

BAB III

TATA KERJA

3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *blender*, timbangan analitik (*Fujitsu Class B*), tanur (*Barnstead Thermolyne*), desikator, maserator, labu bersumbat, *rotary evaporator* (*IKA[®] RV 05 basic*), penangas air, mikro pipet (*SCI LOGEX*), spektrofotometer Uv-Vis (*Thermo Scientific Genesys 10S Uv-Vis*), termometer, pot krim, pH meter (*Mettler Toledo Seven Compact S220*), viskometer (*Brookfield LV*), sentrifugator (*Hettich Zentrifugen EBA 20*), oven (*Memmert UN 55*), alat-alat porselen, alat-alat gelas (*Pyrex*), lemari pendingin (*Polytron[®]*).

3.2. Bahan

3.2.1. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah rambutan yang berasal dari Subang dan daun sirsak yang berasal dari Manoko Lembang Bandung.

3.2.2. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian adalah akuades, etanol 70% (*Smart-Lab*), metanol p.a (*Anhui Fulltime Specialized Solvents & Reagents Co.LTD*), DPPH (*Sigma-Aldrich*), asam stearat, trietanoamin (TEA) (*Petronas Chemical*), parafin cair, gliserin, setil alkohol, natrium benzoat (*Wuhan Youji Industries Co., Ltd*), vitamin C (*CSPC Weisheng Pharmaceutical, China*).

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Determinasi Kulit Buah Rambutan dan Daun Sirsak

Kulit buah rambutan dan daun sirsak yang akan digunakan dalam penelitian dideterminasi terlebih dahulu di Laboratrium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran Jatinangor.

3.3.2. Pengumpulan dan Pengolahan Kulit Buah Rambutan dan Daun Sirsak
Sampel Kulit buah rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang diperoleh disortasi basah kemudian ditimbang. Sampel selanjutnya dicuci bersih dengan air mengalir, dirajang, lalu dikeringkan pada suhu ruangan dengan cara diangin-anginkan. Sampel yang telah kering disortasi kering dan ditimbang kemudian dihaluskan menggunakan *blender* hingga diperoleh serbuk. Serbuk kemudian disimpan dalam wadah yang bersih untuk dilakukan langkah selanjutnya (Ulfah, 2016).

3.3.3. Karakterisasi Simplisia

Pemeriksaan karakteristik simplisia meliputi kadar air, kadar abu total, kadar sari yang larut dalam air, kadar sari yang larut dalam etanol, dan penetapan susut pengeringan.

A. Penetapan Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan dengan cara destilasi, yaitu dengan memasukan sejumlah 5 g serbuk simplisia, lalu ditambahkan sejumlah 100 mL toluen jenuh air kedalam labu yang telah berisi sampel uji lalu dididihkan sampai toluen mendidih. Kemudian dilakukan penyulingan dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes perdetik pada awal penyulingan dan dinaikan 4 tetes perdetik. Penyulingan dihentikan setelah seluruh air telah tersuling. Untuk mengantisipasi masih adanya air yang belum tersuling, maka dilakukan penyulingan kembali selama 5 menit. Setelah air dan toluen pada tabung penerima memisah, maka dilakukan perhitungan kadar air dengan cara menghitung volume air terhadap bobot kering simplisia (Depkes RI, 1989).

B. Penentuan Kadar Abu

Simplisia yang telah digiling, ditimbang sebanyak lebih kurang 2 gram secara seksama, dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditarakan. Krus yang berisi simplisia dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, kemudian didinginkan dan ditimbang (Depkes RI, 2000).

C. Penentuan Kadar Sari Larut Air

Serbuk simplisia kering terlebih dahulu dikeringkan di udara, kemudian 5 g simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan menggunakan 100 mL air kloroform P (100:10), dalam labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring dan 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan alas yang telah ditara, kemudian dihitung terhadap bobot bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

D. Penentuan Kadar Sari Larut Etanol

Serbuk simplisia terlebih dahulu dikeringkan di udara, kemudian 5 g serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 70% menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol. Kemudian 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, kemudian sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam etanol 70% dihitung terhadap bobot yang sudah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

E. Penetapan Susut Pengerinan

Serbuk simplisia ditimbang seksama 5 gram dalam cawan penguap yang sebelumnya telah dipanaskan dan ditara. Bahan diratakan dalam cawan penguap, lalu dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 105°C selama 6 jam, setelah itu biarkan cawan penguap mendingin dalam eksikator hingga suhu ruangan (Depkes RI, 2000).

3.3.4. Ekstraksi Kulit Buah Rambutan dan Daun Sirsak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 600 gram, kemudian dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan pelarut etanol 70% sampai terendam. Pelarut diletakkan setinggi kurang lebih 2,5 cm di atas permukaan simplisia (Harbone, 1973).

