

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental yang bertujuan untuk membuat formulasi daun kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm.) menjadi sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* sebagai afrodisiaka dengan metode Emulsifikasi Ultrasonik dan optimasi formula menggunakan metode *Simplex Lattice Design*.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Laboratorium Bahan Alam, dan Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi STIKES Borneo Lestari dari bulan Januari 2021 hingga Juli 2021.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan.

3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah karakteristik sediaan *self nanoemulsifying drug delivery system*

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (*Pyrex*[®]), blender (*Kirin*[®]), cawan porselen, *magnetic stirrer* (*Thermo Scientific*[®]), *particle size analyzer*, pH meter (*ATC*[®]), *rotary evaporator* (*Ika-rv 10 basic*[®]), *sentrifuge* (*Kenko*[®]), *ultrasonicator waterbath* (*Sonica*), spektrofotometer uv-vis (*T60*[®]), timbangan analitik (*Ohaus*[®]), *viscometer stromer* Tipe NDJ-5S, *vortex mixer* (*VM-300*[®]), dan *waterbath* (*Memmert*[®]).

3.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *aquadest* (CV. Eralika), *capryol 90*, daun kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm.), etanol 96% (CV. Eralika), PEG 400 (Brataco), propilen glikol (CV. Quadrant), tween 20 (CV. Eralika), tween 80 (CV. Eralika), dan *virgin coconut oil*.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan Bahan

Daun Kasturi diperoleh dari Kota Banjarbaru (Sungai Besar) Provinsi Kalimantan Selatan. Pengambilan dilakukan pada pagi hari pukul 08.00 WITA pada bulan Desember 2020.

3.5.2. Determinasi Tanaman Kasturi

Determinasi tanaman dilakukan di “Herbarium Bogoriense”, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor.

3.5.3. Pembuatan Simplisia Daun Kasturi

Daun kasturi yang diperoleh dari hasil pengumpulan lalu disortasi basah, kemudian dilakukan pencucian, selanjutnya daun kasturi dirajang menjadi bagian-bagian kecil, lalu dikeringkan dibawah sinar matahari dengan menggunakan penutup kain hitam. Daun kasturi yang sudah kering disortasi kering, lalu dihaluskan menggunakan blender hingga terbentuk serbuk. Serbuk kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 40, lalu serbuk disimpan dalam wadah tertutup rapat

3.5.4. Pembuatan Ekstrak Daun Kasturi

Simplisia daun kasturi dalam bentuk serbuk dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan cara perendaman selama tiga hari. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan 1 Kg serbuk simplisia yang dimasukkan ke dalam wadah dan ditambahkan pelarut dengan menggunakan perbandingan pelarut 1:3 yaitu 3 L. Kemudian

direndam selama 3 x 24 jam dengan pengadukan selama 15 setiap 1 jam selama 6 jam pertama. Maserat dipisahkan menggunakan kertas saring dengan cara filtrasi. Remaserasi dilakukan sebanyak satu kali dengan perbandingan pelarut 1:2 yaitu 2 L pelarut. Maserat yang diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga maserat mengental dan diuapkan menggunakan penangas air pada suhu 50°C hingga ekstrak kental mencapai bobot tetap yaitu dengan persyaratan bobot yang ditimbang dengan dua kali penimbangan berturut-turut hasil selisihnya tidak lebih dari 0,5 mg. Setelah bobot tetap ekstrak kental didapat kemudian dihitung persen rendemennya.

3.5.5. Skrinning Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ekstrak etanol daun kasturi (*Muntingia calabura* L.) ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian ditambahkan asam sulfat 1 M sebanyak 5 mL. Kemudian dimasukkan ke dalam 3 tabung, lalu ditambahkan pereaksi *Mayer*, *Dragendorf*, dan *Wagner* sebanyak 2-3 tetes. Reaksi positif ditunjukkan dengan endapan putih dengan pereaksi *Mayer*, endapan kuning jingga dengan pereaksi *Dragendorf*, dan warna coklat kemerahan dengan pereaksi *Wagner* (Wachidah, 2013).

