

BAB IV**METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental. Penelitian ini berdasarkan manipulasi variabel bebas, kemudian diukur efeknya pada variabel terikat.

4.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi dua kategori, yaitu:

1. Variabel Bebas

Terdiri dari surfaktan, kosurfaktan, fase minyak, dan fase air. Dilakukan pengujian dengan perbandingan Smix (surfaktan : kosurfaktan) 1:1 dan 2:1, kemudian dibandingkan dengan fase minyak dengan perbandingan 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, dan 9:1. Rasio perbandingan formula yang paling sesuai, dilakukan pada rasio perbandingan antar surfaktan (span 80 : tween 80) adalah 40:60, 30:70, dan 20:80.

2. Variabel Terikat

Terdiri dari organoleptik, morfologi partikel, tipe mikroemulsi, tegangan permukaan, dan pH.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama \pm 10 bulan dimulai dari bulan September hingga bulan Juli di Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi untuk ekstraksi. Laboratorium Farmasetika Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya untuk pembuatan sistem mikroemulsi, uji pH, dan uji organoleptik. Unit Layanan TEM Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gadjah Mada untuk pengujian morfologi dan ukuran partikel. Laboratorium Kimia Fisik Universitas Brawijaya untuk pengujian tegangan permukaan.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah toples kaca ukuran 2 L, batang pengaduk, timbangan digital 'Mettler Toledo', kain flanel, *rotary evaporator*, cawan porselen, corong gelas, *beaker glass* 'Pyrex', *magnetic stirrer* 'Shimadzu Uni Bloc AUW 220', TEM (*Transmission Electron Microscopy*) 'TEM JEOL JEM 1400, pH meter 'TOA DKK Model HM 30 R', dan tensiometer Du Nouy 'Fisher Surface Tension Model 20' untuk optimasi dan karakterisasi sistem mikroemulsi. UV-Vis, lempeng silika gel, dan *water bath* untuk identifikasi senyawa kurkumin dan flavonoid.

4.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah serbuk rimpang temu giring dari UPT Materia Medika Batu, pelarut etanol 96% dari Makmur

Sejati, tween 80 dari PT. BRATACO, span 80 dari PT. Tritunggal Arthamakmur, isopropanol dari Labtech Citra Persada, isopropil miristat dari Croda Singapore Pte Ltd, dan akuades dari Makmur Sejati untuk optimasi dan karakterisasi sistem mikroemulsi. Larutan amonia encer, H_2SO_4 , larutan $AlCl_3$, etil asetat, kloroform P, dan metanol untuk identifikasi senyawa kurkumin dan flavonoid.

4.5 Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol 96% temu giring (*Curcuma heyneana*) merupakan hasil dari metode maserasi serbuk simplisia temu giring dengan memakai pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10
2. Optimasi mikroemulsi merupakan proses pencarian nilai perbandingan antara bahan penyusun sistem mikroemulsi yang terdiri dari surfaktan, kosurfaktan, minyak dan air yang paling optimal
3. Optimal merupakan kondisi yang sesuai dengan parameter yang telah ditetapkan (lihat tabel 4.3) yang dapat dicapai dari hasil uji yang dilakukan terhadap mikroemulsi
4. Karakterisasi mikroemulsi merupakan karakteristik sifat dari sediaan sistem mikroemulsi yang dibuat dengan mempertimbangkan evaluasi organoleptik, pH, tegangan permukaan, morfologi partikel, dan tipe mikroemulsi
5. Stabil secara fisik adalah suatu bentuk tetap dari sediaan mikroemulsi yang karakteristik fisiknya tidak berubah dari pertama kali sediaan tersebut dibuat.