Proses maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam, kemudian disaring, proses ini dilakukan berulang ulang sampai tidak ada lagi senyawa yang terekstrak yang ditandai dengan warna pelarut yang jernih atau hampir tidak berwarna. Filtrat yang diperoleh kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary vaporator* sampai diperoleh ekstrak kental etanol kulit buah rambutan dan daun sirsak, kemudian rendemen ekstrak dihitung.

3.3.5. Penapisan Fitokimia

A. Fenolat

Sejumlah sampel ditambahkan dengan air didalam tabung reaksi, kemudian dididihkan dan disaring. Pada filtrat ditambahkan pereaksi FeCl_3 . Terbentuknya warna hijau biru menandakan adanya senyawa fenolik (Depkes RI, 1989).

B. Flavonoid

Sampel digerus dalam mortir dengan sedikit air, kemudian dipindahkan dalam tabung reaksi, ditambahkan sedikit logam magnesium dan 5 tetes HCl 2N. Campuran dipanaskan dan disaring, kemudian filtrat ditambahkan amil alkohol, lalu dikocok kuat-kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1989).

C. Alkaloid

Sampel dibasahi dengan amonia, kemudian ditambahkan kloroform, digerus kuat-kuat. Lapisan kloroform diambil kemudian ditambahkan asam klorida 2N. Setelah dikocok kuat-kuat dan terbentuk dua lapisan, lapisan asam diambil, dibagi menjadi tiga bagian.

Bagian 1 ditambahkan pereaksi Mayer. Jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna putih, berarti sampel kemungkinan mengandung alkaloid.

Bagian 2 ditambahkan pereaksi Dragendorf. Jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna jingga-kuning berarti sampel kemungkinan mengandung alkaloid. Dilakukan pengujian terhadap blanko (Depkes RI, 1989).

D. Saponin

Sampel ditambahkan air, lalu dipanaskan dan disaring. Filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi, dikocok kuat-kuat. Terbentuknya busa yang mantap dan tidak hilang selama 10 menit dengan tinggi busa minimal 1 cm menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1989).

E. Tanin

Sampel dalam tabung reaksi dipanaskan diatas penangas air dan kemudian disaring. Pada filtrat ditambahkan larutan gelatin 1% adanya senyawa tanin ditandai dengan adanya endapan berwarna putih. Dilakukan pengujian terhadap blanko (Depkes RI, 1989).

F. Kuinon

Sampel ditambahkan air dalam tabung reaksi, lalu dipanaskan dan disaring. Pada filtrat ditambahkan KOH 5 %. Adanya senyawa kuinon ditandai dengan terjadinya warna kuning (Depkes RI, 1989).

G. Steroid dan Triterpenoid

Sampel digerus dengan eter, filtratnya diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap, dan dibiarkan kering, kemudian ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchard. Terjadinya warna ungu menunjukkan adanya senyawa terpenoid. Terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1989).

H. Monoterpen dan Seskuiterpen

Sampel digerus dengan eter, filtratnya ditempatkan dalam cawan penguap, dan dibiarkan kering. Ditambahkan larutan vanilin 10 % dalam H₂SO₄ pekat. Terjadinya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan seskuiterpen (Depkes RI, 1989).

3.3.6. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Rambutan dan Daun Sirsak

A. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH 50 ppm dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 5 mg dilarutkan dengan 100 mL metanol pro analisis dalam labu terukur.

1. Pengukuran Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Rambutan, Ekstrak Etanol Daun Sirsak, Kombinasi Ekstrak, dan Vitamin C (Blois, 1958).

Sampel uji disiapkan dengan berbagai konsentrasi dengan pelarut metanol kemudian ditambahkan dengan larutan DPPH 50 ppm (1:1). Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap dan absorbansi diukur pada λ 516 nm (Blois, 1958). Aktivitas antioksidan diukur sebagai persen penurunan absorbansi DPPH pada sampel uji dihitung menggunakan rumus yang ditunjukkan oleh persamaan (3.1)

$$\text{Persen aktivitas} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

2. Penetapan IC_{50} Peredaman Radikal Bebas DPPH

Sampel uji dibuat dengan 6 variasi, kemudian diambil 2 mL dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH (1:1). Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap dan absorbansi diukur pada λ 516 nm. Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung persentase aktivitas antioksidan dan membuat kurva kalibrasi dengan persentase aktivitas antioksidan sebagai sumbu y dan konsentrasi sampel uji/pembanding sebagai sumbu x, sehingga diperoleh regresi linier. IC_{50} dihitung dengan cara memasukkan nilai 50 kedalam persamaan linier sebagai y, kemudian dihitung nilai x. Hasil yang diperoleh merupakan konsentrasi IC_{50} . Pada penetapan ini vitamin C digunakan sebagai pembanding (Blois, 1958).

