

## **BAB IV**

### **PROSEDUR KERJA**

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

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah manggis (*Garcinia Magostana L.*) yang diperoleh dari perkebunan Wanayasa, Purwakarta.

##### **4.1.1. Determinasi tanaman**

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

##### **4.1.2. Pembuatan simplisia**

Perlakuan awal yang dilakukan dalam pengolahan simplisia kulit buah manggis setelah terkumpul, yaitu kulit buah manggis dicuci, dirajang, dan dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari di dalam rumah plastik.

#### **4.2. Penapisan Fitokimia**

Dilakukan penapisan fitokimia simplisia kulit buah manggis. Prosedur penapisan fitokimia yang dilakukan adalah sebagai berikut :

##### **4.2.1. Golongan senyawa alkaloid**

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia digerus kuat dengan 5 ml ammonia 21% dan 20 ml kloroform kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi 2 bagian. Filtrat bagian pertama diteteskan pada kertas saring dan ditambahkan beberapa tetes pereaksi Dragendorff. Warna merah atau jingga yang terbentuk pada kertas saring menunjukkan adanya alkaloid pada simplisia. Filtrat

bagian kedua diekstraksi cair- cair dengan asam klorida 10% dan pada lapisan air ditambahkan masing-masing pereaksi Dragendorff dan pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan jingga pada lapisan air yang ditambahkan pereaksi Dragendorff dan endapan putih pada lapisan air yang ditambahkan pereaksi Mayer menunjukkan adanya alkaloid pada simplisia (Farnsworth, 1966:245).

#### **4.2.2. Golongan senyawa flavonoid**

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia ditambah 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Sebagian filtrat yang diperoleh (larutan A) ditambah serbuk magnesium dan asam klorida pekat, kemudian ditambah amil alkohol, lalu dikocok dengan kuat. Timbulnya warna pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid. Sisa larutan A digunakan untuk pemeriksaan tannin, saponin, dan kuinon (Farnsworth, 1966:262).

#### **4.2.3. Golongan senyawa monoterpenoid dan seskuiterpenoid**

Simplisia ditambahkan eter, dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Ke dalam hasil filtrat ditambahkan larutan vanilin 10 % dan asam sulfat pekat. Terjadi warna-warna menunjukkan senyawa monoterpenoid dan seskuiterpenoid (Farnsworth, 1966:263)

#### **4.2.4. Golongan senyawa polifenolat dan tanin**

Sebanyak 5 mL larutan A direaksikan dengan beberapa tetes larutan besi (III) klorida. Terbentuknya warna biru, ungu, dan hitam menunjukkan adanya tanin pada simplisia. Sebanyak 5 mL larutan A ditambahkan larutan gelatin. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya tanin pada simplisia. Sebanyak

5 ml larutan A direaksikan dengan beberapa tetes pereaksi Steasny. Terbentuknya endapan merah menunjukkan adanya tanin katekat pada simplisia. Campuran kemudian disaring dan filtrat yang diperoleh ditambahkan beberapa tetes natrium asetat dan besi (III) klorida. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat pada simplisia (Farnsworth, 1966:264).

#### **4.2.5. Golongan senyawa steroid dan triterpenoid**

Simplisia digerus dengan eter, lalu dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan pereaksi Lieberman Burchard. Warna ungu yang timbul menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966:259).

#### **4.2.6. Golongan senyawa kuinon**

Sebanyak 5 mL larutan A ditambahkan dengan beberapa tetes natrium hidroksida 1 N. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya kuinon pada simplisia (Farnsworth, 1966:266)

#### **4.2.7. Golongan senyawa saponin**

Sebanyak 10 mL larutan A tabung reaksi dikocok dengan arah vertikal selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa setinggi minimal 1 cm selama 10 menit, kemudian ditambah beberapa tetes asam klorida. Busa yang tidak hilang menunjukkan adanya saponin pada simplisia (Farnsworth, 1966:263).

### 4.3. Pemeriksaan Karakteristik Mutu Simplisia

#### 4.3.1. Pemeriksaan kadar air dengan metode Azeotroph

Tabung penampung dan kondensor dibilas dengan air, kemudian dikeringkan didalam oven. Dimasukkan 200 mL toluen yang telah dijenuhkan dengan aquadest, masukkan sejumlah simplisia 25 gram yang diperkirakan mengandung air 2-3 mL ke dalam labu bundar. Lalu dididihkan perlahan-lahan selama kurang lebih 15 menit (tambahkan serpihan batu didih). Setelah mendidih, suling dengan kecepatan 2 tetes/ detik hingga sebagian besar air tersuling, naikan kecepatan penyulingan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bilas bagian kondensor dengan toluen. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit, kemudian hentikan pemanasan. Dinginkan tabung penerima sampai suhu kamar, hilangkan tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima. Biarkan air dan toluen dalam tabung penerima memisah. Baca volume air dalam tabung penerima. Hitung kadar air dalam % dengan rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{volume air (ml)} \times \text{Bj air (g/ml)}}{25 \text{ gram simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

