

## **BAB IV**

### **PROSEDUR KERJA**

#### **4.1. Pengumpulan Tanaman**

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tapak dara (*Catharanthus roseus*, (L) G. Don) yang diperoleh dari Manoko, Lembang, Bandung.

#### **4.2. Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung.

#### **4.3. Pembuatan Simplisia**

Daun tapak dara segar dicuci hingga terpisah dari pengotornya, kemudian disortasi basah, dilakukan pengeringan terhadap daun tapak dara dengan cara diangin-anginkan selama beberapa hari, kemudian dilakukan sortasi kering.

#### **4.4. Penapisan Fitokimia Pada Simplisia dan Ekstrak**

Menurut buku Fransworth (1996), penapisan fitokimia pada simplisia dan ekstrak meliputi :

##### **4.4.1. Senyawa Polifenolat**

Simplisia atau ekstrak sebanyak 1 gram ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan di atas penangas air, kemudian di

saring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida. Apabila timbul warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru hitam sampai hitam, maka menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat.

#### **4.4.2. Flavonoid**

Simplisia atau ekstrak sebanyak 1 gram ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan 100 mL air panas kemudian dididihkan selama 10 menit, campuran tersebut disaring, (Larutan A). Larutan A ini akan digunakan untuk pemeriksaan golongan senyawa flavonoid, saponin dan kuinon). Sebanyak 5 mL larutan A dicampur dengan serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat dan 8 tetes amilalkohol, kocok dengan kuat. Biarkan sampai terjadi pemisahan dan timbulnya warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menandakan positif flavonoid.

#### **4.4.3. Tanin**

Simplisia atau ekstrak sebanyak 1 gram ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan 100 mL air dan dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit kemudian didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama ditambahkan larutan gelatin 1% dan adanya endapan putih menandakan positif tanin dan bagian keduanya ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1%, apabila terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tannin.

#### **4.4.4. Kuinon**

Simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya, dipanaskan di atas penangas air kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 20 mL larutan natrium hidroksida 1 N dan apabila timbul warna kuning sampai merah menandakan positif kuinon.

#### **4.4.5. Monoterpen dan sesquiterpen**

Simplisia atau ekstrak digerus dengan eter kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat dan apabila timbul warna-warna menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen.

#### **4.4.6. Triterpenoid dan steroid**

Simplisia atau ekstrak digerus dengan eter kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi Liebermann-Burchard dan apabila timbul warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau-biru menandakan positif steroid.

#### **4.4.7. Saponin**

Sebanyak 1 gram simplisia atau ekstrak ditambahkan air 100 ml, kemudian dipanaskan di penangas air selama 30 menit dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dibiarkan sampai dingin, kemudian dimasukkan tiga

ekor ikan. Ikan diamati selama satu jam, jika ikan mati maka simplisia mengandung saponin.

#### 4.4.8. Alkaloid

Simplisia atau ekstrak ditempatkan dalam mortir dan ditambahkan amoniak 25% yang kemudian digerus dan ditambahkan 20 mL  $\text{CHCl}_3$ , gerus dengan kuat. Selanjutnya disaring dan diambil filtratnya (larutan 1). Larutan 1 tersebut ditambahkan dengan HCl 10% v/v hingga terbentuk dua fasa, kemudian pisahkan fasa air (larutan 2). Larutan 1 diteteskan pada kertas saring, semprotkan pereaksi Dragendorff. Apabila terbentuk warna merah/jingga maka positif alkaloid.

#### 4.5. Pembuatan Ekstrak Daun Tapak Dara

Metode yang dilakukan untuk proses ekstraksi daun tapak dara adalah dengan metode maserasi. Alat maserator dibersihkan dan dibilas dengan menggunakan etanol. Dipasang sumbat kapas pada bagian bawah alat dan pastikan saluran pada bagian bawah maserator tertutup. Simplisia dimasukkan kedalam alat maserator. Setelah itu dimaserasi dengan etanol 96%, tutup bagian atas maserator dan diamkan selama 24 jam dengan beberapa kali pengadukan. Setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan ampas dan filtratnya. Remaserasi simplisia dengan pelarut etanol 96% baru selama 24 jam sebanyak dua kali berturut-turut. Kemudian dilakukan evaporasi untuk menguapkan pelarut dan pemekatan ekstrakny sehingga diperoleh ekstrak kental menggunakan *rotary evaporator* pada suhu  $40^\circ\text{C}$ .

#### 4.6. Pemeriksaan Karakteristik Non Spesifik pada Simplisia

Pemeriksaan karakteristik non spesifik pada simplisia dilakukan meliputi kadar air dan kadar abu.

##### 4.6.1. Parameter kadar air dengan metode Gravimetri

Panaskan krus porselin beberapa menit kemudian dinginkan dalam eksikator dan timbang setelah 30 menit. Sebanyak 2 gram sampel dimasukkan kedalam krus kemudian krus dipanaskan kembali selama 10 menit dan dinginkan dalam eksikator kemudian timbang kembali. Pemijaran diulangi sampai diperoleh berat yang konstan.

