

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian pada penelitian ini ialah *Eksperimental Laboratories* yang memanfaatkan penggunaan ekstrak bunga telang dengan menggunakan metode *Spontaneous Emulsification (SE)* untuk memformulasikan sediaan nanoemulsi dengan melakukan optimasi pada Tween 80 dan PEG 400 menggunakan perangkat lunak *Design Expert Versi 13*. Ekstrak bunga telang dibuat dengan metode ekstraksi maserasi. Dilakukan pengujian terhadap ukuran nanoemulsi, PDI dan persen transmittan hasil dari pengaruh tiga variabel independen dengan menggunakan metode *Simplex Lattice Design*

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

a. Determinasi

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi, yang merupakan bagian dari Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

b. Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi bunga telang (*Clitoria ternatea*) dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Program Studi Farmasi di Universitas Ngudi Waluyo.

c. Pembuatan Nanoemulsi

Pembuatan nanoemulsi dari ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

d. Ukuran dan Distribusi Partikel

Pengukuran ukuran dan distribusi partikel (indeks polidispersitas) dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai Maret 2024

C. Definisi Operasional

1. Uji Ukuran Nanoemulsi

Pengujian ukuran partikel nanoemulsi dilakukan untuk melihat sediaan nanoemulsi memiliki ukuran partikel yang memenuhi kriteria ukuran nanoemulsi yaitu <100 nm (Destiyana, 2018)

2. Uji Tipe Nanoemulsi

Pengujian tipe nanoemulsi bertujuan untuk melihat apakah sediaan nanoemulsi yang dimuat termasuk kedalam tipe M/A atau A/M. Prinsip dari pengujian ini yaitu tipe nanoemulsi M/A dapat diencerkan dengan air dan tipe nanoemulsi A/M dapat diencerkan dengan minyak (Cicilia, 2016) dalam (Maharini, 2020).

3. Uji Persen Transmitan

Uji % transmitan digunakan sebagai metode untuk mengamati tingkat kejernihan sediaan nanoemulsi. Sediaan nanoemulsi dianggap baik jika memiliki nilai % transmitan yang mendekati 100%, karena hal ini menunjukkan bahwa globul yang terbentuk dalam nanoemulsi kemungkinan sudah mencapai ukuran nanometer, seperti disebutkan dalam penelitian oleh Priani (2017).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah faktor-faktor yang menjadi fokus penelitian atau penyebab utama suatu fenomena. Dalam penelitian ini, variabel bebas terdiri dari optimasi komposisi Tween 80 18-22% dan PEG8-12%.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah variabel yang diukur untuk menentukan pengaruh dari variabel bebas. Dalam penelitian ini, variabel tergantung meliputi formulasi nanoemulsi dengan menggunakan parameter uji ukuran partikel, uji persen transmitan dan PDI

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali adalah faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil penelitian dan dapat diatur atau dikendalikan. Dalam konteks ini, beberapa contoh variabel terkendali termasuk suhu, bahan,

kondisi laboratorium, dan kecepatan pengaduk magnetik. Variabel-variabel ini dapat diatur agar konsistensi dan kontrol eksperimen.

E. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Spektrofotometer *Uv-Vis* (Shimadzu), Timbangan analitik (Matrix), Magnetic stirrer (Thermo), Rotary evaporator, pH meter, dan PSA (*Particle Size Analyzer*), batang pengaduk, spatula, pipet ukur, gelas ukur 10mL dan 100mL, gelas beker 250mL, cawan porselin 300mL.

b. Bahan

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah bunga telang yang diambil dari daerah Kabupaten Banjarnegara yang dipetik dalam kondisi masih segar, telah mekar sempurna, dan berwarna ungu kebiruan, tween 80 (*food grade*), PEG 400 (*food grade*), aquadest, minyak VCO (*Virgin Coconut Oil*), etanol 96%, kertas saring.