(DepKes RI, 2000:14)

#### 4.3.2. Pemeriksaan kadar abu total

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, 2000:17)

#### 4.3.3. Kadar sari larut air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia kulit buah manggis dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air dan 10 tetes kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama enam jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam lalu disaring. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara, kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam air dinyatakan dalam persen (%), dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. Kadar sari larut air dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{berat sari larut air (gram)}}{\text{berat bahan awal (gram)}} \times 100\% \quad (3)$$

(DepKes RI, 2000:31)

#### 4.3.4. Kadar sari larut etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia kulit buah manggis dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama enam jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam lalu disaring dengan cepat untuk menghindari penguapan etanol. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara, kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dinyatakan dalam persen (%) dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. Kadar sari larut etanol dihitung dengan rumus

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{berat sari larut etanol (gram)}}{\text{berat bahan awal (gram)}} \times 100\% \quad (4)$$

(DepKes RI, 2000:31)

#### **4.4. Pembuatan ekstrak kulit buah manggis**

Metode yang dilakukan pada proses ekstraksi ini yaitu menggunakan metode maserasi. Simplisia kulit buah manggis sebanyak 1 kg dimasukan ke dalam wadah kaca. Setelah itu dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 5 liter selama 4-5 hari dengan beberapa kali pengadukan. Setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan ampas dan filtratnya. Kemudian dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C untuk menguapkan pelarut dan pemekatan ekstraknya sehingga diperoleh ekstrak kental.

#### **4.5. Penentuan KHM Ekstrak Kulit Buah Manggis Terhadap *Malassezia.sp***

##### **4.5.1. Sterilisasi alat**

Bahan dan peralatan yang akan digunakan dalam penentuan KHM harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan dan peralatan tersebut tidak boleh didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya. Mikroba yang dimaksud adalah mikroba yang tidak baik yang dapat mengganggu atau merusak media ataupun mengganggu pertumbuhan jamur dan proses yang sedang dikerjakan.

##### **4.5.2. Pembuatan medium pertumbuhan**

Media SDA (*Saburoud Dextrose Agar*) terbuat dari serbuk SDA sebanyak 16,25 gram dilarutkan dalam 250 mL aquadest, ditambahkan chlorampenicol dan minyak zaitun dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih diangkat lalu disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C.

#### 4.5.3. Uji aktivitas antifungi terhadap jamur

Sterilisasi alat dan media SDA dilakukan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Kemudian dibuat lempeng agar dengan cara 20 mL agar (SDA) cair dicampur dengan 0,5 mL inokulum *Malassezia.sp*, dituangkan ke dalam cawan petri, dihomogenkan lalu dibiarkan sampai menjadi padat. Agar yang sudah memadat diberi lubang-lubang sumur. Pada tiap lubang diteteskan ekstrak etanol kulit buah manggis dengan konsentrasi 1;1,2 dan 1,4%, kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu ruangan selama 20-30 menit. Dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam, setelah itu amati diameter hambatnya.

#### 4.6. Orientasi basis sampo

Timbang semua bahan yang digunakan sesuai dengan kebutuhan. Basis terdiri dari natrium lauril sulfat, cocamide DEA, natrium benzoat, natrium klorida, natrium EDTA, dan aquadest. Natrium lauril sulfat digerus ditambahkan aquadest kemudian dikocok menggunakan stirer dengan kecepatan antara 100-150 rpm selama  $\pm 1$  menit, setelah itu ditambahkan cocamide DEA lalu distirer selama  $\pm 5$  menit hingga homogen. Campuran natrium lauril sulfat dan cocamide DEA yang sudah homogen tersebut ditambahkan natrium EDTA, natrium klorida, dan natrium benzoat yang sebelumnya telah dilarutkan dalam aquadest lalu distirer kembali hingga membentuk sediaan kental.

Formulasi basis yang akan digunakan untuk membuat sediaan sampo antiketombe dapat dilihat pada **Tabel III.1**

Tabel III.1 Orientasi basis sediaan sampo

Bahan	Konsentrasi (%)			
	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
Natrium lauril sulfat	8	8	5	5
Cocamide DEA	2	4	4	5
Natrium klorida	3,3	3,3	3,3	3,3
Natrium EDTA	0,5	0,5	0,5	0,5
Natrium benzoat	0,25	0,25	0,25	0,25
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

#### 4.6.1. Evaluasi basis

##### 1) Pengamatan organoleptis

Analisis organoleptis dilakukan dengan mengamati perubahan-perubahan bentuk, bau, dan warna basis sediaan sampo antiketombe yang mengandung berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah manggis. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 4 minggu penyimpanan.

