

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Penyiapan bahan uji

Penyiapan herba seledri meliputi pengumpulan bahan, determinasi herba seledri yang diperoleh dari kebun warga di Ciherang-Cipanas Jawa Barat, dan pengolahan herba seledri segar hingga menjadi simplisia kering. Usia tanaman sekitar 3 bulan.

4.1.1. Pengumpulan Bahan Tanaman

Bahan yang digunakan adalah Herba seledri (*Apium graveolens* L.) meliputi batang, daun dan bunga.

4.1.2. Determinasi Tanaman

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

4.1.3. Pengolahan Bahan

Herba seledri dicuci bersih kemudian digantung untuk diangin-anginkan pada suhu ruang sampai setengah kering. Setelah itu dipotong kecil-kecil dan dikeringkan pada suhu 40°C-50°C selama 24 jam.

4.2. Ekstraksi

Simplisia diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Ekstraksi dilakukan selama 2x24 jam dengan 2 kali penggantian pelarut..

Maserat disatukan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga di dapat ekstrak kental

4.3 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia simplisia meliputi pemeriksaan kualitatif senyawa golongan alkaloid, flavonoid, polifenolat, tanin, steroid dan triterpenoid, monoterpen dan seskuiterpen, kuinon dan saponin. Prosedur penapisan fitokimia adalah sebagai berikut:

4.3.1. 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 (Fransworth, 1996:245).

4.3.2. Flavonoid

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia ditambah 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Sebagian filtrate yang diperoleh (larutan A) ditambah serbuk magnesium dan asam klorida pekat, kemudian ditambah amil

alcohol lalu dikocok kuat. Timbulnya warna menunjukkan adanya flavonoid. Sisa larutan A digunakan untuk pemeriksaan tannin, saponin, dan kuinon (Fransworth, 1996:262).

4.3.3. Polifenolat dan Tanin

Sebanyak 5 mL larutan A direaksikan dengan beberapa tetes larutan besi(III) klorida. Terbentuknya warna biru, ungu, dan hitam menunjukkan adanya tannin pada simplisia. Sebanyak 5 mL larutan A ditambahkan larutan gelatin. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya tannin. Sebanyak 5 mL larutan A direaksikan dengan pereaksi steasny, terbentuknya endapan merah menunjukkan adanya tannin katekat pada simplisia. Campuran kemudian disaring dan filtrat yang diperoleh ditambahkan beberapa tetes natrium asetat dan besi (III) kloida, terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tannin galat pada simplisia (Fransworth, 1996:264).

4.3.4. Steroid dan Triterpenoid

Sampel digerus dengan eter, kemudian fase eter diuapkan dalam cawan penguap hingga kering, pada residu ditetesi pereaksi Liberman-Burchard. Terbentuknya warna ungu menunjukkan kandungan triterpenoid sedangkan bila terbentuk warna hijau biru menunjukkan adanya senyawa steroid (Oktaviani,2012:29).

4.3.5. Monoterpen dan Seskuiterpen

Sampel digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap hingga kering, pada residu ditetesi pereaksi vanilin 10% dan asam sulfat

pekat. Terbentuknya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan seskuiterpen (Fransworth, 1996:263).

4.3.6. Kuinon

Sebanyak 5 mL larutan A ditambahkan dengan beberapa tetes natrium hidroksi 1 N, terbentuknya warna merah menunjukkan adanya kuinon pada simplisia (Fransworth, 1996:266).

4.3.7. Saponin

Sebanyak 10 mL larutan A dalam 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 (Fransworth, 1996:263).

4.4. Karakteristik Mutu Simplisia

Karakteristik mutu simplisia meliputi penetapan kadar air simplisia, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam simplisia.

4.4.1. Penetapan Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan dengan cara destilasi, Tabung penerima, labu, dan tabung pendingin dibersihkan, dibilas dengan air lalu dikeringkan. Sebanyak 200 mL toluene dan 2 mL air suling dalam labu selama 2 jam, didinginkan selama 30 menit, dan volume air dibaca sebagai volume destilasi pertama. Sebanyak 2,5 gram serbuk simplisia ditimbang seksama dan dimasukkan

kedalam labu destilasi bersama batu didih. Kemudian labu dipanaskan perlahan hingga cairan didalamnya mendidih. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluene kemudian penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima dilepaskan dengan mengetuk tabung. Air dan toluene dibiarkan memisah menjadi dua lapisan dan volume air dibaca sebagai volume destilasi kedua (DepKes RI, 2000:15). Kadar air dihitung dengan persamaan :

$$\text{Rumus Kadar sari larut air} = \frac{\text{mL air} \times \text{BJ air}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \quad (1)$$

