

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini bersifat eksperimental yaitu pemanfaatan minyak biji labu kuning menjadi sediaan nanoemulsi dengan optimasi Tween 80, Span 80 dan PEG 400 menggunakan *software design expert* metode *Simplex Lattice Design*, sebagai respon yaitu karakterisasi nanoemulsi meliputi uji organoleptis, % transmittan, uji pH, uji viskositas, uji ukuran droplet, PDI, uji tipe nanoemulsi, dan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode uji DPPH (*1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil*).

B. LOKASI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo. Penyiapan sampel minyak biji labu kuning dan skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, formulasi dan karakterisasi fisik sediaan nanoemulsi dilakukan di Laboratorium Teknologi, uji aktivitas antioksidan sediaan nanoemulsi dilakukan di Laboratorium Instrumen.

C. SUBJEK PENELITIAN

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak biji labu kuning yang diperoleh dari PT Tamba Sanjiwani. Minyak biji labu kuning yang digunakan sebagai sampel didapat dengan metode *cold pressed* yang kemudian diformulasikan menjadi nanoemulsi minyak biji labu kuning.

D. DEFINISI OPERASIONAL

1. Minyak Biji Labu Kuning

Minyak biji labu kuning adalah minyak nabati yang diperoleh dari proses ekstraksi dengan metode *cold pressed*. Minyak biji labu kuning dengan konsentrasi 5% sebagai fase minyak pada formulasi nanoemulsi yang ditambahkan dengan surfaktan dan kosurfaktan.

2. Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan adalah kemampuan senyawa uji untuk menangkap radikal bebas DPPH dibandingkan dengan larutan kontrol kuersetin dan diinterpretasikan dalam nilai *Inhibitory Concentration 50%* (IC₅₀).

3. Nanoemulsi

Nanoemulsi adalah sediaan yang berisi campuran isotropik antara minyak, surfaktan, dan kosurfaktan, sehingga terbentuk sediaan nanoemulsi yang stabil dengan ukuran partikel kurang dari 200 nm.

4. Karakterisasi sediaan nanoemulsi meliputi uji ukuran partikel, nilai indeks polidispersitas (PDI), persen transmitan, organoleptis, viskositas, tipe nanoemulsi, dan pH sediaan.

5. *Simplex Lattice Design*

SLD merupakan *software design expert* yang digunakan untuk mengoptimasi formula pada berbagai perbedaan jumlah komposisi bahan yang jumlah totalnya dibuat sama yaitu 12.

E. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi minyak biji labu kuning dengan konsentrasi 5%, variasi kombinasi surfaktan Tween 80, Span 80 dan kosurfaktan PEG 400.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah optimasi formula nanoemulsi dengan parameter ukuran droplet, PDI, persen transmitan, karakteristik nanoemulsi yang meliputi organoleptis, pH, viskositas, tipe nanoemulsi, dan aktivitas antioksidan yang diinterpretasikan dengan nilai IC_{50} .

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah formulasi dan prosedur pembuatan sediaan nanoemulsi, termasuk waktu dan kecepatan pengadukan.

F. PENGUMPULAN DATA

1. Alat

Alat yang digunakan yaitu neraca analitik (OHAUS), *magnetic stirrer* (Cimarex), seperangkat alat gelas (Pyrex, Iwaki), *Particle Size Analyzer* (PSA) (*Malvern*), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1900), pipet volume, *paleus ball*, pipet tetes, *ultra-turrax* (IKA-T25), viskometer *Brookfield*, pH meter (OHAUS), mikroskop, cawan porselen, aluminium foil, spatula

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak biji labu kuning (PT Tamba Sanjiwani), Tween 80 (MKR), Span 80 (MKR), PEG 400 (MKR), aquadest (MKR), DPPH (sigma aldrich), etanol p.a (*Merck*), kuersetin (sigma aldrich), serbuk Mg (farmasetis), HCl pekat (farmasetis), asam sulfat (farmasetis), reagen Dragendorf (farmasetis), FeCl 1% (farmasetis), metanol (farmasetis).

G. PROSEDUR PENELITIAN

1. Skrining fitokimia minyak biji labu kuning

a. Uji Flavonoid

Sebanyak 2 mL minyak biji labu kuning ditambahkan 0,2 g bubuk logam Mg dan 3 tetes HCl pekat pada tabung reaksi. Selanjutnya dikocok dan diamati, apabila terbentuk warna kuning hingga sampai kemerahan maka menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Palupi et al., 2016).

b. Uji Alkaloid

Sebanyak 2 mL minyak biji labu kuning ditambahkan 5 tetes asam sulfat 2N dalam tabung reaksi, kemudian dikocok dan diuji dengan pereaksi Dragendorf. Amati apabila terdapat endapan hingga maka menunjukkan adanya alkaloid (Palupi et al., 2016).

c. Uji Tanin

Sebanyak 2 mL minyak biji labu kuning ditambahkan 1 mL metanol dan 2 tetes FeCl 1% pada tabung reaksi, kemudian dikocok dan diamati

apabila terbentuk warna coklat kehijauan maka menunjukkan adanya tanin (Palupi et al., 2016).

