

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Pengumpulan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak biji mimba yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat di Bogor.

4.2. Determinasi Bahan

Sebelum digunakan bahan tanaman yang digunakan di determinasi di Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi, FMIPA UNPAD untuk mengetahui kebenaran jenis tanaman yang digunakan.

4.3. Penanganan Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah kelinci Albino Hibrid *New Zealand*. Bulu punggung kelinci dicukur dengan menggunakan alat pencukur. Punggung kelinci yang sudah dicukur dibersihkan dengan alkohol 70%.

4.4. Pembuatan Ekstrak Udang

Udang yang digunakan sebagai alergen adalah udang peci (*Penaeus indicus*) yang diperoleh dari Saribakti Subang. Udang peci (*Penaeus indicus*) segar dicuci dan daging dipisahkan dari pengotornya. Daging udang yang telah dibersihkan kemudian dimaserasi dengan etil asetat selama 24 jam untuk menghilangkan lemak. Setelah

disaring daging udang dikeringkan pada suhu kamar. Daging udang yang telah kering diblender dengan dapar fosfat isotonis pH 8 selama 5 menit dengan perbandingan 1 : 3. Campuran yang sudah diblender di sentrifugasi selama 15 menit kemudian supernatannya diambil. Larutan ekstrak udang diencerkan dengan NaCl 0,9% b/v sehingga diperoleh konsentrasi 32% b/v dan 10% b/v. Selanjutnya ekstrak udang disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C. Larutan ekstrak udang disimpan di dalam lemari pendingin (Sherlly, 2005).

4.5. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia simplisia meliputi pemeriksaan kualitatif adanya senyawa tertentu antara lain flavonoid, alkaloid, saponin, triterpenoid, tanin, fenolat dan kuinon.

4.5.1. Senyawa Flavonoid

Minyak biji mimba ditambah larutan etanol 95% sebanyak 1ml, kemudian tambahkan serbuk Mg dan 1ml HCl pekat. Jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu yang dapat ditarik oleh amil alkohol menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron (Depkes RI, 1995)

4.5.2. Senyawa Alkaloid

Minyak biji mimba ditambah dengan 1 ml HCl 2N dan 9 ml air, kemudian dipanaskan pada penangas air 60°C selama 2 menit dan dinginkan. Pindahkan masing-masing 3 tetes minyak biji mimba pada kaca arloji. Tambahkan 2 tetes Mayer LP, apabila terjadi endapan putih atau kuning yang larut dalam metanol P

menunjukkan adanya alkaloid. Tambahkan 2 tetes Lieberman Bouchardat LP pada filtrat berikutnya, jika terbentuk endapan putih coklat sampai hitam maka menunjukkan alkaloid (Depkes RI, 1995).

4.5.3. Senyawa Saponin

Minyak biji mimba dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dipanaskan dalam penangas air selama 2-3 menit. dinginkan kembali pada suhu kamar lalu dikocok kuat. Uji positif saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa stabil setinggi 1 cm sedikitnya 10 menit pada penambahan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang (Depkes RI, 1995).

4.5.4. Senyawa Triterpenoid

Pada plat tetes diletakkan minyak biji mimba ditambah larutan pereaksi Lieberman-Buchardart. Perubahan warna menjadi biru menunjukkan steroid positif dan perubahan warna ungu menunjukkan triterpenoid positif (Fransworth, 1996)

4.5.5. Senyawa Tanin

Minyak biji mimba ditambah larutan HCl 2N kemudian dipanaskan di penangas air selama 30 menit. Perubahan warna merah menunjukkan tanin positif (Harborne, 1996).

4.5.6. Senyawa Fenolat

Minyak biji mimba ditambah pereaksi FeCl_3 1% dalam air. Fenolat positif bila terjadi perubahan warna biru hijau (Harborne, 1996).

4.5.7. Senyawa Kuinon

Minyak biji mimba dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan NaOH 5% dan timbulnya warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon(Harborne, 1996).