3.3.7. Formula Krim Antioksidan

Tabel 3.1 Pembuatan Sediaan Krim Antioksidan dari kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Buah Rambutan dan Daun Sirsak

Bahan	F1 (g)	F2 (g)	F3 (g)	F4 (g)	Fungsi
Ekstrak Etanol Kulit Buah Rambutan dan Daun Sirsak	0,004	0,005	0,0029	0,0028	Zat Aktif
Asam Stearat	7	7	7	7	Emulgator
Trietanolamin	1	1	1	1	Emulgator
Parafin cair	6	6	6	6	Fase Minyak
Gliserin	15	15	15	15	Humektan
Setil alkohol	2	2	2	2	<i>Stiffening agent</i>
Natrium Benzoat	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet
Akuades	68,90	68,90	68,90	68,90	Pelarut

3.3.8. Pembuatan Krim Antioksidan

Pembuatan krim dilakukan dengan memanaskan masing-masing fase minyak dan fase air di atas *water bath* suhu 70°C sampai melebur. Fase minyak dibuat dengan melebur setil alkohol, parafin cair, asam stearat dan fase air dibuat dengan melebur TEA dan gliserin. Setelah melebur fase minyak, fase air ditambahkan sedikit demi sedikit lalu diaduk sampai dingin dan terbentuk masa basis krim yang homogen, kemudian ditambahkan natrium benzoat yang telah dilarutkan dengan akuades. Selanjutnya, ekstrak etanol kulit buah rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) dan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) ditambahkan sedikit demi sedikit lalu diaduk hingga homogen dan disimpan dalam wadah krim.

3.3.9. Evaluasi Sediaan dan Basis Krim

A. Pengamatan Organoleptis

Diamati bentuk, warna, dan bau krim. Hal ini dilakukan untuk mengetahui krim yang dibuat sesuai dengan bentuk, warna, dan bau yang digunakan (Murruckmihadi, dkk., 2012).

B. Pengujian pH

Pengukuran pH dilakukan menggunakan alat pH meter yang sebelumnya sudah dikalibrasi menggunakan larutan dapar standar pH

4 dan 7. Krim diuji nilai pH nya dan interpretasi hasilnya disesuaikan dengan pH kulit. Krim sebaiknya memiliki pH 4,5-8,0 (Setiawan, 2010).

C. Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan *viscometer brookfield* yaitu dengan memasang *spindel* No.64 pada alat kemudian dicelupkan kedalam sediaan sampai batas tertentu dan atur kecepatan 6 rpm pada suhu (25⁰C). Tiap masing-masing pengukuran dibaca skalanya ketika jarum merah telah stabil nilai viskositas diperoleh dari hasil perkalian *dial reading* dengan faktor koreksi khusus pada masing-masing kecepatan *spindel*. Nilai viskositas yang diharapkan adalah 5000 – 100.000 cP (Kurniati, 2011).

D. Uji Daya Sebar

Sebanyak 0,5 gram sediaan diletakan diatas kaca bulat berdiameter 15 cm, kaca lain diletakan diatas krim dan dibiarkan selama 1 menit. Diameter sebar krim diukur. Setelah diukur ditambahkan 50 gram beban dan didiamkan selama 1 menit lalu diukur diameter yang konstan. Kemudian dicatat diameter penyebaran. Daya sebar yang baik 5-7 cm (Ikhsanudin, dkk., 2012).

E. Uji Homogenitas

Homogenitas diuji dengan cara mengoleskan krim yang telah dibuat pada kaca objek, lalu dilihat bagaimana sebaran basis tersebut (Setiawan, 2010).

F. Uji Sentrifugal

Sediaan dimasukkan kedalam *tube* sentrifugasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Syaratnya yaitu tidak terjadi pemisahan (Smaoui, *et al.*, 2012).

G. Pengujian Antioksidan Sediaan Krim dan Basis Krim Dengan Metode DPPH

Sampel krim (F1, F2, F3, F4) sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a, diperoleh larutan induk 1000 ppm. Kemudian dibuat pengenceran 40 ppm, 20 ppm, 10 ppm, dan 5 ppm.

Larutan krim masing-masing diambil 2 ml dimasukkan kedalam vial dan ditambahkan 2 ml DPPH. Inkubasi selama 30 menit. Kemudian mengukur absorbansi DPPH pada panjang gelombang 516 nm. Selanjutnya dihitung persen inhibisinya dan IC_{50} (Kiay, dkk., 2011).

H. Analisa Data

Hasil yang diperoleh dari pengamatan stabilitas fisik krim berupa data deskriptif dan kuantitatif. Data deskriptif diperoleh dari pengamatan organoleptis, homogenitas, dan sentrifugasi. Data kuantitatif diperoleh dari pengujian pH, viskositas, dan daya sebar. Data kuantitatif dianalisis secara statistik dengan metode *One-Way* ANOVA (Yuyun, dkk., 2016).