6. Sistem mikroemulsi merupakan kumpulan komponen dan bahan penyusun yang dibutuhkan untuk membentuk satu kesatuan sediaan mikroemulsi



4.6 Rancangan Formula

Komposisi Bahan Mikroemulsi dengan Variasi Konsentrasi Fase Minyak, Surfaktan, dan Air (%)

- Perbandingan Span 80 : Tween 80 = 40:60
- Perbandingan Span 80 : Tween 80 = 30:70
- Perbandingan Span 80 : Tween 80 = 20:80

1. Perbandingan Smix (Surfaktan : Kosurfaktan) 1:1

Tabel 4.1 Komposisi Bahan Penyusun Mikroemulsi dengan Perbandingan Smix 1:1

Perbandingan Fase Minyak : Smix	Fase Minyak Isopropil miristat (gram)	Surfaktan (gram)						Kosurfaktan Isopropanol (gram)
		40:60		30:70		20:80		
		Span 80	Tween 80	Span 80	Tween 80	Span 80	Tween 80	
1:9	5,00	9,00	13,50	6,75	15,75	4,50	18,00	22,50
2:8	10,00	8,00	12,00	6,00	14,00	4,00	16,00	20,00
3:7	15,00	7,00	10,50	5,25	12,25	3,50	14,00	17,50
4:6	20,00	6,00	9,00	4,50	10,50	3,00	12,00	15,00
5:5	25,00	5,00	7,50	3,75	8,75	2,50	10,00	12,50
6:4	30,00	4,00	6,00	3,00	7,00	2,00	8,00	10,00
7:3	35,00	3,00	4,50	2,25	5,25	1,50	6,00	7,50
8:2	40,00	2,00	3,00	1,50	3,50	1,00	4,00	5,00
9:1	45,00	1,00	1,50	0,75	1,75	0,50	2,00	2,50

2. Perbandingan Smix (Surfaktan : Kosurfaktan) 2:1

Tabel 4.2 Komposisi Bahan Penyusun Mikroemulsi dengan Perbandingan Smix 2:1

Perbandingan Fase Minyak : Smix	Fase Minyak		Surfaktan (gram)					Kosurfaktan
	Isopropil miristat (gram)	40:60		30:70		20:80		Isopropanol (gram)
		Span 80	Tween 80	Span 80	Tween 80	Span 80	Tween 80	
1:9	5,00	12,00	18,00	9,00	21,00	6,00	24,00	15,00
2:8	10,00	10,67	16,00	8,00	18,67	5,33	21,34	13,33
3:7	15,00	9,33	14,00	7,00	16,33	4,67	18,66	11,67
4:6	20,00	8,00	12,00	6,00	14,00	4,00	16,00	10,00
5:5	25,00	6,67	10,00	5,00	11,67	3,33	13,34	8,33
6:4	30,00	5,33	8,00	4,00	9,33	2,67	10,66	6,67
7:3	35,00	4,00	6,00	3,00	7,00	2,00	8,00	5,00
8:2	40,00	2,67	4,00	2,00	4,67	1,33	5,34	3,33
9:1	45,00	1,33	2,00	1,00	2,33	0,67	2,66	1,67

Dasar pemilihan bahan-bahan yang digunakan untuk formulasi:

1. Surfaktan non ionik

Surfaktan tipe non ionik dipilih karena sifatnya yang lebih aman pada kulit karena kurang mengiritasi dan kadar racun lebih sedikit dibandingkan tipe surfaktan lainnya (Kumar, 2011)

a. Tween 80

Tween 80 sering digunakan sebagai *emulsifying agent* pada emulsi topikal tipe minyak dalam air, dikombinasikan dengan *emulsifier* hidrofilik pada emulsi minyak dalam air, dan untuk menaikkan kemampuan menahan air pada sediaan topikal

b. Span 80

Span 80 berfungsi sebagai surfaktan atau emulgator yang bersifat nonionik yang larut dalam minyak. Span 80 sering digunakan secara luas dalam produk kosmetik dan dapat menghasilkan emulsi OW atau W/O yang stabil dalam mikroemulsi dalam kombinasi bersama bermacam-macam *polysorbate*

c. Isopropil miristat

Isopropil miristat pada penelitian ini berfungsi sebagai fase minyak yang dapat meningkatkan penetrasi seyawa-senyawa yang bersifat hidrofilik dan lipofilik. Mekanisme isopropil miristat sebagai peningkat penetrasi adalah dengan cara berinteraksi dengan lipid pada stratum korneum karena sifatnya

sebagai fase minyak sehingga mudah berinteraksi dengan lipid dan akhirnya mudah menembus stratum korneum.

