

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah rancangan penelitian 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

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu terdiri dari surfaktan, kosurfaktan, fase minyak. Dilakukan pengujian terhadap fase minyak menggunakan minyak biji bunga matahari dan minyak biji jarak, surfaktan menggunakan tween 80 dan span 80 serta kosurfaktan menggunakan gliserin, propilen glikol, PEG.

##### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini yaitu penentuan kadar alfa-tokoferol yang terdifusi pada membran kulit ular dengan menggunakan metode Franz.

#### 4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan dimulai dari bulan Februari 2016 hingga bulan Juli 2016 di Laboratorium Farmasetika Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya untuk pembuatan sistem nanoemulsi, uji

pH, uji organoleptik, dan uji difusi. Unit Layanan PSA di Laboratorium Cair dan Padat Institut Teknologi Surabaya (ITS) untuk pengukuran rata-rata ukuran globul dan indeks polidispersitas.

#### 4.4 Alat dan Bahan

##### 4.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah batang pengaduk, timbangan digital 'Metter Teledo', gelas beaker 'Pyrex', pipet ukur, pipet tetes, cawan porselen, Erlenmeyer, vial, gelas ukur, corong gelas, hot plate, pH meter, *magnetic stirrer* 'Shimadzu Uni Bloc AUW 220', PSA (*Particle Size Analyzer*) "MALVERN", Spektrofotometer UV-Vis dan alat uji difusi Franz.

##### 4.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah alfa-tokoferol asetat, minyak biji bunga matahari dan minyak biji jarak, tween 80, span 80, gliserin, propilen glikol, dan PEG serta aquades.

#### 4.5 Definisi Operasional

1. Optimasi nanoemulsi merupakan proses pencarian nilai perbandingan antara bahan penyusun sistem nanoemulsi yang terdiri dari surfaktan, kosurfaktan, dan fase minyak yang menghasilkan sediaan yang jernih
2. Karakterisasi nanoemulsi merupakan karakterisasi sifat dari sediaan sistem nanoemulsi yang dibuat dengan mempertimbangkan evaluasi organoleptik, pH, ukuran partikel, indeks polidispersitas dan uji difusi

3. Uji difusi merupakan pengujian permeasi obat melalui tahanan pergerakan molekul senyawa melalui barrier pembawa dan pembatas kulit
4. Sistem nanoemulsi merupakan kumpulan komponen dan bahan penyusun yang dibutuhkan untuk membentuk satu kesatuan sediaan nanoemulsi
5. HLB (*Hydrophylic-Lipophylic Balance*) adalah nilai yang menunjukkan perbandingan antara grup hidrofil dan lipofil pada surfaktan dan menunjukkan perbedaan sifat surfaktan

#### 4.6 Rancangan Formula

##### 4.6.1 Formula Nanoemulsi Minyak Biji Bunga Matahari

$$\text{Kadar Alfa Tokoferol Asetat} = \frac{5\%}{15\%} = 33\% \quad (\text{HLB} = 6)$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar Minyak Biji Bunga Matahari} &= \frac{10\%}{15\%} = 67\% \\ &= \text{HLB} = 7 \end{aligned}$$

- a. Perbandingan Surfaktan pada Minyak Biji Bunga Matahari

$$\text{HLB butuh} = (7 \times 67\%) + (6 \times 33\%) = 6,67$$

$$\% \text{ Tween 80} = \frac{(6,67 - 4,3)}{(15 - 4,3)} \times 100\% = 22,15\%$$

$$\% \text{ Span 80} = 100\% - 22,15\% = 77,85\%$$

HLB butuh 6,67 → Span 80 : tween 80 = 77,85 : 22,15

**Tabel 4.1 Formula Nanoemulsi Minyak Biji Bunga Matahari**

Fase minyak : Smix	Alfa tokoferol (gr) (500 IU)	Minyak Biji Bunga Matahari (gr)	Smix (Surfaktan : Kosurfaktan) 1:1		
			Surfaktan (Span 80:tween 80) (gr)		Kosurfaktan (gr)
			77,85 : 22,15		
Tween 80	Span 80				
1:9	1	2	21,011	5,980	27
2:8	1	2	9,338	2,658	12
3:7	1	2	5,447	1,550	7
4:6	1	2	3,501	0,996	4,5
5:5	1	2	2,334	0,664	3
6:4	1	2	1,556	0,443	2
7:3	1	2	1,001	0,284	1,2857
8:2	1	2	0,583	0,166	0,75
9:1	1	2	0,259	0,073	0,3333

