

## **BAB IV**

### **PROSEDUR KERJA**

#### **4.1 Determinasi tumbuhan**

Buah manggis diperoleh dari perkebunan Purwakarta Jawa barat yang dipanen pada umur 114 hari setelah bunga mekar. Determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

#### **4.2 Pembuatan simplisia**

Manggis segar dicuci kemudian dipisahkan bagian kulit buahnya kemudian dirajang halus dan dilakukan pengeringan dengan lemari pengering pada suhu 50-60°C. Selanjutnya dilakukan sortasi kering dan dilakukan pengilingan terhadap kulit kering dengan mesin penggiling.

#### **4.3 Penetapan kadar air simplisia dan ekstrak**

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotroph, tahapannya yaitu tabung penampung dan kondensor dengan cara dengan asam, lalu dibilas dengan air, kemudian dikeringkan dalam oven. Ke dalam labu destilata dimasukkan 200-300 mL toluen yang telah dijenuhkan dengan aqua destilata. Simplisia sebanyak 2-3 g dimasukkan kedalam labu bundar. Labu didihkan pelahan-lahan selama kurang lebih 15 menit (tambahan serpihan porselen), setelah mendidih disuling dengan kecepatan 2 tetes/detik hingga sebagian besar air tersuling kemudian

kecepatan penyulingan dinaikkan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam kondensor dibilas dengan toluen, selanjutnya penyulingan dilanjutkan selama 5 menit, kemudian pemanasan dihentikan. Tabung penerima didinginkan sampai suhu kamar. Tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima dihilangkan. Air dan toluene dibiarkan memisah dalam tabung penerima, kemudian volume air dalam tabung penerima diamati. Kadar air dihitung dalam persen (Depkes RI, 2000:14). Perhitungan kadar air menggunakan rumus :

$$\text{kadar air} = \frac{\text{ml air} \times \text{bobot jenis air}}{\text{berat simplisa (ekstrak)}} \times 100 \% \quad (4.1)$$

#### 4.4 Penetapan kadar abu total

Sampel ditimbang kurang lebih 2-3 g zat yang telah digerus, kemudian dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, selanjutnya diratakan. Perlahan-lahan dipanaskan hingga arang habis, kemudian didinginkan dan ditimbang. Apabila cara ini tidak dapat dihilangkan dapat ditambahkan air panas, kemudian disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa dipanaskan dan kertas saring dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan kedalam krus dan diuapkan. Pijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang, hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000:17). Perhitungan menggunakan rumus :

$$\text{kadar abu} = \frac{\text{Berat abu (gram)}}{\text{bobot sampel awal (gram)}} \times 100 \% \quad (4.2)$$

#### 4.4.1 Penentuan kadar abu tidak larut asam

Abu yang telah diperoleh dari penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL asam sulfat encer P selama 5 menit, dikumpulkan bagian yang tidak larut asam, saring melalui kertas saring bebas abu dengan air panas, dipijarkan abu, dicuci dengan air, pijarkan sampai bobot tetap, dan ditimbang. Hitung kadar yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000:17). Kadar abu tidak larut dalam asam dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam}(g)}{\text{berat bahan awal}(g)} \times 100\% \quad (4.3)$$

#### 4.4.2 Penentuan kadar abu larut air

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 ml air selama 5 menit, bagian yang tidak larut dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan selama 15 menit pada suhu tidak lebih dari 450°C hingga bobot tetap dan ditimbang. Perbedaan bobot sesuai dengan jumlah abu yang larut dalam air. Kadar abu yang larut dalam air terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara dihitung (Depkes RI, 1979:155).

Kadar abu larut air dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar abu larut air} = \frac{\text{Berat abu total}(g) - \text{berat abu tidak larut air}(g)}{\text{berat bahan awal}(g)} \times 100\% \quad (4.4)$$

#### 4.5 Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia simplisa dan ekstrak kulit buah manggis. Prosedur penapisan fitokimia yang digunakan menurut (Farnsworth, 1966) adalah sebagai berikut :

#### 4.5.1 Senyawa polifenolat dan tanin

Bahan digerus dengan air hingga lumat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dididihkan selama beberapa menit. Setelah disaring, filtrat dibagi dua bagian.

