

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Dalam penelitian kali ini dilakukan rancangan penelitian eksperimental untuk mengetahui karakteristik dan stabilitas formula optimum sediaan nanoemulsi ekstrak etanol 96% daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.).

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada Januari tahun 2022 hingga juni 2022, meliputi persiapan dan pelaksanaan. Adapun seluruh rangkaian penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknolgi Farmasi, Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Farmasi STIKES Borneo Lestari Banjarbaru.

3.3. Variable Penelitian

Pada penelitian kali ini didapatkan variabel bebas dan terikat yaitu:

Variabel Bebas : Formula optimum sediaan nanoemulsi

Variabel Terikat : Karakterisasi, stabilitas, dan aktivitas antioksidan sediaan nanoemulsi dengan parameter uji persen transmattan, ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial, *drug loadings*, persen *entrapment*, stabilitas sentrifugasi, *freeze-thaw cycle*, dan *heating stability*.

3.4. Desain Penelitian

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: alat-alat gelas (*Pyrex*[®]), aluminium foil, kertas saring, timbangan analitik (*OHAUS*[®]), oven (*ATC*[®]), lemari pendingin, *rotary evaporator (Ika-rv 10 basic*[®]), waterbath (*Memmert*[®]), piknometer (*Pyrex*[®]), *sentrifuge (Kenko*[®]), cawan porselin, spektrofotometer UV-Vis (*T60*[®]), pH meter (*ATC*[®]), *Particle Size Analyzer (PSA)*, magnetic stirrer (*Thermo Scientific*[®]), viscometer stromer, dan *ultrasonicator bath type (Krisbow*[®]).

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: Aquades, simplisia daun bayam merah, etanol 96%, PEG 400, nipagin, nipasol, tween 80, dan fase minyak (VCO, minyak kedelai, capryol 90, *isopropyl myristate*).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru. Determinasi tanaman dilakukan bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas dari tanaman bayam merah (*Amaranthus tricolor* L). Hal ini dilakukan agar tidak terjadi kesalahan dalam pengumpulan bahan penelitian.

3.5.2 Penyiapan Bahan

Tanaman bayam merah didapatkan di kebun Kelompok Tani Sri Rejeki Landasan Ulin, Banjarbaru. Tanaman bayam merah disortir untuk memisahkan bagian tanaman yang ingin digunakan yaitu daun. Setelah disortir daun dibersihkan dari zat pengotor lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah daun bayam merah kering, simplisia dimasukkan ke dalam blender untuk menghaluskan simplisia menjadi serbuk (Handayani, dkk 2017).

3.5.3 Pembuatan ekstrak

Sebanyak 1000 g serbuk kering daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) direndam dengan etanol secukupnya selama 3 x 24 jam dalam wadah maserasi dan dilakukan pengadukan setiap hari kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator (rotavapor) sehingga diperoleh ekstrak kental (Handayani, dkk 2017).

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

3.5.4 Formula Optimum Sediaan Nanoemulsi Ekstrak Etanol 96% Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.)

Pada penelitian sebelumnya dilakukan optimasi formula menggunakan aplikasi design expert dengan metode *simplex lattice design* untuk mendapatkan sediaan nanoemulsi ekstrak etanol 96% daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.).

Tabel 1. Formula Nanoemulsi Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah

Bahan	Formula (%)
Ekstrak etanol daun bayam merah	0,07
Minyak	13
Surfaktan	X
Kosurfaktan	Y
Nipagin	0,1
Nipasol	0,5
Aquades	Ad 20 mL

3.5.5 Pembuatan Formula Optimum Sediaan Nanoemulsi Ekstrak Etanol 96% Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.)

Pembuatan sediaan nanoemulsi dilakukan menggunakan metode sonikasi yaitu dengan cara menimbang semua bahan. Ekstrak bayam merah dicampur dengan fase minyak dan nipasol, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer*. Fase air (PEG 400, tween 80, tween 20, propilen glikol, etilen glikol) dan nipagin dicampur sedikit demi sedikit pada suhu 60°C. Lalu sediaan disonikasi dengan alat sonikator selama 15 menit.

3.6. Uji Karakteristik Fisika Kimia Formula Optimum Sediaan Nanoemulsi Ekstrak Etanol 96% Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.)

Pada sediaan nanoemulsi dilakukan uji fisik antara lain:

a. Organoleptis

Uji organoleptis dapat dilakukan dengan cara mengamati visualnya. Pada sediaan nanoemulsi organoleptis yang perlu diamati adalah bentuk, kejernihan, warna, serta aromanya (Marnawati, 2018).

b. Uji PH

Untuk mengetahui rentang pH yang sesuai maka dilakukan uji pengukuran pH. Pengukuran pH sediaan dapat dilakukan dengan menggunakan pH meter yang dilakukan pada suhu ruang (Marnawati, 2018). Berdasarkan penelitian Yuliani, dkk (2016) Sebelum alat pH meter digunakan, elektroda perlu dikalibrasi dengan menggunakan larutan standar dapar pH 4 dan 7 hingga didapatkan pH yang sesuai. Setelah itu, elektroda dicelupkan ke dalam sediaan dan nilai pH sediaan akan tertera pada layar. Nilai pH yang aman dan tidak mengiritasi kulit adalah 4-6. Jika sediaan memiliki pH yang terlalu basa dapat menyebabkan kulit bersisik, sedangkan pH yang terlalu asam dapat menyebabkan iritasi kulit (Swastika, dkk 2013).

c. Uji Tipe Emulsi

Uji tipe emulsi dapat dilakukan dengan berbagai cara. Cara penentuan tipe emulsi yaitu dengan pengenceran, pewarnaan, kertas saring, dan konduktivitas. Pengujian tipe nanoemulsi dapat dilakukan menggunakan metode dilusi atau pengenceran sampel. Metode dilusi dapat dilakukan dengan melarutkan sampel ke dalam fase air (1:100) dan fase minyak (1:100). Jika sampel larut sempurna dalam aquades, 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) (Yuliani, dkk 2016).

d. Uji Viskositas

Pengukuran viskositas dapat dilakukan dengan menggunakan alat viskometer. Cara mengukur viskositasnya yaitu dengan diambil sebanyak 20 mL sampel lalu dimasukkan ke dalam cup dan dipasang pada solvent trap yang telah tersedia. Viskometer diatur dengan kecepatan 60 rpm dengan *spindle* 2 (Maskanah, 2021). Sediaan nanoemulsi yang baik akan memiliki nilai viskositas < 200 mPas (Hakim, dkk 2018).

e. Penentuan Bobot Jenis

Pengukuran bobot jenis dapat dilakukan dengan menggunakan alat piknometer. Piknometer kosong ditimbang pada suhu ruang. Kemudian piknometer diisi dengan air lalu ditimbang dan dikeluarkan air yang ada didalamnya. Lalu dimasukkan sediaan nanoemulsi ke dalam piknometer dan ditimbang (Permatasari, 2015).

$$\text{Bobot jenis (gram/mL)} = \frac{A_2 - A}{A_1 - A}$$

Keterangan: A = bobot pikno kosong
A1 = bobot pikno + air
A2 = bobot pikno + sediaan nanoemulsi

f. Persen Transmitan

Sampel sebanyak 1mL dilarutkan dalam labu takar 100 mL dengan menggunakan aquades. Larutan diukur persen transmitan pada panjang gelombang 650 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Aquades digunakan sebagai blanko saat pengujian untuk mengetahui kejernihan sediaan yang dihasilkan berdasarkan kemampuan transmittan yang tinggi (Yuliani, dkk 2016). Uji persen transmitan dapat menunjukkan kejernihan

suatu sampel. Semakin transparan warna sediaan, maka dapat diperkirakan bahwa droplet nanoemulsi mencapai ukuran nano meter (Patel, dkk 2011). Nilai persen transmitten yang baik adalah 100% (Mentari, 2018).

g. Ukuran Partikel

Partikel diukur pada waktu awal setelah pembuatan sediaan dan setelah dilakukan freeze-thaw. *Particle Size Analyzer* (PSA) merupakan alat yang dapat digunakan untuk mengukur ukuran partikel dengan menggunakan metode *dynamic light scattering* dengan sudut *scattering* 90°. Pada sediaan nanoemulsi, partikel di dalamnya memiliki ukuran partikel yaitu < 100 nm. (Maskanah, 2021).

h. Indeks Polidispers

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 ukuran globul dan PDI (Handayani, dkk 2018). Polidispersitas yang mendekati nol menunjukkan distribusi partikel yang homogen atau seragam sedangkan nilai indeks polidispersitas yang melebihi 0,5 menunjukkan partikel memiliki tingkat heterogenitas yang tinggi (Taurina, dkk 2017)

i. Zeta Potensial

Zeta potensial dapat diukur dengan menggunakan alat PSA. Pengukuran zeta potensial dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 mL nanoemulsi yang diencerkan dalam air sebanyak 250 mL pada suhu 25°C.

Lalu dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dilakukan pengukuran terhadap zeta potensial. Suatu formulasi nanoemulsi dikatakan stabil apabila memiliki nilai zeta potensial yang tinggi yaitu diatas ± 30 mV (Eid, dkk 2013).

j. Drug Loading dan Persen *Entrapment Efficiency*

Pada uji *drug loading* dan persen *entrapment efficiency* menggunakan metode sentrifugasi dilakukan dengan cara memasukkan sediaan nanoemulsi ke dalam tabung *sentrifuge* kemudian disentrifugasi dan di ambil supernatannya (Maskanah, 2021).

a. Penentuan panjang gelombang maksimal

Dibuat larutan stok dari endapan yang terbentuk setelah dilakukan sentrifugasi dengan dilarutkan dalam etanol hingga 5 ml kemudian dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan panjang gelombang maksimal.

b. Pembuatan kurva baku

Dilakukan pengenceran larutan stok dengan berbagai konsentrasi. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimal yang didapatkan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.7. Stabilitas Formula Optimum Ekstrak Etanol 96% Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.)

a. Uji Sentrifugasi

Uji sentrifugasi dilakukan pada sampel nanoemulsi yang dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian dimasukkan ke dalam

sentrifugator dengan kecepatan putaran 3750 rpm selama 1 jam (Daud, 2017).

b. Uji *Freeze Thaw Cycle*

Pengujian stabilitas dengan metode *freeze thaw* dilakukan sebanyak 6 siklus. Tiap siklus terdiri dari penyimpanan sediaan pada suhu $4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam lalu dilanjutkan pada suhu $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ untuk 24 jam berikutnya (1 siklus). Pengamatan dilakukan terhadap organoleptis, pH, dan viskositas (Elya, dkk 2013).

c. Uji *Heating Stability*

Uji stabilitas *Heating Stability* dapat dilakukan dengan menggunakan oven. Suhu yang digunakan pada uji ini adalah $60^{\circ}\text{C} - 100^{\circ}\text{C}$. sampel di simpan selama 5 jam dan setelah itu dilakukan uji organoleptik (Fitriani, dkk 2016).

3.8. Uji Aktivitas Antioksidan Formula Optimum Ekstrak Etanol 96% Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*)

Pengujian aktivitas daya antioksidan pada formula optimum ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (2,2- *diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dengan pembandingan kuersetin.

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,5 Mm

Pembuatan larutan DPPH dilakukan dengan ditimbang sebanyak 4,929 mg DPPH dan dilarutkan dalam etanol dan dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan sampai tanda batas sehingga didapatkan larutan DPPH 0,5 Mm (Handayani, dkk 2017).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH dilakukan dengan ditambahkan DPPH 0,5 Mm sebanyak 5 mL dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan hingga tanda batas lalu diinkubasi selama 30 menit (Handayani, dkk 2017). Kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada rentang panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 500 – 550 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Magfirah, 2021).

c. Pembuatan Larutan dan Uji Aktivitas Antioksidan Pembanding Kuersetin

Ditimbang kuersetin sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam etanol pro analisis lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan dengan etanol pro analisis hingga tanda batas. Dilakukan pengenceran seri dari larutan induk kuersetin. Hasil pengenceran masing-masing diambil 5 mL masukkan kedalam vial gelap dan dicampurkan dengan 1 mL larutan DPPH lalu diinkubasi selama 30 menit. Kemudian dibaca hasil absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Magfirah, 2021).

d. Pembuatan Larutan dan Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.)

Ditimbang ekstrak sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam etanol pro analisis lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan dengan etanol pro analisis hingga tanda batas. Dilakukan pengenceran seri dari larutan induk. Hasil pengenceran masing-masing diambil 5 mL masukkan kedalam vial gelap dan dicampurkan dengan 1 mL larutan

DPPH lalu diinkubasi selama 30 menit. Kemudian dibaca hasil absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Magfirah, 2021).

e. Pembuatan Larutan Uji dan Uji Aktivitas Antioksidan Nanoemulsi Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah (*Amaranthus Tricolor L.*)

Dibuat larutan induk dari sampel nanoemulsi dengan konsentrasi 500 ppm menggunakan pelarut etanol p.a lalu dibuat larutan seri dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm. Diambil masing-masing seri 5 mL lalu ditambahkan 1 mL larutan DPPH dan dihomogenkan. Masing-masing sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian dibaca hasil absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Magfirah, 2021).

f. Penentuan Persen Inhibisi

Persen inhibisi dapat dihitung dengan rumus : (Abdullah, dkk 2014)

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Keterangan : A0 = absorbansi control (DPPH)
 A1 = absorbansi sampel (DPPH + sampel)

g. Penentuan Nilai IC₅₀

Nilai *inhibition concentration* 50% (IC₅₀) dapat dihitung dengan menggunakan persamaan $y = ax + b$ (Abdullah dkk, 2014) dimana x merupakan konsentrasi larutan nanoemulsi dan y merupakan % inhibisinya (Magfirah, 2021).

3.9. Analisis Data

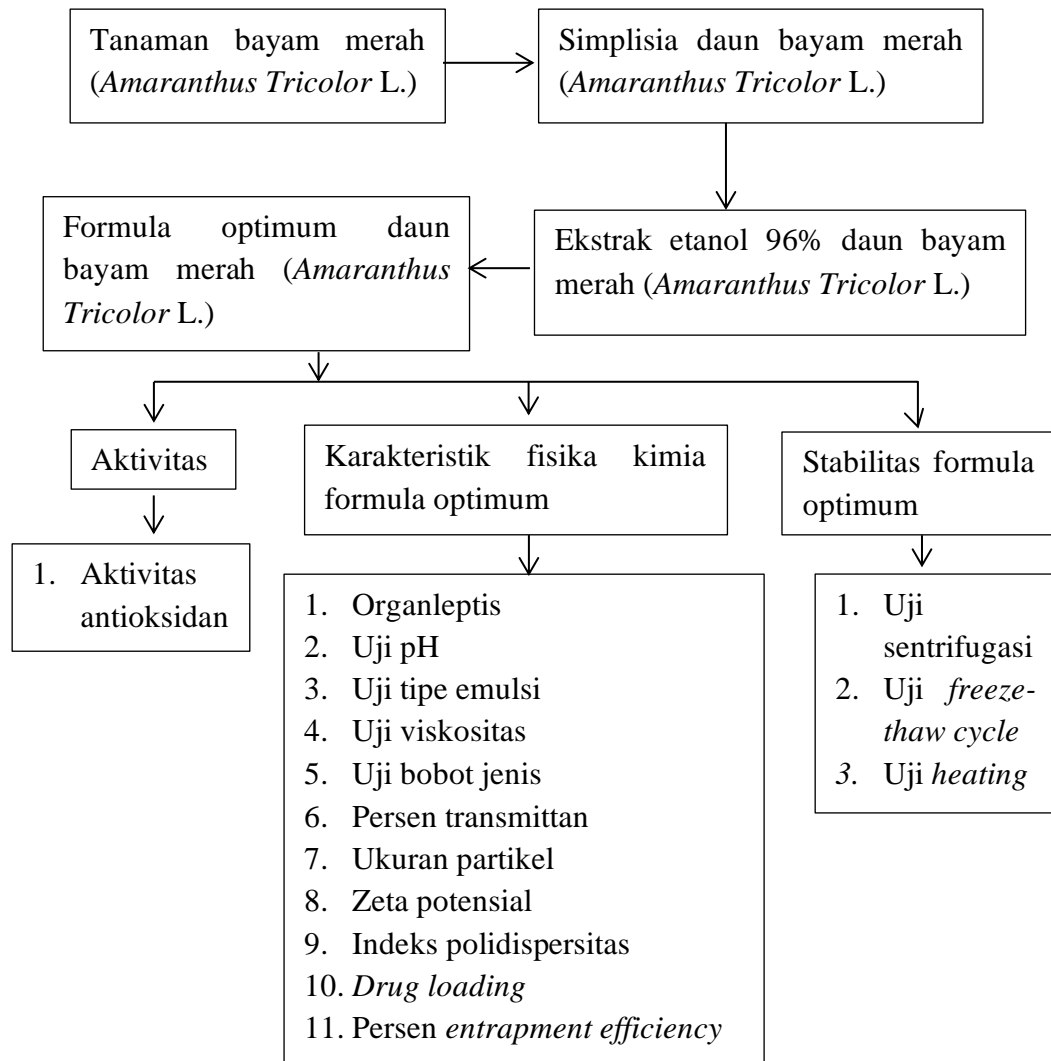
Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kuantitatif yang didapat yaitu hasil Pengamatan organoleptis yang dianalisis berdasarkan bentuk, kejernihan, warna, dan aroma. Visualisasi nanoemulsi yang dianalisis berdasarkan tipe sediaan dan kejernihannya. Uji Stabilitas Sentrifugasi yang dianalisis berdasarkan ada atau tidaknya kerusakan stabilitas atau pemisahan fase sediaan setelah diberikan gaya sentrifugal. Uji stabilitas *freeze thaw* dan *heating stability* yang dianalisis berdasarkan ada atau tidaknya kerusakan stabilitas atau pemisahan fase jika dilakukan penyimpanan pada suhu tertentu dalam beberapa siklus.

Data kuantitatif yang didapatkan dari penelitian ini meliputi pengujian pH sediaan yang dianalisis berdasarkan hasil pengukuran pH sediaan dengan pH yang aman dan tidak mengiritasi kulit adalah 4-6. Pengujian viskositas dianalisis berdasarkan hasil perhitungan besarnya viskositas sediaan nanoemulsi yang menunjukkan kekentalan sediaan sehingga dapat berpengaruh pada sifat alirnya. Sediaan nanoemulsi yang baik akan memiliki nilai viskositas sebesar < 200 mPas. Pengujian bobot jenis dianalisis berdasarkan perhitungan bobot jenis sediaan nanoemulsi dengan menggunakan piknometer. Uji persen transmittan dianalisis berdasarkan hasil pengukuran persentase transmittan yang menunjukkan penampakan visual yang jernih dan transparan. Sediaan nanoemulsi yang baik memiliki nilai transmittan mendekati 100%.

Penentuan ukuran partikel dianalisis berdasarkan ukuran partikel yang diukur menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) sehingga dapat diketahui bahwa sediaan nanoemulsi memiliki ukuran partikel yang sesuai. Sediaan nanoemulsi yang baik memiliki ukuran partikel yaitu <100 nm. Penentuan zeta potensial dianalisis berdasarkan karakteristik muatan permukaan partikel sehingga pada partikel yang memiliki muatan yang sama akan mengalami gaya tolak menolak antar partikel yang dapat meningkatkan kestabilan sediaan. Suatu sediaan nanoemulsi yang baik memiliki nilai zeta potensial yang tinggi yaitu di atas ± 30 mV. Pengujian persen *entrapment* dan *drug loading* dianalisis berdasarkan besarnya kelarutan obat pada sediaan nanoemulsi dan perhitungan persentase besarnya senyawa aktif yang terperap. Semakin besar hasil yang diperoleh maka semakin baik pula obat yang tersalurkan dengan baik ke dalam sel. Pegujian indeks polidispers dianalisis berdasarkan hasil pengukuran distribusi ukuran partikel dalam sediaan (homogenitas) agar didapatkan sediaan yang stabil. Pada sediaan nanoemulsi yang memiliki indeks polidispers mendekati 0 menunjukkan bahwa partikel terdistribusi normal dan homogen. Namun, jika sediaan nanoemulsi memiliki indeks polidispers $> 0,5$ maka partikel sediaan nanoemulsi tidak terdistribusi secara homogen.

Pengujian aktivitas antioksidan dianalisis berdasarkan hasil perhitungan nilai IC_{50} yang diujikan pada sediaan nanoemulsi dengan metode DPPH dan kuersetin sebagai pembanding. Sediaan yang memiliki

nilai $IC_{50} < 50$ ppm menunjukkan bahwa sediaan memiliki daya antioksidan yang sangat kuat, sediaan Sediaan yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 50-100 ppm menunjukkan bahwa sediaan memiliki daya antioksidan yang kuat, sediaan Sediaan yang memiliki nilai IC_{50} 101-150 ppm menunjukkan bahwa sediaan memiliki daya antioksidan yang sedang, dan sediaan Sediaan yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 151-200 ppm menunjukkan bahwa sediaan memiliki daya antioksidan yang lemah. Dari hasil penelitian untuk mengetahui perbedaan pengaruh sebelum dan sesudah perlakuan uji *freeze thaw* maka dilanjutkan analisa dengan menggunakan SPSS *Paired Sample T-Test* dengan tingkat kepercayaan 95%.



Gambar 2. Kerangka Penelitian (Koleksi pribadi, 2021).