

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimen yaitu pemanfaatan ekstrak buah parijoto menjadi sediaan nanoemulsi dengan optimasi Tween 80 dan PEG 400 menggunakan software *Design Expert Versi 11*, sebagai respon adalah uji ukuran nanoemulsi, PDI (Particle Distribution Index) dan uji transmittansi dari efek tiga variabel independen menggunakan metode *Simplex Lattice Design*.

B. Lokasi dan waktu penelitian

1. Lokasi

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang
- b. Pembuatan ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi waluyo
- c. Pembuatan nanoemulsi ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi waluyo
- d. Ukuran dan distribusi partikel (indeks polidispersitas) dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

2. Waktu

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan November 2019-Januari 2020.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah formulasi optimum nanoemulsi ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume).

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian formulasi nanoemulsi ekstrak buah parijoto dengan menggunakan variasi surfaktan tween 80 dan PEG 400.

D. Defini Operasional

1. Uji pH adalah uji stabilitas fisik yang menggunakan kertas lakmus, pH sediaan nanoemulsi memiliki memiliki rentang 4-6.
2. Uji organoleptis adalah pengujian dengan pengamatan pengindraan, nanoemulsi yang stabil ditandai dengan tidak terjadi pemisahan fase, jernih, homogen, dan tidak berbau tengik.
3. Uji viskositas menunjukkan sifat dari cairan untuk mengalir. Makin kental suatu cairan, maka semakin besar kekuatan yang diperlukan agar cairan dapat mengalir.
4. Uji ukuran nanoemulsi dilakukan untuk mengetahui apakah ukuran yang terbentuk memenuhi kriteria ukuran nanoemulsi yaitu 50-500 nm.
5. Uji tipe nanoemulsi memiliki prinsip mengencerkan sistem yang terbentuk dengan fase minyak atau fase airnya. Sehingga akan menghasilkan tiga tipe emulsi yaitu tipe minyak dalam air (M/A) atau tipe air dalam minyak (A/M), atau tipe emulsi ganda (M/A/M) dan (A/M/A).

6. *Freeze – Thaw* adalah uji stabilitas fisik yang dilakukan pada suhu ekstrim misalnya pada suhu 4⁰C dan 40⁰C.
7. Uji Persen Transmittan
8. Uji Suhu Kulkas

E. Variable penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah faktor-faktor yang menjadi pokok masalah yang ingin diteliti atau penyebab utama suatu gejala. Variabel bebas pada penelitian ini adalah komposisi Tween 80 dan PEG 400 ekstrak buah parijoto.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah variabel bebas yang diberikan dan ukur untuk menentukan ada tidaknya pengaruh. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah untuk memenuhi uji pH, uji organoleptis, uji viskositas, uji ukuran droplet, uji tipe nanoemulsi, uji *Freeze – Thaw* dan uji suhu kulkas pada sediaan nanoemulsi ekstrak buah parijoto dengan respon program dari *Design Expert 11 Trial* yaitu PDI, uji ukuran nanoemulsi, dan uji persen trasmittan.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali adalah faktor - faktor yang dapat mempengaruhi hasil penelitian yaitu suhu, bahan, kondisi laboratorium, dan kecepatan *magnetic stirrer*.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer *Uv* (UV mini 1240), Timbangan analitik (Matrix), *magnetic stirrer*(Malvern), *rotary evaporator* (Ika RV10 Digital V), seperangkat alat gelas (Pyrex), pH meter (Ohaus), Viskometer Brookfield (Rion DV2T), PSA (*particle size analyzer*).

b. Bahan

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah ekstrak buah parijoto, tween 80 [PT. Brataco], PEG 400 [Merck], aquadest, minyak VCO (*Virgin Coconut Oil*) [CV. Cipta Anugrah], kertas saring.

