

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Pengumpulan Tanaman dan Jamur

Tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*, L. Willd.) yang diperoleh dari Balai Tanaman Rempah dan Obat Manoko, Lembang, Bandung. Jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Malassezia Sp* yang diperoleh dari PT. Biofarma, Pasteur.

4.2. Determinasi Tanaman dan Jamur

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

4.3. Pembuatan Simplisia

Rimpang lengkuas segar dicuci hingga terpisah dari pengotornya, kemudian disortasi basah, dilakukan pengeringan terhadap rimpang lengkuas dengan cara diangin-anginkan pada suhu 50°-60°C selama 2-3 hari, kemudian dilakukan sortasi kering dan ditimbang berat rimpang kering dengan berat 1 kg dari berat rimpang segar 7 kg, selanjutnya dilakukan perajangan.

4.4. Pembuatan Ekstrak Rimpang Lengkuas

Metode ekstraksi yang dilakukan pada proses pembuatan ekstrak rimpang lengkuas ini dilakukan menggunakan metode maserasi. Simplisia sebanyak 1 kg

ditimbang, kemudian dimasukkan kedalam wadah kaca. Setelah itu, simplisia dimaserasi dengan 6 Liter etanol 95% selama 3 hari dengan beberapa kali pengadukan. Kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan ampas dan filtratnya dan dilanjutkan dengan evaporasi untuk menguapkan pelarut serta ekstrak dipekatkan sehingga diperoleh ekstrak kental menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

4.5. Penapisan Fitokimia pada Simplisia dan Ekstrak

4.5.1. Senyawa polifenolat

Simplisia atau ekstrak sebanyak 1 gram ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan di atas penangas air, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida. Apabila timbul warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru hitam sampai hitam, maka menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Fransworth, 1966:255).

4.5.2. Flavonoid

Simplisia atau ekstrak sebanyak 1 gram ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan 100 mL air panas kemudian dididihkan selama 10 menit, campuran tersebut disaring, (Larutan A). Larutan A ini akan digunakan untuk pemeriksaan golongan senyawa flavonoid, saponin dan kuinon). Sebanyak 5 mL larutan A dicampur dengan serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat dan 8 tetes amilalkohol, kocok dengan kuat. Biarkan sampai terjadi pemisahan dan

timbulnya warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menandakan positif flavonoid (Fransworth, 1966:263).

4.5.3. Tanin

Simplisia atau ekstrak sebanyak 1 gram ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan 100 mL air dan dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit kemudian didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama ditambahkan larutan gelatin 1% dan adanya endapan putih menandakan positif tanin dan bagian keduanya ditambahkan FeCl_3 1%, apabila terbentuk warna biru tua/ hitam kehijauan menunjukkan adanya tannin (Fransworth, 1966:264).

4.5.4. Kuinon

Simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya, dipanaskan di atas penangas air kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 20 mL larutan natrium hidroksida 1 N dan apabila timbul warna kuning sampai merah menandakan positif kuinon (Fransworth, 1966:265-266).

4.5.5. Monoterpen dan sesquiterpen

Simplisia atau ekstrak digerus dengan eter kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat dan apabila timbul warna- warna menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Fransworth, 1966:132).

4.5.6. Triterpenoid dan steroid

Simplisia atau ekstrak digerus dengan eter kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi Liebermann-Burchard dan apabila timbul warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau-biru menandakan positif steroid (Fransworth, 1966:259).

4.5.7. Saponin

Simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan air secukupnya, kemudian dipanaskan di penangas air selama 30 menit dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dibiarkan sampai dingin, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik dengan arah vertikal dan terjadinya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang bertahan selama 10 menit menandakan positif saponin dan busa tersebut masih bertahan setelah penambahan beberapa tetes HCl (Fransworth, 1966:258).

4.5.8. Alkaloid

Simplisia atau ekstrak ditempatkan dalam mortir dan ditambahkan amoniak 25% yang kemudian digerus dan ditambahkan 20 mL CHCl_3 , gerus dengan kuat. Selanjutnya disaring dan diambil filtratnya (larutan 1). Larutan 1 tersebut ditambahkan dengan HCl 10% v/v hingga terbentuk dua fasa, kemudian pisahkan fasa air (larutan 2). Larutan 1 diteteskan pada kertas saring, semprotkan pereaksi Dragendorff. Apabila terbentuk warna merah/jingga maka positif alkaloid (Fransworth, 1966:258).

4.6. Penetapan Parameter Standar Simplisia

4.6.1. Penetapan Parameter 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)

4.6.2. Parameter 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)

4.6.3. Parameter 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 di udara. Kadar abu tidak larut asam dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam}}{\text{berat bahan awal (gr)}} \times 100\% \quad (3)$$

(Depkes RI, 2000: 17)

4.7. Optimasi Formula Sampo

Optimasi pada formula sampo dilakukan dengan optimasi basis terlebih dahulu yang dibuat ke dalam 3 formula yang bervariasi pada konsentrasi natrium lauril sulfat. Optimasi basis sampo dapat dilihat pada **Tabel IV.1** :

Tabel IV.1 Optimasi formula basis sampo

Bahan	Konsentrasi (%)			
	F1	F2	F3	F4
Natrium Lauril Sulfat	2,5	5	7,5	10
Cocamide DEA	4	4	4	4
Natrium EDTA	0,5	0,5	0,5	0,5
Natrium Klorida	3	3	3	3
Aquadest ad	100	100	100	100

Proses optimasi dilakukan dengan cara melarutkan natrium lauril sulfat dalam aquadest, kemudian dicampurkan dengan natrium klorida dan natrium EDTA yang telah dilarutkan terlebih dahulu dengan aquadest. Selanjutnya dimasukkan

cocamide DEA ke dalam campuran tersebut, aduk dengan menggunakan pengaduk mekanik pada kecepatan 150 rpm sampai homogen.

4.8. Formulasi Sampo Mengandung Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas

Formulasi sampo mengandung ekstrak lengkuas dilakukan dengan cara melarutkan natrium lauril sulfat dalam aquadest, kemudian dicampurkan dengan natrium klorida dan natrium EDTA yang telah dilarutkan terlebih dahulu dengan aquadest. Selanjutnya dimasukkan cocamide DEA ke dalam campuran tersebut, aduk dengan menggunakan pengaduk mekanik pada kecepatan 150 rpm sampai homogen.

Setelah itu tambahkan ekstrak lengkuas, propil paraben dan metil paraben yang terlebih dahulu dilarutkan dengan etanol 95%. Formulasi sampo antiketombe dapat dilihat pada **Tabel IV.2** :

Tabel IV.2 Formula sediaan sampo

Bahan	Konsentrasi (%)
	F 4
Ekstrak Rimpang Lengkuas	1
Natrium Lauril Sulfat	10
Cocamide DEA	4
Natrium Klorida	3
Natrium EDTA	0,5
Propil Paraben	0,02
Metil Paraben	0,18
Aquadest ad	100

4.9. Evaluasi Sediaan Sampo

4.9.1. Uji organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati perubahan-perubahan bentuk, bau, dan warna sediaan sampo antiketombe yang dibuat.

4.9.2. Pengukuran tinggi busa

Sediaan sampo antiketombe dibuat larutan 1% dalam 100 ml air. Kemudian kocok didalam tabung reaksi selama 30 detik dan diamkan selama 10 menit, Selanjutnya ukur tinggi busa dengan menggunakan penggaris.

4.9.3. Pengukuran pH

Pengukuran pH sediaan sampo antiketombe dilakukan dengan mencelupkan elektroda pH meter ke dalam sediaan sampo dan dilihat nilai pH yang dihasilkan. Sebelum dilakukan pengukuran tersebut dianjurkan alat pH meter untuk di kalibrasi terlebih dahulu baik sebelum ataupun sesudah digunakan.

4.9.4. Pengukuran viskositas

Pengukuran dilakukan dengan alat Viskometer Brookfield tipe RV1. Sediaan sampo diukur dengan kecepatan pengadukan 10, 20, 50, dan 100 rpm.

4.9.5. Uji stabilitas

Dilakukan pengamatan organoleptis, pH, dan viskositas pada sediaan yang disimpan di suhu 40°C selama 28 hari penyimpanan. Pengamatan dilakukan pada hari ke-1, 7, 14, 21, dan 28.

4.10. Uji Aktivitas Sediaan Sampo Antiketombe Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Terhadap Jamur *Malassezia sp*

4.10.1. Pembuatan medium

Pembuatan medium dilakukan dengan cara menimbang SDA sebanyak 6,5 gram dan dimasukkan ke dalam air suling sebanyak 100 mL, kemudian dipanaskan di atas hotplate sambil terus diaduk sampai larutan homogen. Selanjutnya medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C

4.10.2. Uji aktivitas

Uji aktivitas ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antijamur dari sediaan sampo yang telah ditambahkan dengan zat aktif ekstrak rimpang lengkuas dengan menggunakan metode difusi agar. Pengujian dilakukan dengan menyiapkan SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dalam keadaan cair yang dicampurkan dengan 1 tetes minyak zaitun dan 100µl suspensi jamur ke dalam cawan petri, cawan petri digoyangkan hingga homogen dan dibiarkan sampai agar di dalam cawan petri memadat.

Selanjutnya dibuat sumur-sumur pada agar menggunakan perforator, kemudian sediaan, basis, ketokonazol, dan produk sampo antiketombe yang telah beredar di pasaran ditetaskan ke dalam masing-masing sumur tersebut. Setelah itu media diinkubasi pada suhu 29°C selama 72 jam. Kemudian dilihat zona hambat yang dihasilkan di masing-masing sumur.

4.11. Uji Iritasi Pada Mata Kelinci Jantan Albino Galur New Zealand

Sebagai hewan uji digunakan kelinci yang dimanfaatkan matanya untuk melihat iritasi yang ditimbulkan dari sediaan pada organ yang berdekatan dengan penggunaan sampo dan dinilai sangat sensitif, kemudian sebagai sediaan uji adalah larutan sediaan sampo 1% dalam air. Sebanyak 0,1 mL sediaan yang telah diencerkan, diteteskan ke dalam salah satu kelopak mata kelinci dan kelopak mata yang lain digunakan sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan selama 1 – 3 hari setelah penetesan. Pengamatan meliputi reaksi reaksi yang terjadi pada kornea, iris, dan konjungtiva mata. Reaksi yang terjadi pada kornea, terlihat dengan adanya kekeruhan pada iris dan berubahnya ukuran pupil atau bahkan adanya pendarahan pada iris, sedangkan pada konjungtiva adalah timbulnya kemerahan, pembengkakan, dan penutupan kelopak mata (Mita,dkk.,2009).