

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Pengumpulan dan Determinasi Mentimun

Mentimun (*Cucumis sativus* L.) diperoleh dari Manoko Lembang, dipanen pada umur 33 hari setelah tanam. Mentimun (*Cucumis sativus* L.) dideterminasi di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB.

4.2. Pembuatan Simplisia

Buah mentimun segar (*Cucumis sativus* L.) sebanyak 5 kg dirajang kemudian di maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95% selama tiga kali dua puluh empat jam pada suhu ruangan. Ekstrak etanol (maserat) yang diperoleh diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dibawah tekanan vakum pada suhu kurang lebih 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental, kemudian dihitung rendemennya.

4.3. Penetapan Parameter Standar

4.3.1. Penetapan kadar abu total

Sebanyak dua gram ekstrak ditimbang lalu dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, ekstrak diratakan. Bahan dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan, dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, maka ditambahkan air panas lalu disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa bahan dan kertas saring dipijarkan dengan

krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, dan dipijarkan pada suhu 450°C hingga bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut: (Depkes RI, 2000: 17).

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{berat abu (gr)}}{\text{berat bahan awal (gr)}} \times 100\%$$

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 di udara. Kadar abu tidak larut asam dihitung dengan rumus: (Depkes RI, 2000: 17).

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

4.3.3. Penetapan kadar abu larut air

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL air selama 5 menit, bagian yang tidak larut dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan selama 15 menit pada suhu tidak lebih dari 450°C hingga bobot tetap dan ditimbang. Perbedaan bobot sesuai dengan jumlah abu yang larut dalam air. Kadar abu larut dalam air terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara dihitung.

$$\text{Kadar abu larut air} = \frac{\text{berat abu total (gr)} - \text{berat abu tidak larut air (gr)}}{\text{berat bahan awal (gr)}} \times 100\%$$

4.3.4. Penetapan kadar air pada ekstrak

Menggunakan metode gravimetri yaitu kurang lebih timbang 2 gram simplisia/ekstrak kemudian dimasukkan kedalam wadah yang telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 1 jam dan telah ditara. Pengeringan dilakukan pada suhu 105°C selama 30 menit dalam oven, lalu dimasukkan dalam desikator selama 10-15 menit dan ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada jarak satu jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2000:16)

Hitung kadar air dalam % dengan rumus :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{bobot bahan yang hilang}}{\text{bobot bahan awal}} \times 100\%$$

4.4. Penapisan Fitokimia Ekstrak Mentimun (*Cucumis sativus* L)

4.4.1. Senyawa alkaloid

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia/ ekstrak ditambah 5 mL ammonia 25% dan 20 mL kloroform kemudian digerus kuat dan disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi 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 HCl 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 pada simplisia (Fransworth, 1966:253).

4.4.2. Pemeriksaan flavonoid

Sebanyak 1 gram simplisia/ekstrak ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat ditambahkan serbuk magnesium, dan asam hidroklorida 2N, lalu ditambahkan amil alkohol dan dikocok kuat, dibiarkan memisah. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid (Fransworth, 1966: 263).

4.4.3. Pemeriksaan tanin

Sebanyak 1 gram simplisia/ekstrak atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi dua. Pertama, filtrat ditambahkan FeCl_3 akan terbentuk warna hijau, violet, atau hitam (tanin positif). Kedua, filtrat ditambahkan dengan gelatin 1% terbentuk endapan maka tanin positif (Fransworth, 1966: 264).

4.3.4. Pemeriksaan kuinon

Sebanyak 1 gram simplisia/ekstrak atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan NaOH 5% apabila membentuk warna jingga menandakan positif kuinon (Fransworth, 1966:265-266).

4.4.5. Pemeriksaan saponin

Sebanyak 1 gram simplisia/ekstrak masing-masing ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat dalam

tabung reaksi dikocok vertikal selama 10 detik, kemudian dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa selama kurang lebih 10 menit dengan ketinggian 1-10 cm maka saponin positif. Busa ditambah dengan HCl 2N beberapa tetes, apabila busa hilang maka saponin negatif sedangkan jika busa tidak hilang maka positif (Fransworth, 1966:258).

4.4.6. Pemeriksaan steroid dan triterpenoid

Simplisia/ekstrak digerus dengan eter, lalu dipipet sambil disaring. Filtrat diuapkan hingga kering. Residu ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Warna ungu menunjukkan positif adanya triterpenoid, sedangkan bila warna hijau-biru yang timbul menunjukkan positif steroid (Fransworth, 1966: 259).

