

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Bahan dan Alat

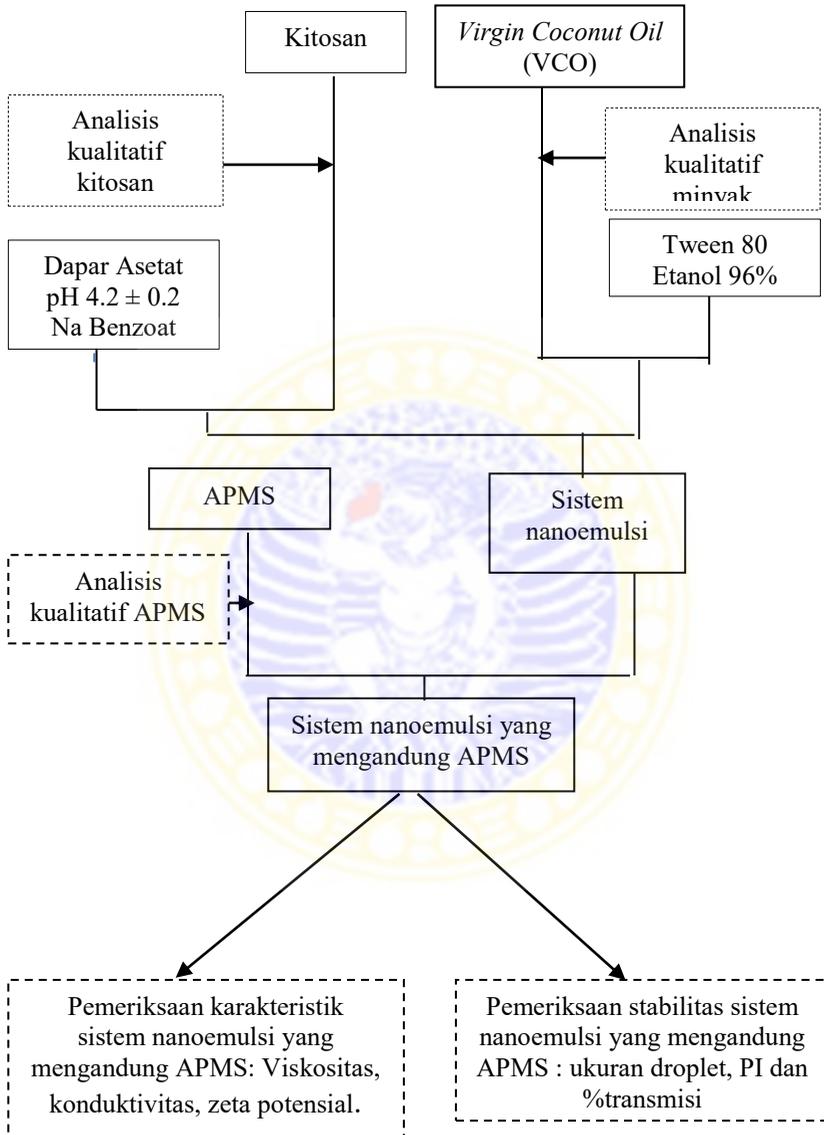
##### 4.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini bila tidak disebutkan lain mempunyai derajat kemurnian *Pharmaceutical Grade*. Bahan yang digunakan yaitu bahan-bahan penyusun nanoemulsi, bahan untuk pembuatan dapar asetat pH  $4,2 \pm 0,2$ ,. Bahan penyusun nanoemulsi antara lain asam *p*-metoksisinamat (Sigma Aldrich), *virgin coconut oil* (VCO), Tween 80 (p.a), kitosan (p.a), Natrium benzoat (p.a), etanol 96% (p.a), dan aquademineralisata. Bahan penyusun dapar antara lain asam asetat (p.a), natrium asetat (p.a), dan NaCl (p.a).