d. Isopropanol

Isopropanol pada penelitian ini berfungsi sebagai kosurfaktan yang dapat ditoleransi oleh kulit dan dapat mempercepat penghantaran mikroemulsi pada kulit

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Temu Giring

Serbuk rimpang temu giring dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Sebanyak 1 kg serbuk rimpang temu giring dimasukkan ke dalam maserator, lalu ditambah 10 liter bagian etanol 96%. Dikarenakan kapasitas toples yang hanya cukup menampung 200 mg serbuk rimpang dan 2 liter pelarut, maka maserasi dilakukan di 5 toples berbeda. Campuran diaduk menggunakan batang pengaduk sesekali selama 6 jam. Kemudian dibiarkan sampai \pm 24 jam. Setelah itu larutan disaring menggunakan kain flanel untuk mendapatkan filtrat. Dilakukan remaserasi hingga 2 kali. Filtrat yang dihasilkan kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 70 rpm, Didapatkan ekstrak kental etanol 96% temu giring. Ekstrak kemudian disimpan dalam lemari es untuk menghindari pertumbuhan mikroorganismenya.

4.7.2 Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid

Ekstrak ditimbang 100 mg, kemudian dibagi dua menjadi masing-masing 50 mg. Pada ekstrak 50 mg pertama, ekstrak kembali dibagi dua menjadi masing-masing 25 mg, sehingga terdapat 3 pembagian ekstrak. Bagian pertama, ekstrak ditambahkan 5 mL amonia encer dan 1 mL H₂SO₄; bagian kedua, ekstrak ditambahkan 1% larutan AlCl₃; dan bagian ketiga, ekstrak ditambahkan 10 mL etil asetat, yang akan didispersikan di atas *water bath* lalu disaring. Filtrat yang didapat lalu ditambahkan amonia encer 1 mL. Reaksi positif menunjukkan adanya flavonoid yang terkandung, ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning.

4.7.3 Identifikasi Senyawa Golongan Kurkumin

Identifikasi senyawa kurkumin dilakukan menggunakan alat UV-Vis. Digunakan fase gerak kloroform P:metanol (95:5), fase diam lempeng silika gel 60, dan larutan uji standar kurkumin 0,1 % dalam etanol P. Ekstrak yang diuji ditotolkan pada plat silika sebanyak 10 µL kemudian dilakukan eluasi. Larutan uji standar kemudian ditotolkan pada plat silika sebanyak 2 µL dan dilakukan eluasi. Setelah itu, kedua lempeng dideteksi dengan menggunakan UV-Vis. Nilai R_f yang didapat kemudian dibandingkan dengan hasil larutan uji standar.

4.7.4 Pembuatan Sistem Mikroemulsi

Pembuatan sistem mikroemulsi adalah dengan cara mencampur kedua bahan yaitu tween 80 dan span 80 sebagai surfaktan pada gelas beaker 100 mL. Kemudian, bahan dihomogenkan dengan memasukkan *magnetic stirrer* dan dicampur dengan kecepatan 350 rpm tanpa pemanasan. Diambil isopropanol dengan menggunakan pipet ukur dan dicampurkan ke dalam tween 80/span80. Setelah homogen, campuran ditambahkan isopropil miristat dengan pengadukan dengan *magnetic stirrer* selama ± 5 menit. Hasil sistem yang didapat adalah kuning jernih. Sistem kemudian dititrasi dengan air, dengan penambahan setetes demi setetes hingga sistem berubah dari jernih menjadi keruh

4.7.5 Pembuatan Sistem Mikroemulsi dengan Penambahan Ekstrak Temu Giring

Pembuatan sistem mikroemulsi dengan penambahan ekstrak temu giring, adalah dengan mencampurkan surfaktan dan kosurfaktan terlebih dahulu dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada kecepatan 350 rpm tanpa pemanasan. Ekstrak kemudian dilarutkan di isopropil miristat sebagai fase minyak lalu dicampurkan ke dalam sistem. Sistem kemudian ditambahkan fase air dan dicampur hingga homogen. Sistem yang telah dibuat kemudian dikarakterisasi yang meliputi uji organoleptik, uji tegangan permukaan, uji pH, uji tipe sediaan mikroemulsi, dan uji morfologi droplet.