#### 4.6.2 Formula Nanoemulsi Minyak Biji Jarak

$$\text{Kadar Alfa Tokoferol Asetat} = \frac{5\%}{15\%} = 33\%$$

$$\text{Kadar Minyak Biji Jarak} = \frac{10\%}{15\%} = 67\%$$

- Perbandingan Surfaktan pada Minyak Biji Jarak
- HLB butuh = (14 x 67%) + (6 x 33%) = 11,36

$$\% \text{ Tween 80} = \frac{(11,36 - 4,3)}{(15 - 4,3)} \times 100\% = 65,98\%$$

$$\% \text{ Span 80} = 100\% - 65,98\% = 34,02\%$$

HLB butuh 11,3 → Span 80 : tween 80 = 65,98 : 34,02

**Tabel 4.2 Formulasi Nanoemulsi Minyak Biji Jarak**

Fase minyak : Smix	Alfa tokoferol (gr)	Minyak jarak (gr)	Smix (Surfaktan : Kosurfaktan) 1:1		
			Surfaktan (Span 80 : tween 80) (gr)		Kosurfaktan (gr)
			65,98 : 34,02		
			Tween 80	Span 80	
1:9	1	2	17,8146	9,1854	27
2:8	1	2	7,9176	4,0824	12
3:7	1	2	4,6186	2,3814	7
4:6	1	2	2,9691	1,5309	4,5
5:5	1	2	1,9794	1,0206	3
6:4	1	2	1,3196	0,6804	2
7:3	1	2	0,8384	0,4373	1,2857
8:2	1	2	0,4949	0,2552	0,75
9:1	1	2	0,2199	0,1134	0,3333

Perhitungan formula nanoemulsi:

- Jumlah satu formula = 20 gram
- Alfa tokoferol asetat = 5 % x 20 gram = 1 gram
- Minyak biji bunga matahari = 10 % x 20 gram = 2 gram
- Minyak biji jarak = 10% x 20 gram = 2 gram
- Perhitungan Span, tween dan kosurfaktan
  - gram = % Span 80 x jumlah kosurfaktan
  - = % Tween 80 x jumlah kosurfaktan

**Total jumlah bahan :**

- Alfa tokoferol asetat = 1 gram x 9 = 9 gram
- Minyak biji bunga matahari = 2 gram x 9 = 18 gram
- Minyak biji jarak = 2 gram x 9 = 18 gram
- Span 80 = 23 gram x 2 = 46 gram
- Tween 80 = 50 gram x 2 = 100 gram
- Kosurfaktan = 67,5 gram x 2 = 135 gram

**4.6.3 Formula emulsi**

HLB butuh 6,67 → Span 80 : tween 80 = 77,85 : 22,15

**Tabel 4.3 Perbandingan formula emulsi minyak biji bunga matahari**

Bahan	Konsentrasi (%)
Alfa tokoferol	10
Minyak biji bunga matahari	5
Tween 80	35
Span 80	65
Akuades	Ad 20 ml

Perhitungan formula emulsi:

- Jumlah satu formula = 20 gram
- Alfa tokoferol asetat = 5 % x 20 gram = 1 gram
- Minyak biji bunga matahari = 10 % x 20 gram = 2 gram
- Span 80 = 65% x 20 gram = 13 gram
- Tween 80 = 35% x 20 gram = 7 gram
- Akuades ad 20 mg

**Tabel 4.4 Perbandingan formula emulsi minyak biji jarak**

Bahan	Konsentrasi (%)
Alfa tokoferol	10
Minyak biji jarak	5
Tween 80	65,42
Span 80	34,68
Akuades	ad 20 ml

HLB butuh 11,3 → Span 80 : tween 80 = 34,68 : 65,42

Perhitungan formula emulsi:

- Jumlah satu formula = 20 gram
- Alfa tokoferol asetat = 5 % x 20 gram = 1 gram
- Minyak biji jarak = 10 % x 20 gram = 2 gram
- Span 80 = 3,458 x 20 gram = 0,6916 gram

100



- Tween 80 =  $\frac{6,542}{100} \times 20 \text{ gram} = 1,3084 \text{ gram}$
- Aquades ad 20 mg

#### 4.6.4 Dasar pemilihan bahan-bahan yang digunakan untuk formulasi:

##### 1. Minyak biji bunga matahari

Biasa digunakan sebagai diluen; emolien; emulsifying agent; pelarut; pengikat tablet. Sunflower berbentuk cairan yang berwarna kuning terang dan jernih dan memiliki rasa yang hambar/netral. Komposisi asam lemak rata-rata minyak dari tanaman bunga matahari adalah 55-75% asam linoleat dan 15-25% asam oleat serta kandungan protein 15-20%. Minyak biji bunga matahari terlarut dalam benzena, kloroform, karbon tetraklorida, dietil eter, dan light petroleum dan praktis tidak larut dalam etanol (95%) dan air. Minyak biji bunga matahari banyak digunakan secara luas dalam kosmetik dan formulasi farmasi. Hal ini juga digunakan secara luas dalam kosmetik dan topikal formulasi farmasi, dan umumnya dianggap sebagai bahan yang tidak iritasi dan tidak toksik. Berat molekul rata-rata dari asam lemak adalah 275-286. Viskositas pada 25 ° C adalah 0,049414 kg/(M\*S). *Refractive index* (25 ° C)  $\approx 1,473$ . Densitas (25 ° C) adalah 917 kg/m<sup>3</sup>.