##### 2) Pengukuran tinggi busa

Sediaan sampo antiketombe yang mengandung ekstrak kulit buah manggis dibuat larutannya 1% dalam air. Kemudian dimasukkan kedalam gelas ukur bertutup, dan dikocok selama 20 detik dengan cara membalikkan gelas ukur secara beraturan. Kemudian diukur tinggi busa yang terbentuk. Pengukuran dilakukan setiap minggu selama 4 minggu penyimpanan.

##### 3) Pengukuran pH

Pengukuran pH sediaan sampo antiketombe ekstrak etanol kulit buah manggis dilakukan dengan menggunakan pH meter digital, dengan cara terlebih dahulu diencerkan dengan aquadest dengan perbandingan 1 : 10. Elektroda pada pH meter digital dicelupkan ke dalam larutan sampai

menunjukkan angka yang stabil. Pengukuran dilakukan seminggu sekali selama 4 minggu penyimpanan.

#### 4) Pengukuran viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan alat Brookfield model RV dengan kecepatan pemutar (spindel) yang sesuai. Pengukuran dilakukan setiap minggu selama 4 minggu penyimpanan.

### 4.7. Formulasi Sediaan Sampo

Parameter pada formula sediaan sampo ini akan membedakan tingkat konsentrasi *cocamide DEA* sebagai surfaktan sekunder.

Formulasi sediaan sampo antiketombe dari ekstrak etanol kulit buah manggis adalah natrium lauril sulfat, *cocamide DEA*, ekstrak etanol kulit buah manggis terpilih, natrium benzoat, natrium klorida, natrium EDTA, dan aquadest. Natrium lauril sulfat digerus terlebih dahulu ditambahkan aquadest kemudian dikocok menggunakan stirer dengan kecepatan antara 100-150 rpm selama  $\pm$  1menit, setelah itu ditambahkan *cocamide DEA* lalu distirer selama  $\pm$  5 menit hingga homogen. Campuran natrium lauril sulfat dan *cocamide DEA* yang sudah homogen tersebut ditambahkan natrium EDTA, natrium klorida, dan natrium benzoat yang sebelumnya telah dilarutkan dengan aquadest lalu distirer kembali hingga membentuk sediaan kental, kemudiaan ditambahkan ekstrak etanol kulit buah manggis terpilih.

Formulasi yang akan digunakan untuk membuat sediaan sampo antiketombe menggunakan ekstrak etanol kulit buah manggis dapat dilihat pada

**Tabel III.2**

**Tabel III.2** Formulasi Sediaan Sampo

Bahan	Konsentrasi (%)
	Formula 2
Natrium lauril sulfat	8
Cocamide DEA	4
Ekstrak etanol kulit buah manggis	3
Natrium klorida	3,3
Natrium EDTA	0,5
Natrium benzoat	0,25
Aquadest	ad 100

#### 4.7.1. Pengujian aktivitas sediaan sampo antiketombe

Aktivitas antijamur dalam bentuk sediaan sampo diuji terhadap jamur *Malassezia.sp* dengan metode difusi agar. Pengujian aktivitas antijamur bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas antijamur pada sediaan sampo dari ekstrak kulit buah manggis terpilih.

Pengujian ini dilakukan menggunakan medium *Saburoud Dextrose Agar* (SDA) yang ditambahkan dengan chlorampenicol dan minyak zaitun. Medium SDA diletakkan pada penangas air dan didinginkan hingga suhunya mencapai 45°C. Kemudian media dicampurkan dengan suspensi jamur ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Pengujian dilakukan terhadap sediaan sampo ekstrak kulit buah manggis terpilih, kontrol (-) dan (+). Kontrol (+) yang digunakan adalah sediaan sampo pembanding, kontrol (-) yang digunakan adalah basis dari formula.

Disiapkan 3 cawan petri, pada setiap cawan petri diberi lubang-lubang sumur. Pada setiap lubang ditetaskan kontrol positif (+), kontrol (-), dan sediaan sampo ekstrak etanol kulit buah manggis. Kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu ruangan selama 20-30 menit. Dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam. Diameter yang terjadi diamati dan ditentukan nilai diameter hambat yang terjadi.

#### **4.7.2. Uji keamanan sediaan**

Uji iritasi mata, sebagai binatang percobaan digunakan kelinci jantan, dan sebagai sediaan uji adalah larutan sediaan sampo. Dibuat larutan 1% sediaan sampo, kemudian sediaan sampo yang sudah diencerkan diambil 0,1 mL ditetaskan ke dalam salah satu mata kelinci pada bagian dalam konjungtiva dan mata yang satunya lagi digunakan sebagai kontrol. Setelah ditetaskan, mata kelinci dipejamkan selama 1 menit. Pengamatan dilakukan selama 24-72 jam setelah penetesan, meliputi reaksi-reaksi yang terjadi pada pupil, konjungtiva, dan air mata (OECD,2002:1-14).