jeruk nipis dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan akuades dengan perbandingan 1:1, dikocok, dibasakan dengan ammonia, lalu ditambahkan kloroform dan dikocok kuat-kuat. Lapisan kloroform diambil lalu ditambahkan asam klorida 2N. Setelah dikocok kuat-kuat akan terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam diambil menjadi 2 bagian. Bagian pertama ditambahkan pereaksi Mayer. Jika terjadi kekeruhan atau endapan putih maka sampel mengandung alkaloid. Bagian kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff. Jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna jingga-kuning maka sampel mengandung alkaloid. Dilakukan pengujian terhadap blanko (Farnsworth, 1966).

B. Flavonoid

Sampel perasan jeruk nipis dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan akuades dengan perbandingan 1:1, dan dikocok. Campuran ditambahkan serbuk Mg dan 5 tetes HCl 2N. Campuran kemudian dipanaskan selama 5-10 menit. Dalam keadaan panas, campuran ditambahkan amil alkohol dan dikocok kuat-kuat. Adanya

flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol. Pengujian dilakukan juga terhadap blanko (Farnsworth, 1966).

C. Fenolat

Sampel perasan jeruk nipis dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan akuades dengan perbandingan 1:1, dan dikocok. Sampel tersebut kemudian dipanaskan selama 5-10 menit. Dalam keadaan panas, campuran ditambahkan larutan FeCl_3 . Senyawa fenolat ditandai dengan terbentuk warna hijau-biru gelap hingga hitam. Pengujian dilakukan juga terhadap blanko (Farnsworth, 1966).

D. Tanin

Sampel perasan jeruk nipis dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan akuades dengan perbandingan 1:1, dan dikocok. Sampel tersebut kemudian dipanaskan selama 5-10 menit. Dalam keadaan panas, campuran ditambahkan larutan gelatin 1%. Senyawa tanin ditandai dengan adanya endapan berwarna putih. Pengujian dilakukan juga terhadap blanko (Farnsworth, 1966).

E. Kuinon

Sampel perasan jeruk nipis dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan akuades dengan perbandingan 1:1, dan dikocok. Campuran kemudian dipanaskan selama 5-10 menit. Dalam keadaan panas, campuran ditambahkan KOH 5%. Senyawa kuinon ditandai dengan terbentuknya warna kuning. Pengujian dilakukan juga terhadap blanko (Farnsworth, 1966).

F. Saponin

Sampel perasan jeruk nipis dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan akuades dengan perbandingan 1:1, dan dikocok. Campuran kemudian dipanaskan selama 5-10 menit. Dalam keadaan panas, campuran dikocok kuat-kuat. Saponin ditunjukkan adanya busa yang mantap dan tidak hilang selama 10 menit dengan tinggi busa minimal 1 cm. Pengujian dilakukan juga terhadap blanko (Farnsworth, 1966).

G. Monoterpen dan Seskuiterpen

Sampel perasan jeruk nipis dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan akuades dengan perbandingan 1:1, dan dikocok. Campuran kemudian dipanaskan selama 5-10 menit, dimasukkan dalam cawan penguap, dan ditambahkan eter. Setelah eter

menguap, larutan vanilin 10% dalam H₂SO₄ pekat ditambahkan ke dalam sampel tersebut. Monoterpen dan seskuiterpen ditandai dengan warna-warna. Pengujian dilakukan juga terhadap blanko (Farnsworth, 1966).

H. Steroid dan Triterpenoid

Sampel perasan jeruk nipis dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan akuades dengan perbandingan 1:1, dan dikocok. Campuran kemudian dipanaskan selama 5-10 menit, dimasukkan dalam cawan penguap, dan ditambahkan eter. Setelah eter menguap, pereaksi Lieberman-Burchard ditambahkan ke dalam sampel tersebut. Senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan warna ungu. Senyawa steroid ditunjukkan dengan warna hijau biru. Pengujian dilakukan juga terhadap blanko (Farnsworth, 1966).

3.3.4 Uji Kadar Hambat Minimum Perasan Jeruk Nipis

Uji kadar hambat minimum perasan jeruk nipis dilakukan dengan cara terlebih dahulu alat dan bahan disterilkan, pembuatan nutrient agar, peremajaan bakteri, pembuatan suspensi mikroba uji dan penentuan kadar hambat minimum dengan metode sumur.

A. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan, seperti cawan petri, tabung reaksi, dan alat gelas lainnya terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan sebelum disterilkan. Beberapa alat, seperti cawan petri dibungkus dengan kertas minyak, tabung reaksi, erlenmeyer ditutup mulutnya dengan kapas steril yang telah dibalut kassa steril lalu dibungkus satu persatu dengan kertas minyak. Semua alat disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Kawat ose disterilkan dengan cara di-*flambir* di api langsung (Kumesan, dkk., 2013).

B. Pembuatan Nutrient Agar (NA)

Serbuk nutrient agar sebanyak 2,8 gram dilarutkan dalam 100 mL akuades (28 g/1000 mL) dalam erlenmeyer, lalu digoyang-goyang diatas pemanas (*hot plate*) hingga homogen. Erlenmeyer ditutup mulutnya dengan kapas steril yang telah dibalut kassa steril lalu dibungkus dengan kertas minyak kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Media dikeluarkan dan dibiarkan dingin 45-50⁰C, dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 20 mL, dan didinginkan (Kumesan, dkk., 2013).

- C. Peremajaan *Staphylococcus aureus*
Peremajaan bakteri dilakukan dengan memindahkan satu sampai empat ose mikroba dari stok murni ke dalam medium nutrient agar baru di dalam tabung reaksi dalam bentuk miring. Ose *Staphylococcus aureus* digoreskan pada medium nutrient agar kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam (Colome, *et al.*, 1986).
- D. Pembuatan Kultur Cair *Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus yang sudah diremajakan sebanyak 1-2 goresan diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi nutrient broth. Inokulum diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Kekeruhan dari suspensi diukur dengan spektrofotometer UV-Visibel sehingga diperoleh suspensi dengan transmittan 25% pada panjang gelombang 565±15 nm (Chapin, 2007).
- E. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri (*Optical Density*)
Suspensi *Staphylococcus aureus* diambil setiap 2 jam selama 24 jam. Kekeruhan dari suspensi diukur transmittan dengan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang 565±15 nm. Nilai *optical density* dibuat grafik untuk menentukan kurva pertumbuhan bakteri. (Olearnik, *et al.*, 2014)
- F. Uji Kadar Hambat Minimum (KHM) Perasan Jeruk Nipis
Cawan petri steril disiapkan. Suspensi bakteri uji sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam cawan petri, dituangkan media nutrient agar lalu dihomogenkan. Setelah media padat, dibuat lubang dengan perforator. Lubang diisi 50µL perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 50%, 40%, 30%, 20%, 12,5%, dan 10%, 50µL akuades steril sebagai kontrol negatif, dan 50 µL antibiotik gentamisin sebagai kontrol positif. Sampel berisi perasan jeruk nipis, kontrol positif, kontrol negatif diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Diameter hambatan pertumbuhan bakteri uji ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat yaitu daerah bening disekitar lubang atau sumuran. Pengukuran dilakukan dari dasar cawan petri dengan jangka sorong dan ditentukan nilai KHM perasan jeruk nipis.

3.3.5 Formula *Spray gel*

Formula *spray gel* dilakukan dengan membuat 3 formula (formula 1, formula 2, formula 3) dan 3 basis (basis 1, basis 2, basis 3) dengan variasi konsentrasi karbopol. Formulasi *spray gel* dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Formula *Spray Gel*

Komposisi	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Basis 1	Basis 2	Basis 3
Perasan Jeruk Nipis (%)	x	x	x	-	-	-
Karbopol (g)	0,5	0,75	1	0,5	0,75	1
Trietanolamin (mL)	3	3	3	3	3	3
Propilen Glikol (mL)	15	15	15	15	15	15
Akuades ad (mL)	100	100	100	100	100	100

Keterangan : x = nilai yang didapat pada hasil Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) perasan jeruk nipis

Pada formulasi basis *spray gel*, karbopol dilarutkan dalam akuades (70°C) dan didiamkan selama 15 menit agar mengembang dan diaduk dengan homogenizer dengan kecepatan 5000 rpm hingga terbentuk massa kental. Trietanolamin ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam massa gel sambil terus diaduk hingga terbentuk basis gel yang transparan. Propilen glikol ditambahkan ke dalam campuran tersebut, diaduk, dan ditambahkan akuades hingga homogen.