##### 2. Minyak biji jarak

Minyak biji jarak berwarna bening, hampir tidak berwarna atau kuning pucat berwarna kental, memiliki sedikit bau dan rasa yang awalnya hambar tapi setelah itu sedikit tajam. Banyak digunakan sebagai

Emollient; oleaginous vehicle; solvent. Minyak biji jarak secara luas digunakan dalam kosmetik, produk makanan, dan formulasi farmasi. Dalam formulasi farmasi, Castro oil ini paling sering digunakan dalam krim topikal dan salep pada konsentrasi 5-12,5%. Namun, juga digunakan dalam tablet oral dan formulasi kapsul, emulsi ophthalmic, dan sebagai pelarut dalam injeksi intramuskular. Minyak biji jarak digunakan dalam kosmetik dan makanan dan oral, parenteral, dan topikal dalam formulasi farmasi, umumnya dianggap sebagai bahan yang relatif tidak iritan dan tidak beracun ketika digunakan sebagai eksipien. Viskositas pada 20° C adalah 9,5-10,0 dPa.S. *Refractive index* (25 ° C)  $\approx$  1,477-1,479. Densitas (20 ° C) adalah 957-963 kg/m<sup>3</sup>. Ikatan ester, ikatan ganda dan kelompok hidroksil dalam minyak jarak menyediakan manfaat-manfaat untuk reaksi derivatif. Posisi hidroksil begitu reaktif sehingga dapat menghasilkan produk yang berguna pada panjang rantai yang lebih pendek. Kelompok hidroksil pada minyak jarak menambah stabilitas ekstra untuk minyak dan turunannya sehingga mencegah pembentukan hidroperoksida.

### 3. Span 80

Span 80 merupakan sinonim dari Sorbitan monooleate, berbentuk cairan kental dan berwarna kuning. Biasa digunakan untuk *emulsifying agent*, meningkatkan kelarutan dan sebagai pembasah. Banyak digunakan dalam kosmetik, produk makanan, dan formula farmasi sebagai surfaktan lipofilik nonionik. Terutama digunakan dalam formulasi farmasi sebagai agen pembentuk emulsi dalam krim, emulsi, dan salep untuk aplikasi topikal. Ketika digunakan sendiri, menghasilkan emulsi air

dalam minyak yang stabil dan mikroemulsi, tetapi sering digunakan dalam kombinasi dengan proporsi yang bervariasi dari polisorbat untuk menghasilkan emulsi air dalam minyak atau minyak dalam air atau krim dari berbagai konsistensi. Aman untuk digunakan karena merupakan bahan yang tidak toksik dan tidak iritan meskipun sesekali dilaporkan terjadi reaksi hipersensitif.

#### 4. Tween 80

Tween 80 merupakan sinonim dari Polysorbate 80. Biasa digunakan sebagai Bahan pendispersi; bahan pembentuk emulsi; surfaktan nonionik; meningkatkan kelarutan; pensuspensi; pembasah. Terbukti dapat meningkatkan bioavailabilitas molekul obat yang substrat untuk P Glycoprotein.

#### 5. Propilen Glikol

Propilen glikol telah menjadi banyak digunakan sebagai pelarut, ekstraktan, dan pengawet dalam berbagai formula farmasi parenteral dan non parenteral. Propilen glikol umumnya digunakan sebagai plasticizer dalam air. Dalam sediaan topikal, propilen glikol dianggap memiliki efek yang minimal untuk mengiritasi, meskipun lebih iritan dari gliserin.

#### 6. Gliserin

Dalam formula farmasi topikal dan kosmetik, gliserin ini digunakan terutama untuk humektan dan sifat emolien. Gliserin digunakan sebagai pelarut atau kosolven dalam krim dan emulsi. Gliserin yang juga

digunakan dalam air dan gel tak berair dan juga sebagai aditif dalam aplikasi patch. Dalam formula parenteral, gliserin digunakan terutama sebagai pelarut dan kosolven.