2. Formulasi

Formulasi dilakukan dengan tahap awal yaitu penentuan formula yang merujuk pada penelitian Indalifiany (2021) dan dimodifikasi dengan penambahan Span 80 pada formula nanoemulsi. Formula dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Formula Sediaan Nanoemulsi

Bahan	Konsentrasi (%)	Kegunaan
Minyak biji labu kuning	5	Zat aktif
Tween 80	7	Surfaktan
Span 8-	1,5	Surfaktan
PEG 400	2	Kosurfaktan
Aquadest ad	100	Pelarut

(Indalifiany et al., 2021)

Sebelum optimasi formula, dilakukan penentuan aras rendah dan aras tinggi surfaktan dan kosurfaktan agar diperoleh komposisi yang tepat. Penentuan aras rendah dan aras tinggi surfaktan dan kosurfaktan dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3. 2 Aras Rendah Aras Tinggi Surfaktan Tween 80 – Span 80 dan Kosurfaktan PEG 400

Bahan	Konsentrasi (%)	Aras rendah	Aras tinggi
Tween 80	6-8	6	8
Span 80	1-2	1	2
PEG 400	1-3	1	3

Penentuan aras rendah dan aras tinggi surfaktan dan kosurfaktan dibuat dengan total yang sama, yaitu 12. Hasil optimasi surfaktan dan kosurfaktan menghasilkan 13 *run*, dapat dilihat pada Tabel 3.3.

Tabel 3. 3 Formulasi Nanoemulsi dengan *Design Expert Versi 13 Trial*

Run	Konsentrasi (%)		
	Tween 80	Span 80	PEG 400
1	7,5	1,5	3
2	8	1,5	2,5
3	8	1,5	2,5
4	8	1	3
5	7,5	2	2,5
6	7	2	3
7	8	1,5	2,5
8	7,5	2	2,5
9	7,5	1,5	3
10	7,5	2	2,5
11	8	2	2
12	7,66667	1,66667	2,66667
13	7,5	1,5	3

Hasil optimasi surfaktan dan kosurfaktan berdasarkan *software Design Expert* selanjutnya dimasukkan kedalam *run* formula sebanyak 13 formula. Hasil formula nanoemulsi minyak biji labu kuning dapat dilihat pada Tabel 3.4. Apabila formula sudah lengkap maka dilanjutkan dengan pembuatan sediaan nanoemulsi minyak biji labu kuning sebanyak 13 formula sebagai percobaan untuk verifikasi optimasi formula nanoemulsi yang optimum.

Tabel 3. 4 Formulasi Nanoemulsi Minyak Biji Labu Kuning dengan Variasi Tween 80 – Span 80 dan PEG 400 *Simplex Lattice Design*

Run Formula	Bahan (%)				
	MBLK	Tween 80	Span 80	PEG 400	Aquadest <i>ad</i>
F1	5	7,5	1,5	3	100
F2	5	8	1,5	2,5	100
F3	5	8	1,5	2,5	100
F4	5	8	1	3	100

F5	5	7,5	2	,5	100
F6	5	7	2	3	100
F7	5	8	1,5	2,5	100
F8	5	7,5	2	2,5	100
F9	5	7,5	1,5	3	100
F10	5	7,5	2	2,5	100
F11	5	8	2	2	100
F12	5	7,66667	1,66667	2,66667	100
F13	5	7,5	1,5	3	100

3. Prosedur pembuatan nanoemulsi

Formula nanoemulsi dibuat seperti pada Tabel 3.4. Nanoemulsi dibuat dengan minyak biji labu kuning (fase minyak) dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 7 menit pada kecepatan 300 rpm dengan suhu 50°C, kemudian ditambahkan Tween 80 dan Span 80 diaduk selama 7 menit (Campuran 1). PEG 400 dimasukkan pada campuran 1 dan diaduk selama 7 menit (Campuran 2). Aquadest ditambahkan pada campuran 2 sedikit demi sedikit hingga 100 mL dan diaduk kembali menggunakan *magnetic stirrer* selama 7 menit (Firmansyah et al., 2022). Untuk mengecilkan ukuran partikel pada sediaan nanoemulsi, selanjutnya pengadukan menggunakan *ultra-turrax* dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit (Nurrahliati et al., 2020).

