

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium yaitu pemanfaatan ekstrak biji pinang sebagai sediaan nanoemulsi dengan optimasi variasi PEG 400 : Tween 80 dan uji stabilitas fisik sediaan nanoemulsi menggunakan program *Design Expert Versi 11 Trial*.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Universitas Ngudi Waluyo dan determinasi dilakukan di Universitas Diponegoro (UNDIP) untuk mengetahui kebenaran biji pinang (*Areca catechu L.*). Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember-Januari 2020.

#### **C. Variable Penelitian**

##### 1. Variabel bebas

Optimasi surfaktan dan kosurfaktan sediaan nanoemulsi ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*)

##### 2. Variable tergantung

a. Respon formula optimum meliputi ukuran nano, indeks polidispers, persen transmattan.

b. Uji stabilitas formula optimum meliputi uji organoleptis, uji pH, uji viskositas, uji sentrifugasi, uji tipe nanoemulsi, uji ukuran nano, indeks polidispers, uji persen transmattan, cycling test.

## **D. Definisi operasional**

### **1. Maserasi**

Maserasi adalah salah satu jenis [metoda ekstraksi](#) dengan sistem tanpa pemanasan atau dikenal dengan istilah ekstraksi dingin, jadi pada metoda ini pelarut dan sampel tidak mengalami pemanasan sama sekali. Sehingga maserasi merupakan teknik ekstraksi yang dapat digunakan untuk senyawa yang tidak tahan panas ataupun tahan panas (Hamdani, 2014).

### **2. Nanoemulsi**

Nanoemulsi adalah system emulsi transparent, tembus cahaya dan merupakan disperse minyak air yang distabilkan oleh film surfaktan ataupun molekul surfaktan yang memiliki ukuran droplet <100nm.

### **3. Surfaktan**

Surfaktan ialah molekul yang terdiri atas gugus hidrofilik dan hidrofobik yang dapat menyatukan campuran antara air dan minyak. Dalam penelitian ini digunakan Tween 80 sebagai surfaktan dengan konsentrasi sebesar 16% w/w.

### **4. Kosurfaktan**

Kosurfaktan berperan dalam membantu surfaktan meningkatkan kelarutan zat terlarut dalam medium dispers dengan meningkatkan fleksibilitas lapisan di sekitar area droplet. Dalam penelitian ini digunakan PEG 400 sebagai kosurfaktan dengan konsentrasi sebesar 8% w/w.

### **5. Stabilitas fisik nanoemulsi ekstrak biji pinang**

Uji stabilitas yang dilakukan meliputi uji organoleptis, uji pH, uji viskositas, uji tipe nano, uji sentrifugasi, uji persen transmittan, uji ukuran droplet, uji stabilitas dipercepat dengan suhu 4°C dan 40°C

## **E. Pengumpulan Data**

### **1. Bahan**

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah ekstrak biji pinang, tween 80 (Tween®80, Merck), PEG 400 (Kollisolv, BASF), aquadest, minyak VCO (*Virgin Coconut Oil*).

### **2. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer *Uv-Vis* (Shimadzu), Timbangan analitik (Matrix), magnetic stirrer (Cimarex), *rotary evaporator* (Ika RV10 Digital V), climetic chamber, *Particle Size Analyzer* (PZA), seperangkat alat gelas (Pyrex), pH meter (Ohaus), Viskometer Brookfield (Rion DV2T), PSA (Malvern), Sentrifugator (Kubota 5100).

### **3. Prosedur kerja**

#### **a. Determinasi tanaman**

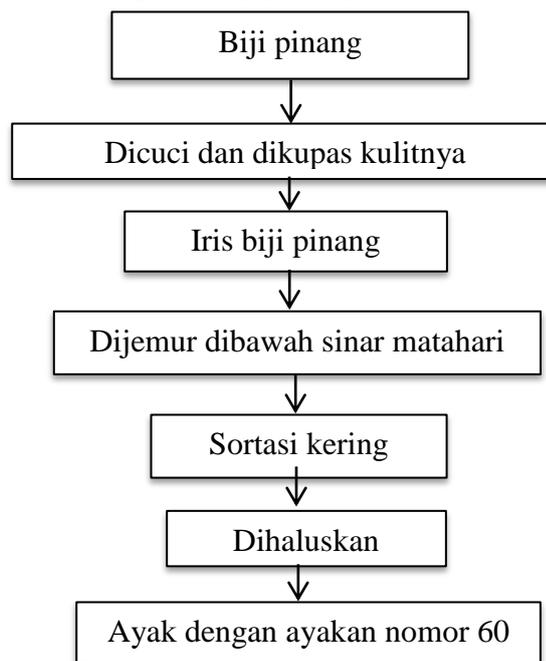
Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Negeri Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dari biji pinang (*Areca catechu* L.) dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan penelitian dan mencegah kemungkinan tercampur dengan tanaman lain.

