

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental murni, dengan tujuan untuk memberikan informasi mengenai formulasi dan uji sifat fisik granul *effervescent* nanopartikel ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*). Penelitian eksperimental merupakan suatu penelitian dengan melakukan percobaan yang mempunyai tujuan untuk mengetahui pengaruh atau gejala yang ditimbulkan dan disebabkan akibat dari perlakuan tertentu atau eksperimental tertentu.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian pembuatan uji sifat fisik granul *effervescent* nanopartikel ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) serta skrining fitokimianya dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

1. Pembuatan nanopartikel ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo
2. Uji skrining fitokimia menggunakan uji tabung ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Ngudi Waluyo
3. Uji karakteristik nanopartikel ekstrak daun insulin dilakukan di Laboratorium Instrument Universitas Ngudi Waluyo

4. Pembuatan granul *effervescent* nanopartikel ekstrak daun insulin dan uji sifat fisik granul *effervescent* nanopartikel ekstrak daun insulin dilakukan di Laboratorium Teknologi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang kemudian dibuat menjadi ekstrak. Subjek dalam penelitian adalah formulasi dan uji sifat fisik dari granul *effervescent* pada ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*).

D. Defini Oprasional

1. Metode ekstraksi refluks merupakan salah satu metode panas yang menggunakan alat destilasi dengan menggunakan pelarutnya yaitu etanol 96%.
2. Ekstrak kental daun insulin adalah ekstrak yang didapatkan dari proses refluks dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian dilanjutkan dengan proses evaporasi.
3. Nanopartikel ekstrak daun insulin adalah sediaan nanopartikel yang dibuat dari ekstrak daun insulin dengan menggunakan metode gelasi ionik. Metode gelasi ionik adalah teknik sederhana dalam pembentukan nanopartikel. Pembentukan nanopartikel metode ini dilakukan dengan melarutkan kitosan (bermuatan positif) dalam asam asetat, kemudian dicampurkan dengan larutan polianionik (bermuatan negatif) seperti larutan natrium tripolifosfat (NaTPP).

4. Granul *effervescent* nanopartikel ekstrak daun insulin merupakan granul atau serbuk kasar sampai kasar sekali dan mengandung unsur obat dalam campuran yang kering, biasanya terdiri dari natrium bikarbonat, asam sitrat, dan asam tartrat, bila ditambahkan dengan air, asam dan basanya bereaksi membebaskan karbondioksida(CO₂) sehingga menghasilkan buih.
5. Uji sifat fisik granul *effervescent* nanopartikel ekstrak daun insulin adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui karakteristik atau sifat fisik dari granul *effervescent* yang dihasilkan.

6. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas ialah variabel yang mempengaruhi atau sebab dari perubahan yang akan terlihat timbul dari variabel yang terikat. Variabel bebas dari penelitian yaitu kadar kitosan 0,1% dan kadar NaTPP 0,1%, variasi asam tartrat sebanyak 8,8%, 17,6%, dan 26,4%, dan variasi natrium bikarbonat sebanyak 25%, 27,5%, dan 30%.
2. Variabel tergantung adalah variabel yang terpengaruh akibat adanya variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian yaitu karakteristik sediaan nanopartikel ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*), uji sifat fisik granul *effervescent* sediaan nanopartikel ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*), dan formulasi granul

effervescent nanopartikel ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang baik.

3. Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol penelitian ini yaitu pembuatan granul *effervescent* sediaan nanopartikel ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*).

E. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan
 - a. Alat yang digunakan dalam penelitian adalah batang pengaduk, tabung reaksi, pipet tetes, corong kaca, gelas beaker 100 ml, gelas beaker 250 ml, magnetic stirrer, *Partikel Size Analyzer* (PSA), spatula, gelas ukur 10 ml, gelas ukur 100 ml, neraca analitik, tabung reaksi, rak tabung, spektrofotometer UV-VIS, sentrifugasi, tabung sentrifugasi 10 ml, Alat untuk granul *effervescent* yang digunakan gelas beaker 100 ml, gelas beaker 250 ml, ayakan mesh no 12 dan no 16, bejana maserasi, eksikator, kertas perkamen, spektrofotometer UV-Vis, lemari pengering granul, timbangan analitik, oven, dan *flow tester* granul.
 - b. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun insulin (*Tithonia diversifolia*), kitosan, dan Na-TPP, kertas saring, etanol

96%, etanol p.a, kuersetin, HCl, aquadest, butir magnesium, HCl pekat, reagen mayer, reagen dragendorff, reagen bouchardat, NaCl 10%, dan FeCl 1%. Bahan yang digunakan untuk granul *effervescent* pada penelitian ini adalah asam sitrat, asam tartrat, natrium bikarbonat, PVP, aerosil, aspartame, essens jeruk, dan laktosa.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi bahan tumbuhan daun insulin (*Tithonia diversifolia*) telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya, determinasi tumbuhan daun insulin dilakukan di Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi “Yayasan Farmasi” Pusat Laboratorium.

