

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1 Pengumpulan Bahan Tanaman dan Determinasi

Tanaman daun jawer kotok diperoleh dari kebun percobaan tanaman obat Manoko, lembang. Selanjutnya dilakukan determinasi terhadap tanaman jawer kotok di Herbarium Jatinangor Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi, Universitas Padjajaran.

4.2 Penyiapan Simplisia

Daun jawer kotok dikumpulkan lalu dicuci bersih, ditiriskan, kemudian diangin-anginkan di tempat terbuka yang terlindung dari cahaya matahari langsung. Selanjutnya sampel dihaluskan dengan menggunakan blender . Hasilnya dimasukkan ke dalam wadah gelas tertutup.

4.3 Penetapan Parameter Spesifik dan Non Spesifik

Penetapan parameter spesifik yaitu meliputi organoleptis yaitu bau, bentuk dan warna. Parameter non spesifik dilakukan dengan menetapkan kadar air, kadar abu dan kadar sari pada simplisia daun jawer kotok.

4.3.1 Penetapan kadar Abu

Lebih kurang 2-3 gram zat yang telah digerus ditimbang seksama, masukkan ke dalam krus platina atau krus silikat yang telah dipijarkan dan telah ditara, ratakan. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dianginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989:536).

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{berat abu (gram)}}{\text{bobot sampel awal (gram)}} \times 100\%$$

4.3.2 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL asam hidroklorida encer selama 5 menit. Bahan yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu dan dicuci dengan air panas. Kemudian dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara. (Depkes RI, 2000:17).

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu (gram)}}{\text{bobot sampel awal (gram)}} \times 100\%$$

4.3.3 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotroph, tahapannya yaitu ke dalam labu destilasi dimasukkan 200 ml toluene yang telah dijenuhkan dengan

aquadest. Simplisia sebanyak 20-25 gram dimasukkan ke dalam labu bundar. Lalu dididihkan perlahan-lahan selama ± 15 menit (tambahkan serpihan porselen), setelah mendidih disuling dengan kecepatan 2 tetes/detik hingga sebagian air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan menjadi 4 tetes/ detik. Setelah semua air tersuling, 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).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{ml air} \times \text{bobot jenis air}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

4.3.4 Penetapan Kadar Sari Larut dalam Air

Serbuk dikeringkan diudara, 5 gram serbuk dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air:klorofom P, menggunakan labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Sejumlah 20 ml filtrat, yang telah disaring, diambil kemudian diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989:540).

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{berat simplisia gram} \times 5}{\text{bobot sampe awal (gram)}} \times 100\%$$

4.3.5 Penetapan Kadar Sari Larut dalam Etanol

Serbuk dikeringkan diudara, 5 gram serbuk dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol 95%, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat disaring cepat untuk menghindarkan penguapan etanol (95%), kemudian diambil 20 ml filtrat dan diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, sisa dipanaskan pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam etanol 95% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989:540).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{berat simplisia gram} \times 5}{\text{bobot sampe awal (gram)}} \times 100\%$$

4.4 Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia ini bertujuan mengetahui kandungan metabolit sekunder yang ada di dalam simplisia dan ekstrak.

4.4.1 Golongan Senyawa Alkaloid

Sampel ditambahkan dengan ammonia 25% kemudian digerus dalam mortar, ditambahkan 20 ml kloroform dan digerus kuat-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 diesktraksi 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, 1966:253).

4.4.2 Golongan senyawa flavonoid

Sampel dicampur dengan bubuk magnesium dengan HCl 2 N. Campuran dipanaskan diatas penangas air, lalu disaring. Ke dalam 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, 1966:263).

4.4.3 Golongan senyawa monoterpenoid dan Seskuioterpenoid

Sampel ditambahkan eter, dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap kemudian dibiarkan hingga kering. Ke dalam hasil filtrat ditambahkan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat. Terjadi warna-warna menunjukkan senyawa mono dan sesquiterpenoid.