##### 4.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pH meter (Eutech Instrument pH 700), neraca analitik (Chyo Balance Serial 51347), *sochorex*, spektrofotometer infra merah (Jasco FT-IR 5300), *differential thermal apparatus* (Mettler Toledo - SP 85), refraktometer ABBE, *stirrer plate* (Dragon Lab MS-Pro), *ultrasonic* (Branson 3510), *shaker machine* (Wineshake), *particle analyzer* (Delsa Nano C), *Viscometer Brookfield Cone and Plate*, *uu mv meter* (Benchtop 86505-AZ86P3), *magnetic stirrer*, dan *double-beam spectrophotometer* (Shimadzu UV-1800).

## 4.2 Rancangan Penelitian



**Gambar 4.1** Skema rancangan penelitian

### 4.3 Analisis Kualitatif Asam *p*-Metoksisinamat (APMS)

Pemeriksaan kualitatif APMS dilakukan untuk memastikan bahwa APMS yang digunakan adalah benar, serta untuk mengetahui kemurnian APMS secara kualitatif.

#### 1. Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis dilakukan secara visual meliputi pemeriksaan konsistensi, warna, dan bau, kemudian dibandingkan dengan organoleptis APMS pada pustaka.

#### 2. Pemeriksaan Spektrum Inframerah

Pemeriksaan menggunakan spektroskopi FTIR (*Fourier-transform Infrared*) dengan metode cakram KBr. APMS digerus dan dicampur dengan KBr dengan perbandingan 1 : 200 jika alat menggunakan prisma sebagai monokromator atau 1 : 300 jika alat menggunakan kisi sebagai monokromator. Campuran dimasukkan ke dalam cetakan, dan dicetak dengan tekanan tinggi dalam hampa udara hingga terbentuk cakram transparan. Sampel diamati pada panjang gelombang antara  $4000\text{ cm}^{-1}$  –  $670\text{ cm}^{-1}$  (Depkes RI, 1979). Hasil pemeriksaan dibandingkan dengan spektrum inframerah APMS pada pustaka.

#### 3. Pemeriksaan Suhu Lebur

Penentuan suhu lebur dilakukan menggunakan alat *Differential Thermal Analysis* (DTA). Sejumlah APMS dimasukkan ke dalam *sample pan*, dan ditutup. Kemudian *sample pan* dimasukkan ke dalam *sample holder*. Digunakan *aluminium crucible* sebagai *sample pan* dengan suhu maksimum  $350^{\circ}\text{C}$ .

Pemanasan dijalankan dengan laju pemanasan  $5^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ , waktu kesetimbangan adalah setelah suhu awal melebur tercapai. Hasil pengujian suhu lebur yang diperoleh dibandingkan suhu lebur APMS pada pustaka.

#### 4.4 Analisis Kualitatif *Virgin Coconut Oil* (VCO)

Pemeriksaan kualitatif minyak dilakukan untuk memastikan bahwa minyak yang digunakan adalah benar, serta untuk mengetahui kemurnian minyak secara kualitatif.

##### 1. Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis dilakukan secara visual meliputi pemeriksaan konsistensi, warna, dan bau, kemudian dibandingkan dengan organoleptis masing-masing minyak pada pustaka.

##### 2. Pemeriksaan Indeks Bias

Masing-masing minyak sebanyak 1 ml diteteskan pada refraktometer ABBE, kemudian diamati indeks biasnya. Indeks bias hasil pengamatan dibandingkan dengan indeks bias *virgin coconut oil* pada pustaka.

#### 4.5 Pembuatan Nanoemulsi

##### 4.5.1 Pembuatan Larutan Dapar Asetat $\text{pH } 4,2 \pm 0,2$

Pembuatan larutan dapar asetat  $\text{pH } 4,2 \pm 0,2$  diawali dengan pembuatan larutan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,2 M dan larutan  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,2 M.

1. Pembuatan larutan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,2 M :

Diambil 5,75 ml larutan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial, dimasukkan ke dalam labu ukur 500,0 ml, kemudian ditambahkan aquademineralisata bebas  $\text{CO}_2$  sampai volume tepat 500,0 ml.

