BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true eksperimental design*).

4.2. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi 2 kategori, yaitu:

1. Variabel bebas

   Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perbandingan konsentrasi lesitin kedelai dan ekstrak tebu (*Saccharum officinarum*).

2. Variabel tergantung

   Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah ukuran partikel fitosom ekstrak tebu (*Saccharum officinarum*).

4.3. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Oktober tahun 2016 di Laboratorium Simplisia dan Laboratorium Ekstraksi Balai Materia Medika Batu untuk ekstraksi akar dan daun tebu serta uji kandungan sakarin dalam ekstrak tebu. Laboratorium Farmasetika Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pembuatan fitosom. Laboratorium Kimia Analitik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya untuk menganalisa ukuran partikel fitosom. Laboratorium Kimia Universitas Gajah Mada untuk menganalisa morfologi fitosom.

4.4. Bahan dan Alat

4.4.1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah lesitin kedelai (Fisher Scientific), aseton (PT Insoclay), etanol 96% (PT Smartlab), akuades (Hydrobatt) daun, batang bawah dan akar tebu (Perkebunan Tebu Desa Pringgodani, Sidoarjo).

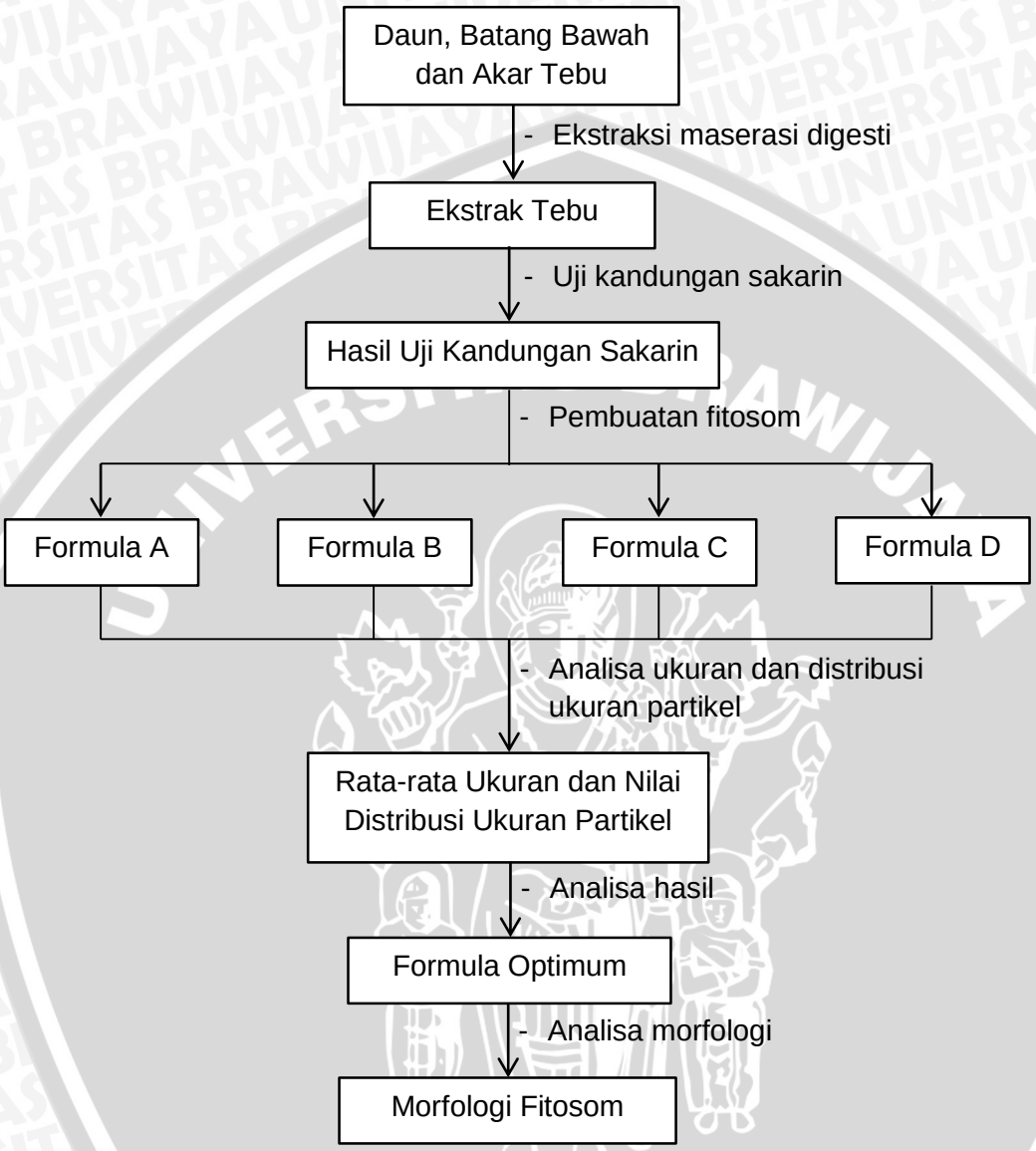
4.4.2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan digital Mettler Toledo, *rotary evaporator* IKA RV 10 Basic, *magnetic stirrer* Arec Velp Scientific, sonikator Sonica, PSA (*Particle Size Analyzer*) Cilas 1090 Liquid, *Transmission Electron Microscopy* (TEM) JEOL JEM 1400 dan peralatan gelas.