4.4.2. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Sampel digerus kemudian ditimbang sebanyak 5 gram, dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform, berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Filtrat disaring, kemudian diambil 20 mL filtrat untuk diuapkan sampai kering dalam cawan porselen, hasil penguapan dipanaskan pada suhu 105⁰C sampai bobot tetap. Dilakukan penimbangan dan penentuan kadar dalam persen sari larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara Depkes RI,2000:31). Kadar sari larut air dihitung dengan persamaan :

$$\text{Rumus Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat sari}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \quad (2)$$

4.4.3. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Sampel digerus kemudian ditimbang sebanyak 5 gram, dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 95%, berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Filtrat disaring, kemudian diambil 20 mL filtrat untuk diuapkan sampai kering dalam cawan porselen, hasil penguapan dipanaskan menggunakan waterbath dan terkadang dengan oven pada suhu 105⁰C

sampai bobot tetap. Dilakukan penimbangan dan penentuan kadar sari larut dalam etanol 95% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI,2000:31). Kadar sari larut etanol dihitung dengan persamaan :

$$\text{Rumus Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{Berat sari}}{\text{Berat sampel}} \times \frac{100}{20} 100\% \quad (3)$$

4.4.4. Penetapan Kadar Abu Total

2 gram bahan yang telah digerus dan ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam krus yang telah dipijarkan dan ditara. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan, timbang. Jika arangnya tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (DepKes RI, 2000:17). Kadar abu total dihitung dengan persamaan :

$$\text{Rumus Kadar abu total} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \quad (4)$$

4.4.5. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Dalam Asam

Abu yang telah diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL asam sulfat encer P selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (DepKes RI, 2000:17). Kadar abu tidak larut asam dihitung dengan persamaan :

$$\text{Rumus Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \quad (5)$$

4.5. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Etanol Seledri (*Apium graveolens* L) Terhadap jamur *Candida albicans*.

4.5.1. Sterilisasi alat

Alat dan bahan yang digunakan untuk pengujian ini harus dalam keadaan steril agar pengujian memperoleh hasil yang pasti tanpa adanya kontaminasi dari mikroba lain yang tidak diujikan. Sterilisasi yang dilakukan menggunakan metode panas lembab dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4.5.2. Pembuatan media pertumbuhan *Candida albicans*

Media yang digunakan adalah SDA (Sabouraud Dextrose Agar). Pembuatan media dilakukan dengan mencampurkan serbuk SDA dan aquadest dengan perbandingan 65 gr : 1 liter. Campuran tersebut dipanaskan dan distirer hingga media menjadi bening lalu dingkat dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4.5.3 Penyiapan *Candida albicans*

Candida albicans diperoleh dari laboratorium farmasi Institut Teknologi Bandung. Sebelum digunakan biakan yang diperoleh diremajakan terlebih dahulu selama 3 hari pada suhu 37°C. Suspensi *Candida albicans* dibuat dengan mencampurkan beberapa ose biakan kedalam NaCl fisiologis steril hingga diperoleh persen transmittan 25% yang dibaca oleh spektrofotometri.

4.5.4 Penentuan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) ekstrak terhadap *Candida albicans*

Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar. Media padat SDA (Sabouraud Dextrose Agar).

dicairkan hingga suhunya $\pm 50^{\circ}\text{C}$ sebanyak 20 mL dicampur dengan 100 μL suspensi *Candida albicans* dan dibiarkan memadat pada suhu kamar. Media dilubangi menggunakan perforator berukuran 0,6cm. Ekstrak dibuat dengan beberapa konsentrasi yaitu 0,1%; 0,2%; 0,3%; dan 0,4% dengan pelarut DMSO.

Sebanyak 50 μL ekstrak etanol herba seledri (*Apium graveolens L.*) dengan konsentrasi yang sudah dibuat beserta kontrol negatif (pelarut DMSO) dimasukkan ke dalam masing –masing lubang tersebut. Media uji diinkubasi pada suhu 25°C - 29°C selama 18-24 jam kemudian diukur daya hambatnya menggunakan jangka sorong dari 3 sisi.