#### 7. Polietilen glikol 400

Polietilen glikol (PEG) yang banyak digunakan dalam berbagai formulasi farmasi, termasuk parenteral, topikal, mata, mulut, dan dubur. Polietilen glikol telah digunakan secara eksperimental dalam matriks polimer biodegradable digunakan dalam sistem *controlled release*. Adanya polietilen glikol di luar film, cenderung untuk meningkatkan permeabilitas air mereka dan dapat mengurangi perlindungan terhadap pH rendah dalam film *enteric-coating*. Polietilen glikol berguna sebagai *plasticizer* dalam produk mikroenkapsulasi untuk menghindari pecahnya film pelapis ketika mikro kapsul yang dikompresi menjadi tablet.

### 4.7 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Pembuatan sistem emulsi

Bahan-bahan untuk pembuatan sistem emulsi adalah alfa-tokoferol, minyak biji jarak, minyak biji bunga matahari, tween 80, span 80, dan aquades. Semua bahan ditimbang yang berfungsi sebagai fase minyak terdiri atas alfa-tokoferol, minyak biji jarak atau minyak biji bunga matahari, dan span 80. Fase air terdiri dari aquades dan tween 80. Fase minyak dan fase air dicampur pada suhu yang sama ( $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$ ) untuk homogenisasi bahan baku karena alfa-tokoferol tidak tahan terhadap pemanasan. Fase minyak ditambahkan secara bertahap ke

fasa air dan dikocok dengan kuat selama 10 menit menggunakan *magnetic stirrer* 600 rpm sampai homogen (Shahin, et al., 2011)

#### 4.7.2 Pembuatan sistem nanoemulsi

Pembuatan optimasi nanoemulsi Alfa-tokoferol asetat dilakukan dengan formula yang terdiri dari Alfa-tokoferol asetat sebagai bahan aktif, minyak biji bunga matahari dan minyak biji jarak sebagai fase minyak, tween 80 dan span 80 sebagai surfaktan, serta PEG (Polietilen glikol), PG (Propilenglikol) dan Gliserin sebagai kosurfaktan. Tween dan span ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam vial dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit hingga homogen. Kemudian ditambahkan salah satu jenis kosurfaktan dan diaduk hingga homogen menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit. Kemudian ditambahkan fase minyak (salah satu jenis minyak yang telah ditambah alfa-tokoferol 5% yang telah diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 10 menit). Pada formula ini digunakan perbandingan *Smix* (Perbandingan surfaktan dan kosurfaktan) 1:1 dan perbandingan antara minyak dan *Smix* dalam optimasi ini adalah 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, dan 9:1. Pencampuran dari semua bahan tersebut dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 600 rpm selama 1 jam. Setelah itu optimasi formula digunakan metode titrasi menggunakan aquades, dimana titik akhir aquades ditandai dengan perubahan sistem dari jernih menjadi agak keruh. Berikut ini merupakan hasil dari titrasi.

Tabel 4.5 Hasil Titration Nanoemulsi Alfa-tokoferol Minyak Jarak HLB 11

Perbandingan minyak dengan <i>Smix</i>	Volume penambahan air (ml)
1:9	1,2 ml
2:8	1,2 ml
3:7	1,2 ml
4:6	1,8 ml
5:5	1 ml
6:4	0,8 ml
7:3	1,6 ml
8:2	1,1 ml
9:1	1 ml

Setelah melakukan titrasi, dilakukan pengecilan ukuran menggunakan handmixer blender "NANOTECH" dengan kecepatan 5 selama 11 menit. Lalu dilakukan metode sonikasi selama 30 menit menggunakan *ultrasonic bath* dengan frekuensi 30 kHz.

Pada minyak biji jarak dan kosurfaktan dilakukan penelitian dengan langkah yang sama secara bergantian. Setelah dilakukan optimasi, data yang diperoleh diplotkan pada diagram pseudoterner. Hasil optimasi yang telah diplotkan didiagram pseudoterner diambil 3 titik dari setiap jenis fase minyak dan kosurfaktan yang digunakan.

#### 4.7.3 Pembuatan diagram *pseudo ternary*

Diagram *pseudo ternary* terdiri dari minyak, air dan surfaktan atau surfaktan dan kosurfaktan dengan campuran nilai HLB yang berbeda dibangun menggunakan metode titrasi air. Rasio surfaktan dan kosurfaktan adalah tetap pada 1:1. Setiap minyak dicampur dengan

surfaktan atau campuran surfaktan dan kosurfaktan pada rasio 1.0:9.0, 2.0:8.0, 3.0:7.0, 4.0:6.0, 5.0:5.0, 6.0:4.0, 7.0:3.0, 8.0:2.0 dan 9.0:1.0. Air suling ditambahkan secara bertahap 100 uL oleh mikropipet pada suhu kamar ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ) untuk minyak dan surfaktan atau campuran kosurfaktan sampai 90,90% b/b. Sampel dicampur dengan *mixer vortex*. Kualitas visual dari campuran emulsi dicatat sebagai cairan keruh atau susu.

