

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1 Pengumpulan Bahan dan Determinasi Tanaman

Penelitian dimulai dengan pengumpulan bahan aktif yaitu buah nanas yang didapat dari Lembang, kemudian buah nanas dideterminasi yang dilakukan di Herbarium Bandungense sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung.

4.2 Persiapan Bahan

Penyiapan bahan meliputi pemilihan organ tanaman, pencucian, penggilingan dan penyimpanan. Buah nanas yang masih segar dikupas kulitnya kemudian dicuci untuk menghilangkan kotoran. Pembuatan perasan dilakukan dengan metode penyarian menggunakan *juice extractor* untuk memisahkan serat dari komponen lain. Sari yang diperoleh dikeringkan dengan metode *freeze dry* untuk mendapatkan serbuk ekstrak buah nanas.

4.3 Pemeriksaan Karakteristik Mutu Serbuk Ekstrak Buah Nanas

Pemeriksaan karakteristik serbuk ekstrak buah nanas yang dilakukan meliputi penetapan kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam (Dirjen POM, 2000:14-32).

4.3.1 Penetapan Kadar Abu Total

Sejumlah 2 gram serbuk ekstrak yang telah halus dimasukkan ke dalam krus silikat, kemudian dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis. Waktu

pemijaran selama 8 jam dan suhu yang digunakan 600°C. Abu didinginkan, ditimbang dan kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Dirjen POM, 2000:17).

$$\text{kadar abu total} = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat serbuk ekstrak}} \times 100\%$$

4.3.2 Parameter Kadar Abu Yang Tidak Larut Dalam Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Dirjen POM, 2000:17).

$$\text{kadar} = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$

4.3.3 Kadar Sari Larut Air

Sejumlah 5,0 gram serbuk ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 20 mL air kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Sebanyak 20 mL filtrat disaring dan diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap serbuk ekstrak awal (Dirjen POM, 2000:31).

$$\text{kadar} = \frac{\text{bobot setelah dipanaskan} - \text{bobot kosong}}{\text{bobot awal serbuk ekstrak}} \times \frac{100}{20} \times 100 \%$$

4.3.4 Kadar Sari Larut Dalam Etanol

Sejumlah 5,0 gram serbuk ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 95%, menggunakan labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Sebanyak 20 mL filtrat disaring dan diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen senyawa yang larut dalam etanol 95% dihitung terhadap serbuk ekstrak (Dirjen POM, 2000:31-32).

$$\text{kadar} = \frac{\text{bobot setelah dipanaskan} - \text{bobot kosong}}{\text{bobot awal serbuk ekstrak}} \times \frac{100}{20} \times 100 \%$$

4.4 Penapisan Fitokimia

Penapisan simplisia dan serbuk ekstrak buah nenas yang dihasilkan kemudian diperiksa kandungan kimianya meliputi pemeriksaan terhadap keberadaan senyawanya golongan fenol, flavonoid, tannin, kuinon, steroid dan triterpenoid, alkaloid serta saponin (Farnsworth, 1966:243-269).

4.4.1 Senyawa Polifenolat

Ke dalam 5 mL larutan ditambahkan beberapa tetes besi (III) klorida dan timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah-ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat.

4.4.2 Flavonoid

Dua spatel serbuk ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, kemudian dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2 N dan dipanaskan diatas penangas air dan disaring. Filtrat yang

diperoleh ditambahkan amil alkohol lalu dikocok kuat-kuat. Warna kuning, jingga atau merah pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid.

4.4.3 Tanin

Sejumlah 1 gram serbuk ekstrak atau 2 mL ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, kemudian dipanaskan di atas penangas air lalu disaring. Larutan gelatin 1% ditambahkan pada filtrat dan adanya endapan putih menandakan positif tanin.

4.4.4 Kuinon

Sejumlah 1 gram serbuk ekstrak atau 2 mL ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, kemudian dipanaskan di atas penangas air lalu disaring. Larutan natrium hidroksida atau kalium hidroksida 5% ditambahkan pada filtrat dan timbulnya warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon.

4.4.5 Triterpenoid dan steroid

Sejumlah 1 gram serbuk ekstrak atau 2 mL ekstrak ditambahkan dengan eter lalu disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan pereaksi Liberman Burchard dan terjadinya warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau-biru menunjukkan positif steroid.

4.4.6 Saponin

Sejumlah 1 gram serbuk ekstrak atau 2 mL ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit, lalu disaring. Filtrat dibiarkan sampai dingin, lalu

dikocok kuat-kuat selama 10 detik dengan arah vertikal dan terjadinya busa setinggi ± 1 cm yang bertahan selama 10 menit menandakan positif saponin.

4.4.7 Alkaloid

Sampel ditambahkan dengan ammonia 25% kemudian digerus dalam mortar, ditambah 20 ml kloroform dan digerus dengan kuat-kuat. Campuran disaring dan filtrate digunakan untuk percobaan (Larutan A). Larutan A ditetaskan pada kertas saring dan diberi pereaksi Dragendorf. Warna jingga yang timbul pada kertas saring menunjukkan alkaloid positif. Sisa larutan A diekstraksi 2 kali dengan HCl 10% lalu lapisan air atau fraksi asamnya dipisahkan (Larutan B). Masing-masing 5 ml larutan B dalam tabung reaksi diuji dengan pereaksi mayer, hasil positif bila endapan putih terbentuk bertahan 15 menit dan hasil positif pada uji dengan pereaksi Dragendorf bila terbentuk endapan merah bata yang bertahan 15 menit.

4.5 Prosedur Penentuan Aktivitas Antibakteri

Ditimbang 10 gram Nutrient agar (NA) dan dilarutkan dalam 500 ml aquadest yang telah dihangatkan dalam labu erlenmeyer. Bila perlu dipanaskan lagi sampai semua larut dan terbentuk larutan yang bening. Kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C .