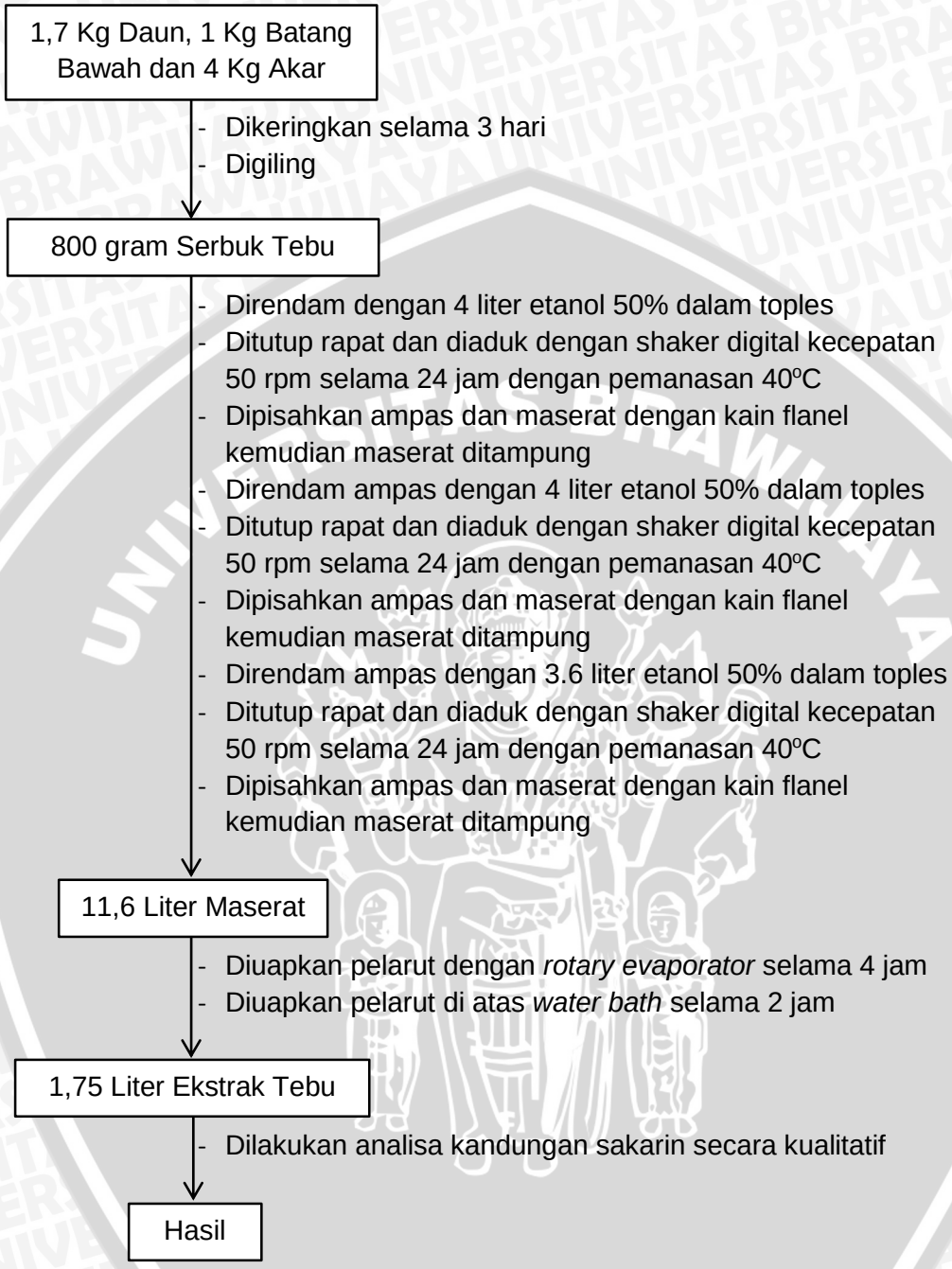
4.5. Definisi Operasional

1. Fitosom adalah istilah yang berarti formulasi yang mengandung konstituen fitokimia dari ekstrak tanaman yang dikelilingi dan terikat oleh lipid yang berbentuk vesikel.
2. Rata-rata ukuran partikel adalah nilai $D_{90\%}$ partikel fitosom ekstrak tebu hasil pemeriksaan PSA.
3. Optimum adalah formula fitosom ekstrak tebu yang memiliki ukuran partikel paling kecil.
4. Nilai distribusi ukuran partikel adalah nilai yang menunjukkan homogenitas distribusi ukuran partikel fitosom.