Emulsi w/o menduduki wilayah kanan bawah dari diagram fase segitiga (wilayah kaya minyak). Pada sebaliknya, emulsi o/w berada di tengah dan daerah kiri (daerah yang kaya air) dari diagram *pseudo ternary*. Pembentukan emulsi w/o atau o/w tergantung pada komposisi emulsifier dan kelarutannya dalam minyak dan air (Haroon dan Kok, 2014)

Cara mengetahui nanoemulsi yang terbentuk o/w atau w/o dapat ditentukan melalui 4 cara, yaitu *Dye Test*, *CoCl<sub>2</sub>/filter paper test*, *Fluorescence*, dan konduktivitas. *Dye Test* yaitu menggunakan pewarna yang larut dalam air atau minyak. Pewarnaan tes dengan dye larut dalam air seperti methylene blue, jika o/w akan menghasilkan globul tidak berwarna dengan latar belakang tetesan berwarna biru (fase kontinu) dan w/o menunjukkan gelembung-gelembung biru berwarna dengan globul tidak berwarna. *CoCl<sub>2</sub>/filter paper test* menggunakan kertas filter yang diresapi dengan  $\text{CoCl}_2$  dan dikeringkan yang sebelumnya berwarna biru akan berubah menjadi warna merah muda ketika terjadi o/w. *Fluorescence* terjadi beberapa minyak berpendar di bawah sinar UV. Kemudian, konduktivitas apabila terjadi o/w

konduktor listrik akan menyala sedangkan w/o tidak menyala (Klaus. 2007)

#### **4.7.4 Pembuatan kurva kalibrasi alfa-tokoferol asetat dalam pelarut ethanol 96%**

Alfa-tokoferol asetat ditimbang seksama sebanyak  $\pm 20$  mg, kemudian dilarutkan dalam ethanol 96% dalam beaker glass sebanyak 4 ml dan ditambahkan dengan larutan dapar fosfat pH 5,5 sebanyak 4 ml. Didapat larutan dengan konsentrasi 2500 ppm. Kemudian larutan tersebut, dipipet 8 ml dan dicukupkan volumenya sampai 25 ml. sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 800 ppm. Dari larutan 800 ppm, diencerkan menjadi larutan dengan konsentrasi 75, 100, 150, 200, dan 250 ppm. Larutan dengan konsentrasi tersebut kemudian diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dalam panjang gelombang maksimumnya. Panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum alfa-tokoferol asetat dalam ethanol dan buffer, ditentukan dengan melakukan scanning pada panjang gelombang antara 200-600 nm. Serapan larutan-larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yaitu 284,0 nm, kemudian dihitung persamaan regresi linearnya.

#### **4.7.5 Penetapan kadar alfa-tokoferol asetat dalam sediaan**

Sediaan nanoemulsi alfa-tokoferol asetat ditimbang secara seksama sebanyak  $\pm 1,0$  gram, kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat pH 5,5 sebanyak 27 ml dalam beaker glass lalu aduk ad

homogen. Larutan tersebut diambil sebanyak 3 ml dan ditambahkan dengan ethanol 96% sebanyak 3 ml. Setelah diaduk ad homogen, dilakukan pengenceran dengan mengambil 2 ml dan ditambahkan ethanol 96% hingga batas labu terukur 10,0 ml. Larutan tersebut diukur serapannya, dan dihitung konsentrasi sebenarnya melalui persamaan kurva kalibrasi kurkumin standar dalam ethanol 96%. Dari konsentrasi yang didapat kemudian dihitung kadarnya. Perhitungan dapat dilihat dalam lampiran 13.

#### **4.7.6 Pembuatan dapar fosfat pH 5,5**

Kalium dihidrogen fosfat ditimbang sebanyak 6,8 gram dilarutkan dengan aquades dan dimasukkan ke dalam labu terukur ad 50 ml, didapatkan larutan kalium hidroksida fosfat 0,2 M. Kemudian larutan natrium hidroksida diambil 12 ml dan dimasukkan ke dalam labu terukur ad 25 ml, didapatkan larutan NaOH 0,2 N. Larutan kalium dihidrogen fosfat dimasukkan ke dalam labu ukur 1 L dan ditambahkan 8 ml larutan natrium hidroksida dan dicukupkan volumenya dengan aquades bebas karbondioksida, kemudian pH dapar dilihat dengan pH-meter pada nilai 5,5

#### **4.8 Spesifikasi Sistem Nanoemulsi**

Spesifikasi sistem nanoemulsi ditentukan untuk melihat apakah sistem telah mencapai parameter yang ditentukan seperti yang terlihat pada tael berikut ini:

**Tabel 4.6 Spesifikasi Sistem Nanoemulsi**

<b>Uji Sediaan</b>	<b>Spesifikasi</b>
Organoleptik	Berwarna kuning jernih, tidak berbau, dan cair
Tipe Nanoemulsi	Tipe o/w
pH	4-6
Ukuran droplet	50 - 1000 nm
Efisiensi penjerapan	80 – 100%
Indeks polidispersitas	< 0,5

## 4.9 Evaluasi Sediaan

### 4.9.1 Uji Organoleptik

#### Tujuan

Untuk mengetahui dan mengidentifikasi karakterisasi sediaan berupa kejernihan, sedimentasi, bau serta perubahan warna.