Filtrat 1: ke dalam filtrat satu diteteskan larutan pereaksi besi (III) klorida. Adanya warna biru hingga hitam menunjukkan adanya senyawa golongan polifenol.

Filtrat 2: ke dalam filtrat dua diteteskan larutan gelatin, lalu diamati terjadinya pengendapan atau penggumpalan. Adanya penggumpalan menunjukkan bahwa dalam filtrat terkandung senyawa golongan tanin. Endapan gelatin disaring. Filtrat ditetesi larutan pereaksi besi (III) klorida. Bila terbentuk warna hitam, berarti bahwa dalam bahan tersebut terkandung golongan tanin dan polifenol (Farnsworth, 1966:264-265).

#### 4.5.2 Flavonoid

Sampel dicampur dengan serbuk magnesium dan HCl 2N. Campuran dipanaskan diatas tangas air, lalu disaring. Kedalam filtrat dalam tabung reaksi ditambahkan amil alkohol, lalu kocok kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Farnsworth, 1966:262-263).

#### 4.5.3 Kuinon

Sebanyak 10 mL larutan A dalam tabung reaksi ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1N. Adanya kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah (Farnsworth, 1966:265-266).

#### 4.5.4 Monoterpen dan Sesquiterpen

Sampel ditambahkan eter, dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Ke dalam hasil filtrat di tambahkan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terjadi warna-warna menunjukkan senyawa mono dan seskuiterpenoid (Depkes, 1977:132).

#### 4.5.5 Triterpenoid dan Steroid

Sampel ditambahkan eter, dipipet sambil disaring dan filtratnya diuapkan. Residunya ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika terbentuk warna biru hijau, positif steroid dan jika terbentuk warna merah-ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Farnsworth, 1966:259-260).

#### 4.5.6 Saponin

Sebanyak 10 mL larutan A dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dikocok vertikal selama 10 detik. Jika busa dengan tinggi 1 cm stabil selama 10 menit, maka pengujian dilanjutkan dengan menambahkan 2 tetes HCl 2N. Jika busa tersebut tetap tidak hilang maka di dalam simplisia terkandung saponin (Farnsworth, 1966:257-258).

#### 4.5.7 Alkaloid

Sampel ditambahkan dengan ammonia 25% kemudian digerus dalam mortar, ditambah 20 ml kloroform dan digerus dengan kuat. Campuran disaring dan filtrat digunakan untuk percobaan (Larutan A). Larutan A diteteskan pada kertas saring dan diberi pereaksi Dragendorff. Warna jingga yang timbul pada kertas saring menunjukkan alkaloid positif. Sisa larutan A diekstraksi dua 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 yang terbentuk bertahan selama 15 menit dan hasil positif pada uji dengan pereaksi Dragendorff bila terbentuk endapan merah bata yang bertahan selama 15 menit (Farnsworth, 1966:245-246).

#### **4.6 Pembuatan Ekstrak kulit buah manggis**

Ekstraksi dilakukan dengan cara dingin menggunakan metode maserasi, simplisia dimaserasi dengan etanol 95% dengan beberapa kali pengadukan. Setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan ampas dan filtratnya. Residu yang diperoleh diekstrak kembali dengan etanol 95%, dilakukan sebanyak 2 kali. Ekstrak pertama, kedua dan ketiga dicampurkan kemudian dievaporasi untuk menguapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak kental.

#### **4.7 Pembuatan Fraksi Ekstrak kulit buah manggis**

Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair, ekstrak kental yang didapat disuspensikan dengan aquades, kemudian dimasukkan ke corong pisah, lalu ditambahkan n-heksan sebagai pelarut non polar, campuran dikocok dan pisahkan lapisan n-heksan, selanjutnya lapisan air ditambahkan etil asetat, pisahkan fraksi air dan etil asetat. Uapkan masing-masing pelarut dengan *rotary evaporator*.

## 4.8 Uji aktivitas antioksidan

### 4.8.1 Pembuatan larutan uji

Larutan uji yang digunakan adalah fraksi kulit buah manggis dengan konsentrasi 5, 10, 15, dan 20 µg/ml yang dilarutkan dalam pelarut etanol.