4.6. Orientasi basis sabun cair

Konsentrasi basis pada formula sabun cair yang dibuat mengacu pada data yang tercantum dalam Handbook of Pharmaceutical Excipient. Komposisi basis sabun cair yang dibuat sebagai berikut :

Tabel IV.1 Orientasi Basis Sabun Cair

Bahan	Formula sediaan			
	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
Triethanolamin lauryl sulfat	1%	1%	-	-
Ammonium lauryl sulfat	-	-	1%	1%
Cocamidopropyl betaine	3%	5%	3%	5%
Poliethilen glycol 400	20%	20%	20%	20%
Propilenglycol	10%	10%	10%	10%
Asam laktat	1,4%	1,4%	1,4%	1,4%
Natrium benzoat	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
Dinatrium EDTA	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Oleum rosae	3gtt	3gtt	3gtt	3gtt
Aquadest	ad 100%	ad 100%	ad 100%	ad 100%

Formula dibuat dengan cara sebagai berikut: Ammonium lauryl sulfat dan cocamidopropyl betain dicampurkan ad homogen (1). Selanjutnya asam laktat, Sodium benzoat dan disodium EDTA dilarutkan masing-masing dalam aquadest (2). Kemudian PEG 400 dicampurkan dengan Propylen glycol (3). Campuran (2) dicampurkan dalam campuran (3) (4). Terakhir campuran 4 di campurkan dengan campuran (1).

4.7 Formulasi Sediaan Sabun Cair

Formula dibuat dengan cara sebagai berikut: Ekstrak sebanyak 0,2g dilarutkan dalam 15g Propylen glycol dan 30g PEG 400 lalu distrirer selama 15 menit dengan kecepatan 100 rpm (1) . Ammonium lauryl sulfat 1,5g dan cocamidopropyl betain 7,5g dicampurkan ad homogen (2). Selanjutnya asam laktat 2,1g, Sodium benzoat 0,3g dan disodium EDTA 0,15g dilarutkan masing-masing dalam aquadest ad homogen(3). Kemudian campuran (3) dicampurkan dalam larutan (1)(4). Setelah itu larutan (4) dicampurkan dengan campuran (2) dan sistrirer kembali selama 2 menit. Setelah itu tambahkan aquadest ad 150g dan oleum rosae sebanyak 3 tetes. Kemudian diaduk hingga homogen dan dikemas dalam wadah tertutup baik.

4.8 Uji hedonik basis sabun cair

Uji hedonik terhadap 4 formula dilakukan kepada 10 orang panelis wanita yang dipilih secara acak. Masing – masing formula diaplikasikan pada tangan panelis sebanyak 3mL, lalu di lihat pembusaannya setelah sabun

digosokan pada telapak tangan, kecepatan pembersihan busa dengan cara mengukur waktu pembersihannya menggunakan stopwatch dan pembersihan digunakan air mengalir. Kemudian setelah tangan bersih dari busa dan kering dirasakan rasa panas serta kelembabannya.

Pengujian ini dilakukan terhadap masing-masing formula dengan selang waktu 2 menit untuk setiap formula setelah tangan benar – benar kering dan bersih dari busa sebelumnya.

4.9 Evaluasi Sediaan Sabun Cair

Evaluasi sediaan sabun cair dilakukan untuk mengetahui kestabilan sediaan. Evaluasi sediaan meliputi evaluasi fisika, kimia dan biologi. Formula disimpan selama 28 hari pada suhu 40 °C. dan dievaluasi pada hari ke 7, 14, 21 dan ke-28. Evaluasi sediaan mengikuti evaluasi sabun mandi cair berdasarkan SNI dengan tambahan evaluasi pH mengikuti pH vagina, kecepatan pembersihan busa ALT (Angka lempeng total) dan AKK (Angka kapang khamir). Sedangkan untuk evaluasi uji aktivitas sediaan digunakan metode difusi agar dan metode waktu kontak. Prosedur evaluasi sebagai berikut:

4.9.1 Pemeriksaan organoleptis

Pemeriksaan organoleptis meliputi kestabilan bentuk, warna dan bau.

4.9.2 Pengukuran pH

Pengukuran pH menggunakan pH meter yang terdiri dari gabungan elektroda gelas hidrogen sebagai standar polimer dan elektroda kalomel reference sebagai pasangan elektroda ini, akan menghasilkan perubahan tegangan 59,1

mv/pH unit pada 25°C (SNI, 1996:2). Sebelum alat digunakan , alat dikalibrasi terlebih dahulu dengan pH 4 untuk asam, pH 7 untuk netral dan pH 9 untuk basa. Setelah kalibrasi selesai, elektroda dicelupkan kedalam sediaan lalu hasilnya dibaca.

4.9.3 Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan menggunakan viskometer brookfield LV karena sediaan yang dihasilkan sangat cair. Spindel yang digunakan adalah spindel no 61 dengan kecepatan 100 rpm dan sediaan diukur viskositasnya selama 30 detik.

