

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental *post-test only*.

Penelitian didasarkan pada manipulasi variabel bebas, kemudian mengukur efek pada variabel terikat.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel terikat

Stabilitas formula etosom ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C.) yang diukur melalui uji organoleptik, pengukuran rata-rata diameter vesikel dan pH etosom.

4.2.2 Variabel bebas

Konsentrasi lesitin kedelai yang digunakan pada formulasi etosom ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C.).

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasetika Program Studi Farmasi untuk ekstraksi daun jeruk purut, pembuatan dan evaluasi etosom ekstrak daun jeruk purut. Penelitian dilakukan selama \pm 3 bulan.

4.4 Bahan dan Alat

4.4.1 Alat

4.4.1.1 Alat Ekstraksi

Alat yang digunakan yaitu toples kaca sebagai wadah untuk merendam serbuk daun jeruk purut yang telah dicampur pelarut. *Rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut yang masih tersisa dalam ekstrak yang dihasilkan. Gelas ukur 250 ml untuk mengukur volume pelarut yang digunakan.

Timbangan digital untuk menimbang daun jeruk purut yang akan digunakan dan ekstrak yang didapatkan. Kain flanel dan corong kaca untuk menyaring hasil rendaman daun jeruk purut agar diperoleh filtrat. Botol kaca digunakan untuk menampung filtrat

4.4.1.2 Alat untuk Pembuatan Etosom

Peralatan yang digunakan adalah timbangan digital untuk menimbang bahan-bahan etosom yang akan digunakan. Beaker glass 250 ml dan gelas arloji untuk menempatkan bahan-bahan yang telah ditimbang. *Ultra Nanotec* untuk mencampurkan bahan-bahan pembuatan etosom. Sonikator untuk membentuk vesikel dengan ukuran lebih kecil.

4.4.1.3 Alat untuk Uji Etosom

pH meter untuk mengukur pH etosom. *Particle Size Analyser* (PSA) untuk mengukur ukuran diameter vesikel etosom yang terbentuk. *Transmission Electron Microscopy* (TEM) untuk melihat morfologi dan mengukur ukuran diameter vesikel etosom.

4.4.2 Bahan

4.4.2.1 Bahan Ekstraksi

Bahan yang digunakan adalah daun jeruk purut segar (*Citrus hystrix*) diperoleh dari Materia Medika Batu dan pelarut etanol teknis 96%.

4.4.2.2 Bahan Formulasi Etosom

Bahan formulasi Etosom yang digunakan adalah lesitin kedelai, etanol teknis 85%, dan aquades.

4.4.2.3 Bahan Uji Etosom

Aquades untuk membasahi pH meter sebelum digunakan mengukur pH sampel.

4.5. Definisi istilah/Operasional

1. Maserasi merupakan metode ekstraksi dingin dengan merendam bahan ekstrak dengan menggunakan pelarut tertentu sesuai karakteristik senyawa yang akan diekstrak.
2. Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D. C.) merupakan hasil dari metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%.
3. Etosom adalah sistem penghantaran obat *non-invasif* yang memungkinkan obat untuk mencapai lapisan kulit dalam dan/atau sirkulasi sistemik.
4. Etosom ekstrak daun jeruk purut adalah etosom yang dibuat dari 1-3% (b/v) lesitin kedelai, 40% (v/v) etanol teknis 85%, ekstrak daun jeruk purut dengan konsentrasi 1,1 mg/ml dan ditambahkan air sampai 100% (b/v).
5. Daun jeruk purut yang digunakan diperoleh dari Balai Materia Medica kota Batu, Jawa Timur yang kemudian dikeringkan menjadi serbuk.

4.6. Rasionalitas Formulasi

4.6.1 Formula Etosom

Tabel 4.1 Formula Etosom Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.)