### 4.8.2 Pembuatan Larutan pembanding

Larutan pembanding yang digunakan adalah vitamin C dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 µg/ml yang dilarutkan dalam pelarut etanol.

### 4.8.3 Pembuatan larutan DPPH

DPPH sebanyak 4 mg dilarutkan dalam etanol 100 ml sehingga didapat larutan 0.004% (40 µg/ml). Larutan dijaga pada suhu rendah, terlindung dari cahaya untuk segera digunakan

### 4.8.4 Pengukuran persen inhibisi larutan uji

Larutan uji adalah fraksi kulit buah manggis dan ditambahkan dengan larutan DPPH sebanyak 1.5 ml, kemudian dihomogenkan. Campuran larutan ini kemudian diinkubasi selama 30 menit. Sebagai kontrol digunakan larutan 1.5 ml etanol ditambahkan 1.5 ml larutan DPPH.

Kemudian dihitung % inhibisinya dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (4.5)$$

### 4.8.5 Penentuan IC<sub>50</sub>

Dari harga persen inhibisi radikal bebas yang diperoleh, dibuat kurva antara persen inhibisi radikal bebas terhadap konsentrasi larutan uji. Dari persamaan regresi linier tersebut dapat ditentukan nilai IC<sub>50</sub>, yaitu konsentrasi inhibisi larutan uji yang mampu menangkal radikal bebas sebanyak 50%.

#### 4.9 Orientasi Formulasi (Penentuan HLB butuh)

Formulasi diawali dengan mencari HLB butuh VCO (*Virgin Coconut oil*). Orientasi HLB butuh VCO dilakukan dengan menggunakan rentang HLB VCO 8-14, konsentrasi surfaktan yang digunakan adalah 20%. Kemudian dibuat formula dengan HLB butuh VCO. Krim yang dibuat kemudian di uji stabilitasnya dengan uji setrifuga dengan 2000 rpm selama 5 jam untuk mengetahui nilai HLB yang paling stabil. Selanjutnya dilakukan optimasi penurunan konsentrasi surfaktan yang akan digunakan yaitu dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20%.

#### 4.10 Formulasi krim yang mengandung fraksi kulit buah manggis

Setelah didapatkan nilai HLB yang stabil dibuat krim antioksidan mengandung fraksi kulit buah manggis dengan dua variasi dosis dapat dilihat pada (Tabel III.I).

**Tabel IV. 1** Formulasi krim antioksidan fraksi kulit manggis

Bahan / formula	F I (%)	F II (%)
Fraksi kulit manggis terpilih	0,5	2
Tween 80	x	x
Span 80	x	x
<i>Virgin coconut oil</i>	20	20
Setostearil alkohol	10	10
Propilen glikol	10	10
Metil paraben	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02
Tokoferol asetat	0,05	0,05
Aqua destilata add	100	100



#### 4.11 Pembuatan sediaan krim

Pembuatan sediaan krim antioksidan dari fraksi kulit buah manggis ini dilakukan dengan metode pelelehan dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Fase minyak yaitu VCO, emulgator span 80 dan setostearil alkohol dicampur dan dipanaskan dalam cawan penguap hingga mencapai suhu 60-70°C.
- b. Fase air yaitu aquadestilata dan tween 80 dipanaskan hingga mencapai suhu 60-70°C.
- c. Campurkan kedua fase, aduk dengan alat *ultra turrax* dengan kecepatan 15000 rpm selama 10 menit hingga terbentuk massa krim.
- d. Metil paraben dan propil paraben dilarutkan dengan beberapa tetes etanol, kemudian campurkan dengan basis.
- e. Tokoferol asetat dan fraksi kulit buah manggis yang telah dilarutkan dengan propilen glikol sedikit demi sedikit ditambahkan, pada campuran diatas aduk dengan strirer sampai merata selama 5 menit.

#### 4.12 Evaluasi sediaan

##### 4.12.1 Organoleptik

Pengujian organoleptik meliputi pengamatan terhadap perubahan warna, bau pada suhu kamar dan suhu 40 °C dari krim selama 28 hari.