4.4.4. Golongan Senyawa Polifenol dan Tanin

Sampel digerus dengan air hingga lumat. Kemudian dipisahkan ke dalam tabung reaksi dan dididihkan selama beberapa menit. Setelah disaring, filtrat dibagi dua bagian :

Filtrat 1 : ke dalam filtrat 1 ditetaskan FeCl_3 , terbentuknya warna hitam hingga biru menunjukkan adanya senyawa polifenol.

Filtrat 2 : ke dalam filtrat 2 ditetaskan larutan gelatin, lalu diamati terjadinya endapan dan gumpalan. Adanya golongan senyawa tanin ditandai dengan terbentuknya gumpalan. Endapan disaring, filtrat ditetesi dengan larutan FeCl_3 , terbentuknya warna hitam menunjukkan bahwa dalam senyawa tersebut terkandung tanin dan polifenol (Farnsworth, 1966:264).

4.4.5 Golongan Senyawa Steroid dan Triterpenoid

Sampel digerus dengan eter kemudian dipipet melalui kapas dengan penyaringan lalu diuapkan hingga kering. Pada residu ditetaskan larutan Liebermen-Burchard atau Carr-price. Adanya golongan triterpenoid menunjukkan adanya senyawa steroid (Farnsworth, 1966:259).

4.4.6 Golongan Senyawa Quinon

Sampel digerus dengan air kemudian disaring dengan kapas. Filtrat ditetesi dengan NaOH dan KOH 5%. Adanya senyawa kuinon ditandai dengan terbentuknya warna merah (Farnsworth, 1966:265).

4.4.7 Golongan Senyawa Saponin

Sampel digerus dengan air hingga lumat, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan sedikit air dan dipanaskan. Setelah dingin dikocok kuat beberapa menit hingga terbentuk buih atau busa. Adanya golongan

saponin ditandai dengan terbentuknya buih atau busa yang bertahan selama 5 hingga 10 menit serta tidak hilang pada penambahan satu tetes larutan HCl 0,1 N (Farnsworth, 1966:258).

4.5 Pembuatan Ekstrak

Ekstrak daun jawa kotok dibuat dengan maserasi. Sebanyak 800 gram simplisia dimasukkan ke dalam maserator kemudian direndam dengan menggunakan larutan etanol 96% sebanyak 3 liter ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 5 hari sambil sesekali diaduk dan dilakukan penggantian pelarut setiap harinya. Setelah 5 hari sampel yang direndam tersebut disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat. Filtrat kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental daun jawa kotok. Ekstrak kemudian ditimbang dan disimpan dalam gelas tertutup sebelum dilakukan pengujian. Persen rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak (g)} \times 100\%}{\text{bobot simplisia (g)}}$$

4.6 Karakterisasi Ekstrak

Karakterisasi mutu ekstrak daun jawa kotok meliputi organoleptis dan penetapan pH ekstrak.

4.6.1 Organoleptis Ekstrak

Parameter organoleptis dilakukan dengan menggunakan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna dan bau. Tujuan dari penetapan parameter organoleptis ekstrak ini adalah sebagai pengenalan awal sederhana yang seobyektif mungkin dari ekstrak yang digunakan (Depkes RI, 2000:31).

4.6.2 Penetapan pH ekstrak

Penetapan pH ekstrak diukur dengan menggunakan pH meter dengan cara 1 gram ekstrak dilarutkan dalam 1 ml aquadest kemudian elektroda dicelupkan ke dalam larutan tersebut, diusahakan volume tidak terlalu sedikit agar katoda dapat terendam dalam larutan.

4.7 Optimasi Basis

Optimasi basis dilakukan untuk menetapkan basis yang paling baik yang digunakan untuk formulasi sediaan gel antiseptik tangan. Formulasinya adalah sebagai berikut :

Tabel IV.1 Formulasi optimasi basis

Nama Bahan (%)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Karbomer	0,25	0,5	0,75	1	-	-	-
Trietanolamin	qs	qs	qs	qs	-	-	-
HPMC	-	-	-	-	0,5	0,75	1
Propilenglikol	10	10	10	10	10	10	10
Aquadest ad	100	100	100	100	100	100	100

Optimasi basis dengan basis karbomer dilakukan dengan cara mengembangkan karbomer 940 terlebih dahulu dalam air panas kemudian ditambahkan propilenglikol dan aquades hingga homogen. Kemudian tambahkan TEA tetes demi tetes hingga terbentuk gel yang jernih. Kemudian diamati organoleptis dan konsistensi pada setiap basis lalu ditentukan formula basis yang paling baik.