No	Bahan	Formula			Fungsi Bahan
		E1	E2	E3	
1.	Ekstrak daun jeruk purut	0,11 % (b/v)	0,11 % (b/v)	0,11 % (b/v)	Sebagai bahan aktif ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri
2.	Lesitin kedelai	1 % (b/v)	2% (b/v)	3% (b/v)	Membentuk komponen vesikel
3.	Etanol Teknis 85%	40% (b/v)	40% (b/v)	40% (b/v)	Sebagai <i>penetration enhancer</i> Membentuk membran vesikel yang halus
4	Air	Sampai 100%	Sampai 100%	Sampai 100%	Sebagai pelarut dan mengencerkan suspensi etosom

4.6.2. Spesifikasi Etosom Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.)

Tabel 4.2 Spesifikasi Etosom Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.)

No.	Parameter	Spesifikasi
1.	Oraganoleptik <ul style="list-style-type: none"> • Bau • Warna • Homogenitas 	Bau : Khas aromatik Warna : Hijau kekuningan Homogenitas : Homogen
2.	Uji pH	4,5 – 7,0
3.	Diameter vesikel	3 μ m -10 μ m
4.	Uji Morfologi	Berbentuk <i>spheris</i>
5.	Uji Stabilitas	Stabil pada suhu penyimpanan yang diukur berdasarkan uji orgaleptik, pH dan ukuran diameter vesikel

4.6.3. Bahan Formulasi Etosom Ekstrak Daun Jeruk Purut

4.6.3.1. Ekstrak Daun Jeruk Purut

Ekstrak daun jeruk purut digunakan sebagai bahan aktif karena memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* dengan konsentrasi hambat minimum dan konsentrasi bunuh minimum sebesar 1,1 mg/ml (Srisukh, dkk, 2012).

4.6.3.2. Lesitin Kedelai

Lesitin kedelai digunakan untuk membentuk komponen vesikel. Rentang konsentrasi yang digunakan dalam formulasi etosom yaitu 1-3%. Konsentrasi lesitin kedelai yang digunakan sebesar 1%, 2%, dan 3%. Variasi konsentrasi lesitin kedelai yang digunakan bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi terhadap ukuran diameter vesikel etosom (Gunjan dan Swarnlata, 2014).

4.6.3.3. Etanol Teknis 85%

Etanol digunakan untuk membentuk membran vesikel yang halus. Selain itu etanol berfungsi sebagai *penetration enhancer* sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel kulit. Konsentrasi etanol yang digunakan dalam formulasi etosom yaitu sebesar 40%, karena pada konsentrasi tersebut jumlah obat yang terdisposisi ke dalam kulit optimal (Gunjan dan Swarnlata, 2014).

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D. C.)

Di timbang serbuk daun jeruk purut sebanyak 165 gram kemudian dicampurkan dengan etanol teknis 96% dalam toples kaca dengan perbandingan bahan ekstrak dan pelarut adalah 1 : 5, kemudian ditutup dengan aluminium foil dan diaduk dengan menggunakan alat pengaduk otomatis (*Orbital Shaker*). Serbuk daun jeruk purut dimaserasi selama 48 jam. Filtrat yang didapatkan disaring, kemudian residunya dimaserasi kembali dengan menggunakan pelarut etanol teknis 96% dengan prosedur yang sama. Proses maserasi diulang sebanyak 3 kali. Masing-masing filtrat pada setiap ulangan maserasi dikumpulkan menjadi satu dalam botol kaca yang tertutup rapat. Ekstrak kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* selama 35 menit dengan suhu 60°C dan kecepatan 80 rpm, ekstrak di tampung diatas cawan porselen, selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan penangas air hingga diperoleh ekstrak dengan berat konstan.

4.7.2 Uji Penapisan Fitokimia Ekstrak

Tabel 4.3 Uji Penapisan Fitokimia Ekstrak Daun Jeruk Purut

No.	Kandugan	Bahan uji	Reagen	Reaksi	Hasil
1.	Fenol	Ekstrak daun jeruk purut	3 - 4 tetes larutan FeCl ₃	Jika terdapat perubahan warna menjadi biru kehitaman	(+) Fenol
2.	Flavonoid	Ekstrak daun jeruk purut	Larutan NaOH + larutan asam	Jika terdapat perubahan warna dari kuning pekat menjadi bening saat ditambahkan larutan asam	(+) Flavonoid
3.	Terpenoid	0,5 g ekstrak daun jeruk purut	2 ml kloroform + 3 ml H ₂ SO ₄	Jika muncul warna coklat kemerahan	(+) Terpenoid