2. Pembuatan larutan  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,2 M :

Ditimbang sebanyak 4,1 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , dilarutkan dalam aquademineralisata bebas  $\text{CO}_2$ , lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 250,0 ml, kemudian ditambahkan aquademineralisata bebas  $\text{CO}_2$  sampai volume tepat 250,0 ml.

3. Pembuatan larutan dapar pH  $4,2 \pm 0,2$  :

Diambil 392 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,2 M, 108 ml  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,2 M, kemudian ditambahkan ke dalamnya sebanyak 8,7 g NaCl. Larutan diamati pH-nya menggunakan pH meter dan dilakukan penyesuaian hingga tercapai pH  $4,2 \pm 0,2$ .

#### 4.5.2 Formula Nanoemulsi (Pratama, 2013; Rahmawati, 2013; Winarso, 2013) yang dimodifikasi

**Tabel IV.1** Formula nanoemulsi

No.	Bahan	Fungsi	Kadar dalam formula (%) *)			
			I	II	III	IV
1.	APMS **	Bahan aktif	0,20	0,20	0,20	0,20
2.	VCO	Fase minyak	2,66	2,66	2,66	2,66
4.	Tween 80	Surfaktan	20,58	20,58	20,58	20,58
5.	Etanol 96%	Kosurfaktan	3,42	3,42	3,42	3,42
6.	<i>Chitosan</i>	<i>Thickening Agent</i>	-	0,05	0,15	0,3
7.	Natrium Benzoat	<i>Preservative</i>	0,1	0,1	0,1	0,1
8.	Larutan dapar pH 4,2 ± 0,2	Fase air	73,04	72,99	72,89	72,74

Keterangan:

- \* = Masing – masing formula dibuat sebanyak 50 gram (%b/b)
- \*\* = Jumlah APMS yang ditambahkan dihitung di luar sistem nanoemulsi (%b/b) Fase minyak (*virgin coconut oil*) : surfaktan (Tween 80) -kosurfaktan (etanol 96%) : fase air (dapar asetat pH 4,2 ± 0,2) = 1 : 9 : 27,5



Dicampur satu persatu Tween 80, Etanol 96%, dan VCO dalam *beaker glass* 100 ml, diaduk dengan *magnetic stirrer* 600 rpm masing-masing selama 5 menit (fase minyak). Kitosan dikembangkan dalam larutan dapar asetat diaduk dengan *magnetic stirrer* 600 rpm selama 4 jam. Ambil larutan kitosan sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan, ditambahkan Na Benzoat, kemudian ditambahkan sisa dapar asetat hingga mencapai volume fase air yang dibutuhkan. Larutan dapar asetat pH  $4,2 \pm 0,2$  yang sudah bercampur dengan kitosan dan Na Benzoat ditambahkan dengan cara *inverse* (diteteskan sedikit demi sedikit) pada campuran fase minyak sambil diaduk kembali dengan *magnetic stirrer* 1000 rpm selama 10 menit hingga terbentuk sistem nanoemulsi yang jernih. APMS ditambahkan pada sistem nanoemulsi, kemudian disonikasi selama 30 menit (15 menit 2x) dan *dishaking* menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 60 menit, setelah itu disonifikasi kembali selama 20 menit (10 menit 2x) sampai seluruh APMS terlarut.

#### **4.7 Pemeriksaan Karakteristik Nanoemulsi**

##### **4.7.1 Pemeriksaan Organoleptis Nanoemulsi**

Pemeriksaan organoleptis dilakukan secara visual meliputi pemeriksaan konsistensi, warna, dan bau.

##### **4.7.2 Pemeriksaan pH Nanoemulsi**

Pemeriksaan pH dilakukan untuk mengetahui pH sistem nanoemulsi, sehingga dapat diperkirakan apakah nanoemulsi

*acceptable* digunakan pada kulit. Pemeriksaan pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. pH meter dibilas dengan aquademineralisata dan dikeringkan sebelum digunakan. Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam nanoemulsi untuk mengetahui pH nanoemulsi. Sebelum digunakan, dilakukan kalibrasi dengan mengukur pH standard untuk mengetahui faktor koreksi.

#### 4.7.3 Pemeriksaan Konduktivitas Nanoemulsi

Pemeriksaan konduktivitas dilakukan untuk mengetahui tipe nanoemulsi yang terbentuk. Nanoemulsi dengan tipe o/w, dimana fase luarnya adalah air, memiliki nilai konduktivitas yang tinggi. Sebaliknya, nanoemulsi dengan tipe w/o, dimana fase luarnya adalah minyak, memiliki konduktivitas yang rendah (Devarajan *and* Ravichandran, 2011).

Pemeriksaan konduktivitas nanoemulsi dilakukan dengan menggunakan alat mv meter (Benchtop 86505-AZ86P3). Sejumlah sistem nanoemulsi dihubungkan dengan konduktometer (mv meter). Selanjutnya, diamati nilai konduktivitasnya (Devarajan *and* Ravichandran, 2011). Pemeriksaan konduktivitas dilakukan terhadap sistem nanoemulsi sesudah penambahan bahan obat APMS.

#### 4.7.4 Pemeriksaan Ukuran Droplet dan *Polydispersity Index*

Pemeriksaan ukuran droplet dilakukan untuk mengetahui ukuran droplet dalam sistem nanoemulsi. Nanoemulsi yang ideal memiliki ukuran droplet 10 hingga 200 nm (Devarajan *and* Ravichandran, 2011). Sedangkan pemeriksaan *polydispersity index* dilakukan untuk mengetahui keseragaman ukuran droplet.

*Polydispersity index* akan bernilai 0,00 ketika hanya satu partikel yang terukur. Nilai *polydispersity index* 0,10-0,20 menunjukkan distribusi ukuran yang sempit (ukuran homogen), sedangkan nilai *polydispersity index* lebih dari 0,50 menunjukkan distribusi ukuran yang luas (ukuran heterogen) (Hommos, 2008).

Pemeriksaan *polydispersity index* dan distribusi ukuran droplet pada sistem nanoemulsi dilakukan menggunakan alat Delsa™ Nano C *particle analyzer* (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Sejumlah sistem nanoemulsi dimasukkan ke dalam wadah (kuvet), kemudian dilakukan pengukuran ukuran droplet dan *polydispersity index* (Saloko *et al.*, 2013). Pengukuran ukuran droplet dilakukan terhadap sistem nanoemulsi sesudah penambahan APMS.

#### 4.7.5 Pemeriksaan Viskositas Nanoemulsi

Pemeriksaan viskositas nanoemulsi dilakukan karena viskositas sistem pembawa merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kestabilan system nanoemulsi (Mou *et al.*, 2007). Pemeriksaan viskositas dilakukan dengan alat *Viscometer Brookfield Cone and Plate* dengan dengan *shear rate* 100 rpm.

#### 4.7.6 Pemeriksaan Zeta Potensial

Zeta potensial adalah teknik yang digunakan untuk mengukur muatan partikel dan sistem, dan kestabilan nanoemulsi dalam jangka panjang. Alat yang digunakan untuk mengukur Zeta Potensial adalah ZetaPALS. Pengukuran dilakukan dengan nanoemulsi yang sudah di encerkan dan harga zeta potensial

ditentukan dari pergerakan elektroporetik dari droplet minyak. (Bhatt and Madhav, 2011)

#### 4.7.7 Pemeriksaan % *Transmittance*

Pemeriksaan % *transmittance* merupakan salah satu dari parameter stabilitas nanoemulsi, karena %*transmittance* dapat menunjukkan tingkat kekeruhan nanoemulsi. Kekeruhan dari nanoemulsi tersebut berhubungan dengan ukuran droplet dari nanoemulsi, semakin kecil ukuran droplet yang terbentuk maka semakin jernih sistem nanoemulsi yang terbentuk. Ditentukan dengan alat Spektrofotometer UV-Vis (Bhatt and Madhav, 2011).