2. Prosedur Penelitian

a. Determinasi Tanaman

Penentuan tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang. Tujuannya adalah untuk memastikan identitas bunga telang (*Clitoria Ternatea*) guna menghindari kesalahan dalam

pengumpulan bahan penelitian dan untuk mencegah kemungkinan adanya pencampuran dengan tanaman lain.

b. Penyiapan Bahan

Proses penyiapan simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea*) melibatkan penggunaan bagian bunga tanaman. Bunga yang dipetik harus dalam kondisi masih segar, telah mekar sempurna, dan berwarna ungu kebiruan. Setelah dipetik, bunga disorotasi untuk memisahkan kotoran atau benda asing yang mungkin mengikuti selama proses pemetikan. Selanjutnya dilakukan proses pencucian bunga dengan menggunakan air mengalir agar bunga bersih dari debu dan kotoran. Bunga telang dijemur dengan penutup kain hitam untuk melindunginya dari paparan langsung sinar matahari. Hal ini dilakukan karena sinar matahari langsung dapat merusak kandungan metabolit sekunder dari tanaman. Bunga telang yang telah kering kemudian diblender dan diayak menggunakan ayakan berukuran 40 mesh.

c. Pembuatan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea*)

Pembuatan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi di laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo. Bunga telang yang sudah berbentuk simplisia dihaluskan kemudian disaring menggunakan ayakan 40 mesh. Proses pembuatan ekstrak bunga telang menggunakan teknik maserasi, dimulai dengan merendam

500gram serbuk simplisia bunga telang dalam pelarut etanol 96%. Dalam proses ini, 500 mg serbuk simplisia bunga telang direndam dalam 1.750 mL pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:5. (Nurcahyo & Kunci, 2020). Maserasi dilakukan selama 2 hari dalam toples kaca tertutup rapat, ditempatkan di tempat yang terhindar dari cahaya, dengan pengadukan yang dilakukan 3 kali sehari. Setelah 2 hari, dilakukan penyaringan menggunakan kain flanel untuk memisahkan maserat dan filtrat. Filtrat kemudian dilakukan remaserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 750 mL dengan cara yang sama seperti sebelumnya. Selanjutnya, maseraat yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50⁰ hingga membentuk ekstrak kental. Proses selanjutnya melibatkan pemanasan dengan *waterbath* pada suhu 50⁰ untuk mendapatkan ekstrak kental (Narsih & Agato, 2018). Hasil rendemen ekstrak kental dihitung setelah proses selesai.

Rumus perhitungan rendemen:

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot total ekstrak}}{\text{bobot total serbuk}} \times 100\%$$

d. Formulasi

Nanoemulsi, sebagai salah satu sistem pengantaran obat atau bahan aktif yang inovatif, telah mendapatkan perhatian signifikan dalam penelitian dan pengembangan karena potensi aplikasinya yang luas. Formulasi nanoemulsi melibatkan pemilihan bahan-bahan yang tepat dan teknik pembuatan yang

optimal. Beberapa faktor penting dalam formulasi ini meliputi pemilihan surfaktan dan ko-surfaktan yang sesuai dan penentuan rasio fase minyak dan fase air. Setiap parameter ini berkontribusi pada stabilitas, ukuran droplet, dan efisiensi nanoemulsi dalam aplikasi akhir. Acuan formulasi mendasari prinsip dasar dan teknik pembuatan. Acuan ini mencakup pemilihan bahan aktif, evaluasi stabilitas, dan parameter proses yang berpengaruh pada karakteristik akhir nanoemulsi. Memahami dan mengikuti acuan formulasi ini memastikan bahwa nanoemulsi yang dihasilkan memiliki kualitas yang konsisten dan memenuhi standar aplikasi yang diinginkan. Acuan Formulasi dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Acuan Formulasi Sediaan Nanoemulsi

Bahan	Fungsi	Jumlah (%b/b)				
		A1	A2	A3	A4	A5
Ekstrak daun karika	Bahan aktif	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
VCO	Fase minyak	3	3	3	3	3
Tween 80	Surfaktan	12	8	6	18	16
PEG 400	Co-surfaktan	12	16	18	6	8
Aquadest	Fase air ad	100	100	100	100	100