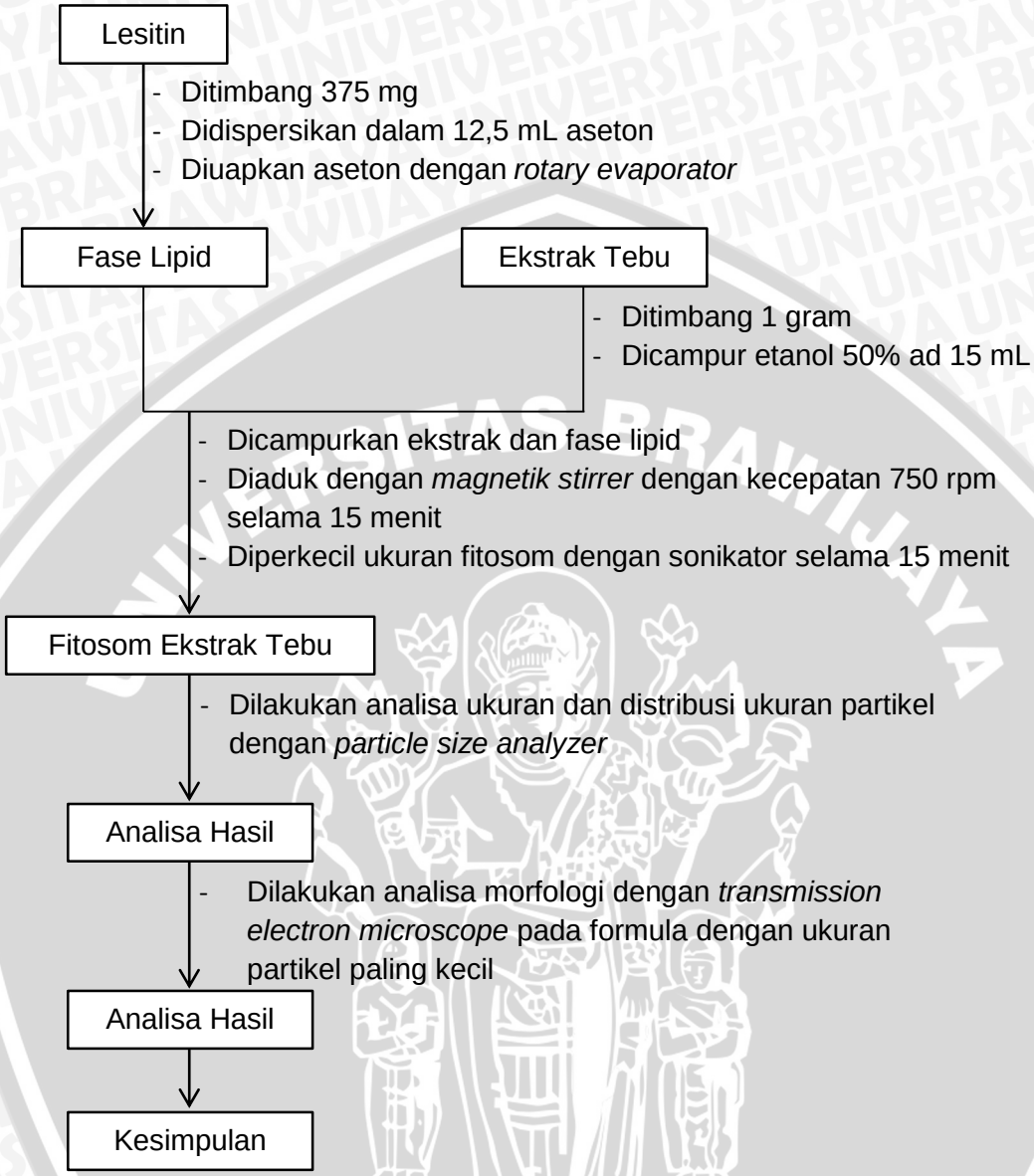
4.6. Skema Kerja



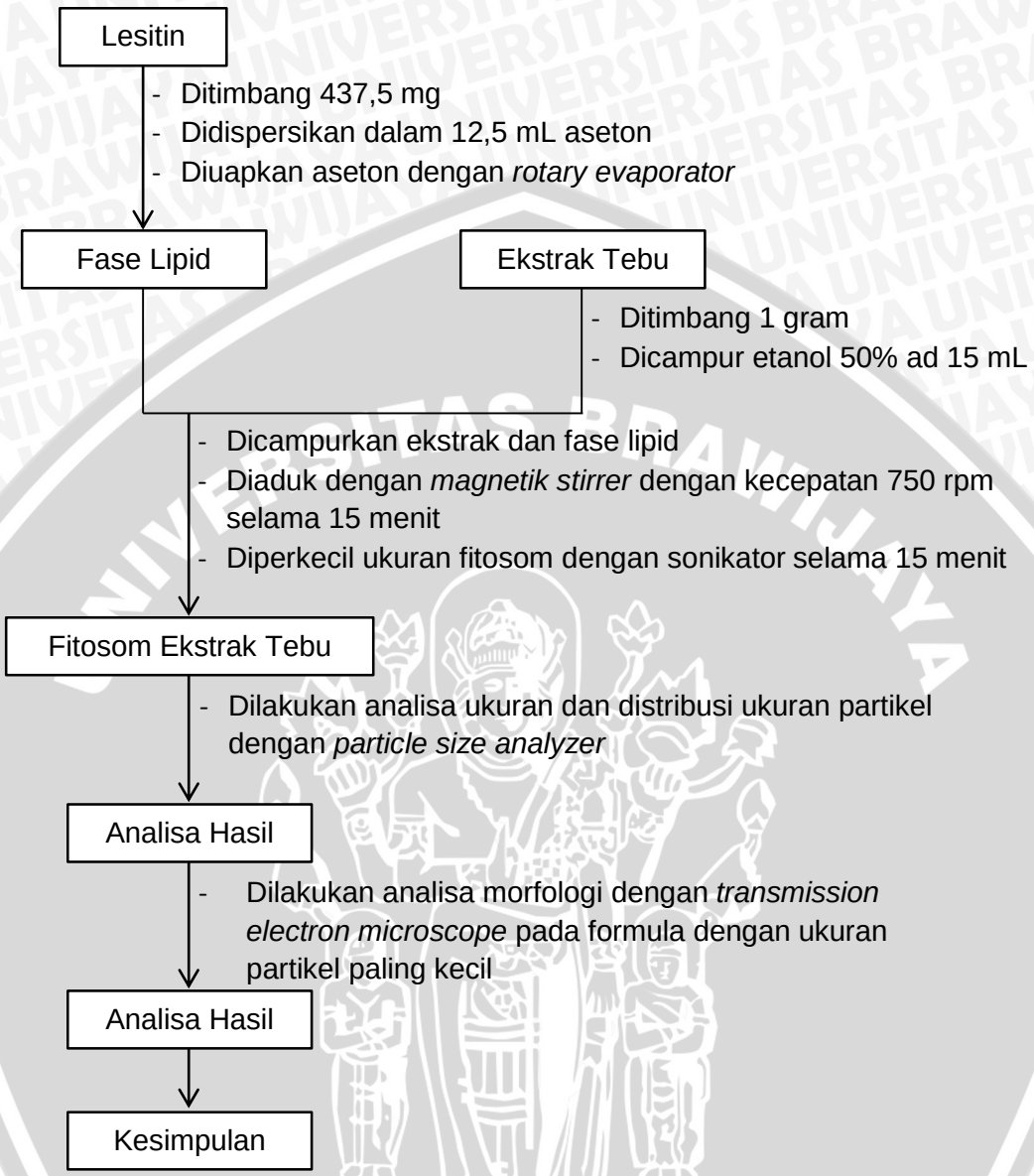
Gambar 4.1 Kerangka alur kerja