##### 4.12.2 Homogenitas

Penentuan homogenitas dilakukan dengan cara meletakkan sedikit sediaan diantara dua kaca objek dan diperhatikan adanya partikel-partikel kasar atau

ketidak homogenan. Untuk mendapatkan permukaan sediaan yang homogen dilakukan dengan menggeser sejumlah sediaan dari ujung kaca objek dengan bantuan batang pengaduk sampai ujung kaca objek lain.

#### **4.12.3 Penentuan tipe emulsi**

##### **a. Uji kelarutan warna**

Sedikit zat warna larut air, misal metilen blue atau biru berlian CFC ditetaskan pada permukaan emulsi. Jika zat warna terlarut dan berdifusi homogen pada fase eksternal yang berupa air maka tipe emulsi adalah minyak dalam air, demikian juga sebaliknya.

##### **b. Uji pengenceran**

Uji ini dilakukan dengan mengencerkan emulsi dengan air, jika emulsi tercampur baik dengan air, tanpa memperlihatkan ketidak campuran maka tipe emulsi adalah minyak dalam air. hal ini dapat dilakukan dengan mikroskop untuk memberikan visualisasi yang lebih baik.

#### **4.12.4 Viskositas**

Krim yang telah dibuat dimasukan kedalam gelas piala 100 ml, diukur viskositasnya dengan *Brook field* RVT dengan kecepatan 100 rpm. Viskositas krim diamati pada tiap minggu selama 28 hari dan diamati kerusakan sediaan selama penyimpanan.

#### **4.12.5 Penetapan pH**

Digunakan pH meter yang telah dikalibrasi terlebih dahulu dengan menggunakan larutan dapar pH 4 dan 7. Setelah itu dilihat pH dari sediaan dengan menuangkan sediaan kedalam gelas kimia 50 ml dan ujung pH meter dicelupkan

kedalam gelas kimia 50 ml tersebut, ditunggu hingga menunjukkan angka kestabilan atau dengan menggunakan pH universal.

#### **4.12.6 Uji stabilitas dipercepat**

Sediaan di simpan pada suhu 40 °C kemudian dilihat organoleptis, pH, dan viskositas sediaan selama 28 hari, pada hari 1, 7, 14, 21, dan 28.

#### **4.12.7 Uji Sentrifugasi**

Sediaan krim dimasukan ke dalam tabung sentrifugasi kemudian dilakukan pengocokan atau setrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 5 jam.

#### **4.12.8 Uji *Freeze-thaw***

Stabilitas krim dilakukan dengan Uji *Freeze-thaw*. Evaluasi dilakukan untuk mengetahui pengaruh perubahan suhu terhadap kestabilan sediaan. Pengujian dilakukan selama 6 siklus. Satu siklus terdiri dari 48 jam disimpan pada suhu 4 °C dan 48 jam pada suhu 40°C. Diamati ada tidaknya pemisahan fasa pada suhu kamar pada akhir siklus ke 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 dan dilakukan pengukuran ukuran globul pada setiap akhir siklus *freeze-thaw*.

#### **4.12.9 Uji iritasi kulit**

Uji iritasi kulit dilakukan pada punggung kelinci yang sebelumnya telah dibersihkan dari bulu dengan menggunakan alat pencukur listrik. Kelinci dibiarkan selama 24 jam sebelum perlakuan. Kelinci yang digunakan adalah kelinci normal dan bebas luka. Sediaan krim ditimbang masing-masing 0,5 g dan dioleskan pada bagian punggung yang telah ditetapkan, ditutup dengan kasa hidrofili, plastik selofan, kapas, dan kemudian direkatkan dengan plester hipoalergenik. Punggung kelinci dibalut dengan perban dan dibiarkan minimal 4

jam. Eritema dan udem diamati pada jam ke 24, 48, dan 72 jam setelah perlakuan. Iritasi ditentukan dengan menggunakan tiga ekor kelinci dan nilai skor iritasi ketiga kelinci ditentukan berdasarkan pedoman skor iritasi. Selanjutnya berdasarkan skor eritema dan udem masing-masing kelinci dihitung Indeks Iritasi Kutan Primer.