(Suciati et al., 2014; Yuliani, 2016)

Penggunaan kombinasi surfaktan dan kosurfaktan dalam rentang aras tinggi dapat menciptakan ukuran droplet berukuran nano. Kosurfaktan yang digunakan dalam rentang aras rendah dapat meningkatkan efisiensi formulasi dengan mengurangi tegangan permukaan dan mendukung pembentukan nanoemulsi yang stabil. Pemilihan surfaktan dan kosurfaktan berdasarkan

penelitian dari jurnal yang relevan memungkinkan pencapaian formulasi nanoemulsi yang optimal dan sesuai dengan standar aplikasi yang diharapkan. Aras rendah aras tinggi surfaktan dan kosurfaktan dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Aras Rendah Aras Tinggi Surfaktan dan Kosurfaktan

Bahan	Konsentrasi (%)	Aras rendah (%)	Aras tinggi (%)
Tween 80	18-22	18	22
PEG 400	8-12	8	12

Nilai faktor dalam *mixture design* memiliki proporsi antara 0 dan 1. Salah satu metode dalam *mixture design* adalah *Simplex Lattice Design* (SLD). *Simplex Lattice Design* adalah metode optimasi yang digunakan untuk menentukan formula optimum suatu campuran bahan dengan proporsi jumlah total suatu bahan yang berbeda harus 1 (100%). Bahan atau faktor yang digunakan dalam optimasi adalah minimal terdiri dari dua bahan yang berbeda. Faktor dalam *mixture design* akan menentukan ruang desain atau daerah uji. *Run* adalah banyaknya eksperimen yang harus dilakukan sesuai dengan desain eksperimental yang dipilih (Hidayat, 2020)

Tabel 3.3 Formulasi Ekstrak Bunga Telang menurut *Design Expert Versi.13 Trial*

Run	Component 1 Tween 80	Component 2 PEG 400
-----	-------------------------	------------------------

1	18	12
2	22	8
3	21	9
4	20,7	9,3
5	20	10
6	19	11
7	19,3	10,7
8	18	12

Berdasarkan kajian yang mengacu pada jurnal ilmiah serta hasil analisis yang telah dilakukan menggunakan perangkat lunak *Design Expert*. Proses pengolahan data melalui *Design Expert* memungkinkan pemodelan yang akurat terhadap berbagai parameter, sehingga hasil akhirnya menunjukkan komposisi nanoemulsi yang optimal. Dengan mempertimbangkan berbagai faktor dan variabel yang terlibat. Komposisi nanoemulsi yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 3.4.

Tabel 3.4 Formulasi Ekstrak Bunga Telang dengan Kombinasi Tween 80 dan PEG 400

Bahan	Jumlah (%b/b)							
	FI	FII	FIII	FIV	FV	FVI	FVII	FVIII
Ekstrak bunga telang	1	1	1	1	1	1	1	1
VCO	3	3	3	3	3	3	3	3
Tween 80	18	22	21	20,7	20	19	19,3	18
PEG 400	12	8	9	9,3	10	11	10,7	12
Aquadest ad	100	100	100	100	10	100	100	100
					0			

e. Pembuatan Nanoemulsi

Formula sediaan topikal nanoemulsi ekstrak bunga telang seperti pada Tabel 3.2 ekstrak bunga telang, Tween 80 dan VCO di masukkan ke dalam beaker glass dan dicampur dengan *magnetik stirrer* selama 5 menit dengan kecepatan 1000rpm. Kemudian ditambah dengan PEG 400 di buat menggunakan *magnetik stirrer*

selama 5 menit dengan kecepatan 1000rpm. Setelah 5 menit, aquadest ditambah sedikit demi sedikit, kecepatan pengadukan ditingkatkan menjadi 1250 rpm selama 10 menit. Bahan yang telah tercampur dihomogenkan. Penambahan aquadest dihentikan setelah volume ad 100 % (b/b), nanoemulsi yang terbentuk akan berwarna jernih (Suciati et al, 2014).