#### **b. Pembuatan serbuk simplisia**

Pengambilan biji pinang didapatkan dari daerah Magelang yang digunakan sebagai bahan utama penelitian. Pengambilan biji pinang

dilakukan pada satu daerah untuk menghindari perbedaan varian tanaman, perbedaan suhu daerah dan tanah. Biji pinang yang sudah dikumpulkan dibersihkan dari pengotor yang terbawa dengan menggunakan air mengalir sampai bersih, ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara dikeringkan dibawah sinar matahari. Biji pinang yang kering dihaluskan menggunakan alat penyerbuk, kemudian diayak menggunakan ayakan dengan mesh 60 hingga diperoleh serbuk halus dan seragam, lalu ditimbang untuk mendapatkan bobot akhir simplisia dan disimpan dalam wadah yang kering dan bersih.

Alur pembuatan simplisia biji pinang



**Gambar 3.1 Skema pembuatan simplisia**

c. Pembuatan ekstrak biji pinang

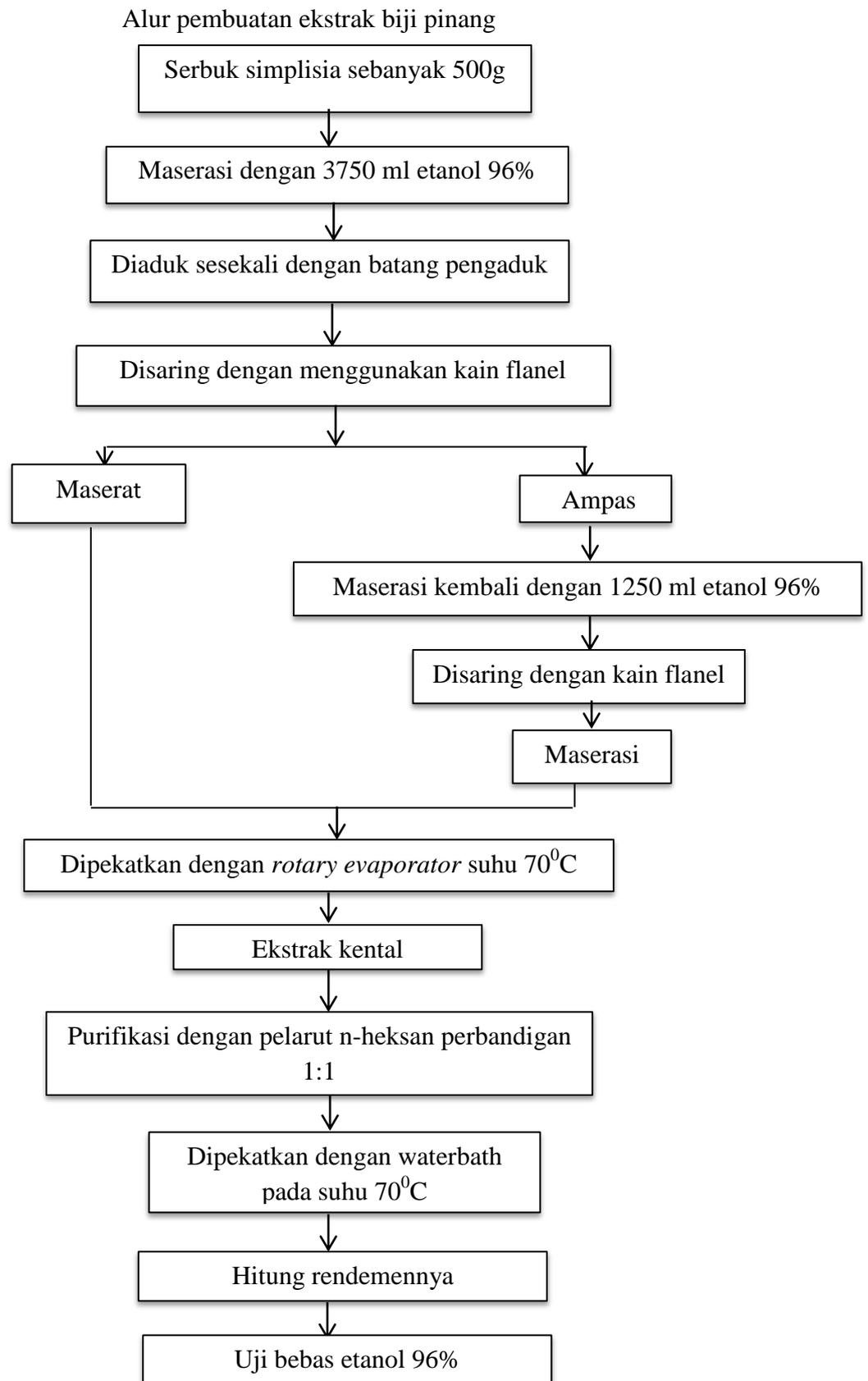
Serbuk simplisia biji pinang sebanyak 500 gram diekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:10. Serbuk dimasukan kedalam bejana kemudian

dituangi dengan 7,5 bagian pelarut etanol 96% yaitu 3750 mL, ditutup dan dibiarkan selama 3x24 jam pada suhu ruang sambil diaduk berulang-ulang agar zat aktif terekstraksi sempurna. Setelah 3 hari ekstrak disaring menggunakan kain flannel, Kemudian diremaserasi dengan 2,5 bagian pelarut etanol yaitu 1250 mL. Bejana ditutup dan dibiarkan pada suhu ruang dan terlindungi dari cahaya selama 3x24 jam lalu disaring menggunakan kain flannel. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan vacuum *rotary evaporator* pada suhu 70<sup>o</sup>c untuk memisahkan pelarut dengan zat aktif lalu diuapkan lagi dengan menggunakan waterbath pada suhu 70<sup>o</sup>C hingga diperoleh ekstrak kental biji pinang. . Ekstrak kental biji pinang dilarutkan menggunakan etanol sebanyak 100 ml dan dipurifikasi dengan pelarut n-heksan (1:1), selanjutnya digojok menggunakan corong pisah hingga terbentuk 2 fase dan diambil bagian etanol. Purifikasi dilakukan hingga pelarut n-heksan bening kira-kira 3-5 kali pengulangan. Kemudian dipekatkan menggunakan waterbath dengan suhu 70<sup>o</sup>C. Ekstrak kemudian ditimbang untuk mengetahui berat dan presentase ekstrak.

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

d. Uji bebas etanol 96%

Ekstrak diuji bebas etanol 96% dengan menggunakan uji kualitatif yaitu ekstrak ditambahkan 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat, adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan.



**Gambar 3.2 skema pembuatan ekstrak etanol biji pinang**

e. Formulasi

**Tabel 3.1 Formula Nanoemulsi**

Bahan	Jumlah (% b/v)				
	I	II	III	IV	V
Ekstrak daun kemangi	1	1	1	1	1
VCO	3	3	3	3	3
Tween 80	10	12	14	15	19
PEG 400	10	12	14	15	19
Aquadest ad	100	100	100	100	100

Modifikasi formula (Suciati *et al.*, 2014) dan (Yuliani *et al.*, 2016)

**Tabel 3.2 Formula Optimum nanoemulsi (Tabel 3.2 Formulasi Ekstrak biji pinang dengan Kombinasi Tween 80 dan PEG 400) menggunakan SLD**

	F I	F II	F III	F IV	F V	F VI	F VII	F VIII
Ekstrak biji pinang	1	1	1	1	1	1	1	1
VCO	3	3	3	3	3	3	3	3
Tween 80	20,50	20	21	20,75	20,50	20,25	20	21
PEG 400	10,50	11	10	10,25	10,50	10,75	11	10
Aquadest	65	65	65	65	65	65	65	65

**Tabel 3.3 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. Pembuatan nanoemulsi

Pembuatan sediaan 1 nanoemulsi biji pinang. Tween 80 dan PEG 400, ekstrak biji pinang dan VCO dimasukkan kedalam beaker glass dan dicampur dengan *magnetik stirrer* selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Setelah 10 menit, aquadest ditambah sedikit demi sedikit dan kecepatan pengadukan ditingkatkan menjadi 1250 rpm selama 10 menit. Bahan yang telah tercampur dihomogenkan. Penambahan aquadest dihentikan setelah volume ad 100 ml (b/v), nanoemulsi yang terbentuk akan berwarna jernih (Suciati *et al.*, 2014).

g. Respon nanoemulsi ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*)

1) Ukuran Droplet

Ukuran droplet diukur dengan menggunakan *particle size analyzer* (PSA) dengan tipe *dynamic light scattering*. Sebanyak 10 ml sampel diambil dan dimasukkan ke dalam kuvet. Kuvet harus terlebih dahulu dibersihkan sehingga tidak mempengaruhi hasil analisis. Kuvet yang telah diisi dengan sampel kemudian dimasukkan kedalam sampel *holder* dan dilakukan analisis instrumen. Menurut Ahmed *et al.* 2012, nanoemulsi terbentuk jika ukuran diameter partikel  $<100$  nm. i.