Sedangkan untuk basis HPMC dilakukan dengan cara mengembangkan HPMC dalam aquadest panas kemudian ditambahkan propilenglikol diaduk menggunakan *stirrer* hingga homogen. Kemudian diamati konsistensi, organoleptis pada setiap basis lalu ditentukan formula basis yang paling baik.

4.8 Formulasi sediaan gel antiseptik tangan yang mengandung ekstrak daun jawa kotok

Formulasi gel dilakukan dengan menggunakan basis terbaik yang ditambahkan ekstrak daun jawa kotok dengan variasi konsentrasi. Pembuatan sediaan gel dilakukan dengan cara mengembangkan karbomer dalam air panas. Ekstrak, metil paraben dan propil paraben dilarutkan ke dalam propilen glikol kemudian ditambahkan ke dalam larutan karbomer. Tambahkan TEA tetes demi tetes hingga terbentuk gel yang jernih.

4.9 Evaluasi fisik sediaan gel antiseptik tangan

Evaluasi sediaan yang dilakukan meliputi pengamatan organoleptis, warna, bau, homogenitas dan viskositasnya selama waktu penyimpanan

a. Organoleptis

Pengamatan dilakukan dengan melihat konsistensi warna, dan bau dari sediaan gel.

b. Homogenitas

Sampel diletakan diatas kaca objek lalu ditekan dengan kaca objek lainnya hingga rata, kemudian diamati homogenitasnya secara visual.

c. Viskositas dan Rheologi

Penentuan viskositas dilakukan menggunakan viscometer *Brookfield RV* dengan spindel nomer 15 pada rpm 100. Untuk penentuan tipe aliran dilakukan penentuan viskositas pada berbagai rpm dimulai dari 10, 20, 30, 50, 60 dan 100 rpm. Kemudian dilakukan pengukuran viskositas dengan nilai rpm dimulai dari yang terbesar sampai yang terkecil.

d. Pengujian pH

Sediaan yang telah dibuat diukur pHnya menggunakan pH meter yang telah terkalibrasi dengan cara sediaan dilarutkan terlebih dahulu di dalam aquadest kemudian diukur pHnya dengan cara mencelupkan elektroda ke dalam larutan gel. Besarnya pH akan terbaca pada alat.

e. Uji Stabilitas Dipercepat

Sediaan disimpan pada suhu kamar dan 40°C kemudian dilakukan uji organoleptis, homogenitas dan viskositas pada hari ke 1, 7, 14, 21 dan 28.

4.10 Uji aktivitas antiseptik sediaan gel

4.10.1 Sterilisasi alat

Alat –alat yang digunakan dalam penelitian aktivitas ini disterilkan terlebih dahulu. Alat – alat gelas disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121⁰ C selama 15 menit.

4.10.2 Pembuatan Media *Nutrien Agar*

Pembuatan media uji dilakukan dengan melarutkan media *nutrient agar* (NA) ke dalam aquadest dengan takaran sebanyak 20 gram perliter. Kemudian media ini disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C.

4.11 Pengujian Antiseptik Dengan Menggunakan Metode Replika

Pengujian aktivitas antibakteri sediaan gel antiseptik tangan dilakukan pada sediaan gel antiseptik tangan yang telah mengandung ekstrak daun jawaer kotok dengan berbagai konsentrasi, kontrol positif, kontrol negatif (basis gel) dan pembanding yaitu produk gel *handsanitizer* yang terdapat di pasaran. Dilakukan dengan cara metode replika yaitu pertama masukkan media nutrient agar yang sudah steril sebanyak 20 ml ke dalam cawan petri, diamkan hingga memadat. Telapak tangan ditetesi gel sebanyak 4 tetes, tangan diusapkan selama 20 detik. Kemudian ibu jari di *swabb* pada media agar hingga membentuk lintasan zig zag. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, jumlah koloni

bakteri dihitung dengan metode hitung cawan. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali.