4.6. Formulasi Krim

Krim diformulasi dengan tipe minyak dalam air (m/a) yang mengandung minyak biji mimba dengan emulgator TEA dengan konsentrasi 4%. Komposisi krim selengkapnya dapat dilihat pada tabel IV.1.

Fase minyak dibuat dengan cara melebur propil paraben dan TEA secara berturut-turut dalam cawan porselen diatas penangas air hingga suhu 70 °C sambil diaduk hingga homogen. Fase air dibuat dengan cara memanaskan air hingga 70 °C dalam gelas piala kemudian taburkan CMC Na diatas air panas, tambahkan metil paraben dan propilenglikol sambil diaduk hingga homogen. Selanjutnya fase minyak dituang ke dalam fase air, gerus hingga terbentuk basis krim. Krim yang terbentuk didiamkan hingga suhu 50 °C, kemudian ditambahkan α -tokoferol, etanol 95% dan minyak biji mimba sedikit demi sedikit, diaduk hingga homogen.

Tabel IV.1 Formula Krim

Komposisi	Fungsi	Konsentrasi (%)			
		Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
Minyak Biji Mimba	Zat Aktif	10	15	20	
Fase Minyak					
TEA	Emulgator	4	4	4	4
Etanol 96%	Peningkat penetrasi	6	6	6	6
Propil Paraben	Pengawet	0,02	0,02	0,02	0,02
Alfa tokoferol	Antioksidan	0,05	0,05	0,05	0,05
Fase Air					
CMC-Na	Peningkat Viskositas	0,5	0,5	0,5	0,5
Propilenglikol	Humektan	10	10	10	10
Metil Paraben	Pengawet	0,18	0,18	0,18	0,18
Aquadestillata	Pelarut	69,75	64,75	59,75	79,75

Keterangan :

Formula 1 = Krim Minyak Biji Mimba 10%

Formula 3 = Krim Minyak Biji Mimba 20%

Formula 2 = Krim Minyak Biji Mimba 15%

Formula 4 = Basis Krim

4.7. Evaluasi Sediaan Krim**4.7.1. Pengamatan Organoleptik**

Pengamatan organoleptik terhadap sediaan krim yang dibuat dilakukan dengan mengamati stabilitas dari sediaan seperti perubahan warna, bau, dan penampilan.

4.7.2. Homogenitas Sediaan

Homogenitas sediaan krim dievaluasi dengan mengoleskan sediaan pada permukaan kaca objek kemudian disebarkan dengan bantuan kaca objek yang lain untuk mendapatkan permukaan yang homogen.

4.7.3. Penentuan Tipe Emulsi

Penentuan tipe emulsi dapat dilakukan dengan berbagai cara pengujian yaitu metode pengenceran. Sedikit air diberikan ke dalam sebuah contoh kecil emulsi dan setelah pengocokan atau pengadukan diperoleh kembali suatu emulsi homogen, maka terdapat jenis M/A. metode pengenceran juga dapat dilakukan sebagai berikut : 1 tetes emulsi diberikan ke dalam air dan secara cepat akan terdistribusi (kadang wadah dikocok perlahan), maka terdapat emulsi M/A, 1 tetes emulsi A/M tertinggal pada permukaan air (Voight, 1994).

4.7.4. Pengukuran pH Sediaan

Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter.

4.7.5. Viskositas

Penentuan viskositas krim dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield. Sediaan krim dimasukan ke dalam wadah, pasang spindel no. 15 pada gantungan spindel. Turunkan spindel sedemikian rupa sehingga batas spindel tercelup ke dalam krim (Martin, A., J. Swarbick & A. Cammarata. 1993).