4.4.7. Pemeriksaan senyawa polifenolat

Satu spatel simplisia /ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi, lalu ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan diatas 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 menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat.

4.5. Ekstraksi Buah Mentimun

Simplisia buah mentimun dimaserasi dengan etanol 95%. Setelah itu larutan disaring untuk memisahkan ampas dan filtratnya. Residu yang diperoleh kembali di ekstrak dengan etanol 95% sebanyak 2 kali. Ekstrak yang diperoleh digabung kemudian dievaporasi untuk menguapkan pelarutnya hingga diperoleh

ekstrak pekat. Setelah diperoleh ekstrak pekat, persen rendemen ekstrak dihitung dengan rumus: (Muhyini, 2004:19).

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

4.6. Penetapan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mentimun dengan Metode DPPH

4.6.1. Pembuatan larutan uji dan vitamin C

Dibuat larutan uji dengan berbagai konsentrasi dalam pelarut etanol, yaitu pada larutan ekstrak buah mentimun dengan variasi konsentrasi 10, 50, 100, 300, dan 600 ppm dalam pelarut etanol, serta vitamin C dengan variasi konsentrasi 5, 4, 3, 2, dan 1 ppm (Hanani *et.al.*, 2005; Okawa *et.al.*, 2001).

4.6.2. Pembuatan larutan DPPH

Serbuk DPPH dilarutkan dalam etanol sehingga didapat larutan 40 ppm (0,004%). Larutan dijaga pada suhu rendah, terlindungi dari cahaya untuk segera digunakan (Hanani *et al.*, 2005; Okawa *et.al.*, 2001).

4.6.3. Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum DPPH

Larutan DPPH sebanyak 3 mL ditambah dengan etanol 5 mL, dihomogenkan untuk kemudian diamati absorbansinya dengan spektrofotometri UV/Vis pada panjang gelombang 400 - 600 nm. Panjang gelombang yang memberikan nilai absorbansi paling besar ditetapkan sebagai panjang gelombang maksimum DPPH (Okawa *et.al.*, 2001).

4.6.4. Pengukuran absorbansi persen inhibisi senyawa uji

Larutan uji ekstrak dalam berbagai variasi konsentrasi (600 ppm, 300 ppm, 100 ppm, 50 ppm, dan 10 ppm) ditambahkan dengan larutan DPPH dengan perbandingan 1:1 dan divorteks, diinkubasikan selama 30 menit kemudian dibaca absorbansinya dengan spektrofotometri UV/Vis pada panjang gelombang yang sama dengan panjang gelombang maksimum DPPH. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap larutan uji vitamin C dengan variasi konsentrasi 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, dan 1 ppm. Sebagai blanko yang digunakan campuran etanol dan masing – masing sampel (Hanani *et.al.*,2005).

Nilai % inhibisi senyawa uji dihitung melalui persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \left\{ \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Senyawa Uji}}}{A_{\text{DPPH}}} \right\} \times 100\%$$

4.6.5. Penetapan IC₅₀

Harga IC₅₀ ekstrak buah mentimun dihitung dari kurva regresi antara konsentrasi dengan % inhibisi ekstrak (larutan uji). Sedangkan harga IC₅₀ vitamin C dihitung dari kurva regresi antara konsentrasi dengan % inhibisi vitamin C. Kedua IC₅₀ yang didapat dari ekstrak buah mentimun dan vitamin C kemudian dibandingkan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak buah mentimun dibandingkan dengan vitamin C (Hanani *et.al.*,2005).

4.7. Orientasi Basis Mikroemulsi

Basis mengandung fase minyak VCO, surfaktan tween 80, kosurfaktan dari kombinasi propilenglikol-gliserin, antioksidan tokoferol dan pelarut aquadest.

Orientasi basis mikroemulsi meliputi optimasi fase minyak dan optimasi konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan.

Hasil optimasi fase minyak serta optimasi konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan yang memiliki kemampuan menampung fase minyak yang banyak dengan konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan yang paling rendah, digunakan untuk orientasi basis. Basis didiamkan 24 jam lalu diamati kejernihan dan uji sentrifugasi serta *freeze thaw*. Basis yang paling stabil dan jernih digunakan sebagai formula sediaan mikroemulsi dan dievaluasi.

4.7.1. Optimasi fase minyak

Orientasi basis mikroemulsi salah satunya meliputi optimasi fase minyak. Optimasi ini dilakukan untuk mengetahui seberapa banyak fase minyak yang dapat ditampung oleh surfaktan dan kosurfaktan.

Tabel IV. 1 Optimasi fase minyak

Bahan / Formula	Konsentrasi (%)			
	F1	F2	F3	F4
Virgin coconut oil	5	7	9	11
Tween 80	30	30	30	30
Gliserin	20	20	20	20
Propilen glikol	10	10	10	10

4.7.2. Optimasi konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan

Optimasi konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan dilakukan untuk mengetahui berapa konsentrasi terendah surfaktan dan kosurfaktan yang dapat menampung banyak fase minyak.

Tabel IV. 2 Optimasi konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan

Bahan / Formula	Konsentrasi (%)			
	F1 A	F1 B	F1 C	F1 D
Virgin coconut oil	x	x	x	x
Tween 80	30	28	26	24
Gliserin	20	20	20	20
Propilen glikol	10	10	10	10

4.8. Formulasi Mikroemulsi yang Mengandung Ekstrak Buah Mentimun

Setelah dilakukan orientasi basis mikroemulsi dan didapatkan basis yang paling stabil dan jernih, kemudian dibuat mikroemulsi yang mengandung ekstrak buah mentimun (*Cucumis sativus* L.), VCO, tokoferol dan aquadest.

4.9. Pembuatan Sediaan Mikroemulsi

Mikroemulsi dibuat dengan terlebih dahulu mencampurkan fasa minyak, surfaktan, dan kosurfaktan pada suhu sekitar 50°C dan kemudian dicampurkan dengan fasa air dan diaduk menggunakan pengaduk mekanik pada kecepatan 200 rpm selama 5 menit. Mikroemulsi yang telah dibuat disimpan 24 jam untuk diamati kejernihannya.

4.10. Evaluasi Sediaan Mikroemulsi

Evaluasi mikroemulsi yang dilakukan adalah evaluasi organoleptik, uji sentrifugasi, uji *freeze-thaw*, homogenitas, pH, viskositas, dan uji stabilitas dipercepat.

4.10.1. Evaluasi organoleptik

Evaluasi organoleptik meliputi pengamatan terhadap perubahan warna, bau dan kejernihan dari mikroemulsi pada suhu kamar selama 28 hari.

4.10.2. Uji sentrifugasi

Uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh gravitasi terhadap kestabilan sediaan mikroemulsi. Sebanyak 10 gram sediaan dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 jam (Lachman,1994). Setiap interval waktu 1 jam diamati ada tidaknya pemisahan pada sediaan.

4.10.3. Uji *Freeze-thaw*

Evaluasi dilakukan untuk mengetahui pengaruh perubahan suhu terhadap kestabilan sediaan. Pengujian dilakukan selama 6 siklus. Satu siklus terdiri dari 48 jam disimpan pada suhu 4°C dan 48 jam pada suhu 40°C. Diamati ada tidaknya pemisahan fasa pada suhu kamar pada akhir siklus ke 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 dan dilakukan pengukuran ukuran globul pada setiap akhir siklus *freeze-thaw*.

4.10.4. Homogenitas

Sampel diletakkan diatas kaca objek lalu ditekan dengan kaca objek lain hingga rata, dan diamati homogenitasnya secara visual.

4.10.5. Pengukuran pH dan viskositas sediaan

Pengukuran pH dilakukan dengan melarutkan 1 gram sediaan dalam 10 mL aquadest, kemudian pH diukur menggunakan pH meter. Pengukuran viskositas sediaan menggunakan viskometer Brookfield DV I pada hari ke-0, 1, 7, 14, 21, dan 28 yang disimpan pada suhu 40°C.

4.10.6. Uji stabilitas dipercepat

Uji stabilitas dipercepat dilakukan dengan menyimpan sediaan pada suhu 40°C dan dilakukan pengamatan organoleptis, pH, dan viskositas pada hari ke 1, 7, 14, 21, 28.

4.10.7 Uji aktivitas antioksidan sediaan

Uji ini dilakukan seperti pada sub bab 4.6 tentang penetapan aktivitas antioksidan ekstrak buah mentimun dengan metode DPPH, dengan mengganti larutan uji ekstrak buah mentimun menjadi sediaan mikroemulsi ekstrak buah mentimun. Kemudian dibandingkan dengan ekstrak buah mentimun, basis sediaan, dan sediaan yang mengandung vitamin C.