2. Prosedur penelitian

a. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dari buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan penelitian dan mencegah kemungkinan tercampur dengan tanaman lain.

b. Penyiapan Bahan

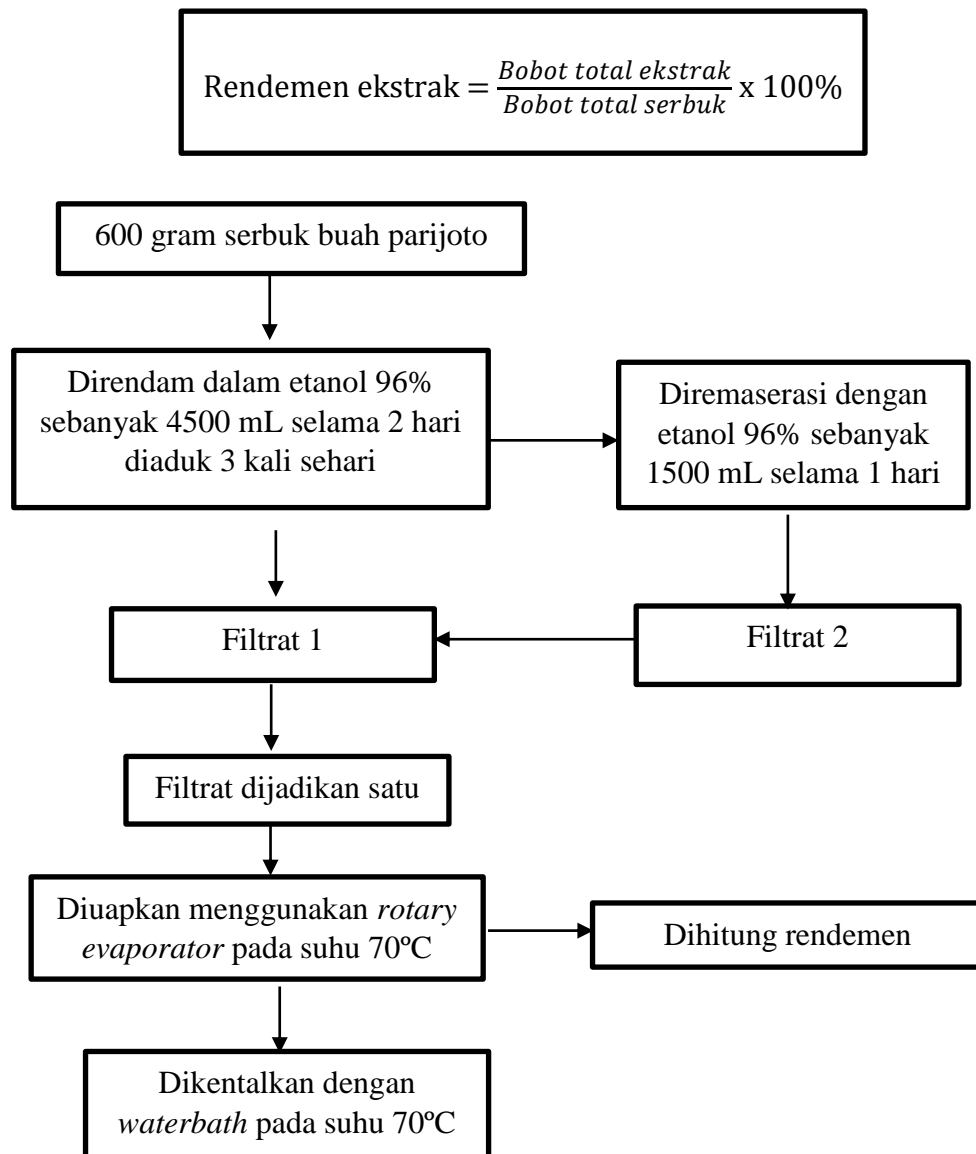
Buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) yang diperoleh selanjutnya dilakukan sortasi untuk memisahkan buah dari rantingnya

dan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji. Buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) yang sudah disortasi selanjutnya dicuci dengan air mengalir, kemudian diangin-anginkan hingga tidak ada sisa air. Buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) kemudian dirajang dan dikeringkan. Buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) yang sudah kering kemudian digiling menjadi serbuk halus dan dilakukan ekstraksi.

c. Pembuatan Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)

Pembuatan ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk simplisia buah parijoto sebanyak 600 gram dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% (1:10) sebanyak 6 L. Maserasi dilakukan selama 2 hari sambil diaduk 3 kali sehari. Maserat yang diperoleh dipisahkan menggunakan kertas saring dan dilakukan proses remaserasi dengan pelarut yang sama hingga hasil maserat berwarna bening yang menandakan pelarut yang digunakan sudah tidak bisa menarik senyawa yang terdapat dalam simplisia. Hasil maserat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 70° C hingga diperoleh ekstrak etanol buah parijoto. (Hendrawati, 2016). Ekstrak kental yang diperoleh, dihitung hasil rendemennya.