4.7.3 Pembuatan Etosom

Etosom dibuat dari fosfatidilkolin kedelai dengan berbagai konsentrasi yaitu 1%, 2%, dan 3% (b/v), etanol teknis 85% dengan konsentrasi 40% (v/v), konsentrasi ekstrak daun jeruk purut sebanyak 0,11% (b/v) dan ditambahkan air sampai 100% (b/v). Komponen lesitin dituangkan ke dalam labu erlenmayer 50 mL dan dilarutkan dengan etanol. Aquades ditambahkan secara perlahan-lahan ke dalam campuran lipid yang diaduk dengan *stirrer* dengan kecepatan konstan. Suspensi etosom dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit dengan pengadukan terus menerus (Gunjan dan Swarnlata, 2014).

4.8 Evaluasi Etosom

4.8.1 Uji Organoleptik

Tujuannya adalah untuk melihat penampakan fisik dari homogenitas, warna, dan bau menggunakan metode pengamatan secara visual dan penciuman.

4.8.2 Uji pH

Pengukuran pH etosom yang dihasilkan dapat menggunakan pH meter Schott. Spesifikasi pH yang diharapkan sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5 - 7,0 (Putra, dkk., 2014).

4.8.3 Pengukuran Diameter Etosom

Rata-rata ukuran diameter vesikel etosom dapat diukur menggunakan *Particle Size Analyser* (PSA), dengan spesifikasi ukuran diameter vesikel yaitu 3 -10 μm (Martinho, dkk., 2011).

4.8.4 Uji morfologi

Transmission Electron Microscopy (TEM) digunakan untuk mempelajari morfologi vesikel, dengan spesifikasi yang diharapkan yaitu morfologi vesikel etosom berbentuk *spheris*.

4.8.5 Uji Stabilitas

Etosom yang terbentuk disimpan dalam suhu 4°C dan 25°C selama 30 hari dan dievaluasi perubahan ukuran rerata dan pH etosom pada hari ke 0, 15, dan 30.

4.9. Analisis Data

4.9.1 Uji Normalitas

Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui apakah distribusi sebuah data mengikuti atau mendekati distribusi normal. Metode yang digunakan adalah *Shapiro Wilk test*. Signifikansi dari tes ini adalah:

H_0 = Distribusi data normal

H_A = Distribusi data tidak normal

Jika distribusi data normal (H_0) pengujian yang dilakukan adalah uji parametrik. Namun, jika distribusi data tidak normal (H_A) pengujian yang dilakukan adalah uji non parametrik.

4.9.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas data yang digunakan secara umum adalah *Levene's test*. Uji ini dapat menunjukkan homogenitas dua kelompok yang diambil datanya. Jika hasil yang didapatkan adalah data homogen pengujian yang dapat dilakukan adalah uji parametrik.