4.8 Spesifikasi Sistem Mikroemulsi

Spesifikasi sistem mikroemulsi ditentukan untuk melihat apakah sistem telah mencapai parameter yang ditentukan seperti yang terlihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.3 Spesifikasi Sistem Mikroemulsi

Uji Sediaan	Spesifikasi
Organoleptik	berwarna kuning jernih, tidak berbau, dan cair
Morfologi Droplet	berbentuk <i>spheric</i> (bulat)
Tegangan Permukaan	<72 dyne/cm
Tipe Mikroemulsi	tipe O/W
pH	< 9,2

4.9 Evaluasi Sediaan

4.9.1 Uji Sistem

4.9.1.1 Uji Organoleptik

Tujuan

Untuk mengetahui dan mengidentifikasi karakteristik sediaan berupa warna, bau dan konsistensi sistem

Metode

Uji organoleptik dilakukan dengan cara identifikasi konsistensi bentuk sistem dan warna yang dihasilkan yang diamati secara deskriptif

Interpretasi Hasil

Didapatkan sediaan sistem yang berwarna kuning jernih, tidak berbau dan larutan kental yang sesuai dengan spesifikasi mikroemulsi

4.9.1.2 Pengamatan Morfologi Droplet

Tujuan

Untuk menentukan ukuran droplet dan morfologi dari masing-masing sistem dan menyesuaikan dengan rentang normal ukuran droplet mikroemulsi

Metode

Pengamatan morfologi dilakukan dengan mengencerkan sistem dengan aquabides pada perbandingan 1:10. Sampel ditetaskan di atas Cu Grid hingga kering lalu ditetaskan PTA (*phosphotungstic acid*) 2% dalam air yang kemudian dikarakterisasi menggunakan TEM (*Transmission Electron Microscope*).

Interpretasi Hasil

Didapatkan adanya ukuran partikel sistem dan didapatkan bentuk *spheric* (bulat) pada partikel

4.9.1.3 Uji Tegangan Permukaan

Tujuan

Untuk menentukan besar tegangan permukaan pada masing-masing sistem sehingga diketahui apakah fase minyak dan air telah bercampur atau tidak

Metode

Digunakan alat tensiometer Du Nouy dengan prinsip gaya yang dibutuhkan untuk mengangkat cincin sampai ke permukaan cairan sebagai penentuan nilai tegangan permukaan. Cincin dicelupkan ke dalam cairan kemudian hati-hati dikeluarkan dengan menurunkan tempat sampel.

Interpretasi Hasil

Didapatkan hasil tegangan permukaan dengan nilai <math><72 \text{ dyne/cm}</math>

4.9.1.4 Uji pH

Tujuan

Untuk mengetahui nilai pH sistem, apakah masuk ke dalam rentang pH yang masih bisa diterima oleh kulit.

Metode

Pengukuran dilakukan dengan menggunakan pH meter. Elektroda pada pH meter digital dicelupkan ke dalam mikroemulsi hingga pH meter menunjukkan angka yang stabil.

Interpretasi Hasil

Didapatkan nilai pH sistem yang masih bisa diterima oleh kulit yaitu $<9,2$ (Yati, 2011)

4.9.1.5 Uji Tipe Mikroemulsi

Tujuan

Untuk mengetahui tipe sistem mikroemulsi yang dibuat termasuk O/W atau W/O

Metode

Pengujian dilakukan dengan cara meneteskan metilen biru yang larut air pada larutan mikroemulsi di atas gelas arloji