Hitung kadar air dalam % dengan rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W_{\text{akhir (bobot tetap)}} - W_{\text{cawan}}}{W_{\text{sampel}}} \times 100\% \quad (1)$$

(Day & Underwood, 2002:76)

##### 4.6.2. Parameter kadar abu

Timbang simplisia sebanyak 2 gram yang telah digerus, dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, ratakan. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan timbang hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

$$\text{Kadar abu total (\%)} = \frac{W_{\text{akhir}} - W_{\text{cawan}}}{W_{\text{sampel}}} \times 100\% \quad (2)$$

(DepKes RI, 2000:31)

#### 4.7. Formula Krim dan Salep

Formula krim ditentukan setelah melakukan optimasi basis krim agar sediaan yang dibuat dapat memenuhi persyaratan farmasetika. Sedangkan formula salep menggunakan basis salep dasar sehingga tidak dilakukan optimasi terlebih dahulu.

##### 4.7.1. Optimasi basis krim

Optimasi dilakukan terhadap basis krim untuk menentukan komposisi basis krim yang paling stabil sebelum ditambahkan dengan ekstrak daun tapak dara. Optimasi berdasarkan perbedaan konsentrasi adeps lanae 3, 5 dan 8%. Komposisi basis krim untuk optimasi dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel IV.1 Rancangan formula basis krim

Bahan	Formula (%)		
	1	2	3
Paraffin cair	25	25	25
Asam stearat	14,5	14,5	14,5
Adeps lanae	3	5	8
Nipagin	0,1	0,1	0,1
Nipazol	0,05	0,05	0,05
TEA	1,5	1,5	1,5
Aquades ad	100	100	100

Ketiga formulasi basis tersebut diuji stabilitasnya menggunakan metode *freeze thaw* selama 5 siklus dan sentrifugasi selama 300 menit. Basis yang stabil digunakan untuk selanjutnya ditambahkan ekstrak daun tapak dara sebanyak 15%.

##### 4.7.2. Formula krim

Krim dibuat dengan konsentrasi ekstrak daun tapak dara 15% dan dibuat dengan metode *fussion*. Formula yang dibuat berdasarkan formula yang telah diuji

sebelumnya oleh Dewi, dkk (2013) yang kemudian di optimasi basisnya agar dihasilkan sediaan yang stabil dan memberikan efek farmakologi yang maksimal.

#### 4.7.3. Formula Salep

Salep dengan kadar ekstrak daun tapak dara 15% dibuat dengan metode *fussion*. Dibawah ini merupakan formula salep ekstrak daun tapak dara:

**Tabel IV.2** Rancangan formula salep ekstrak daun tapak dara

Bahan	Formula (%)
Ekstrak daun tapak dara	15
Adeps lanae	8
Vaselin album ad	100

#### 4.8. Prosedur Pembuatan Krim dan Salep Ekstrak Daun Tapak Dara

Sediaan krim dan salep dibuat dengan menggunakan metode *fussion* dalam keadaan steril.

##### 4.8.1. Sterilisasi

Sterilisasi adalah suatu proses penghancuran secara lengkap semua mikroba hidup dan spora-sporanya. Sterilisasi dilakukan terhadap alat dan bahan yang akan digunakan. Alat-alat gelas disterilisasi dengan cara alat ditutup menggunakan alumunium foil, khusus untuk pipet lubangnya disumbat dengan kapas kemudian dibungkus dengan alumunium foil. Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit. Setelah disterilisasi, alat dikeringkan dalam oven pengering 70°C selama 30 menit. Untuk bahan-bahan tahan panas yang digunakan dimasukkan kedalam alat gelas yang akan disterilkan, tutup rapat, kemudian dibungkus dengan kertas atau alumunium foil, sterilkan seperti

sterilisasi alat dengan menggunakan autoklaf. Untuk ekstrak, nipagin, nipasoldan asam stearat disterilkan menggunakan sinar ultra violet dengan panjang gelombang 256 nm selama 1 jam.

#### **4.8.2. Pembuatan krim dan salep**

Ditimbang basis krim dan salep yang akan digunakan. Dalam formula krim, basis yang digunakan dibagi menjadi dua fasa. Fasa minyak dan fasa air. semua bahan dilebihkan 10% karena melalui proses pemanasan. Masing-masing fasa dilebur diatas penangas air sampai masing-masing fasa tersebut bersuhu 60°C-70°C. Campur kedua fasa dalam satu wadah kemudian kocok dengan *ultraturax* kecepatan 10000 rpm. Tambahkan ekstrak sedikit demi sedikit kemudian kocok kembali sampai dingin. Untuk basis salep, kedua basis dilebur dan dicampur dengan ekstrak daun tapak dara dengan stirrer kecepatan 2000 rpm. Kemudian kedua sediaan dievaluasi dan diuji aktivitas.

#### **4.9. Evaluasi Sediaan**

Evaluasi kedua sediaan ini meliputi organoleptis, homogenitas, viskositas, uji tipe krim, pH, uji stabilitas terhadap suhu, dan uji aktivitas sediaan terhadap hewan percobaan.