optimasi formula fitosom ekstrak tebu



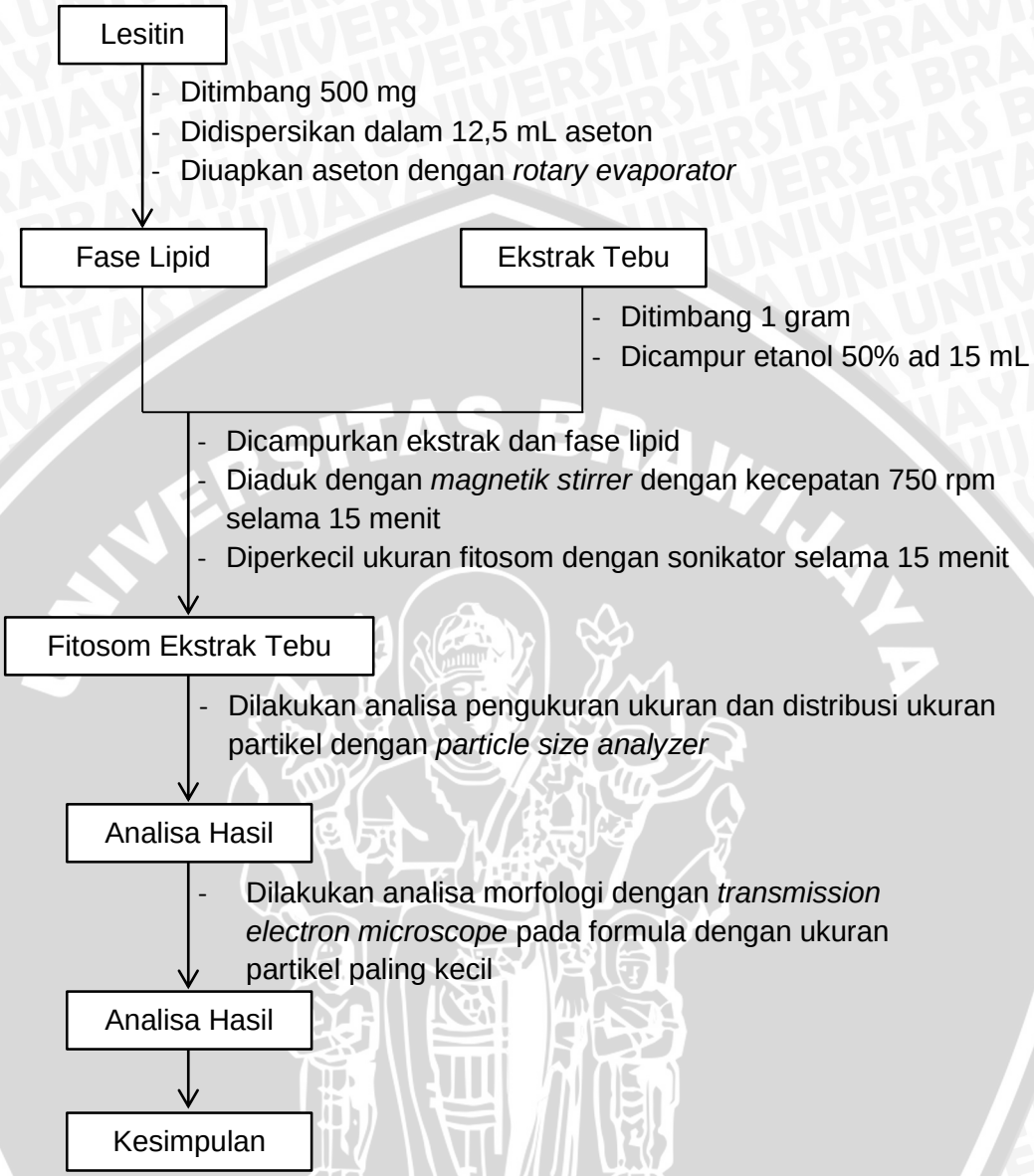
Gambar 4.2 Kerangka alur kerja ekstraksi tanaman tebu