4.8. Induksi Alergi pada Kelinci

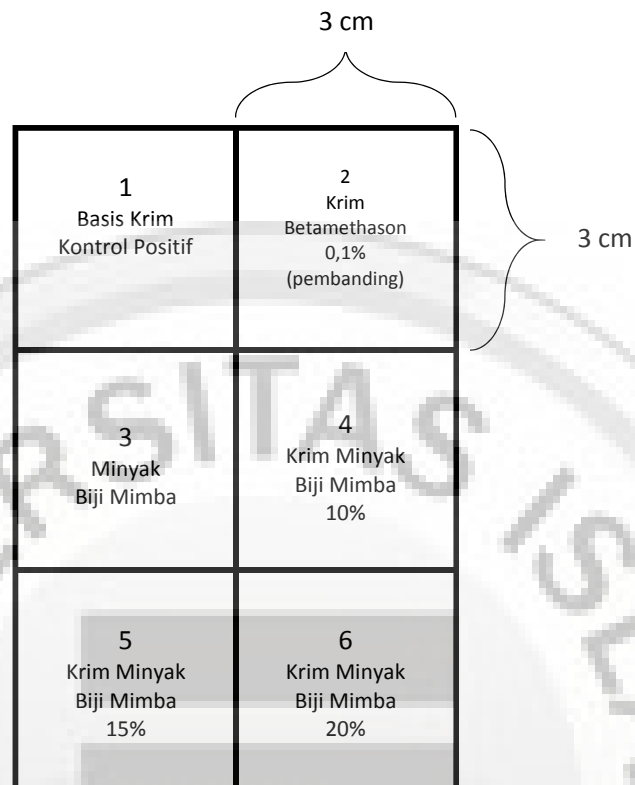
Induksi alergi dilakukan pada 5 ekor kelinci dengan bobot 1,5-2,5 kg. Masing-masing kelinci diinduksi alergi dengan pemberian ekstrak udang 32% sebanyak 2 ml/kg BB secara subkutan. Kelinci yang telah diinduksi alergi selanjutnya dibiarkan selama 23 hari sebagai masa sensitisasi agar terbentuk cukup antibodi terhadap

ekstrak udang sebagai alergen. Selama masa sensitisasi kelinci disimpan di dalam kandang dan diberi makan berupa sayuran dan minum air mineral.

4.9. Tahap Penantangan dan Uji Aktivitas Antialergi Krim Uji

Pada hari ke 23 masing-masing bulu punggung kelinci dicukur, kemudian disuntikkan 0,1 ml ekstrak udang 10% b/v secara intradermal pada 6 titik punggung kelinci.

Satu jam setelah tahap penantangan, maka muncul bentol di daerah penyuntikan alergen sebagai reaksi anafilaksis kutan aktif, selanjutnya diameter bentol diukur dengan cara menjiplak daerah bentol dan mengukur menggunakan jangka sorong. Kemudian pada masing-masing 3 titik bentol diaplikasikan krim minyak biji mimba 10% b/b, 15% b/b, dan 20% b/b. Satu titik diaplikasikan minyak biji mimba, satu titik diaplikasikan krim betametason 0,1% (pembeding) dan satu titik lain dioleskan basis krim (kontrol positif). Luas area pengaplikasian adalah 3 x 3 cm. Untuk melihat pembagian area pengaplikasian sediaan pada punggung kelinci lihat gambar III.1. Bagian yang telah diaplikasikan sediaan uji selanjutnya ditutup dengan kasa hipoalergi. Setelah 1 jam kasa dibuka kembali, kemudian diameter bentol diukur kembali, daerah pengolesan sediaan dibersihkan dengan alkohol 70% untuk menghilangkan sisa sediaan yang telah diaplikasikan. Pada jam ke 2 dan 24 dilakukan perlakuan yang sama seperti sebelumnya. Hasil perhitungan diameter bentol setelah diberikan perlakuan dibandingkan dengan diameter sebelum perlakuan.



Gambar IV.1 Skema pembagian area pengaplikasian sediaan pada punggung kelinci

4.10. Analisis Data

Uji aktivitas antialergi dilakukan dengan mengukur diameter bentol yang terbentuk. Hasil dari pengukuran diameter bentol selanjutnya diuji secara statistik dengan menggunakan metode student-T untuk membandingkan diameter bentol sebelum dan sesudah pengaplikasian masing-masing sediaan uji. Perbandingan efek perubahan diameter bentol antar kelompok pada jam yang sama diuji secara statistik dengan metode Analisis Variansi (ANOVA) dan uji lanjutan HSD dengan selang kepercayaan 95%.