#### Metode

Uji organoleptik dilakukan dengan cara mengamati kejernihan, sedimentasi, bau serta perubahan warna sediaan secara deskriptif.

#### Interpretasi Hasil

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

### 4.9.2 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 "Schott". Elektroda pada pH meter digital dicelupkan ke dalam nanoemulsi hingga pH meter menunjukkan angka yang stabil pada suhu  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

#### Interpretasi Hasil

Didapatkan nilai pH yang dipersyaratkan untuk sediaan topikal dan sesuai untuk kulit yaitu 4-6.

### 4.9.3 Uji efisiensi penyerapan

#### Tujuan

Untuk mengetahui jumlah vitamin E yang terjerap dalam formula nanoemulsi.

#### Metode

Penentuan efisiensi penyerapan setiap formula nanoemulsi dilakukan dengan spektrofotometri UV-VIS. Hasil pemisahan berupa vitamin E yang tidak terjerap dalam nanoemulsi yang akan dilakukan penjuanan dengan cara nanoemulsi ditambahkan dengan aquades 4 ml dan kloroform 4 ml selama 24 jam. Diambil hasil ekstrak cairan bagian bawah berupa alfa-tokoferol asetat yang tidak terjerap. Larutan tersebut dilakukan pengenceran diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum 284,00 nm. Pembuatan kurva baku dilakukan dengan melarutkan alfa-tokoferol asetat dengan kloroform. Hasil serapan yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier, sehingga didapat konsentrasi vitamin E dengan rumus:

Rumus efisiensi penyerapan yaitu:

$$\% \text{ efisiensi penyerapan} = \frac{(100 - \text{Jumlah vitamin E tidak terjerat}) \times 100\%}{\text{Jumlah vitamin E total}}$$

Interpretasi Hasil

Efisiensi penyerapan yang dihasilkan antara 80-100%. Semakin besar nilai efisiensi penyerapan maka sistem nanoemulsi semakin bagus.

#### 4.9.4 Uji Ukuran Partikel

Tujuan

Untuk menentukan intensitas distribusi spasial dari cahaya terhambur yang diakibatkan oleh sinar laser. Distribusi ukuran partikel dapat diketahui dari intensitas distribusi parsial dari cahaya terhambur tersebut.

Metode

Pengukuran ukuran partikel nanoemulsi diukur menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*) Zeta Sizer "MALVERN". *Particle Size Analyzer* didasari oleh difraksi sinar laser dan disertai dengan pantulan sinar paralel dari partikel yang diukur pada medium pendispersinya. Alat ukur sistem optis terdiri dari lensa kondenser yang berfungsi sebagai alat penghambur cahaya dimulai dari sudut 0° hingga 40° dan sensor optis yang berfungsi sebagai detektor intensitas distribusi cahaya yang memasuki detektor tepat pada titik fokus pada lensa kondenser.

#### Interpretasi Hasil

PSA menyajikan distribusi ukuran partikel yang disertai dengan jumlah atau volume dari ukuran-ukuran partikel tersebut mulai 50 sampai 1000 nm.

#### 4.9.5 Indeks Poldispersitas

##### Tujuan

Untuk mengetahui kemudahan droplet nanoemulsi untuk terdispersi kembali karena hal ini dapat mempengaruhi perubahan ukuran droplet dan mengetahui kemungkinan terjadinya *cracking*.

##### Metode

Pengukuran dilakukan menggunakan *Particle size Analysis* (PSA).

##### Interpretasi Hasil

Indeks poldispersitas kurang dari 1,0.