b. Uji Fenol

Ekstrak etanol daun kasturi ditambahkan FeCl_3 1% sebanyak 10 tetes. Terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam menunjukkan adanya fenol pada ekstrak (Wijaya dkk., 2014).

c. Uji Flavonoid

Ekstrak etanol daun kasturi ditimbang sebanyak 500 mg ditambahkan aquadest, lalu ditambahkan sedikit serbuk Mg dan HCl pekat sebanyak 1 ml serta ditambahkan 1 ml amilalkohol kemudian digojog kuat. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol (Nugrahani dkk., 2020).

d. Uji Saponin

Ekstrak etanol daun kasturi dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL air, lalu dikocok. Terbentuknya busa yang stabil dan bertahan selama 10 menit setelah ditambahkan HCl 2N menunjukkan adanya saponin dalam sampel (Tiwari dkk., 2011).

e. Uji Steroid

Ekstrak etanol daun kasturi dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,5 ml kloroform, lalu ditambahkan 2-3 tetes asam asetat anhidrat, dan asam sulfat pekat sebanyak 2 tetes

(pereaksi Liebermann Burchard). Steroid pada ekstrak ditandai dengan terbentuknya warna hijau (Meigaria dkk., 2016).

f. Uji Tanin

Ekstrak etanol daun kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm.) dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan gelatin 1%. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya tanin pada sampel (Nurviana, 2016).

3.5.6. Formulasi *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System*

a. Optimasi kelarutan pembawa ekstrak daun kasturi

Sebanyak 0,1 gram ekstrak etanol daun kasturi ditambahkan kedalam masing-masing pembawa (*capryol 90*, *virgin coconut oil*, Tween 20, Tween 80, PEG 400, dan propilen glikol) dengan secara kualitatif menggunakan perbandingan rasio antara 1:1 hingga 1:20. Campuran diletakkan diatas waterbath dengan suhu 45°C selama 10 menit. Proses pelarutan ekstrak daun kasturi dalam pembawa dimaksimalkan dengan sonikator selama 15 menit dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu ruang untuk dilihat homogenitasnya (Indratmoko, 2020; Nugroho & Sari, 2018).

b. Optimasi Surfaktan dan Kosurfaktan berdasarkan nilai HLB

Optimasi surfaktan dan kosurfaktan berdasarkan dengan nilai HLB terdapat pada tabel 1 yaitu sebagai berikut :

Tabel 1. Optimasi Surfaktan dan Kosurfaktan Berdasarkan Nilai HLB

Bahan	Formula (%)		
	A1	A2	A3
	HLB 13,5	HLB 14	HLB 14,5
Ekstrak Daun Kasturi	1,6	1,6	1,6
Minyak	12	12	12
Surfaktan - Kosurfaktan	15:55	33:37	52:18
Aquadest ad	100	100	100

Keterangan :

A1: Perbandingan konsentrasi surfaktan : kosurfaktan (15 : 55)

A2: Perbandingan konsentrasi surfaktan : kosurfaktan (33 : 37)

A3: Perbandingan konsentrasi surfaktan : kosurfaktan (52 : 18)

c. Formula *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System*

Formula sediaan *self nanoemulsifying drug delivery system*

ekstrak etanol daun kasturi dengan variasi komponen surfaktan dan kosurfaktan terdapat pada tabel 2 yaitu sebagai berikut :

Tabel 2. Formula *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* ekstrak etanol daun kasturi

Bahan	Formula (%)				
	F1	F2	F3	F4	F5
Ekstrak Daun Kasturi	10,67	10,67	10,67	10,67	10,67
Minyak	12	12	12	12	12
Surfaktan	70	0	35	17,5	52,5
Kosurfaktan	0	70	35	52,5	17,5
Sorbitol	5	5	5	5	5
Nipagin	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Nipasol	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Aquadest ad	100	100	100	100	100

Keterangan :

F1: Perbandingan konsentrasi surfaktan : kosurfaktan (70 : 0)

F2: Perbandingan konsentrasi surfaktan : kosurfaktan (0 : 70)

F3: Perbandingan konsentrasi surfaktan : kosurfaktan (35 : 35)

F4: Perbandingan konsentrasi surfaktan : kosurfaktan (17,5 : 52,5)