F. Pengolahan Sampel

Daun insulin dipetik dalam kondisi segar, berwarna hijau dan belum terdapat bagian yang kering, setelah itu dilakukan sortasi basah. Kemudian daun insulin dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan airnya ditiriskan. Daun insulin (*Tithonia diversifolia*), kemudian dikeringkan/dijemur dibawah sinar matahari secara tidak langsung dengan cara ditutup dengan kain hitam, kemudian disortasi kering. Daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang sudah kering diserbuk dengan cara di blender sampai halus. Serbuk diayak menggunakan ayakan dengan derajat kehalusan 40 mesh agar memperoleh serbuk daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang lebih halus (Ningsih, 2016).

1. Pembuatan serbuk simplisia Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Serbuk daun insulin sebanyak 1800 gram yang telah diblender dan diayak. Dilarutkan dalam etanol 96%. Pelarut yang digunakan sebanyak 6000 ml (1:3). Proses perolehan filtrat dilakukan dengan metode refluks dengan waktu 4 jam selama 5 hari, dengan suhu 80°C. Pemilihan metode refluks menghasilkan rendemen yang lebih besar. Ekstrak diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40-60°C dan di lanjutkan dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Ningsih, 2016).

2. Standarisasi Simplisia Parameter Non Spesifik

- a. Kadar Air

Setelah simplisia kering dilakukan uji kadar air, ditimbang 2 gram simplisia kemudian dimasukkan ke dalam alat moisture balance ditunggu sampai terlihat hasilnya seperti abu.

- b. Kadar Abu

Kadar abu pada simplisia daun insulin dilakukan dengan cara ditimbang 2 g simplisia, keseragaman bobotnya kemudian dimasukkan ke dalam krus. Pada proses pijar perlu diperhatikan untuk melakukan dengan perlahan-lahan hingga suhu yang menyebabkan senyawa organik terdestruksi dan menguap sampai

tinggal unsur mineral dan anorganik saja yaitu dengan suhu + 600⁰ C dengan alat moisture analyzer selama 3 jam kemudian ditunggu sampai hasilnya berwarna putih atau abu, kemudian didinginkan. Kadar abu yang telah didapatkan kemudian ditimbang untuk mendapatkan bobot bahan uji atau sampel kemudian setelah itu dinyatakan dalam % b/b.

c. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol secara kualitatif dilakukan dengan menambahkan 5 tetes H₂SO₄ pekat dan 2 ml larutan kalium dikromat, adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan adanya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan.

3. Uji Kandungan Kimia Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dari daun insulin dengan pereaksi warna, seperti flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, steroid/triterpenoid berdasarkan metode (Rahardhian *et al.*, 2019a)

a. Alkaloid

Sampel ditambahkan HCL dan aquades, panaskan dan saring saat dingin, filtrate dibagi tiga, filtrate a ditambah reagen mayer, terdapat endapan putih/kuning, filtrate b ditambahkan reagen dragendorff, terbentuk endapan merah bata, filtrate c

ditambah reagen bouchardat, terbentuk endapan coklat sampai hitam menunjukkan positif alkaloid.

b. Flavonoid

Sebanyak 2 mL ekstrak kasar dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,5 mL asam klorida pekat (HCl pekat) dan logam Mg. Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan terjadinya perubahan warna larutan menjadi merah, orange dan hijau.

c. Saponin

Sampel ditambah aquades dipanaskan kemudian didinginkan ditambah HCL dan dikocok kuat hingga terbentuk buih stabil menunjukkan senyawa saponin.

d. Tanin

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) ditimbang 10 mg, ditambahkan 20 ml air panas dan 5 tetes larutan NaCl 10%. Campuran dibagi menjadi 2 tabung reaksi, tabung pertama sebagai kontrol dan tabung kedua ditambahkan larutan FeCl₃ 1% 3 tetes. Hasil positif apabila terbentuk warna biru hitam.

e. Fenolik

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) ditimbang 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas dan 5 tetes larutan NaCl 10%. Campuran dibagi menjadi 2 tabung reaksi, tabung pertama

sebagai kontrol dan tabung kedua ditambahkan larutan FeCl_3 1 % 3 tetes. Hasil positif apabila terbentuk warna biru atau hijau.