4.9.4 Bobot jenis

Prinsip dari pengujian bobot jenis ini adalah perbandingan bobot contoh dengan bobot air pada volume dan suhu yang sama. Piknometer dibilas dengan aseton kemudian dengan dietil eter, setelah itu dikeringkan dan ditimbang. Sediaan didinginkan dengan dimasukan kedalam piknometer yang terendam air es, kemudian dibiarkan sampai suhu 25°C. Piknometer diangkat dan didiamkan pada suhu kamar. Pekerjaan diulangi dengan memakai air suling sebagai pengganti sediaan. BJ dihitung dengan rumus berikut :

$$\text{Bobot jenis, } 25^{\circ}\text{C} = \frac{W}{W_1} \quad (6)$$

Keterangan :

W : Bobot contoh (sediaan)
 W₁ : Bobot air
 (SNI, 1996:7).

4.9.5 Alkali bebas

Alkali bebas dilakukan dengan menitar alkali bebas dalam sediaan dengan larutan baku asam. Sebanyak 5 gr sediaan ditimbang dan dimasukkan kedalam labu bundar 250ml. Kemudian ditambahkan etanol 95% kedalam labu bundar dengan batu didih didalamnya. Ditambahkan juga indikator phenol phtalein 1% sebanyak 3 tetes. Labu bundar berisi campuran dipasang pada alat refluks dan dididihkan selmama 30 menit mndidih. Bila larutan berwarna merah, titar dengan HCl 0,1 N dalam alkohol sampai warna merah tepat hilang. Lalu hitung kadarnya dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar alkali bebas dihitung sebagai NaOH} = \frac{V \times N \times 0,04}{W} \times 100\% \quad (7)$$

Keterangan :

V : Volume HCl yang digunakan untuk titrasi, mL
 N : Normalitas HCl
 W : Bobot contoh, g
 0,04 : Bobot setara NAOH (SNI, 1996:3-4).

4.9.6 Angka Lempeng Total

Angka lempeng total adalah pengujian untuk menghitung bakteri setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang cocok selama 24-48 jam pada suhu $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Pada pengujian ALT digunakan NA (Nutrient Agar) sebagai media dan bakteri *Escherichia coli* sebagai kontrol positif.

Media NA steril dicairkan lalu didiamkan hingga suhunya 45°C - 50°C . Dibuat pengenceran pada sediaan (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6}), menggunakan aquadest steril. 14 cawan steril disiapkan lalu ditandai dengan tingkat pengenceran. Masing –masing pengenceran dilakukan duplo dan 1 cawan

untuk kontrol positif serta negatif. Media NA dicampurkan dengan masing – masing variasi pengenceran sediaan dalam cawan. Kemudian digoyangkan hingga homogen dan dibiarkan memadat. Dilakukan juga terhadap kontrol dimana kontrol positif berisi media dan *E.coli* dan kontrol negatif hanya media NA saja. lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan dihitung koloni yang tumbuh.

4.9.7 Angka Kapang Khamir

Angka kapang khamir adalah pengujian untuk menghitung jamur setelah contoh diinkubasikan dalam pembedihan yang cocok selama pada suhu 25°C selama 6 hari. Pada pengujian AKK digunakan PDA (Potato Desxtrose Agar + kloramfenicol 100mg) sebagai media dan *Candida albicans* sebagai kontrol positif . Prosedur pengerjaan sama dengan pengujian ALT namun inkubasi dilakukan pada suhu 25°C selama 6 hari.

4.9.8 Kecepatan pembersihan busa

Pengujian kecepatan pembersihan busa diukur menggunakan stopwatch dengan pembersihan menggunakan air mengalir.

4.10 Uji aktivitas sediaan sabun cair terhadap *Candida albicans*

4.10.1 Metode difusi agar

Prosedur pengujian aktivitas sediaan sama dengan pengujian penentuan KHM dengan menggunakan metode difusi agar dan diukur zona bening penghambatannya. Pengujian ini dilakukan terhadap sediaan uji, pembanding sabun cair inovator (Resik-V sabun sirih)®, kontrol positif (ekstrak herba seledri 0,2%), kontrol negatif (basis sabun cair). Hasil uji sediaan dan basis serta sediaan

dan pembandingan dihitung secara statistik menggunakan SPSS Paired Sample t-Test.

4.10.2 Metode waktu kontak

Penentuan waktu kontak sediaan sabun cair dilakukan dengan cara memasukkan 100 μ L suspensi *Candida albicans* pada 3 mL sediaan. Setelah didiamkan selama 15, 30, 45, 60 dan 90 detik masing-masing campuran tersebut diambil 1 ose lalu digores pada media SDA di cawan Petri. Cawan di inkubasi pada suhu 25⁰C selama 18-24 jam, kemudian di amati hasilnya. Perlakuan yang sama dilakukan juga pada sabun cair pembandingan (Mardliyani,2012:25).