Interpretasi Hasil

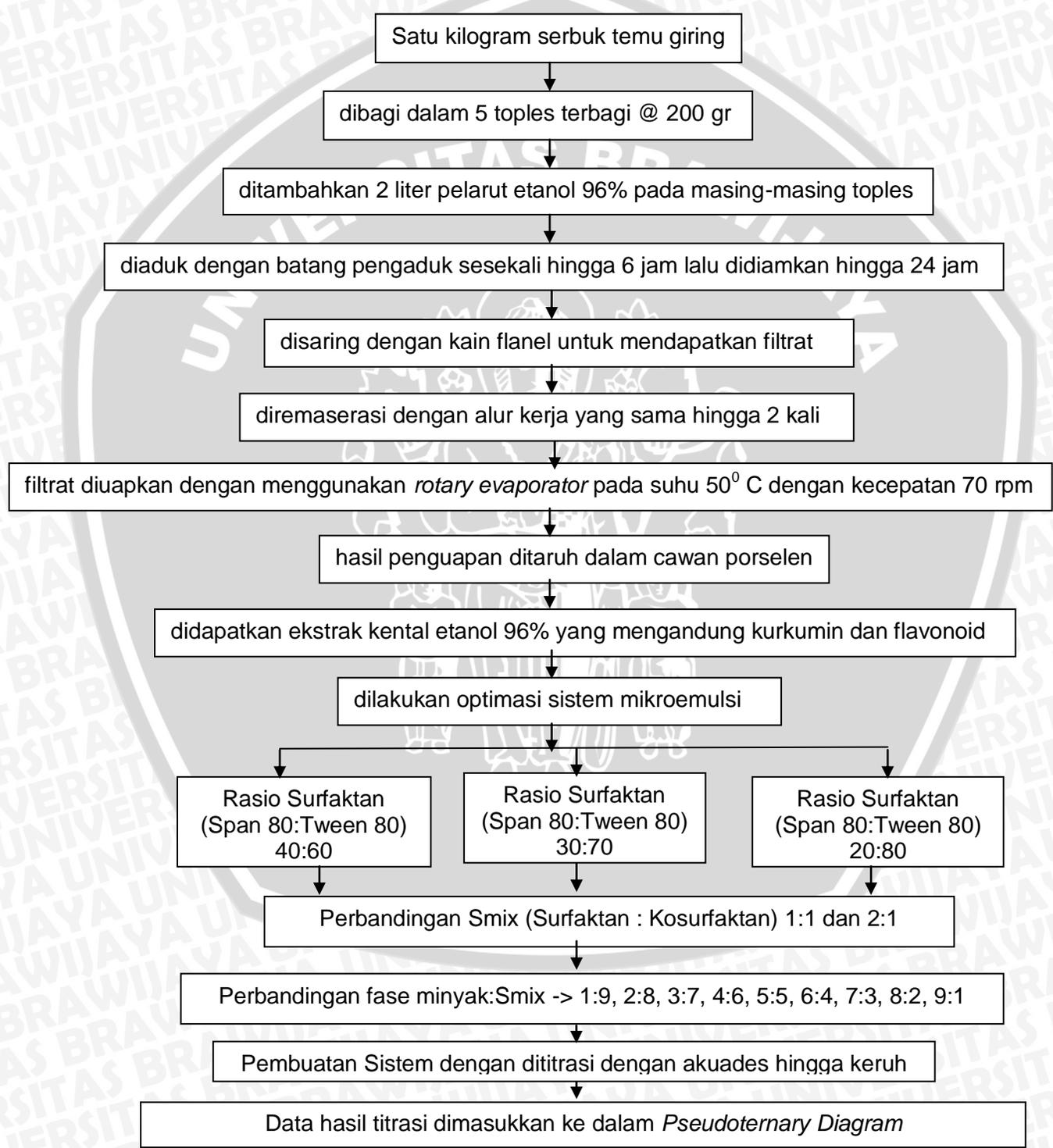
Didapatkan perubahan warna sistem dari kuning menjadi hijau, yang artinya metilen biru larut dalam fase luar sistem