G. Formula Nanopartikel Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Formula ekstrak daun insulin terdapat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Formula Nanopartikel Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Bahan	Formula
Ekstrak etanol daun insulin (<i>Tithonia diversifolia</i>)	0,1 g
Kitosan	0,1%
Na-TPP	0,1%

H. Prosedur Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

1. Pembuatan larutan kitosan 0,1%

Sebanyak 0,1 gram serbuk kitosan yang dilarutkan dalam 100 ml larutan asam asetat glacial dan di aduk dengan magnetic stirrer hingga kitosan larut.

2. Pembuatan larutan natrium tripolifosfat 0,1%

Sebanyak 0,1% gram serbuk NaTPP (natrium tripolifosfat) dilarutkan dalam 100 ml aquades dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer hingga larut.

3. Pembuatan nanopartikel ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*)

Pembuatan nanopartikel ekstrak etanol daun insulin dengan menimbang 0,1 gram ekstrak etanol daun insulin. Ekstrak etanol daun insulin kemudian dilarutkan dalam etanol 96% 12,5 ml dengan

gelas beaker dan ditambahkan sebanyak 5 ml ekstrak ditambahkan kedalam larutan natrium tripolifosfat 0,1% sebanyak 12,5 ml dengan cara diteteskan disertai pengadukan menggunakan magnetik stirrer. Setelah itu di campur ekstrak dan natrium tripolifosfat ditambahkan ke dalam larutan kitosan 0,1 % sebanyak 62,5 ml setetes demi setetes pada temperatur ruangan di bawah putaran magnetic stirrer dengan kecepatan 1500 rpm selama 3 jam sampai terbentuk suspense nanopartikel. Kemudian nanopartikel ekstrak etanol daun insulin disaring menggunakan kertas saring. Kemudian diukur pada spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang 650 nm. Supernatan yang diperoleh dengan suspense nanopartikel ekstrak etanol daun insulin kemudian dilakukan karakteristik PSA dan % transmittan (Stoica, 2013).

I. Uji Karakteristik Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Insulin(*Tithonia diversifolia*)

Pengecekan karakteristik nanopartikel yang dilakukan meliputi ukuran partikel dan % transmittan.

1. Ukuran nanopartikel

Sampel nanopartikel ekstrak etanol daun insulin dilakukan pengukuran *Full range* dengan cara dimasukkan ke dalam *chamber wet dispersion unit* yang berisi aquades hingga warna indikator pada

PC menunjukkan warna hijau pada rentang skala 10-12 secara stabil dan ditunggu beberapa menit selama proses berlangsung.

2. Persen transmitan (%T)

Sampel nanopartikel ekstrak etanol daun insulin sebanyak 1 ml diukur transmitannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm selama 2 menit.

J. Formulasi Granul *Effervescent* Nanopartikel Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Formulasi granul *effervescent* nanopartikel ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) pada penelitian ini terdapat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Formulasi Granul *Effervescent* Nanopartikel Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

No	Bahan	Jumlah (%b/b)			Keterangan
		F1	F2	F3	
	Nanopartikel				
1	Ekstrak Daun Insulin	0,55	0,55	0,55	Zat aktif
2	Asam sitrat	4,4	4,4	4,4	Zat asam
3	Asam tartrat	4,4	8,8	13,2	Zat asam
4	Natrium bikarbonat	12,5	13,75	15	Zat basa
5	PVP	1	1	1	Binder
6	Aerosil	0,25	0,25	0,25	Glidan
7	Aspartam	0,5	0,5	0,5	Pemanis
8	Essens jeruk	0,025	0,025	0,025	Perasa
9	Laktosa	26,375	20,725	15,075	Pengisi

K. Pembuatan Granul *Effervescent*

Pembuatan granul *effervescent* menggunakan granulasi basah dan dibagi menjadi dua komponen, yaitu komponen asam dan komponen basa.

1. Dibuat formula 50 g granul *effervescent*, ditimbang nanopartikel ekstrak daun insulin, ditetesi etanol 96% secukupnya, kemudian ditambahkan laktosa sedikit demi sedikit di gerus campur hingga homogen dan ditambahkan aerosol di gerus hingga homogen.
2. Ditambahkan asam sitrat, asam tartrat, aspartame, dan laktosa sisa di gerus hingga homogen. Kemudian ditambahkan pengikat polivinilpirolidon, penambahan dilakukan sebagian dari polivinilpirolidon, kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 1 ml hingga terbentuk massa yang bisa dikepal dan diayak dengan menggunakan ayakan mesh no. 14 lalu dikeringkan dalam lemari pengering granul pada suhu 500⁰C hingga granul tersebut kering. Setelah kering diayak dengan ayakan mesh no. 16 (komponen asam).
3. Natrium bikarbonat digerus dalam lumpang dan ditambahkan corrigent saporis, kemudian ditambahkan sisa pengikat polivinilpirolidin, kemudian ditetesi etanol 96% sejumlah 1 ml hingga terbentuk massa yang dapat dikepal. Kemudian diayak dengan ayakan mesh no. 14 dan dikeringkan dalam lemari pengering granul pada suhu 500⁰C hingga granul tersebut kering kemudian diayak dengan ayakan mesh no. 16 (komponen basa).