4. Optimasi formula dengan *Design Expert* metode *Simplex Lattice Design*

Optimasi formula dilakukan menggunakan *software design expert* metode *Simplex Lattice Design* (SLD). Hasil olahan akan diperoleh 13 *run* dengan replikasi sebanyak 3 kali (Ayuningtyas et al., 2022). Formula kemudian dibuat menjadi nanoemulsi lalu dilakukan pengujian ukuran

partikel, indeks polidispersitas (PDI), dan persen transmitan. Hasil uji kemudian dimasukkan kedalam *software design expert* metode *simplex lattice design* kemudian dioptimasi hingga diperoleh formula terbaik dari 13 *run* yang ada dengan melihat derajat *desirability* yang mendekati 1 yang ditunjukkan oleh *design expert*. Melihat dari derajat *desirability* (dikatakan baik apabila derajat *desirability* mendekati 1), didapatkan hasil optimasi dari surfaktan tween 80 dan span 80 dan kosurfaktan PEG 400 sesuai pada Tabel 3.5.

Tabel 3. 5 Formula Optimum Variasi Tween 80 – Span 80 dan PEG 400 dengan *Design Expert Versi 13* Metode *Simplex Lattice Design*

Tween 80	Span 80	PEG 400	<i>Desirability</i>	
7,032	2,000	2,968	0,791	<i>Selected</i>

Hasil optimasi surfaktan dan kosurfaktan selanjutnya dimasukkan kedalam formula optimum dengan minyak biji labu kuning konsentrasi 5% sebagai fase minyak dan aquadest sebagai fase air. Hasil formula optimum dapat dilihat pada Tabel 3.6.

Tabel 3. 6 Formula Optimum Nanoemulsi Minyak Biji Labu Kuning

Bahan	Konsentrasi (% b/v)
Minyak biji labu kuning	5
Tween 80	7,032
Span 80	2,000
PEG 400	2,968
Aquadest <i>ad</i>	100

Setelah melakukan verifikasi formula sediaan nanoemulsi minyak biji labu kuning yang optimum, dilakukan pembuatan sediaan nanoemulsi minyak

biji labu kuning dengan replikasi sebanyak 3 kali dan sesuai dengan prosedur pembuatan nanoemulsi sebelumnya.

5. Karakterisasi nanoemulsi

a. Uji organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati terjadinya perubahan warna, bau, dan homogenitas setelah 24 jam pembuatan sediaan nanoemulsi.

b. Uji persen transmittan

Persen transmittan ditentukan dengan mengukur absorbansi sampel. Sampel sebanyak 1 mL dilarutkan dalam labu takar 100 mL dengan menggunakan aquadest. Larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm dengan aquadest sebagai blanko (Lina et al., 2017)

c. Uji pH

Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter. Elektroda dikalibrasi dengan dapar standar pH 4, pH 7, dan pH 10. Proses kalibrasi selesai apabila nilai pH yang tertera telah sesuai dengan nilai pH standar dapar dan stabil. Elektroda dicelupkan ke dalam nanoemulsi, nilai pH yang muncul dicatat. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang (Depkes RI, 2014).

d. Uji viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan viskometer *brookfield*. Sebanyak 50 mL sampel dimasukkan kedalam *beaker glass* dan

viskometer diatur dengan kecepatan 50 rpm spindle 64. Hasil pengukuran akan ditampilkan pada layar monitor viskometer (Purnamasari et al., 2020)

e. Uji ukuran partikel dan indeks polidispersitas (PDI)

Uji ukuran partikel dan nilai PDI dilakukan menggunakan *Particle Size Analyzer*. Sampel sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dianalisis oleh sinar laser PSA (Widyastuti & Saryanti, 2023).

f. Uji tipe nanoemulsi

Sediaan nanoemulsi diteteskan pada kaca objek kemudian ditambahkan zat warna larut air, yaitu metilen *blue*. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40 untuk mengetahui kelarutan metilen *blue* pada sediaan nanoemulsi. Apabila nanoemulsi tipe minyak dalam air maka metilen *blue* akan melarut dan berdifusi merata. Apabila nanoemulsi tipe air dalam minyak maka partikel-partikel metilen *blue* akan bergerombol dipermukaan (Ma'arif et al, 2023).