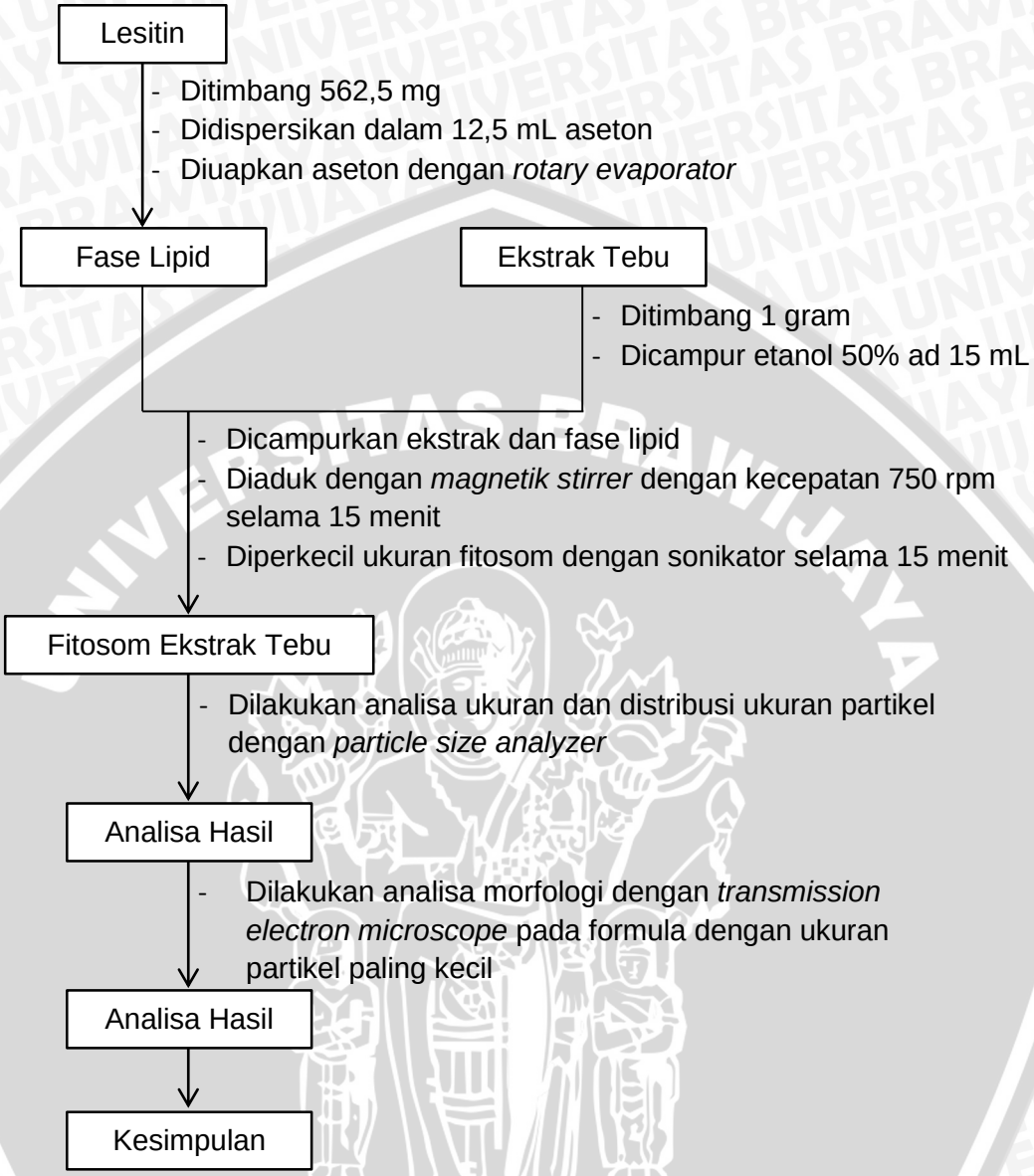
Gambar 4.3 Kerangka alur kerja pembuatan formula A fitosom ekstrak tebu



Gambar 4.4 Kerangka alur kerja pembuatan formula B fitosom ekstrak tebu



Gambar 4.5 Kerangka alur kerja pembuatan formula C fitosom ekstrak tebu



Gambar 4.6 Kerangka alur kerja pembuatan formula D fitosom ekstrak tebu

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Optimasi Formula Fitosom Ekstrak Tebu