##### **4.9.1. Uji organoleptis**

Uji pengamatan organoleptis sediaan krim dan salep dilakukan dengan mengevaluasi dan mengamati perubahan bentuk, warna, dan bau. Evaluasi pada hari ke-1, 3,5, 7, selanjutnya seminggu sekali sampai 28 hari.



#### **4.9.2. Uji homogenitas**

Uji homogenitas dilakukan secara visual untuk melihat ketersebaran zat aktif dalam sediaan yang dibuat. Uji homogenitas dilakukan dengan mengambil sedikit sediaan yang diuji kemudian diletakkan diantara dua kaca arloji. Kaca arloji digesekkan sehingga terlihat homogenitas sediaan. Uji homogenitas dilakukan selama 28 hari yakni pada hari ke 1, 3, 5, 7, selanjutnya seminggu sekali sampai 28 hari.

#### **4.9.3. Uji viskositas**

Uji ini dilakukan dengan viskometer *Brookfield RV*. Sampel dimasukkan ke dalam wadah, kemudian spindle yang sesuai dipilih dan dimasukkan kedalam wadah hingga tanda batas dan rotor dihidupkan, dibiarkan selama beberapa waktu hingga didapat angka yang stabil. Pengamatan dilakukan selama 28 hari, pada hari ke-1, 3, 5, 7, selanjutnya seminggu sekali sampai 28 hari.

#### **4.9.4. Uji tipe krim**

Uji ini dilakukan dengan cara pengenceran, yaitu dengan menambahkan aquadest sebanyak 10 ml kedalam 1 gram sediaan. Jika sediaan dapat bercampur homogen dengan aquadest, maka sediaan mengandung emulsi minyak dalam air (m/a). Pengamatan dilakukan selama 28 hari, yakni pada hari ke 1, 3, 5, 7, selanjutnya seminggu sekali sampai 28 hari.

#### **4.9.5. Uji pH**

Pengamatan pH dilakukan dengan menggunakan pH meter (Mettler Toledo). pH meter dikalibrasi dengan cara memasukkan elektroda kedalam larutan buffer pH 4 dan dibiarkan sampai stabil. Kemudian dibilas dengan

akuades dan dikeringkan. Prosedur diulangi dengan menggunakan buffer pH 7 dan pH 9. Kemudian elektroda dimasukkan kedalam sampel dan dibiarkan stabil kemudian dicatat nilai pH yang tertera pada layar. Pengamatan dilakukan selama 28 hari, pada hari ke-1, 3, 5, 7, selanjutnya seminggu sekali sampai 28 hari.

#### **4.9.6. Uji stabilitas terhadap suhu**

Uji stabilitas sediaan terhadap suhu yaitu dengan metode stabilitas dipercepat. Uji stabilitas dipercepat dilakukan dengan menyimpan sediaan pada suhu 40°C selama 28 hari dan diamati setiap tujuh hari. Hal-hal yang diuji meliputi uji organoleptis, pH dan viskositas.

#### **4.10. Uji Aktivitas Sediaan**

Uji efektifitas dilakukan pada kedua sediaan yang dibuat yang memenuhi karakteristik sediaan farmasetika. Uji aktivitas dilakukan dengan menggunakan metode Morton yang dilakukan pada mencit. Pada hari ke-0 mencit dibius dengan ketamin 0,3 mg/ekor secara intravena, kemudian diletakkan diatas bak bedah dengan posisi telungkup dan keempat kaki diikat. Rambut disekitar punggung bagian tengah dicukur, kemudian dibersihkan dengan kapas yang dibasahi alkohol 70%. Untuk membuat luka berbentuk lingkaran, kulit diangkat dengan pinset dan digunting di daerah tersebut sampai bagian dermis beserta jaringan ikat dibawahnya dengan diameter 0,5 cm. Kemudian luka diobati dengan sediaan yang akan diuji. Pengobatan dan pengamatan dilakukan dua kali sehari, yaitu pada pagi hari (pukul 8.00 WIB) dan sore hari (pukul 17.00 WIB). masing-masing hewan uji ditempatkan di kandang yang terpisah untuk menghindari jilatan dari hewan uji

lain. Perlakuan ini dilakukan pada 6 kelompok uji, kelompok ke-1 merupakan kelompok mencit yang diberikan sediaan krim yang mengandung 15% ekstrak daun tapak dara, kelompok uji ke-2 merupakan mencit yang diberikan sediaan salep mengandung 15% ekstrak daun tapak dara, kelompok ke-3 merupakan mencit yang diberikan basis krim, kelompok ke-4 merupakan mencit yang diberikan basis salep. Kelompok ke-5 merupakan kontrol negatif dimana mencit dilukai tanpa pengobatan dan kelompok ke-6 merupakan kelompok mencit yang diberikan pembanding salep yang mengandung povidone iodine 10%. Setiap kelompok menggunakan lima ekor mencit. Parameter pada uji aktivitas sediaan ini adalah lama kering luka, lama terbentuknya keropeng, dan lama pengelupasan keropeng. Analisa dilakukan pada ketiga parameter tersebut pada setiap kelompok dan dibandingkan secara statistik menggunakan analisis varian (ANOVA).