

## **BAB IV**

### **PROSEDUR KERJA**

#### **4.1 Pengumpulan Bahan dan Determinasi**

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tepung biji bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) yang diperoleh dari kebun percobaan Manoko, Lembang, Jawa Barat. Biji bunga pukul empat dideterminasi di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

#### **4.2 Penyiapan Tepung Biji Bunga Pukul Empat**

Penyiapan bahan dengan cara mengumpulkan biji bunga pukul empat. Kemudian biji dipecahkan dan diambil tepung dari biji bunga pukul empat.

#### **4.3 Penapisan Fitokimia**

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap tepung biji bunga pukul empat. Prosedur penapisan fitokimia yang digunakan menurut Farnsworth (1966, 243-265) adalah sebagai berikut:

##### **4.3.1 Golongan senyawa alkaloid**

Sampel ditambahkan dengan ammonia 25% kemudian digerus dalam mortar, ditambah 20 ml kloroform dan digerus dengan kuat-kuat. Campuran disaring dari filtrat digunakan untuk percobaan (Larutan A). Larutan A ditetaskan pada kertas saring dan diberi pereaksi *Dragendorff*. Warna jingga yang timbul pada kertas saring menunjukkan alkaloid positif. Sisa larutan A diekstraksi dua kali

dengan HCl 10% lalu lapisan air dan 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.

#### **4.3.2 Golongan senyawa flavonoid**

Sampel dicampur dengan serbuk magnesium dan HCl 2N. Campuran dipanaskan di atas tangas 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.

#### **4.3.3 Golongan senyawa monoterpenoid dan seskuiterpenoid**

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

#### **4.3.4 Golongan senyawa polifenol dan tanin**

Sampel digerus dengan air hingga lumat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dididihkan selama beberapa menit. Setelah disaring, filtrat dibagi menjadi dua bagian.

Filtrat 1: ke dalam filtrat 1 diteteskan  $\text{FeCl}_3$ , terbentuknya warna biru hingga hitam menunjukkan adanya senyawa polifenol.

Filtrat 2: ke dalam filtrat 2 diteteskan larutan gelatin lalu diamati terjadinya endapan dan gumpalan. Adanya golongan senyawa tanin ditandai dengan terbentuknya

gumpalan. Endapan disaring, filtrat ditetesi dengan dengan larutan  $\text{FeCl}_3$ , terbentuknya warna hitam menandakan bahwa dalam senyawa tersebut terkandung tannin dan polifenol.

#### **4.3.5 Golongan senyawa steroid dan triterpenoid**

Sampel digerus dengan eter kemudian dipipet melalui kapas dengan penyaringan lalu diuapkan hingga kering. Pada residu ditetesi larutan *Lieberman-Burchard*. Adanya golongan triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu, sedangkan warna hijau menunjukkan adanya senyawa steroid.

#### **4.3.6 Golongan senyawa kuinon**

Sampel digerus dengan air kemudian disaring dengan kapas. Filtrat ditetesi dengan  $\text{NaOH}$  atau  $\text{KOH}$  5%. Adanya senyawa kuinon ditandai dengan terbentuknya warna merah.

#### **4.3.7 Golongan senyawa saponin**

Sampel digerus dengan air hingga lumat, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah sedikit air dan dipanaskan. Setelah dingin dikocok kuat beberapa menit hingga terbentuknya buih dan busa. Adanya golongan saponin ditandai dengan terbentuknya buih atau busa yang bertahan selama 5-10 menit serta tidak hilang pada penambahan satu tetes larutan  $\text{HCl}$  0,1 N.

#### 4.4 Penetapan Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara metode gravimetri. Masukkan lebih kurang 10 gram ekstrak dan timbang saksama dalam wadah yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%. Penetapan kadar air dengan metode ini tidak sesuai untuk ekstrak yang mempunyai kandungan minyak atsiri tinggi (Dirjen POM, 2002: 17).

#### 4.5 Uji Aktivitas Antijerawat Tepung Biji Bunga Pukul Empat Terhadap *P. acnes*

##### 4.5.1 Sterilisasi

Alat-alat dan media yang digunakan dalam pengujian aktivitas antijerawat terlebih dahulu di sterilkan. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit menggunakan sterilisasi uap yaitu autoklaf menggunakan uap air dalam tekanan sebagai pensterilnya.

##### 4.5.2 Penyiapan biakan bakteri *Propionibacterium acnes*

Bakteri *P. acnes* dipelihara dalam agar miring dan disimpan dalam lemari pendingin dilakukan pengembang biakan kembali dalam agar miring menggunakan media TSA dengan cara menggoreskan 1 ose masing-masing bakteri dan diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam maka dapat dilihat goresan putih pada agar miring tersebut menunjukkan bakteri tersebut tumbuh.

Bakteri *P. acnes* dari hasil biakan selanjutnya dibuat suspensi bakteri dengan cara mensuspensikan bakteri sebanyak 1 ose ke dalam media agar cair TSB

yang sebelumnya telah disterilkan. Suspensi kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### **4.5.3 Pembuatan media uji**

Pembuatan media uji adalah dengan cara melarutkan 40 gram media *Tryptic Soy Agar* (TSA) ke dalam aquadest sebanyak 1 L. Kemudian dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih media kemudian diangkat lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### **4.5.4 Pembuatan sediaan uji**

Pembuatan sediaan uji dari tepung biji bunga pukul empat dengan cara diencerkan dengan menggunakan pelarut sorbitol.