Optimasi formula fitosom ekstrak tebu dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Diekstraksi daun, batang bawah dan akar tebu dengan cara maserasi digesti dengan tiga kali pengulangan.
2. Dilakukan uji kandungan sakarin secara kualitatif.
3. Dibuat fitosom ekstrak tebu dengan formula A, B, C dan D.
4. Dilakukan analisa ukuran dan distribusi ukuran partikel dengan *particle size analyzer*.
5. Dilakukan analisis statistik dengan metode *One-Way Anova* sehingga diperoleh formula yang optimum.
6. Dilakukan analisa morfologi formula optimum dengan *transmission electron microscope*.

4.7.2. Pembuatan Ekstrak Tebu dengan Metode Maserasi Digesti

Pembuatan ekstrak tebu dengan metode maserasi dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. 1,7 kg daun, 1 kg batang bawah dan 4 kg akar dikeringkan selama 3 hari dengan panas matahari.
2. Digiling dan didapatkan 800 gram serbuk tebu.
3. Direndam dengan 4 liter etanol 50% dalam toples.
4. Ditutup rapat dan diaduk dengan shaker digital kecepatan 50 rpm selama 24 jam dengan pemanasan 40^{o}C.

5. Dipisahkan ampas dan maserat dengan kain flanel kemudian maserat ditampung.
6. Direndam ampas dengan 4 liter etanol 50% dalam toples.
7. Ditutup rapat dan diaduk dengan shaker digital kecepatan 50 rpm selama 24 jam dengan pemanasan 40^{o}C.
8. Dipisahkan ampas dan maserat dengan kain flanel kemudian maserat ditampung.
9. Direndam ampas dengan 3,6 liter etanol 50% dalam toples.
10. Ditutup rapat dan diaduk dengan shaker digital kecepatan 50 rpm selama 24 jam dengan pemanasan 40^{o}C.
11. Dipisahkan ampas dan maserat dengan kain flanel kemudian maserat ditampung.
12. Ditampung seluruh maserat yang telah dipisahkan dari ampasnya dan didapatkan 11,6 liter maserat.
13. Diuapkan pelarut dengan rotary evaporator selama 4 jam.
14. Diuapkan pelarut di atas water bath selama 2 jam.
15. Dilakukan analisa kandungan sakarin secara kualitatif.

4.7.3. Pembuatan Fitosom Ekstrak Tebu Formula A

Pembuatan fitosom ekstrak tebu formula A dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang lesitin kedelai 375 mg.
2. Didispersikan dalam 12,5 mL aseton.
3. Diuapkan aseton dengan *rotary evaporator*.
4. Ditimbang 1 gram ekstrak tebu.

5. Ditambahkan etanol 50% ad 15 mL.
6. Dicampurkan ekstrak dan fase lipid.
7. Diaduk dengan magnetik stirrer dengan kecepatan 750 rpm selama 15 menit.
8. Diperkecil ukuran fitosom dengan sonikator selama 15 menit.
9. Dilakukan analisa ukuran dan distribusi ukuran partikel dengan *particle size analyzer*.
10. Dilakukan analisis statistik dengan metode *One-Way Anova.*
11. Dilakukan analisa morfologi dengan *transmission electron microscope* pada formula dengan ukuran partikel paling kecil.

4.7.4. Pembuatan Fitosom Ekstrak Tebu Formula B

Pembuatan fitosom ekstrak tebu formula B dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang lesitin kedelai 437,5 mg.
2. Didispersikan dalam 12,5 mL aseton.
3. Diuapkan aseton dengan *rotary evaporator*.
4. Ditimbang 1 gram ekstrak tebu.
5. Ditambahkan etanol 50% ad 15 mL.
6. Dicampurkan ekstrak dan fase lipid.
7. Diaduk dengan magnetik stirrer dengan kecepatan 750 rpm selama 15 menit.
8. Diperkecil ukuran fitosom dengan sonikator selama 15 menit.
9. Dilakukan analisa ukuran dan distribusi ukuran partikel dengan *particle size analyzer*.

10. Dilakukan analisis statistik dengan metode *One-Way Anova*.
11. Dilakukan analisa morfologi dengan *transmission electron microscope* pada formula dengan ukuran partikel paling kecil.

4.7.5. Pembuatan Fitosom Ekstrak Tebu Formula C

Pembuatan fitosom ekstrak tebu formula C dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang lesitin kedelai 500 mg.
2. Didispersikan dalam 12,5 mL aseton.
3. Diuapkan aseton dengan *rotary evaporator*.
4. Ditimbang 1 gram ekstrak tebu.
5. Ditambahkan etanol 50% ad 15 mL.
6. Dicampurkan ekstrak dan fase lipid.
7. Diaduk dengan magnetik stirrer dengan kecepatan 750 rpm selama 15 menit.
8. Diperkecil ukuran fitosom dengan sonikator selama 15 menit.
9. Dilakukan analisa ukuran dan distribusi ukuran partikel dengan *particle size analyzer*.
10. Dilakukan analisis statistik dengan metode *One-Way Anova*.
11. Dilakukan analisa morfologi dengan *transmission electron microscope* pada formula dengan ukuran partikel paling kecil.