f. Evaluasi sediaan nanoemulsi ekstrak bunga telang

1) Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis adalah suatu metode pengujian yang fokus pada penginderaan manusia. Stimulus yang diterima oleh indera dapat bersifat mekanis, bersifat fisik, seperti dingin, panas, sinar, dan warna, serta bersifat kimia, seperti bau, aroma, dan rasa. Uji organoleptis dilakukan dengan cara mencium bau dan warna yang diperoleh dari sediaan. Pengamatan organoleptik bertujuan untuk mengetahui bau dan warna yang dihasilkan pada sediaan nanoemulsi (Arifin, 2006),

2) Uji pH

Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter dengan cara yaitu, alat terlebih dahulu dikalibrasi menggunakan larutan dapar standar pH netral (pH 7,01) dan larutan dapar pH asam (pH 4,01) sampai alat menunjukkan nilai pH tersebut. Kemudian elektroda dicuci

dengan akuades, lalu dikeringkan dengan tissue. Elektroda dicelupkan pada sampel, sampai alat menunjukkan nilai pH yang konstan. Angka yang ditunjukkan pH meter merupakan nilai sediaan (Rawlins, 2002) dalam (Aniqo, 2020).

3) Uji Ukuran Nanoemulsi

Ukuran nanoemulsi diukur menggunakan *particle size analyzer* (PSA). Sampel diambil sebanyak 1ml dan dimasukkan ke dalam kuvet sampai garis kuvet yang telah ditentukan. Kuvet harus dibersihkan terlebih dahulu agar tidak mempengaruhi hasil analisis. Kuvet berisi sampel dimasukkan ke dalam tempat sampel dan dianalisis dengan alat tersebut (Zulfa, 2020).

4) Uji Tipe Nanoemulsi

Pengujian jenis nanoemulsi dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran. Pengujian ini dilakukan dengan melarutkan sampel dalam fasa air (1: 100) dan fasa minyak (1: 100). Jika sampel benar-benar larut dalam aquadest, maka jenis nanoemulsi diklasifikasikan sebagai minyak dalam air (O/W). Sebaliknya jika sampel benar-benar larut dalam fase minyak, maka jenis nanoemulsi diklasifikasikan sebagai air dalam minyak (W/O) (Siqhny, 2020).

5) Uji Persen Transmittan

Sebanyak 1 mL nanoemulsi ekstrak bunga telang diencerkan menggunakan aquadest hingga volume akhir menjadi 10 mL (Darusman, 2017). Transmittansi nanoemulsi ekstrak bunga telang kemudian diukur pada panjang gelombang 650 nm menggunakan spektrofotometer UV (Huda & Wahyuningsih, 2016).

6) PDI

Ukuran nanoemulsi dapat diukur dengan menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA) dengan menggunakan metode hamburan cahaya dinamis. Proses diawali dengan pengambilan sampel sebanyak 1ml kemudian dimasukkan ke dalam kuvet hingga batas garis kuvet yang telah ditentukan. Kuvet harus dibersihkan terlebih dahulu agar tidak mempengaruhi hasil analisis. Kuvet yang telah diisi dengan sampel dimasukkan ke dalam sampel holder atau tempat sampel dan dilakukan analisis oleh instrumen.

F. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini berfokus kepada formulasi optimum dengan parameter uji ukuran droplet, uji %transmitan, PDI dan stabilitas fisik sediaan nanoemulsi ekstrak bunga telang. Untuk menentukan formulasi yang optimum parameter yang dihasilkan akan dibandingkan dengan hasil yang diperoleh dari *Simplex Lattice Design* menggunakan *software Design Expert Versi 13 Trial*. Hasil mutu fisik diuji menggunakan parameter pH, organoleptis dan uji tipe nanoemulsi.

Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan uji statistik *One Sample T-test* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara hasil optimasi dan hasil dari *Simplex Lattice Design*. Tujuan perbandingan ini adalah untuk menilai sejauh mana hasil optimasi mencapai perbaikan dibandingkan dengan rencana awal.