4. Setelah kering, komponen asam dan basa masing-masing diayak dengan menggunakan ayakan no. 16 dan dicampur.
5. Dilakukan uji evaluasi granul.

L. Uji sifat fisik granul *effervescent*

1. Uji kadar air dan susut pengeringan

Kadar air dinyatakan sebagai “*Moisture Content*” (MC) dimana ditentukan dengan cara ditimbang granul basah sebanyak 50 g untuk masing-masing formula yang diperoleh dan dimasukkan didalam lemari pengering granul hingga kering. Granul yang telah dikeringkan, kemudian ditimbang sehingga diperoleh kadar air yang terkandung dalam granul menggunakan rumus :

$$\% \text{ MC} = \frac{\text{bobot granul basah} - \text{bobot granul kering}}{\text{bobot granul kering}} \times 100\%$$

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terdapat dalam sediaan granul *effervescent*, syarat kadar air dalam bentuk sediaan *effervescent* dengan bahan herbal maksimum < 3% (Lee, 2013)

Susut saat pengeringan dinyatakan sebagai *Loss on Drying* yaitu suatu pernyataan kadar kelembaban berdasarkan berat basah yang dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ LOD} = \frac{\text{bobot granul basah} - \text{bobot granul kering}}{\text{bobot granul basah}} \times 100\%$$

Nilai susut pengeringan (LOD) dalam setiap campuran zat padat-cairan dapat bervariasi dari sedikit di atas 0% sampai sedikit dibawah 100%, tetapi nilai kadar air (MC) dapat berubah sedikit di atas 0% dan mendekati tidak terhingga. Jadi sedikit perubahan pada nilai LOD, dari 80% ke 83%, menunjukkan suatu peningkatan MC 88% atau kenaikan jumlah air yang harus diuapkan per pon produk kering sebesar 22%. Jadi persen MC merupakan nilai yang jauh lebih nyata daripada LOD dalam menentukan kapasitas beban pengering (Lee, 2013).

2. Uji Sudut Diam

Granul yang telah dikeringkan ditimbang sebanyak 20 gram, dimasukkan ke dalam corong yang lubang bawahnya ditutup, kemudian diratakan permukaannya. Pada bagian corong diberi alas. Tutup bawah corong dibuka sehingga granul dapat mengalir ke atas meja yang telah dilapisi kertas grafik. Diukur tinggi dan jari-jari dasar timbunan serbuk yang terbentuk. Sudut diam dihitung dengan rumus :

$$\tan \alpha = \frac{h}{r}$$

Dimana : α = sudut diam

h = Tinggi timbunan granul

r = Jari-jari timbunan granul

Sudut diam $\leq 30^0$ umumnya mengindikasikan bahwa bahan tersebut mengalir dengan bebas, tetapi sudut diam $\geq 40^0$

mengindikasikan bahwa bahan tersebut memiliki daya alir yang rendah. (Lee, 2013)

3. Uji Kecepatan Alir

Pengujian dilakukan seperti pada pengujian sudut diam. Granul yang telah dikeringkan, dimasukkan ke dalam corong yang lubang bawahnya ditutup, kemudian diratakan permukaannya. Pada bagian bawah corong diberi alas. Tutup bawah corong dibuka sehingga granul dapat mengalir ke atas meja yang telah dilapisi kertas grafik. Waktu alir dari granul mulai mengalir hingga serbuk berhenti mengalir dengan menggunakan stopwatch (detik). Kecepatan alir dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kecepatan alir} = \frac{\text{Bobot granul}}{\text{waktu alir}}$$

kecepatan alir yang baik bila lebih besar dari 10 gram/detik (Lee, 2013).

4. Uji Waktu Melarut Granul *Effervescent*

Granul ditimbang sebanyak 5 gram lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi aquades sebanyak 200 ml. waktu larut dihitung dengan menggunakan stopwatch (detik) dimulai dari granul tercelup ke dalam aquades sampai semua granul terlarut dan gelembung-gelembung di sekitar wadah mulai menghilang. Waktu larut granul effervescent ≤ 5 menit (Lee, 2013).

M. Analisis Data

Pada penelitian ini adalah dengan melihat hasil uji sifat fisik granul *effervescent* nanopartikel ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) masing-masing formulasi yang kemudian dibandingkan antara formulasi 1-3.