4.10 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dalam bentuk narasi, tabel, atau grafik. Penelitian ini memiliki jumlah perlakuan yang terdiri dari 3 kelompok perlakuan. Analisa data pada penelitian ini dilakukan secara deskriptif, dimana data yang diperoleh dideskripsikan dan dibandingkan dengan persyaratan spesifikasi yang telah ditentukan. Data yang diperoleh kemudian diolah dengan *Microsoft Office Excel 2007* dan disajikan dalam bentuk tabel

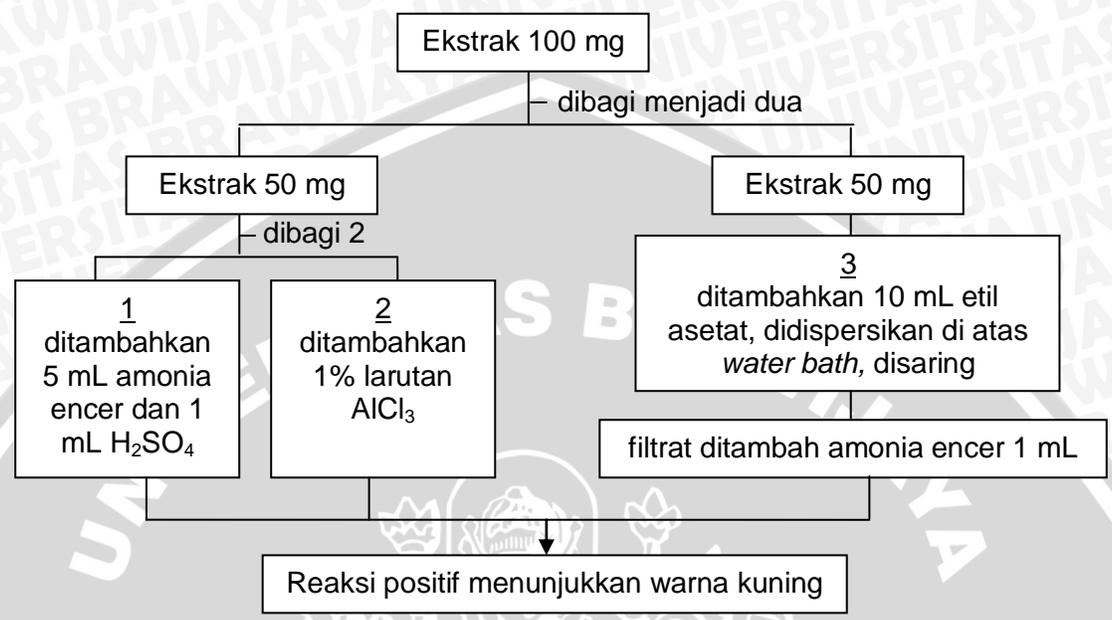