Nutrient agar steril sebanyak 20 ml dituang ke dalam cawan petri kemudian kedalam cawan petri juga dimasukkan 0,1 ml suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*. Cawan petri digoyang perlahan agar suspensi bakteri tersebar merata dan didiamkan supaya mengeras. Penentuan aktivitas antibakteri dilakukan terhadap variasi konsentrasi serbuk ekstrak buah nanas. Pada media

agar dibuat lubang-lubang untuk diisi dengan berbagai konsentrasi serbuk ekstrak buah nanas. Konsentrasi yang digunakan yaitu 0.5%, 2%, 4%. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati diameter zone penghambatan yang akan dihasilkan. Pada pengujian digunakan pelarut gliserin dan antibiotik neomisin sebagai kontrol.

4.6 Formulasi Krim Serbuk Ekstrak Buah Nanas Sebagai Antibakteri

Tabel IV.1. Formulasi sediaan

Bahan	Konsentrasi (%)	
	F1	F2
Serbuk ekstrak buah nanas	2	2
Paraffin cair	20	20
Setil alkohol	10	10
GMS	-	7,5
TEA	-	1,5
Emulgid	10	-
Metil paraben	0,12	0,12
Propil paraben	0,02	0,02
Na-metabisulfit	0,1	0,1
Gliserin	5	5
Aquadest ad.	100	100

4.6.1 Metode Pembuatan Krim

Komponen fase minyak (paraffin cair, setil alkohol, (GMS/emulgid) dilebur di atas penangas pada suhu 70°C. Komponen fase air (TEA) dilarutkan dengan aquadest panas pada suhu 70°C. Kemudian fase minyak dan fase air dicampurkan dan diaduk dengan alat *ultra turax* rpm 15.000 hingga terbentuk

krim. Setelah suhu 40°C, Tambahkan (serbuk ekstrak buah nanas, gliserin, N-metabisulfit, metil paraben dan propil paraben) hingga homogen.

4.7 Evaluasi Sediaan

Evaluasi sediaan meliputi pengujian organoleptis, pengukuran pH sediaan, homogenitas, pengukuran viskositas sediaan, uji diameter hambat sediaan, uji tipe krim, uji sentrifugasi dan uji freeze thaw.

4.7.1 Pengujian Organoleptik

Pengujian dilakukan dengan melihat bau, warna dan bentuk sediaan yang dibuat secara visual.

4.7.2 Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan mengoleskan zat yang akan diuji pada sekeping kaca atau bahan transparan lain yang cocok, harus menunjukkan susunan yang homogen.

4.7.3 Pengukuran pH Sediaan

Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH universal. Pengukuran pH dilakukan setelah pembuatan krim.

4.7.4 Pengukuran Viskositas Sediaan

Viskositas formula krim diukur dengan menggunakan viscometer Brookfield tipe RV. Pengamatan viskositas menggunakan spindel 15 yang dimasukkan kedalam wadah hingga penuh. Kemudian dibiarkan hingga menunjukkan angka persentase yang stabil dan catat nilai viskositas (cps). Penentuan viskositas dilakukan pada suhu ruangan.

4.7.5 Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Krim

Untuk mengetahui efektivitas antibakteri yang ada pada serbuk ekstrak buah nanas setelah dibuat formulasi sediaan krim. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar. Media agar ditambahkan bakteri *Staphylococcus aureus*, lalu media agar dibuat lubang-lubang selanjutnya, ditambahkan sediaan krim serbuk ekstrak buah nanas yang dilarutkan dengan gliserin dengan konsentrasi 1:1. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati diameter zone penghambatannya. Digunakan basis dan antibiotik neomisin sebagai kontrol.

4.7.6 Uji Sentrifugasi

Pengujian krim dengan uji sentrifugasi bertujuan untuk mengetahui kestabilan krim setelah pengocokan yang sangat kuat. Krim dimasukkan dalam tabung sentrifuga kemudian diputar dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 jam.

4.7.7 Uji freeze thaw

Evaluasi stabilitas fisik dengan metode freeze thaw ditentukan dengan menyimpan sediaan tidak kurang dari 48 jam pada suhu 4°C. Setelah 48 jam, dilihat jika adanya pemisahan fase. Kemudian disimpan pada suhu 40°C selama 48 jam, kemudian dilihat terjadinya pemisahan fase. Pengujian dilakukan selama 5 siklus, yaitu satu siklus terdiri dari 48 jam pada kulkas 4°C dan 48 jam kemudian pada oven 40°C.

4.7.8 Uji Tipe Krim

Untuk memastikan tipe emulsi yang telah dibuat sesuai dengan tipe emulsi yang diharapkan, pengujian penentuan tipe emulsi krim dapat dilakukan dengan uji pengenceran. Uji pengenceran dilakukan dengan cara krim diencerkan dengan

pelarut aquadest. Tipe emulsi minyak-air (M/A) dapat diencerkan dengan pelarut aquadest sedangkan tipe emulsi air-minyak (A/M) tidak dapat diencerkan dengan pelarut aquadest.

Tipe emulsi dievaluasi dengan mengoleskan sediaan krim di atas kaca objek kemudian ditambah larutan biru metilen dan kemudian diamati. Tipe emulsi merupakan minyak dalam air apabila fase air tewarnai oleh metilen biru.

Dengan menggunakan kertas saring ambil sedikit krim dan totolkan di atas kertas saring diamkan beberapa saat amati terjadi pembahasan pada kertas saring di sekitar krim maka tipe tersebut adalah tipe emulsi minyak dalam air.