4.7.6. Pembuatan Fitosom Ekstrak Tebu Formula D

Pembuatan fitosom ekstrak tebu formula D dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang lesitin kedelai 562,5 mg.
2. Didispersikan dalam 12,5 mL aseton.
3. Diuapkan aseton dengan *rotary evaporator*.
4. Ditimbang 1 gram ekstrak tebu.
5. Ditambahkan etanol 50% ad 15 mL.
6. Dicampurkan ekstrak dan fase lipid.
7. Diaduk dengan magnetik stirrer dengan kecepatan 750 rpm selama 15 menit.
8. Diperkecil ukuran fitosom dengan sonikator selama 15 menit.
9. Dilakukan analisa ukuran dan distribusi ukuran partikel dengan *particle size analyzer*.
10. Dilakukan analisis statistik dengan metode *One-Way Anova*.
11. Dilakukan analisa morfologi dengan *transmission electron microscope* pada formula dengan ukuran partikel paling kecil.

4.8. Rancangan Formula

Pada penelitian ini digunakan 4 kelompok formula yakni formula A, formula B, formula C dan formula D. Formula A adalah fitosom dengan dengan 375 mg lesitin kedelai dan 1000 mg ekstrak tebu, formula B adalah fitosom dengan dengan 437,5 mg lesitin kedelai dan 1000 mg ekstrak tebu, formula C adalah fitosom dengan dengan 500 mg lesitin kedelai dan 1000 mg ekstrak tebu dan formula D adalah fitosom dengan dengan 562,5 mg lesitin kedelai dan 1000 mg ekstrak tebu. Pembuatan fitosom ekstrak tebu pada penelitian ini menggunakan metode dispersi mekanik dan sonikasi. Rancangan komposisi formula untuk penelitian ini ditunjukkan oleh tabel 4.1.

Tabel 4.1 Komposisi formula fitosom ekstrak tebu

Bahan	Fungsi	Formula A (mg)	Formula B (mg)	Formula C (mg)	Formula D (mg)
Ekstrak Tebu	Zat Aktif	1000	1000	1000	1000
Lesitin kedelai	Fase Lipid	375	437,5	500	562,5
Etanol 50%	Pelarut	Ad 15 mL	Ad 15 mL	Ad 15 mL	Ad 15 mL

4.9. Rasionalisasi Formula

- Ekstrak Tebu

Salah satu kandungan tanaman tebu adalah sakarin (Semwal *et al*, 2007; Saravanamuttu and Sudarsanam, 2012). Senyawa sakarin terbukti dapat menyebabkan efek hipoglikemik (Thompson and Mayer, 1959). Selain itu tebu mengandung flavonoid (Singh *et al*, 2014). Senyawa flavonoid dapat menstimulasi penyerapan glukosa pada jaringan perifer, mengatur aktivitas dan ekspresi dari enzim yang membatasi kecepatan metabolisme tubuh serta menstimulasi pelepasan insulin (Carazolli *et al*, 2008).

- Lesitin kedelai

Sebagai fase lipid yang membentuk ikatan molekul dengan ekstrak tebu, sehingga dapat meningkatkan absorbsi ekstrak tebu melalui rute topikal (Jain *et al*, 2010). Tidak terdapat perbedaan signifikan efisiensi penjerapan antara lesitin kuning telur dan kedelai, namun harga lesitin kedelai lebih murah daripada lesitin kuning telur (Budai *et al*, 2013).

- Aseton

Sebagai pelarut lesitin (Tahir, 2014).

- Etanol 50%

Sebagai pelarut untuk hidrasi fitosom (Tahir, 2014).

- Akuades

  Sebagai pelarut (Rowe *et al*, 2009).

4.10. Evaluasi Ekstrak Tebu

4.10.1. Uji Kandungan Sakarin

Tujuan

Mengetahui adanya kandungan sakarin dalam ekstrak tebu secara kualitatif.

Metode

Diambil sebagian ekstrak sejumlah 100 mL dan diasamkan dengan HCl 8 N. Kemudian sampel diekstrak sebanyak 1 kali dengan 25 mL eter. Setelah terjadi pemisahan larutan, eter diuapkan di udara terbuka. Lalu ditambahkan H_2SO_4 36 N 10 tetes dan 40 mg resorsinol. Setelah itu dilakukan pemanasan perlahan dengan api kecil hingga terjadi perubahan warna menjadi warna hijau kotor. Campuran didinginkan serta ditambahkan 10 mL aquades dan larutan NaOH 10% secara berlebih (Anonim, 1994).

Interpretasi Hasil

Jika terbentuk warna hijau *fluorescent*, maka sampel positif mengandung sakarin (Anonim, 1994).

4.11. Evaluasi Fitosom Ekstrak Tebu

4.11.1. Uji Organoleptis

Tujuan

Mengetahui karakteristik organoleptis fitosom antara lain bau, warna dan konsistensi.

Metode

Uji organoleptik dilakukan dengan mencium bau dan melihat warna serta konsistensi fitosom secara langsung (Cardoso *et al*, 2011).