4.11 Skema Kerja

4.11.1 Optimasi Sistem Mikroemulsi



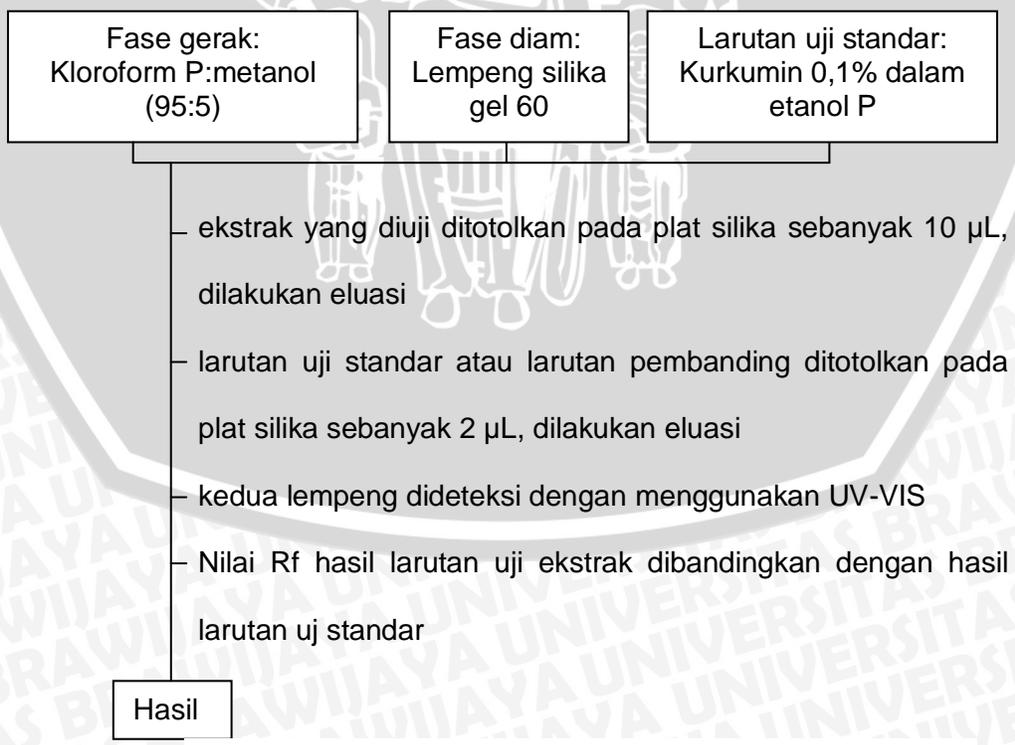
Gambar 4.1 Optimasi Sistem Mikroemulsi

4.11.2 Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid



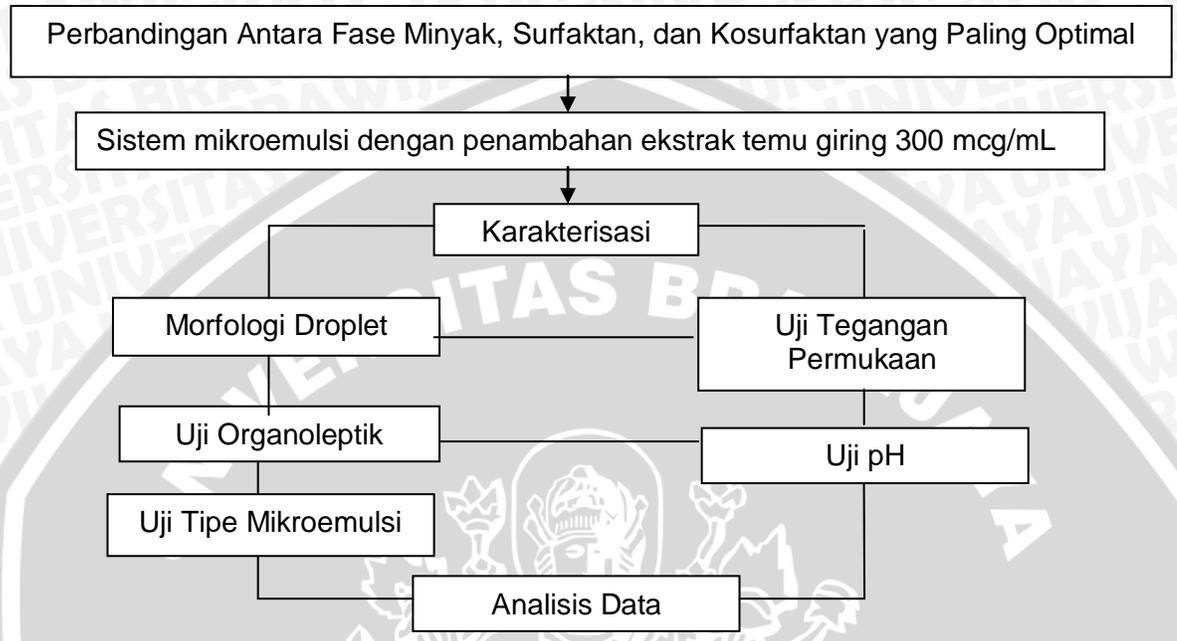
Gambar 4.2 Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid

4.11.3 Identifikasi Senyawa Golongan Kurkumin



Gambar 4.3 Identifikasi Senyawa Golongan Kurkumin

4.11.4 Karakterisasi Sistem Mikroemulsi



Gambar 4.4 Karakterisasi Sistem Mikroemulsi