F5: Perbandingan konsentrasi surfaktan : kosurfaktan (52,5 : 17,5)

d. Pembuatan *Self Nanoemulsifying Drug Delivery System*

Ekstrak daun kasturi dicampurkan pada fase minyak (*capryol 90*, nipasol, dan BHT) lalu diaduk dengan menggunakan

magnetic stirrer dengan kecepatan 150 rpm selama 5 menit. Lalu campurkan fase air (tween 80, PEG 400, nipagin, sorbitol dan *aquadest*) dengan kecepatan 150 rpm selama 5 menit, kemudian campurkan fase minyak kedalam fase air fase air sedikit demi sedikit lalu diaduk kembali dengan kecepatan 150 rpm selama 15 menit (Nugroho & Sari., 2018). Kemudian sediaan disonikasi menggunakan alat sonikator selama 10 menit (Wahyuningsih & Putranti., 2015).

3.5.7 Evaluasi Sediaan SNEDDS

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis pada sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* dilakukan dengan mengamati perubahan warna, bau, pemisahan fase atau pecahnya sediaan, dan kejernihan dari sediaan (Indratmoko dkk., 2020).

b. Uji pH

Sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* SNEDDS dilakukan pengukuran pH menggunakan pH meter. Kalibrasi pH meter menggunakan larutan standar dapar pH 7. Elektroda dicelupkan kedalam sediaan SNEDDS nilai pH akan tertera pada layar pH meter, pengujian pH dilakukan pada suhu ruangan. pH sediaan yang optimal berkisar 6,5 – 9 menyesuaikan dengan pH pada saluran cerna (Indratmoko dkk., 2020).

c. Uji Tipe Emulsi

Uji tipe emulsi sediaan SNEDDS menggunakan metode pengenceran, pewarnaan, kertas saring dan berdasarkan penghantaran listrik. Metode pengenceran sediaan SNEDDS dimasukkan ke dalam cawan lalu diencerkan dengan air, jika tidak terjadi pemisahan maka menunjukkan sediaan SNEDDS dengan tipe minyak dalam air (Priandika, 2014). Metode pewarnaan sediaan SNEDDS diberikan beberapa tetes larutan metilen biru, dikatakan tipe minyak dalam air jika sediaan berwarna biru. Karena metilen biru larut dalam air (Maria, 2010). Pengujian dengan metode kertas saring yaitu dengan cara meneteskan sediaan SNEDDS ke kertas saring. Sediaan tipe minyak dalam air tidak akan meninggalkan noda pada kertas saring. Pengujian berdasarkan penghantaran listrik, apabila sediaan SNEDDS tipe minyak dalam air maka sediaan dapat menghantarkan arus listrik (Anwar, 2012).

d. Uji Viskositas

Pengujian viskositas sediaan SNEDDS dilakukan dengan menggunakan viskometer Stromer. Sampel SNEDDS dimasukkan ke dalam *sample cup*, pastikan sediaan tersebar secara merata pada permukaan cup lalu dipasang kembali *sample cup* pada viskometer. Viskometer dinyalakan lalu dibiarkan beberapa saat hingga pembacaan viscometer stabil dan dicatat hasil pembacaan viskositas yang terdapat pada *display* (Diah & Rahma, 2018).

e. Penentuan Bobot Jenis

Bobot piknometer kosong ditimbang pada suhu ruangan (A gram). Kemudian diisi dengan air sampai jenuh lalu ditimbang (A1 gram). Air dikeluarkan dari piknometer dibersihkan. Sediaan SNEDDS dimasukan kedalam piknometer sampai jenuh dan ditimbang (A2 gram). Bobot jenis sediaan diukur dengan menggunakan perhitungan sebagai berikut (Permatasari, 2015):

$$\text{Bobot jenis (gram/mL)} = \frac{A2-A}{A1-A} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan :

A : Bobot piknometer kosong

A1: Bobot piknometer + air

A2: Bobot piknometer + sediaan *Self Nanoemulsifying Drug Delivery System*

f. Uji Persen Transmittan

Sebanyak 100 μ L formula SNEDDS dilarutkan dengan 5 mL *aquadest* diukur tranmitansinya menggunakan *spektrofotometer UV-Visible* pada panjang gelombang maksimum 650 nm dengan menggunakan blanko *aquadest* untuk mengetahui tingkat kejernihannya. Semakin jernih atau nilai transmitansi semakin mendekati nilai transmitansi aquades maka dapat diperkirakan tetesan emulsi telah mencapai ukuran nanometer (Patel dkk., 2011).

g. Uji *Emulsification Time*

Pengujian dilakukan menggunakan tiga media yaitu *aquadest*, AGF (*Artificial Gastric Fluid*) tanpa pepsin, AIF (*Artificial Intestinal Fluid*) tanpa pankreatin. Media sebanyak 100 mL dikondisikan pada suhu 37°C diatas *magnetic stirrer* dengan kecepatan 120 rpm.

Sejumlah 1 mL SNEDDS ekstrak etanol daun kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm.) ditetaskan ke dalam media secara cepat. Nanoemulsi yang terbentuk, ditandai dengan terlarutnya SNEDDS ekstrak secara sempurna dalam media (Patel dkk., 2011).

h. Penentuan Ukuran dan Distribusi Partikel serta Potensial Zeta

Penentuan ukuran partikel, distribusi partikel, dan potensial zeta dilakukan pengukuran dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA). Sebanyak 2 tetes dari sampel sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm.) dicampur kedalam *aquadest*, lalu diambil 2 mL dan dimasukkan ke dalam kuvet untuk dianalisis (Indriani dkk., 2018).

i. Uji *Drug Loading* dan *Entrapment Efficiency*

Uji *drug loading* dan *entrapment efficiency* pada sediaan dilakukan menggunakan *spektrofotometer UV-Vis* dengan kuersetin sebagai pembanding. Sebelum uji *drug loading* dilakukan penetapan gelombang maksimum pada rentang 350-450 nm selama 30 menit dan penentuan kurva baku menggunakan larutan seri konsentrasi 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm sehingga diperoleh persamaan linier (Indradi dkk., 2017). Uji *drug loading* menggunakan metode sentrifugasi dilakukan dengan cara sediaan SNEDDS dimasukan ke tabung *sentrifuge* kemudian disentrifugasi dan diperoleh endapan. Endapan dilarutkan sampai 5 mL dengan etanol p.a lalu dianalisis menggunakan *spektrofotometer UV-Vis*. Absorbansi larutan yang

diperoleh dihitung menggunakan persamaan regresi linier pada kurva baku (Mentari, 2018). Persentase *drug loading* dari sediaan diukur dengan menggunakan perhitungan sebagai berikut (Suciati dkk., 2019):

$$\text{Rumus Drug loading (\%)} \\ \frac{\text{Bobot Obat Terjerap}}{\text{Bobot Minyak (Lipid)}} \times 100\%$$

$$\text{Rumus Entrapment Efficiency (\%)} \\ \frac{(\text{Jumlah obat awal} - \text{jumlah obat bebas})}{\text{Jumlah obat awal}} \times 100\%$$

3.5.8. Analisis Data

Analisis data menggunakan *software Design Expert version 11* metode *Simplex Lattice Design* untuk mendapatkan formula yang optimum dari optimasi komponen surfaktan, dan kosurfaktan berdasarkan evaluasi uji organoleptis, uji pH, uji viskositas, uji tipe emulsi, uji *emulsification time*, persen *transmittan*, penentuan ukuran dan distribusi partikel serta potensial zeta.

Hasil analisis kemudian dibandingkan dengan hasil secara teoritis pada literatur, lalu dianalisis menggunakan *software Design Expert version 11 Simplex Lattice Design* untuk menghitung koefisien a, b, ab sehingga didapatkan persamaan $Y = a(A) + b(B) + ab(A)(B)$. Data kuantitatif yang diperoleh dari hasil evaluasi dianalisis menggunakan ANOVA satu arah pada *Software Design Expert 11* untuk menunjukkan pengaruh yang signifikansi ($p\text{-value} < 0,05$) serta tidak signifikan ($p\text{-value} > 0,05$) pada perbedaan

perbandingan surfaktan dan kosurfaktan terhadap hasil karakteristik sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm.).