6. Uji Antioksidan Metode DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH 40 ppm

Larutan DPPH 40 ppm dibuat dengan menimbang serbuk DPPH sebanyak 4 mg. Kemudian dilarutkan dengan 100 mL etanol p.a dalam labu ukur (Langi et al., 2020).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Absorbansi larutan DPPH 40 ppm dibaca pada panjang gelombang 400-800 nm (Anggraini et al., 2018).

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Larutan DPPH 40 ppm dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menit ke 1 sampai menit ke 30 (Rahayu et al., 2021).

d. Pengukuran absorbansi larutan blanko

Larutan blanko DPPH dibuat dengan memipet larutan baku DPPH 40 ppm sebanyak 3 mL dan dicukupkan dengan etanol p.a 2 mL. Kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Jumawardi et al., 2021).

e. Pengukuran aktivitas antioksidan baku pembanding kuersetin

Kuersetin ditimbang sebanyak 10 mg kemudian cukupkan dengan etanol p.a 10 mL sehingga didapat larutan baku kuersetin 1000 ppm. Kemudian diencerkan menjadi 100 ppm dengan memipet 1 mL baku kuersetin dan cukupkan dengan etanol p.a 10 mL. Larutan 100 ppm dibuat seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 ppm dengan memipet masing-masing 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 dan dicukupkan dengan etanol p.a pada labu ukur 5 mL. Masing-masing seri diukur sebanyak 2 mL kuersetin dan 3 mL larutan DPPH. Campuran dihomogenkan dan tutup dengan alumunium foil, diinkubasi sesuai *operating time* dengan suhu ruangan 25°C. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh, yaitu 517 nm (Jumawardi et al., 2021).

f. Pengukuran aktivitas antioksidan minyak biji labu kuning

Sebanyak 10 mg minyak labu kuning ditimbang dan dicukupkan dengan etanol p.a pada labu ukur 100 mL sehingga didapat konsentrasi 100 ppm. Larutan 100 ppm dibuat seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 ppm dengan memipet masing-masing 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 dan dicukupkan dengan etanol p.a pada labu ukur 5 mL. Masing-masing seri diukur sebanyak 1 mL minyak biji labu kuning dan 4 mL larutan DPPH. Campuran dihomogenkan dan ditutup dengan alumunium foil, diinkubasi sesuai *operating time* dengan suhu ruangan 25°C. Absorbansi diukur pada panjang gelombang yang telah diperoleh, yaitu 517 nm (Hartaman et al., 2023).

g. Pengukuran aktivitas antioksidan nanoemulsi minyak biji labu kuning

Sebanyak 10 mg minyak labu kuning ditimbang dan dicukupkan dengan etanol p.a pada labu ukur 100 mL sehingga didapat konsentrasi 100 ppm. Larutan 100 ppm dibuat seri konsentrasi 4, 6, 8, 10, 12 ppm. Campuran dihomogenkan dan ditutup dengan alumunium foil, diinkubasi sesuai *operating time* dengan suhu ruangan 25°C. Pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang maksimum λ 517 nm (Abdillah et al., 2018).

Nilai serapan larutan DPPH terhadap sampel tersebut dinyatakan dengan persen inhibisi (IC₅₀) dengan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin tinggi aktivitas antioksidan (Analda Souhoka et al., 2019).

H. ANALISIS DATA

Data uji diolah menggunakan *software design expert* versi 13 dengan metode *simplex lattice design* untuk mendapatkan formula yang optimum dari optimasi komposisi nanoemulsi. Data yang diperoleh dibandingkan dengan persyaratan spesifikasi yang telah ditentukan meliputi organoleptis, persen transmittan, pH, viskositas, tipe nanoemulsi, ukuran partikel, nilai PDI, dan uji antioksidan. Aktivitas antioksidan sampel dinyatakan dalam persen inhibisi dan dihitung menggunakan persamaan:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Setelah didapat persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi selanjutnya dilakukan perhitungan regresi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai IC₅₀ yaitu x sebagai konsentrasi (ppm) dan y sebagai persen inhibisi (%). IC₅₀ sampel dan pembanding didapatkan dari persamaan:

$$y = bx + a$$

Keterangan:

y = absorbansi atau garis regresi

a = slope

b = intersep

x = variabel bebas

Data yang dianalisis secara deskriptif yaitu hasil uji organoleptis dan uji tipe nanoemulsi. Data yang diperoleh dari pengujian ukuran partikel, nilai PDI,

dan persen transmittan selanjutnya dilakukan uji *One Sample T Test* kemudian dibandingkan dengan prediksi dari hasil *numerical Design Expert*. Hasil uji viskositas, pH, dan IC₅₀ diuji statistika parametrik *One Way ANOVA* apabila data yang dihasilkan terdistribusi normal, tetapi apabila data yang dihasilkan tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis*.