

BAB III METODE PENELITIAN

1.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang untuk melakukan maserasi dan ekstraksi buah berenuk, dan untuk membuat formulasi sediaan dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan dan Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

1.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan adalah Timbangan analitik (ADAM EQUIPMENT™), toples kaca, autoklaf, incubator (GEMMYCO), blender (PHILLIPS), *rotary evaporator* (EYELA), *Waterbath* (MAMMERT), Tabung reaksi (PYREX), gelas kimia (PYREX), gelas ukur (PYREX), piknometer, batang pengaduk, jarum ose, batang L, cawan petri, aluminium foil, lampu spiritus, cawan penguap, kaca arloji, krus, pelubang sumuran, mikropipet (*fisherBrend*), jangka sorong (VERNIER CALIPER 6), sarung tangan, masker, PH meter, dan Viskometer lemy.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian kali ini adalah buah berenuk, Etanol 70% (BRATACO), Sodium Lauryl Sulfat (QUADRANT), Cocamid DEA (BRATACO), Gliserin (PURNAMA JAYA SARANA), Natrium Klorida (PURNAMA JAYA SARANA), Na₂EDTA(BRATACO), KOH (BRATACO), Aqua Dest (WIDATRA), NaCl infus (B BRAUN), Ciprofloxacin Hcl (HEXAPHARM), MHA (OXOID™), *Staphylococcus aureus* dan *Ercesia coli*.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Determinasi

Determinasi untuk menentukan kebenaran dari buah berenuk yang akan diteliti berdasarkan kesesuaian kepustakaan dari ciri-ciri dan morfologi dari tumbuhan berenuk. Determinasi dilakukan di laboratorium ITB Bandung.

3.3.2 Preparasi Buah Berenuk (*Crescentia Cujete L*)

Buah berenuk yang diperoleh dari wilayah Kabupaten Karawang, kemudian dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotorannya kemudian diambil daging buahnya, dipotong tipis-tipis.

3.3.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Berenuk (*Crescentia Cujete L*)

Pembuatan ekstrak etanol buah berenuk dilakukan dengan metode maserasi. ditimbang sebanyak 1 kg setelah itu dihaluskan dengan cara di blender kemudian jus buah dimaserasi dengan etanol 70% dengan perbandingan 1Kg : 5L selama 48 jam x 2 kali penyaringan dan dikumpulkan pada wadah botol kaca coklat (ekstrak cair). Ekstrak cair dikentalkan di alat *evaporator* pada suhu 60°C hingga didapatkan ekstrak kental.

3.3.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk memastikan adanya senyawa metabolit sekunder pada buah uji yang digunakan sebagai antibakteri yaitu: flavonoid, polifenol, kuinon, alkaloid, tannin dan saponin.

3.3.5 Standarisasi Ekstrak Buah Berenuk

A. Organoleptik

Pengujian organoleptik ekstrak buah berenuk dilakukan secara visual untuk mengetahui mengenai bentuk, warna, dan bau dari ekstrak Buah Berenuk (Depkes,2000).

B. Rendemen Simplisia Buah Berenuk

Rendemen Simplisia Buah Berenuk dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut (Depkes,2000) :

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{Berat simplisia buah berenuk}}{\text{berat buah berenuk}}$$

C. Rendemen Ekstrak Etanol Buah Berenuk

Rendemen Ekstrak etanol Buah Berenuk dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut (Depkes,2000) :

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{berat simplisia}}$$

D. Massa Jenis Ekstrak Buah Berenuk

Menimbang piknometer kosong ukuran 25 mL. Kemudian piknometer diisi penuh dengan ekstrak yang telah diencerkan 5% dengan air dan ditimbang ulang dinyatakan sebagai berat (M). Kemudian massa jenis Ekstrak dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut (Depkes,2000) :

$$\text{Massa Jenis Ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{Volume ekstrak}}$$