#### 4.9.6 Uji Difusi

##### Tujuan

Sel difusi Franz, salah satu alat untuk menguji permeasi obat melalui kulit secara *in vitro*, merupakan sistem permeasi tipe vertikal

##### Metode

Perangkat ini terdiri atas kompartemen reseptor, tempat pengambilan sampel, dan water jacket. Membran kulit ular direndam dalam larutan dapar fosfat pH 5,5 selama 24 jam dalam suhu ruang dan diletakkan diantara kompartemen donor dan reseptor yang telah diisi dengan larutan dapar fosfat pH 5,5 sekitar 27 ml yang terdapat

*magnetic stirrer* yang diatur pada kecepatan 600 rpm dan *water jacket* untuk menjaga suhu sistem (Thakker, et al., 2003)

Sediaan nanoemulsi ditimbang sebanyak  $\pm 1$  gram yang akan diaplikasikan pada membran kulit. Kemudian ambil sampel pada menit ke- 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360 sebanyak 3 ml dari kompartemen reseptor dengan menggunakan *syringe* dan ditambahkan larutan dapar fosfat pH 5,5 sejumlah volume yang sama dengan volume yang diambil. Sampel sebanyak 3 ml ditambahkan dengan 3 ml ethanol 96%. Kemudian, sampel sejumlah tertentu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml dengan metode pengenceran dan dicukupkan volume dengan ethanol 96% yang ada kemudian digunakan untuk perhitungan persen penetrasi alfa-tokoferol asetat. Secara umum laju difusi obat melewati kulit mengikuti hukum Ficks I karena pada dasarnya obat melalui kulit dengan cara difusi pasif (Shargel, L, et al., 2004).

#### Interpretasi Hasil

Jumlah banyaknya globul yang paling kecil yang dapat berpenetrasi melalui membran kelupasan kulit ular pada sel difusi Franz yang diamati selama 6 jam.

#### 4.10 Analisis Data

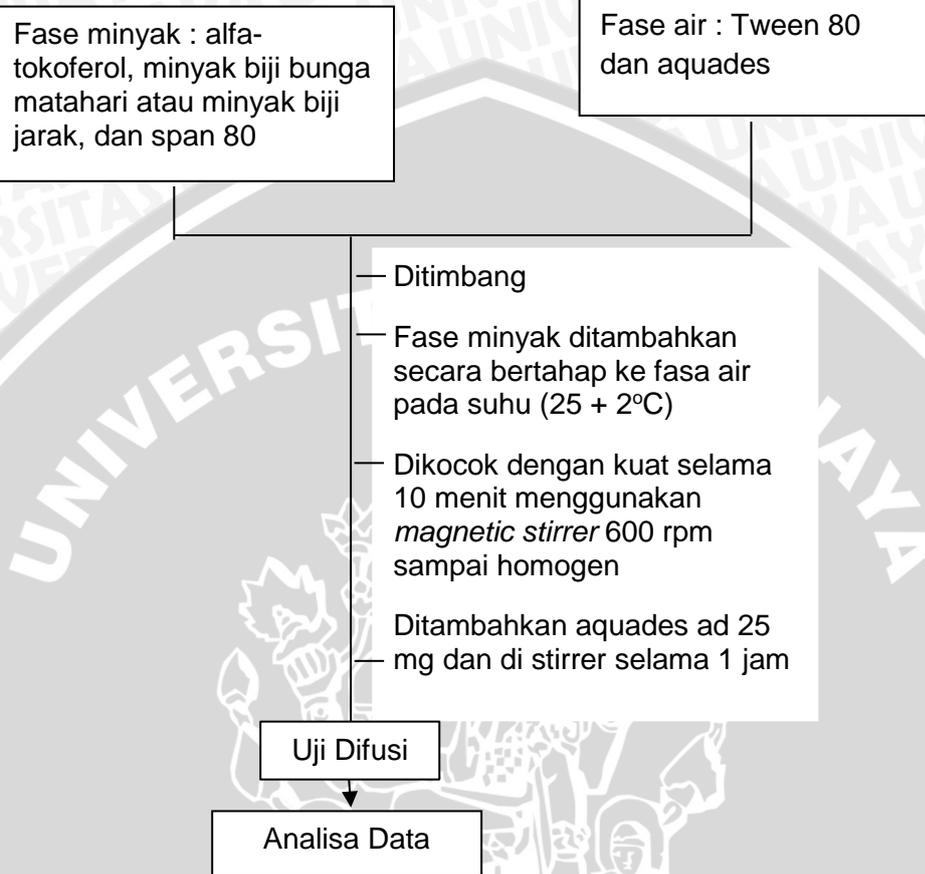
Analisa data dilakukan secara deskriptif dalam bentuk narasi, tabel, atau grafik. Penelitian ini memiliki jumlah perlakuan yang terdiri dari 3 kelompok perlakuan. Analisa data pada penelitian ini dilakukan secara deskriptif, dimana data yang diperoleh dideskripsikan dan dibandingkan

dengan persyaratan spesifikasi yang telah ditentukan. Data yang diperoleh kemudian diolah dengan Microsoft Office 2007 dan disajikan dalam bentuk tabel. Selain itu, data yang diperoleh yaitu data hasil uji difusi merupakan jenis hipotesis (asosiasi) komparatif karena data yang didapatkan akan dilakukan analisis perbandingan atau hubungan analisis data dilakukan menggunakan dengan *Independent T-test* apabila jenis data yang diperoleh hanya 2 macam. Apabila jenis data yang diperoleh lebih dari 2 macam maka dapat dilakukan uji *one way Annova*. Apabila persyaratan uji parametrik tidak terpenuhi, maka dilakukan uji nonparametrik. Pada uji nonparametrik uji t bisa diganti menggunakan uji Wilcoxon, sedangkan uji repeted ANOVA dapat diganti menggunakan uji Friedman.