#### **4.5.5 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)**

Suspensi tepung biji bunga pukul empat diuji aktivitas antijerawatnya terhadap bakteri *P. acnes*. Konsentrasi suspensi tepung biji yang digunakan adalah 2,5; 5; 7,5 dan 10%. Metode yang digunakan adalah metode pengenceran agar. Sebanyak 1000 µl sediaan uji dengan berbagai konsentrasi ditambahkan ke dalam 20 ml media agar yang telah dicairkan dalam cawan petri steril. Kemudian campuran diputar sampai homogen, didinginkan hingga menjadi padat. Sebanyak 1 ose suspensi bakteri kemudian diinokulasikan di atas permukaan agar padat kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Dalam uji ini hal positif ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri yang digoreskan dengan ose disekitar media yang diisi dengan sediaan uji.

#### 4.6 Pembuatan Krim Antijerawat Tepung Biji Bunga Pukul Empat

Menurut Nurhayati (2013:54) formulasi krim antijerawat ekstrak buah tomat yang baik adalah sebagai berikut:

**Tabel IV. 1** Formula Krim Antijerawat Ekstrak Buah Tomat

Komposisi	Formula (%)
Ekstrak Buah Tomat	1
Sorbitol	10
Parafin	10
Na. Lauril Sulfat	0,75
Setostearil Alkohol	6,75
Tokoferol	0,03
Propilen Glikol	10
Metil Paraben	0,18
Propil Paraben	0,02
Aquadest ad	100

Dengan melihat formulasi sediaan krim di atas, maka dilakukan pembuatan formulasi sediaan krim menggunakan formula yang sama, namun zat aktif yang digunakan adalah tepung biji bunga pukul empat, dapat dilihat pada **Tabel III.2.**

**Tabel IV. 2** Formula Krim Antijerawat Tepung Biji Bunga Pukul Empat

Komposisi	Formula (%)
Tepung Biji Bunga Pukul Empat	10
Sorbitol	10
Parafin	10
Na. Lauril Sulfat	0,75
Setostearil Alkohol	6,75
Tokoferol	0,03
Propilen Glikol	10
Metil Paraben	0,18
Propil Paraben	0,02
Aquadest ad	100

Pembuatan sediaan krim antijerawat dari tepung biji bunga pukul empat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

Basis krim dibuat dengan cara memanaskan masing-masing fase minyak (Parafin dan Setostearil alkohol) dan fase air (air dan natrium lauril sulfat) di atas tangas air pada suhu 60-70°C. Setelah masing-masing fase telah mencapai suhu 70°C, kemudian dicampur dan diaduk menggunakan alat pengaduk *Ultra Turrax* dengan kecepatan 15000 rpm selama 10 menit sampai homogen. Campuran lalu ditambahkan bahan uji yang diencerkan sorbitol, metil paraben dan propil paraben yang telah dilarutkan dalam propilenglikol dan tokoferol. Kemudian diaduk lagi menggunakan alat pengaduk *Ultra turrax* dengan kecepatan 15000 rpm selama 5 menit sampai homogen.

#### **4.7 Evaluasi Sediaan Krim Antijerawat Tepung Biji Bunga Pukul Empat**

Evaluasi krim meliputi organoleptis, viskositas, homogenitas, sentrifuga dan pH sediaan.

##### **4.7.1 Evaluasi organoleptis**

Pengamatan organoleptis yang dilakukan terhadap krim dengan mengamati perubahan bentuk, warna, dan bau pada sediaan.

##### **4.7.2 Evaluasi viskositas**

Penentuan viskositas sediaan krim dilakukan dengan menggunakan viskometer *Brookfield* RVT dengan spindle 15.

##### **4.7.3 Evaluasi homogenitas**

Evaluasi homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan tipis-tipis sediaan krim yang dibuat pada dua kaca objek kemudian diamati homogenitas sediaannya.

#### 4.7.4 Pengukuran pH sediaan

Sediaan diukur pHnya menggunakan pH meter. Sebelum digunakan pH meter dikalibrasi dengan larutan dapar dengan pH 4 dan pH 7 kemudian ditimbang seksama sejumlah tertentu krim dimasukkan dalam gelas beker ditambahkan 30 ml akuades sedikit demi sedikit, diaduk sampai larut, diukur pHnya dengan pH meter dengan mencelupkan anoda atau katoda ke dalam larutan tersebut kemudian dilihat pada LCD display sampai tanda “drift” pada layar hilang dan dicatat hasilnya.

#### 4.7.5 Sentrifugasi

Dilakukan uji kestabilan sediaan melalui pengamatan pemisahan beberapa fase dengan dilakukannya sentrifugasi selama 5 jam dengan kecepatan 2000 rpm menggunakan *centrifuge* 80-2.

#### 4.8 Uji Aktivitas Sediaan Krim Antijerawat Tepung Biji Bunga Pukul Empat

Tujuan dari uji mikrobiologi ini adalah untuk mengetahui aktivitas antijerawat yang ada pada sediaan krim yang mengandung tepung biji bunga pukul empat. Uji ini dilakukan dengan metode difusi agar. Uji dilakukan dengan cara sebanyak 20 mL media TSA yang sudah steril diinokulsikan dengan 50  $\mu$ L biakan bakteri uji *P.acnes*. Kemudian digoyang-goyangkan untuk memperoleh suspensi bakteri yang homogen pada permukaan TSA dan dibiarkan sampai padat. 1 gram sediaan diencerkan dengan 3 mL sorbitol, lalu dimasukkan ke dalam lubang sebanyak 50  $\mu$ L. Diinkubasi selama 18-24 jam dalam inkubator yang bersuhu 37°C kemudian diamati dan diukur diameter hambatannya. Dilakukan juga pengujian terhadap basis krim.