E. Bobot jenis ekstrak

Menimbang piknometer kosong ukuran 25 mL, kemudian piknometer diisi penuh dengan air dan ditimbang ulang dapat ditetapkan kerapatan air. Kemudian piknometer kosong diisi penuh dengan ekstrak yang telah diencerkan sebanyak 5% dengan air, lalu ditimbang dengan berat ekstrak yang mempunyai volume 25 mL pada suhu 25 °C, Sehingga dapat ditetapkan kerapatan ekstrak (Depkes RI,2000). Bobot jenis ekstrak dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Bobot jenis ekstrak} = \frac{\text{kerapatan ekstrak}}{\text{kerapatan air}}$$

F. Kadar air

Menimbang cawan kosong dan dinyatakan sebagai W_0 . Kemudian sejumlah ekstrak dimasukkan kedalam cawan kosong yang telah diketahui bobotnya ditimbang W_1 kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu 105 °C selama 3 jam, didinginkan dalam desikator selama 15-30 menit,

lalu ditimbang dinyatakan sebagai W2. Kadar air dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{kadar air (\%)} = \frac{W1 - w2}{w1 - w0} \times 100$$

G. Kadar abu total

Menimbang sejumlah ekstrak dan masukan kedalam crus silikat yang telah dipijarkan, kemudian masukkan kedalam tanur dan pijarkan pada suhu 600⁰C selama 30 menit. Dinginkan dalam desikator selama 15 - 20 menit lalu timbang. Kadar abu total dapat dinyatakan dalam % b/b (Depkes RI,2008). Dan ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{kadar abu (\%)} = \frac{\text{Bobot crus + abu} - \text{bobot crus kosong}}{\text{beras sampel}} \times 100$$

H. Kadar sari larut air

Menimbang sebanyak 5 gram ekstrak, masukan kedalam labu bersumbat tambahkan 100 mL air jenuh kloroform. Kocok berkali-kali selama 6 jam, kemudian biarkan selama 18 jam. Saring filtrate dan uapkan hingga kering dalam cawan porselin yang telah ditimbang. Residu dipanaskan pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap, hitung kadar dalam % sari larut air (Depkes RI., 2008).

I. Kadar sari larut etanol

Menimbang sebanyak 5 gram ekstrak, masukan kedalam labu bersumbat tambahkan 100 mL etanol P. Kocok berkali-kali selama 6 jam, kemudian biarkan selama 18 jam. Saring filtrat dan uapkan hingga kering dalam cawan porselin yang telah ditimbang. Residu dipanaskan pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap, hitung kadar dalam % sari larut etanol (Depkes RI., 2008).

3.4 Pembuatan Sabun Cair

Dilarutkan Nacl dengan aquadest ad larut ditambahkan sls sedikit demi sedikit sambil diaduk ad homogen bila perlu pada suhu 40° C (campuran 1), ditambahkan gliserin kedalam campuran 1 aduk kemudian ditambahkan Na benzoate aduk

kembali ad homogen, ditambahkan ekstrak etanol daging buah berenuk sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga tidak ada yang menggumpal ditambahkan bahan tambahan secukupnya dan aquadest ad 100 ml.

3.4.1 Formulasi Pendahuluan

Formulasi pendahuluan bertujuan untuk mendapatkan basis sabun yang sesuai pada pembuatan sabun cair ekstrak etanol buah berenuk.

Tabel 3.1. Formulasi Pendahuluan (Poucher, 1993)

Bahan	F1	F2	F3	F4
Ekstrak etanol buah berenuk	K1	K2	K3	K4
SLS	24%	24%	24%	24%
Gliserin	5%	5%	5%	5%
Natrium Benzoat	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
Natrium Klorida	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
Citric Oil	q.s	q.s	q.s	q.s
Methyl Jingga	q.s	q.s	q.s	q.s
Aquadest	Add 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

3.4.2 Pengujian Sabun

A. Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik atau uji penampilan fisik dilihat secara langsung warna, bentuk dan bau sabun cair, standar sabun cair yang ideal memiliki bentuk cair serta bentuk warna yang khas (SNI, 1996).

B. Uji pH

1. Kalibrasi pH meter dengan larutan buffer pH, lakukan setiap saat akan melakukan pengukuran.
2. dicelupkan elektroda yang telah dibersihkan dengan air suling pada sediaan 1 gram sabun yang telah diencerkan dengan 10ml aquadest.
3. Dicatat, standar pH sabun 8-11 . (SNI, 1996).

C. Uji Bobot Jenis

Bobot jenis merupakan perbandingan relative antara massa jenis suatu zat dan massa jenis air murni pada volume dan suhu yang sama.

1. Dibersihkan piknometer dengan cara dibilas menggunakan aseton kemudian dietil eter, keringkan dan timbang. Catat hasilnya

2. Dimasukan ekstrak yang sudah diencerkan sebanyak 5% dengan aquadest sampai penuh dan timbang pada suhu 25°C. Catat hasilnya
3. Dihitung bobot jenis ekstrak.

D. Uji Stabilitas Busa

1. Diambil sampel sebanyak 1 gr dilarutkan dalam 9 mL air
2. Dimasukan kedalam tabung reaksi, dikocok selama 30 detik
3. Diukur tinggi busa yang terbentuk, diamkan sampel selama 1 jam, kemudian diukur kembali. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali.(Sasongko, dkk., 2017).

E. Uji Viskositas

1. Diambil sampel sabun ekstrak etanol buah berenuk sebanyak 100 ml dimasukan kedalam tabung
2. Dipasang spindle 4 dengan kecepatan 30rpm dan durasi 60detik, pada tabung yang berisi sampel
3. Diamati nilai viskositas pada layar viscometer

F. Uji Antibakteri

Dibuat media agar MHA dengan cara dilarutkan 19 gram ke dalam 500ml aquadest panas diaduk diatas kompor listrik aduk ad agar menjadi bening, dimasukan kedalam wadah dan ditutup oluminium foil, disterilkan di autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit, tunggu hingga suhu berkisar 45-50° C kemudian di masukan kedalam cawan petri dalam keadaan steril (di dalam lemari LAF) dan dibiarkan memadat, masing-masing cawan petri berkisar 30ml media agar MHA (Acumedia, 2011).

Pengujian dilakukan dengan cara mengukur diameter zona hambat pada bakteri uji yaitu *S.aureus* dan *E.coli* pada media agar, metode yang digunakan untuk pengujian antibakteri adalah difusi sumuran karena hasil zona hambat lebih terlihat dari pada metode difusi lainnya.

Premajaan bakteri uji diatas permukaan media agar di inkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C didalam lemari LAF, kemudian dibuat suspensi bakteri dengan cara melarutkan sebanyak 1 goresan ose bakteri

yang dilarutkan dengan NaCl 10ml dikocok kuat-kuat dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C didalam inkubator.

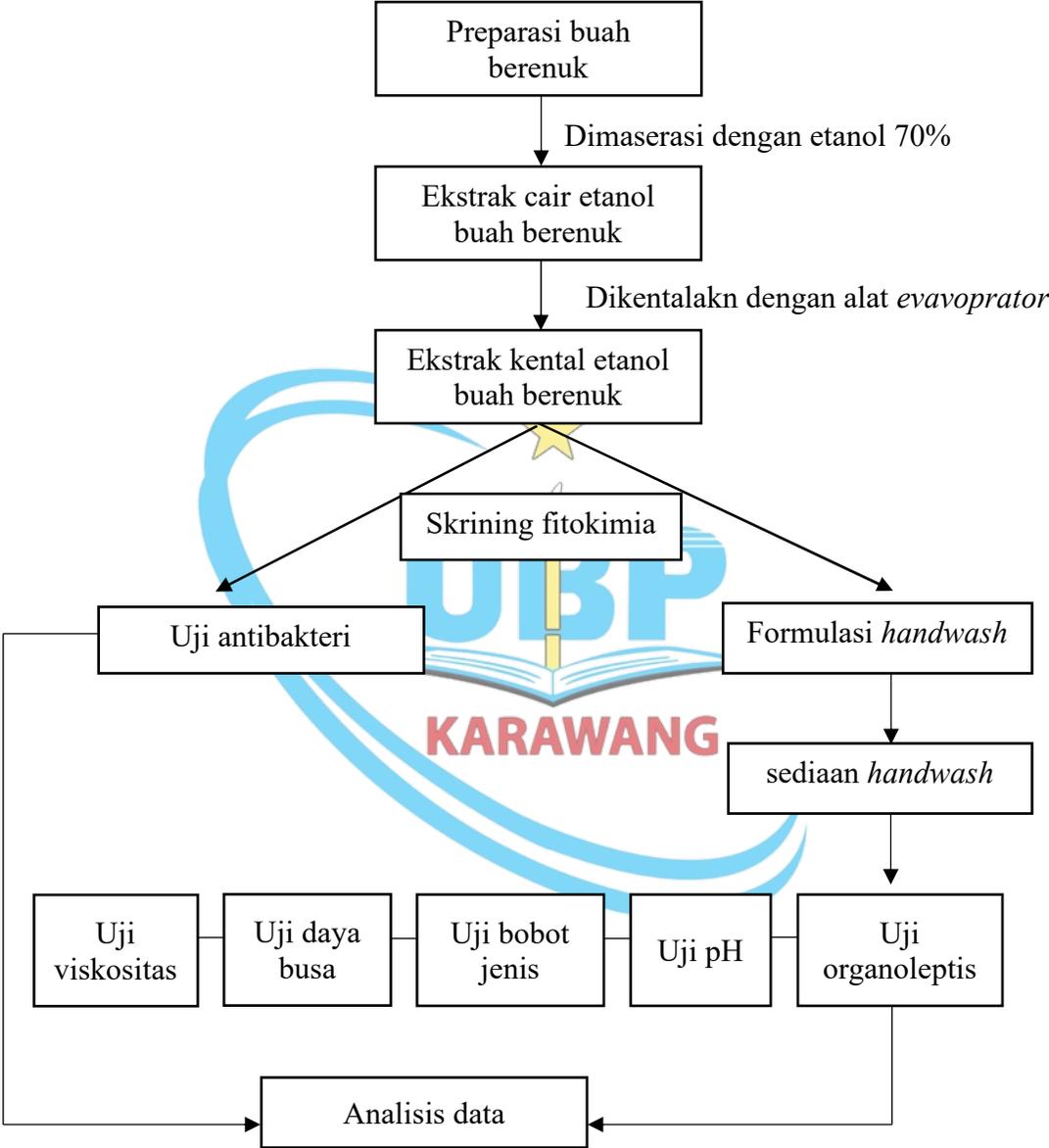
Uji antibakteri ekstrak dimulai dengan melakukan uji orientasi ekstrak etanol buah berenuk terhadap bakteri uji hal ini bertujuan untuk memastikan konsentrasi ekstrak yang dipakai memiliki aktivitas antibakteri. Pengujian dilakukan dengan disebarkan suspensi bakteri sebanyak 200µL ke permukaan media agar, dilubangi dengan pelubang sumuran kemudian lubang sumuran diisi dengan 30µL konsentrasi tanpa kontrol positif dan kontrol negative. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C didalam incubator, hitung zona hambat yang terbentuk.

Perbandingan uji antibakteri ekstrak etanol buah berenuk dengan formula sabun ekstrak buah berenuk dengan cara disebarkan suspensi bakteri sebanyak 200µL ke permukaan media agar, dilubangi dengan pelubang sumuran kemudian lubang sumuran diisi dengan 30µL ekstrak etanol buah berenuk, formula sabun ekstrak buah berenuk, ciprofloxacin sebagai kontrol positif dan aquadest sebagai kontrol negatif diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C didalam incubator, hitung zona hambat yang terbentuk.

3.5 Analisis Data

Analisis data yang diperoleh berupa data nomerik dari analisis statistik menggunakan One Way Anova pada tingkat kepercayaan $\alpha = 95\%$ dengan tiga kali pengulangan pada setiap konsentrasi ekstrak antibakteri. Analisis data ini bertujuan untuk melihat perbedaan bermakna dari masing-masing cakram uji yang mengandung kontrol positif dan kontrol negative.

3.6 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.2. Diagram Alir Penelitian