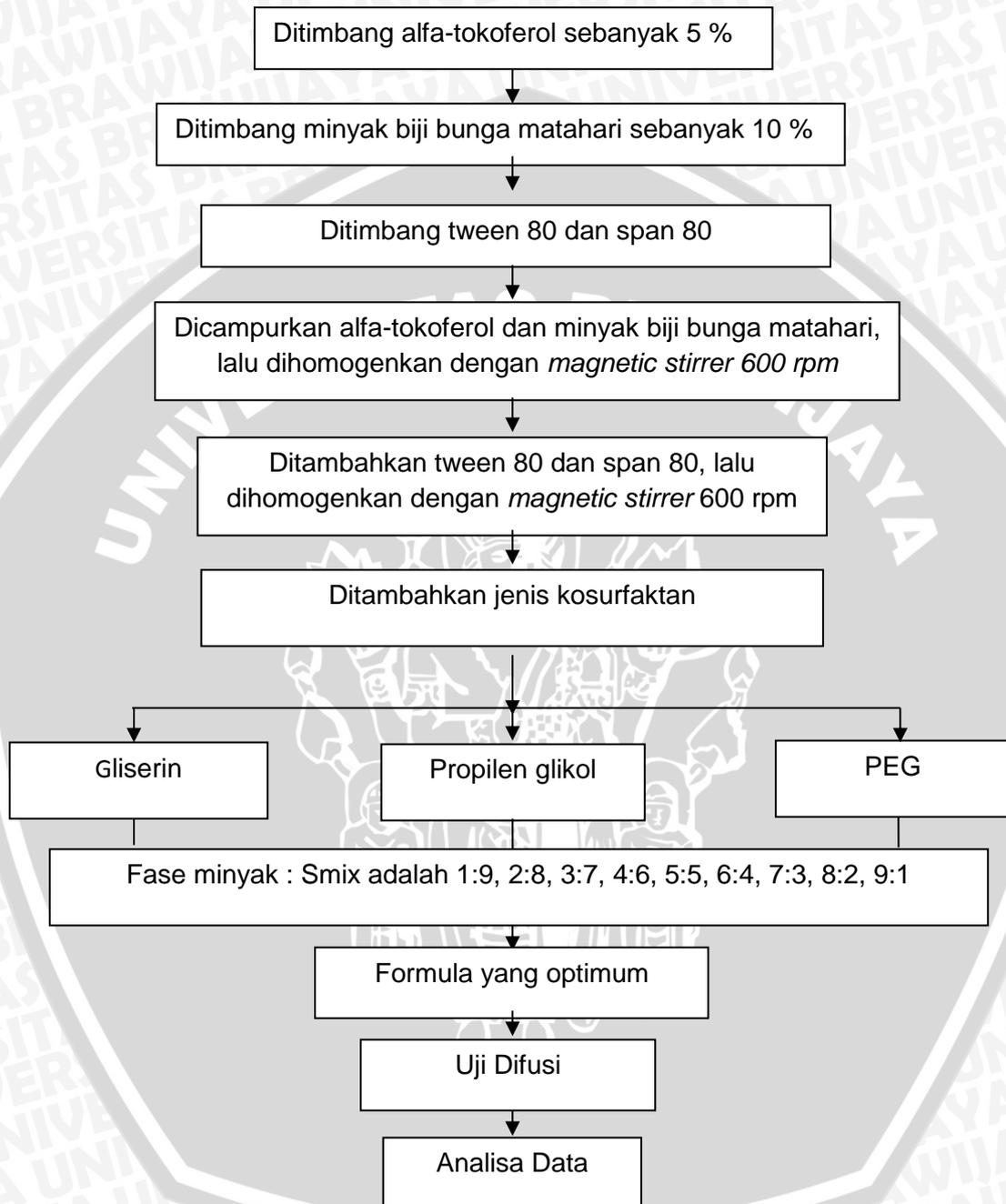


#### 4.11 Skema Kerja

##### 4.11.1 Skema Pembuatan Emulsi



#### 4.11.2 Skema kerja pembuatan nanoemulsi minyak biji bunga matahari



#### 4.11.3 Skema kerja pembuatan nanoemulsi minyak biji jarak