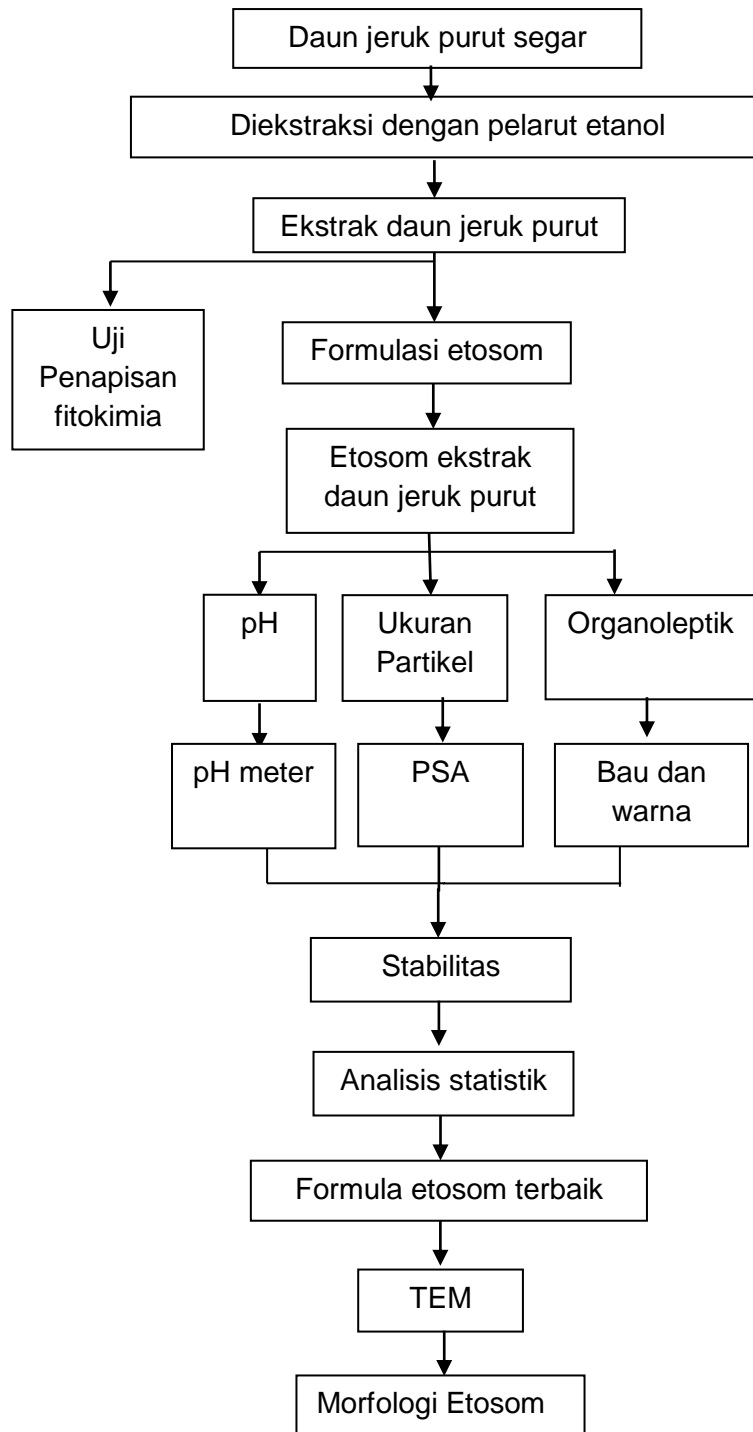
4.9.3 Uji *Repeated ANOVA*

Data yang diperoleh yaitu data hasil uji stabilitas dari segi ukuran dan pH merupakan jenis hipotesis komparatif karena data yang didapatkan akan dilakukan analisis perbandingan atau hubungan. Analisis data dilakukan menggunakan uji *Repeated ANOVA* karena jenis data yang diperoleh lebih dari dua yaitu uji stabilitas pada titik pengamatan ke-0, ke-15 dan ke-30. Uji *Repeated ANOVA* dilakukan apabila data yang diperoleh memenuhi persyaratan uji parametrik yaitu skala pengukuran variabel harus numerik, distribusi data harus normal, variasi data (kesamaan varians *tidak menjadi syarat* untuk uji kelompok yg berpasangan, kesamaan varians adalah syarat tidak mutlak untuk 2 kelompok tidak berpasangan, artinya varians data boleh sama boleh juga berbeda, kesamaan varians adalah syarat mutlak untuk > 2 kelompok tidak berpasangan artinya varians data harus/wajib sama). Jika persyaratan uji *parametric* tidak terpenuhi, maka dilakukan uji *non parametric*. Pada uji *non parametric* uji *Repeated ANOVA* dapat diganti dengan uji Friedman.

Hasil yang bisa diterima sesuai dengan hipotesis jika $p > 0,05$. Nilai $p > 0,05$ menunjukkan bahwa tidak ada perubahan secara bermakna yang berarti

formula etosom yang terbentuk stabil. Jika nilai $p \leq 0,05$ berarti ada perubahan secara bermakna yang berarti etosom tidak stabil.

4.10 Alur Kerja



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian