

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimen yaitu pemanfaatan ekstrak daun karika sebagai sediaan nanoemulsi untuk skin antiaging dengan optimasi variasi surfaktan : cosurfaktan dan karakterisasi sediaan nanoemulsi menggunakan program *Design Expert Versi 11 Trial*.

B. Lokasi penelitian, waktu penelitian.

1. Lokasi penelitian

- a. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi, Fitokimia, Teknologi, Farmasetika, dan Instrumen Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
- b. Uji determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Universitas Negeri Diponegoro Semarang.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan ± 3 bulan (bulan Mei-Juli)

C. Variabel 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 optimum surfaktan dan kosurfaktan sediaan nanoemulsi ekstrak daun karika.

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 persen transmitan, ukuran droplet dan indeks polidispersitas.

3. Variabel terkendali

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

D. Prosedur penelitian

1. Bahan

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah ekstrak daun karika, tween 80, PEG 400, aquadest, minyak VCO (Coco Olio), n-heksan.

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), seperangkat alat gelas (Pyrex), pH meter (Ohaus), Viskometer Brookfield (Rion DV2T), PSA (Malvern), Sentrifugator (Kubota 5100), labu takar, tabung sentrifugasi.

3. Prosedur kerja

a. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Negeri Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dari daun karika (*Lenne K. Koch*) dengan tujuan

untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan penelitian dan mencegah kemungkinan tercampur dengan tanaman lain.

b. Penyiapan bahan

Daun karika yang sudah dikumpulkan dibersihkan dari pengotor yang terbawa dengan menggunakan air mengalir sampai bersih, ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara dikeringkan dibawah sinar matahari. Daun karika yang kering dihaluskan menggunakan alat penyerbuk, kemudian diayak menggunakan ayakan dengan mesh 30 hingga diperoleh serbuk halus dan seragam, lalu ditimbang untuk mendapatkan bobot akhir simplisia dan disimpan dalam wadah yang kering dan bersih.

c. Pembuatan ekstrak daun karika

Serbuk simplisia daun karika diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Maserasi dilakukan dengan merendam 500 gram serbuk simplisia menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 3750 ml hingga simplisia terendam seluruhnya selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah 3 hari, ampas diperas dengan menggunakan kain flanel untuk memisahkan maserat dengan ampas.

Ampas dikeringkan dan di remaserasi dengan 1250 ml etanol 96% selama 2x24 jam sambil sesekali diaduk, maserat disaring dengan kain flanel. Selanjutnya maserat dipisahkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 55°C hingga memperoleh ekstrak daun karika.

Pembuatan ekstrak terpurifikasi dilakukan dengan ekstrak kental daun karika yang dilarutkan dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10, dimasukkan kedalam corong pisah gojok dalam hingga homogen. Kemudian ditambahkan n-heksana ad batas dengan perbandingan 1:10 larutkan hingga homogen, diulang hingga diperoleh lapisan n-heksana berubah warna menjadi bening. Larutan hasil pemisahan tersebut dikumpulkan dan dievaporasi sehingga didapatkan ekstrak terpurifikasi.

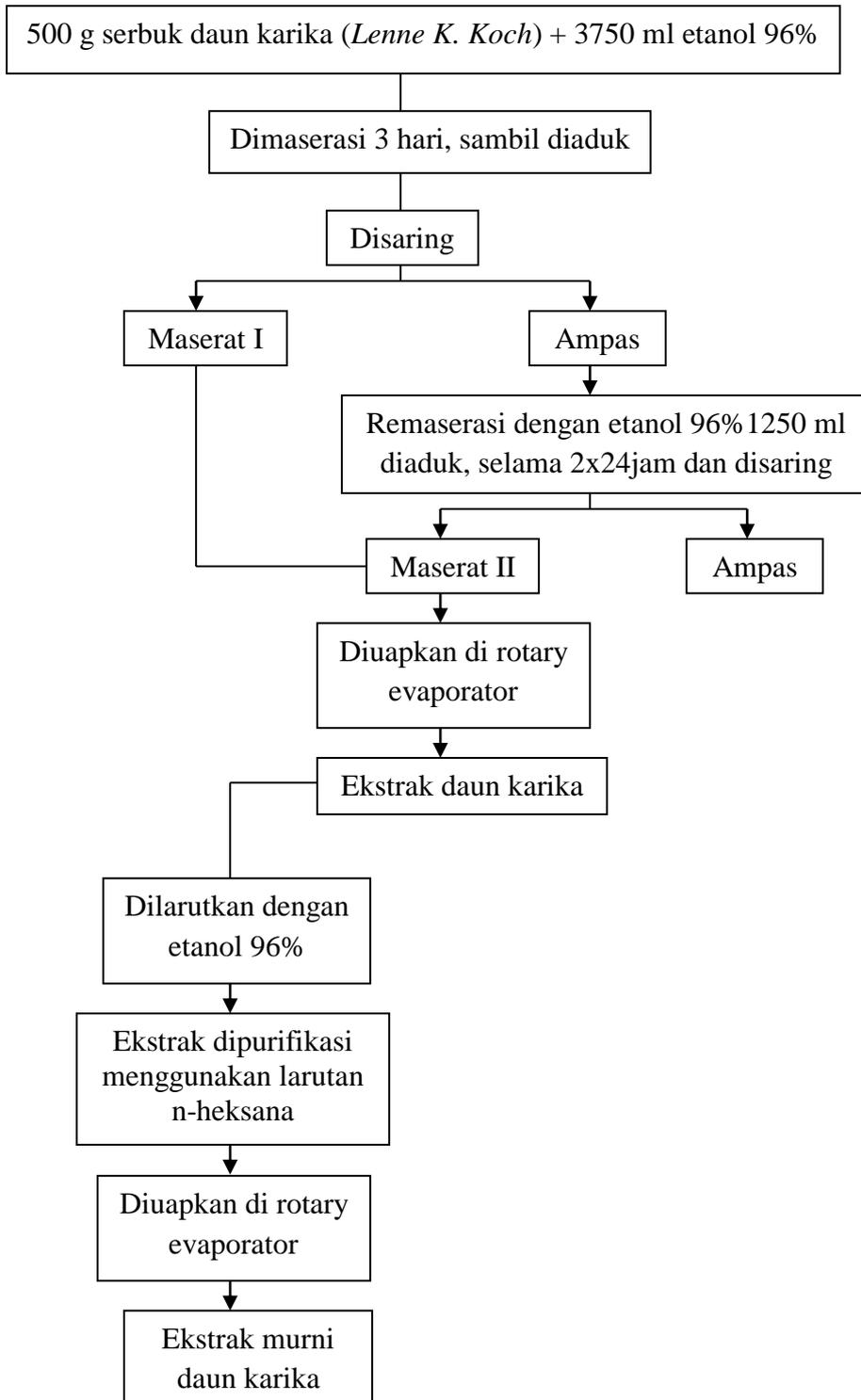
Perhitungan rendemen:

$$\text{Rendemen} = \frac{B}{A} \times 100$$

Keterangan:

Berat simplisia yang diekstraksikan : A (gram)

Berat ekstrak yang didapat : B (gram)



Gambar 3.1 Prosedur kerja ekstrak daun karika

E. Formulasi

Tabel 3.1 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) dan (Yuliani *et al.*, 2016).

Tabel 3.2 Formulasi Ekstrak Daun Karika dengan Kombinasi Tween 80 dan PEG 400

Bahan	Kadar (%) masing-masing bahan							
	F I	F II	F III	F IV	F V	F VI	F VII	F VIII
Ekstrak daun karika	1	1	1	1	1	1	1	1
VCO	3	3	3	3	3	3	3	3
Tween 80	21	20	21	20,75	20,50	20,50	20	20,25
PEG 400	10	11	10	10,25	10,50	10,50	11	10,75
Aquadst ad	100	100	100	100	100	100	100	100

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. Prosedur pembuatan nanoemulsi

Formula sediaan topikal nanoemulsi daun karika seperti pada tabel 3.2 (Suciati *et al.*, 2014; Yulianti *et al.*, 2016). Tween 80 dan PEG 400, ekstrak daun karika 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. Karakterisasi nanoemulsi ekstrak daun karika

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 <200 nm dengan nilai indeks polidispersitas $0,2 < PDI < 0,6$ yang akan stabil dari kemungkinan terjadinya pertumbukkan partikel dan pemisahan gravitasi.

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.

3. Persen transmattan

Sampel 1 ml dilarutkan dalam labu takar 100 ml dengan menggunakan aquadest. Larutan diukur persen transmattan pada panjang gelombang 650nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dengan rentang skala

>95%. Aquadest digunakan sebagai blanko saat pengujian. Uji persen transmittan untuk menunjukkan kejernihan suatu sampel.

4. Uji iritasi

Sukarelawan yang dijadikan panel pada uji iritasi berjumlah 20 orang dengan kriteria sebagai berikut:

- a. Wanita berbadan sehat
- b. Usia antara 20-30 tahun
- c. Tidak ada riwayat penyakit yang berhubungan dengan alergi
- d. Bersedia menjadi sukarelawan.

Penelitian ini dilakukan dengan 5 perlakuan yang dibagi 4 orang pada tiap perlakuan. Sediaan sebanyak 500 mg dioleskan dibagian lengan bawah dengan diameter 3 cm dan dilakukan pengamatan. Permukaan kulit diamati untuk setiap perubahan yang terlihat seperti eritema (kemerahan) dan oedema (bengkak) selama 3 jam pertama kemudian dicuci dan dilanjutkan pengamatan pada jam ke 24, 48 dan 72 jam dari aplikasi formulasi (Bachhav & Patravale, 2010)

H. Evaluasi sediaan nanoemulsi ekstrak daun karika

1. 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). Rentang pH yaitu 4,5-7 sesuai dengan pH kulit.

2. Uji organoleptis

Uji organoleptis meliputi wujud, warna, dan aroma sediaan, yang diamati setiap minggu selama 4 minggu yaitu pada minggu 0, 7, 14 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. Jenis tipe emulsi

Uji tipe emulsi menggunakan metode pengenceran. Emulsi yang telah dibuat dimasukkan ke dalam cawan, kemudian diencerkan dengan ditambahkan air. Jika emulsi dapat diencerkan maka emulsi adalah minyak dalam air.

5. Uji sentrifugasi

Sebanyak 10 ml sediaan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Uji sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 3800 rpm selama 30 menit 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).

H. Analisis Data

Data uji diolah dengan *software Design Expert 11 Trial* Metode *Simplex Lattice Design* untuk mendapatkan formula yang optimum dari optimasi kedua komponen berdasarkan parameter uji persen transmittan, ukuran droplet, uji viskositas, indeks polidispersitas, dan uji pH

Uji evaluasi fisik dilakukan pada hari 0, 7, 14 meliputi uji organoleptis, uji pH, uji viskositas, indeks polidispersitas, persen transmittan, uji sentrifugasi, tipe emulsi, ukuran droplet.

Uji T atau uji *Test* adalah salah satu tes statistik yang digunakan untuk menguji kebenaran atau kepaluan hipotesis nihil yang menyatakan bahwa antara dua buah mean sampel yang diambil secara acak dari populasi yang sama, tidak berbeda signifikan. Formulasi optimum yang diperoleh dari *software Design Expert 11* kemudian di uji T yang dilakukan uji viskositas , uji pH, uji persen transmittan, ukuran nanoemulsi, indeks polidispersitas untuk melihat perbedaan formula yang disarankan *Design Expert* dengan hasil percobaan.