Pada formulasi sediaan *spray gel*, karbopol dilarutkan dalam akuades (70°C) dan didiamkan selama 15 menit agar mengembang dan diaduk dengan homogenizer dengan kecepatan 5000 rpm hingga terbentuk massa kental. Trietanolamin ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam massa gel sambil terus diaduk hingga terbentuk basis gel yang transparan. Propilen glikol dan perasan jeruk nipis ditambahkan ke dalam campuran tersebut, diaduk, dan ditambahkan akuades hingga homogen.

3.3.6 Evaluasi Sediaan

Evaluasi sediaan *spray gel* dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dan biologi dari sediaan yang dibuat. Evaluasi ini meliputi pemeriksaan organoleptis, penetapan pH, viskositas, daya sebar, kondisi semprotan, sifat ketahanan melekat, waktu kering dan uji stabilitas, dan pengujian aktivitas antibakteri sediaan *spray gel*.

A. Organoleptis

Uji organoleptik dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan cara pengamatan terhadap bentuk, warna, dan bau dari sediaan yang telah dibuat (Kumesan, dkk., 2013).

- B. Penetapan pH
pH meter dikalibrasi dengan cara memasukkan elektroda ke dalam larutan *buffer* netral pH 7 dan dibiarkan sampai stabil. Elektroda dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Elektroda dilakukan dengan cara yang sama dalam *buffer* asam dan basa secara berurutan. Elektroda dibilas dengan akuades, dikeringkan, dan dimasukkan ke dalam sampel dan dibiarkan sampai stabil. pH yang tertera dicatat dan dilakukan tiga kali (Hapsari, 2015).
- C. Viskositas
Viskositas sediaan *spray gel* diukur menggunakan viskometer metode Cup & Bob dengan *spindle* no.64. Hasil viskositas dicatat setelah viskometer menunjukkan angka yang stabil (Kamishita, *et al.*, 1992).
- D. Daya Sebar
Sediaan disemprotkan pada plastik mika dengan jarak 3-5 cm. Daya sebar sediaan diukur dengan menggunakan jangka sorong. Parameter yang digunakan adalah diameter. Pengukuran daya sebar dilakukan tiga kali (Shafira, 2015).
- E. Kondisi Semprotan
Uji ini dilakukan untuk mengetahui kondisi semprotan dari sediaan *spray gel*, dengan mengikuti standar sebagai berikut :
Buruk 1 :tidak menyembrot keluar.
Buruk 2 :menyembrot keluar, tetapi tidak dalam bentuk partikel melainkan dalam bentuk tetesan/gumpalan.
Buruk 3 :menyembrot keluar, tetapi partikel terlalu besar.
Baik :menyembrot keluar seragam dan dalam bentuk partikel kecil (Kamishita, *et al.*, 1992).
- F. Sifat Ketahanan Melekat
Untuk pengujian sifat ketahanan melekat, sediaan diaplikasikan pada lengan bagian bawah sukarelawan, dengan cara menyembrotkan *spray gel* pada jarak 3-5 cm. Ketika tetesan *spray gel* menetes setelah 10 detik maka dievaluasi sebagai menetes, dan ketika tetesan *spray gel* tidak menetes setelah 10 detik maka dievaluasi sebagai melekat (Kamishita, *et al.*, 1992).
- G. Waktu Kering

Untuk pengujian waktu kering, sediaan diaplikasikan pada sisi dalam dari lengan bagian bawah sukarelawan kemudian dihitung waktu yang diperlukan hingga cairan yang disemprotkan mengering.

H. Pengujian Aktivitas Antibakteri Sediaan *Spray gel*

Uji aktivitas antibakteri sediaan diuji dengan menggunakan metode sumur (*hole method*). Cawan petri steril disiapkan, diberi tanda untuk masing-masing formula. Sebanyak 1 mL suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan petri dan dituangkan media nutrient agar lalu dihomogenkan. Setelah media padat, lubang dibuat dengan perforator. Lubang diisi 50 μ L *spray gel* perasan jeruk nipis, 50 μ L antibiotik gentamisin sebagai kontrol positif, 50 μ L akuades steril sebagai kontrol negatif. Cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Diameter hambatan pertumbuhan bakteri uji yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat yaitu daerah bening di sekitar lubang atau sumuran. Pengukuran dilakukan dari dasar cawan petri dengan jangka sorong. Pengujian dilakukan 3 kali. Nilai rata-rata efek antibakteri pada formula *spray gel* dihitung. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan pada hari ke- 0 dan 28.