2) Indeks polidispersitas

Sediaan nanoemulsi diambil sebanyak 1 ml diencerkan dengan aqua pro injeksi sebanyak 250 ml. Pada penggunaan *Particle Size Analyzer* (PSA), sampel nanoemulsi yang telah diencerkan dimasukkan kedalam kuvet, kemudian dilakukan pengukuran indeks polidispersitas. nilai indeks polidispersitas  $0,2 < \text{pDI} < 0,6$  yang akan stabil dari kemungkinan terjadinya pertumbukkan partikel dan pemisahan gravitasi.

3) Present transmittan

Sampel sebanyak 1 ml dilarutkan dalam labu takar 100 ml dengan menggunakan aquadest. Larutan diukur persen transmittan pada panjang gelombang 650nm menggunakan spektrofotometer

UV-Vis. Aquadest digunakan sebagai blanko saat pengujian (Gandjar dan Rohman, 2013).

h. Uji stabilitas pada suhu ruang

1) Uji organoleptis

Uji organoleptis meliputi wujud, warna, dan aroma sediaan, yang diamati setiap minggu selama 2 minggu yaitu pada hari ke 0, 7, 14 dengan menggunakan 3 responden.

2) Uji pH

Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter. Sebelum digunakan elektroda dikalibrasi atau diverifikasi dengan menggunakan larutan standar dapar pH 4 dan 7. Proses kalibrasi selesai apabila nilai pH yang tertera pada layar telah sesuai dengan nilai pH standar dapar dan stabil. Setelah itu, elektroda dicelupkan kedalam sediaan. Nilai pH sediaan akan tertera pada layar. Pengukuran pH dilakukan pada suhu ruangan (20-25°C). nilai pH kulit manusia umumnya berkisar antara 4-6 (Ali & Yosipovitch, 2013).

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 sentrifugasi

Sebanyak 10 ml sediaan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Uji sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 3800 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).

#### 5) Uji tipe nanoemulsi

Pengujian 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).

##### i. Uji stabilitas dipercepat dengan metode cycling test

Salah satu cara mempercepat evaluasi kestabilan adalah dengan *cycling test*. Uji *cycling test* ini dilakukan sebanyak 6 siklus. Sediaan gel disimpan pada suhu dingin  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ , proses ini dihitung 1 siklus (Dewi, 2010). Nanoemulsi yang melewati cycling test diamati organoleptis, pH, persen transmittan, ukuran droplet, serta viskositas.

## **F. 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.

### 2. *Tabulating*

*Tabulating* ini merupakan proses penyusunan dan analisis data dalam bentuk tabel dengan cara memasukkan data ke dalam bentuk tabel sehingga peneliti akan mudah melakukan analisis.

### 3. Pemasukan Data (*Entry*)

*Entry data* adalah kegiatan atau langkah – langkah memasukkan data-data hasil penelitian kedalam program aplikasi statistik SPSS (*Statistical Product Service Solution*) untuk pengujian statistik.

### 4. *Cleansing*

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

## **G. Analisis Data**

Formula optimal diolah dengan *software Design Expert 11 Trial* metode *Simplex Lattice Design* untuk mendapatkan formula yang optimum dari optimasi kedua komponen berdasarkan parameter persen transmittan, dan ukuran nanoemulsi.

Formula yang diperoleh akan dilakukan uji stabilitas fisik pada suhu ruang dan suhu dipercepat. Data uji stabilitas fisik pada suhu ruang dan suhu dipercepat akan dilanjutkan dengan uji statistika menggunakan uji T. Uji T adalah salah satu test statistika yang dipergunakan untuk menguji kebenaran atau kepalsuan hipotesis nihil yang menyatakan bahwa diantara dua buah mean sampel yang diambil secara random dari populasi yang sama tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Analisis uji T menggunakan program SPSS yang meliputi uji pH, uji viskositas, uji ukuran droplet, dan uji present transmittan.