Rumus perhitungan rendemen:



Gambar 3.1. Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Parijoto

d. Uji Bebas Etanol

Pengujian bebas etanol dilakukan dengan cara memasukkan sampel ke dalam tabung reaksi, ditambahkan asam asetat dan asam sulfat kemudian dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Tenda *et al.*, 2017)

Tabel 3.4 Aras rendah Aras tinggi surfaktan dan kosurfaktan

Bahan	Konsentrasi (%)	Aras rendah (%)	Aras tinggi (%)
Tween 80	20-21	20	21
PEG 400	10-11	10	11

f. Prosedur pembuatan nanoemulsi

Formula sediaan topikal nanoemulsi ekstrak buah parijoto seperti pada Tabel 3.2 Tween 80 dan PEG 400, ekstrak buah parijoto dan VCO di masukkan ke dalam beaker glass dan dicampur dengan *magnetik stirrer* selama 5 menit dengan kecepatan 750 rpm. Setelah 5 menit, aquadest ditambah sedikit demi sedikit, kecepatan pengadukan ditingkatkan menjadi 1000 rpm selama 5 menit dan 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).

g. Evaluasi sediaan nanoemulsi ekstrak buah parijoto

1) Uji pH

Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter. Sebelum digunakan, elektroda dikalibrasi atau diverifikasi dengan menggunakan larutan standar dalam pH 4, 7 dan 10. Proses kalibrasi selesai apabila nilai pH yang tertera pada layar telah sesuai dengan nilai pH standar dapar dan stabil. Setelah itu, elektroda dicelupkan ke dalam sediaan. Nilai

pH sediaan akan tertera pada layar. Pengukuran pH dilakukan pada suhu ruangan.

2) Uji organoleptis

Uji organoleptis meliputi wujud, warna, dan aroma sediaan, yang diamati setiap minggu selama 3 minggu yaitu pada minggu 0, 7, 14, 21 dengan menggunakan 3 responden.

3) Uji viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield. Sebanyak 14 ml sampel dimasukkan ke dalam cup dan dipasang pada solvent trap yang telah tersedia. Viskometer diatur dengan kecepatan 200 rpm, tiga kali putaran, selama 30 detik.

4) Uji ukuran nanoemulsi

Ukuran nanoemulsi diukur dengan menggunakan particle size analyzer (PSA) dengan tipe dynamic light scattering. Sampel diambil dan dimasukkan ke dalam kuvet sampai batas garis kuvet yang telah ditentukan. Kuvet harus terlebih dahulu dibersihkan sehingga tidak mempengaruhi hasil analisis. Kuvet yang telah diisi dengan sampel kemudian dimasukkan ke dalam sampel holder dan dilakukan analisis oleh instrumen.

5) Uji tipe nanoemulsi

Uji tipe nanoemulsi dilakukan dengan metode dilusi atau pengenceran. Uji ini dilakukan dengan melarutkan sampel ke

dalam fase air (1:100) dan fase minyak (1:100). Jika sampel larut sempurna dalam aquadest, maka tipe nanoemulsi tergolong dalam tipe minyak dalam air (M/A), sedangkan jika sampel larut sempurna dalam fase minyak, maka tipe nanoemulsi tergolong dalam tipe air dalam minyak (A/M).

6) Uji *Freeze – Thaw*

Uji stabilitas *freeze thaw* bertujuan untuk mengetahui ketahanan sediaan terhadap perubahan suhu. Masing masing formula nanoemulsi disimpan pada suhu 10⁰C dan 40⁰C dengan lama penyimpanan pada masing-masing suhu selama 48 jam dan dilakukan 5 siklus. Nanoemulsi yang telah melewati *Freeze – Thaw* diamati organoleptis, terjadinya pemisahan fase, pH, persen transmittan, viskositas, serta ukuran droplet.

7) Uji Persen Transmittan

Sebanyak 100 µL nanoemulsi ekstrak buah parijoto ditambahkan aquadest hingga volume akhir 10 mL (Priani dan Darusman, 2017). Homogenisasi dilakukan dengan bantuan *magnetic stirrer* selama 1 menit. Nanoemulsi ekstrak buah parijoto kemudian diukur transmittannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 650 nm (Huda dan Wahyuningsih, 2016).

8) Uji Sentrifugasi

Sebanyak 10 ml sediaan dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga. Uji sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 3000 rpm

selama 30menit kemudian dilakukan pengamatan. Nanoemulsi yang stabil dapat diamati dengan tidak terjadi pemisahan pada kedua fase. Perlakuan tersebut setara dengan gravitasi penyimpanan selama 1 tahun (Priani *et al.*, 2014).

9) Uji Stabilitas pada suhu kulkas

Sediaan nanoemulsi disimpan pada suhu kulkas yaitu 2 – 8⁰C, selama penyimpanan tersebut dilakukan pengamatan organoleptis pada hari ke 7 dan 14. Spesifikasi sediaan adalah stabil dalam berbagai suhu tanpa ada perubahan organoleptis, dan pH.

10) PDI

Ukuran nanoemulsi diukur dengan menggunakan particle size analyzer (PSA) dengan tipe dynamic light scattering. Sampel diambil dan dimasukkan ke dalam kuvet sampai batas garis kuvet yang telah ditentukan. Kuvet harus terlebih dahulu dibersihkan sehingga tidak mempengaruhi hasil analisis. Kuvet yang telah diisi dengan sampel kemudian dimasukkan ke dalam sampel holder dan dilakukan analisis oleh instrumen.

G. Pengolahan Data

Pengolahan data pada penelitian ini akan dilakukan dengan tahap-tahap berikut ini:

1. Penyuntingan (*Editing*)

Penyuntingan teks merupakan kegiatan memperbaiki sebuah tulisan yang sudah disiapkan dengan memperhatikan penyajian isi, sistematika dan bahasa. Hasil yang didapatkan dari kegiatan menyunting adalah mendapatkan tulisan yang baik, baik dari cara penulisannya, maupun secara konteks kalimatnya, sehingga menjadi sebuah tulisan yang menarik, dan berkualitas (Eneste, 2009).

2. *Tabulating*

Tabulating ini merupakan proses penyusunan dan analisa data dalam bentuk tabel dengan cara memasukkan data kedalam bentuk tabel sehingga peneliti akan mudah melakukan analisis(Notoadmojo,2012).

3. Pemasukan Data (*Enrty*)

Entry data adalah kegiatan atau langkah – langkah memasukkan data- data hasil penelitian kedalam program aplikasi statistic SPSS (*Statistical Product ServiceSolutions*) untuk pengujian statistik (Notoadmojo, 2012).

4. *Cleansing*

Cleansing merupakan bagian pengecekan kembali data yang sudah dimasukkan untuk menghindari kesalahan pengetikan.

H. Analisis data

Data hasil optimasi nanoemulsi, uji stabilitas yang meliputi uji ukuran droplet, pH, viskositas, %transmittan, dan PDI. Masing – masing dibandingkan dengan hasil yang terdapat pada Simplex Lattice Design dengan software *Design Expert Versi 11 Trial*, serta dianalisis menggunakan uji

statistik dengan metode One Sample T-test (Uji-t). Uji T atau uji Test adalah salah satu tes statistik yang digunakan untuk menguji kebenaran atau kepalsuan hipotesis nihil yang menyatakan bahwa antara dua buah mean sampel yang diambil secara acak dari populasi yang sama, tidak berbeda signifikan. Analisa Uji T menggunakan program SPSS versi 16 dengan taraf kepercayaan 95%.