Interpretasi Hasil

Didapatkan fitosom dengan bau khas tebu, berwarna coklat dan berbentuk cair.

4.11.2. Analisa Ukuran dan Distribusi Ukuran Partikel Fitosom

Tujuan

Untuk mengetahui ukuran dan distribusi ukuran partikel fitosom ekstrak tebu.

Metode

Karakterisasi ukuran dan distribusi ukuran partikel dilakukan dengan menggunakan *particle size analyzer* (PSA) (Tahir, 2014).

Interpretasi Hasil

Rata-rata ukuran partikel fitosom ditunjukkan oleh nilai $D_{90\%}$

Nilai distribusi ukuran partikel dihitung dengan rumus

$$Nilai\ distribusi = \frac{D_{90\%} - D_{10\%}}{D_{50\%}} \quad \text{.....(4)}$$

(Horiba, 2016).

Spesifikasi hasil rata-rata ukuran partikel adalah 20-400 µm (Tran *et al*, 2011).

4.11.3. Analisa Morfologi Fitosom

Tujuan

Mengetahui morfologi partikel fitosom ekstrak tebu.

Metode

Morfologi partikel fitosom diamati menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM) (Dwivedi, 2014).

Interpretasi Hasil

Berbentuk sferis dan tidak teragregasi (Tripathy *et al*, 2013; Pandita and Sharma, 2013).

4.12. Spesifikasi Hasil Fitosom Ekstrak Tebu

Spesifikasi fitosom ekstrak tebu ditentukan untuk mengetahui apakah fitosom yang telah dibuat telah mencapai parameter yang telah ditentukan seperti yang tercantum pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Spesifikasi fitosom ekstrak tebu

Evaluasi Fitosom Ekstrak Tebu	Spesifikasi
Organoleptis	bau khas tebu, berwarna coklat dan berbentuk cair.
Rata-rata ukuran partikel fitosom	20-400 µm (Tran *et al*, 2011).
Morfologi	Berbentuk sferis dan tidak teragregasi (Tripathy *et al*, 2013; Pandita and Sharma, 2013).

4.13. Analisa Hasil

4.13.1. Analisa Deskripsi

Analisa organoleptis atau analisa sensorik adalah suatu cara penilaian yang sudah lama digunakan (Umaroh dan Sulistyarsi, 2014). Analisa sensori deskriptif adalah metode analisa dimana atribut sensori suatu produk diidentifikasi dan dideskripsikan oleh peneliti. Analisa deskripsi didasarkan pada kemampuan peneliti dalam mengekspresikan persepsi produk dengan kata-kata (Tabriyani,

2013). Sehingga uji organoleptis pada penelitian ini dianalisa menggunakan analisa deskriptif.

4.13.2. Analisa Statisitik

Analisa data hasil pengukuran rata-rata ukuran partikel yaitu $D_{90\%}$ diolah dengan menggunakan program SPSS 20. Uji statistik yang digunakan antara lain:

- Uji distribusi normal

Uji distribusi normal digunakan untuk mengetahui apakah data yang didapatkan dari hasil penelitian menghasilkan distribusi yang normal. Pengujian normalitas data dapat dilakukan menggunakan *Shapiro Wilk Test*. Jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka data yang didapatkan tidak terdistribusi normal (Field, 2009). Pada penelitian ini nilai α yang digunakan adalah 0,05.

- Uji homogenitas varians

Uji homogenitas varians digunakan untuk mengetahui apakah variasi data antar kelompok sampel memiliki varians yang sama. Uji homogenitas varians data dapat dilakukan dengan menggunakan *Levene's Test*. Jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka variasi data antar kelompok tidak sama (Field, 2009). Pada penelitian ini nilai α yang digunakan adalah 0,05.

- Uji *One Way Anova*

ANOVA adalah metode statistik yang digunakan untuk membandingkan rata-rata data pada lebih dari 2 kelompok. Uji ANOVA dapat dilakukan dengan syarat variabel tergantung dari kelompok yang diuji adalah numerik, data terdistribusi normal dan variasi antar kelompok sama. Uji *one way anova* adalah uji untuk mengetahui perbedaan rata-rata variabel tergantung antar kelompok yang disebabkan satu variabel bebas (Gaur and Gaur, 2009). Jika nilai F_{hitung} sama

atau lebih besar dari pada F_{tabel} pada nilai α yang ditentukan maka terdapat sedikitnya 1 kelompok yang berbeda dari kelompok lainnya. Jika salah satu syarat untuk melakukan uji ANOVA tidak dapat terpenuhi maka dapat dilakukan uji *Kruskal-Wallis Test* (Bolton and Bon, 2010). Jika nilai signifikansi dari hasil uji ANOVA kurang dari 0,05 maka rata-rata antar kelompok berbeda secara signifikan (Field, 2009). Pada penelitian ini nilai α yang digunakan adalah 0,05.

- *Tukey's Multiple Range Test*

Nilai F dan signifikansi pada uji ANOVA hanya menunjukkan adanya satu kelompok yang berbeda dibandingkan dengan kelompok lainnya. Sehingga perlu dilakukan uji *Post-Hoc* untuk mengetahui nilai perbedaan rata-rata antar kelompok (Gaur and Gaur, 2009). Salah satu uji *Post-Hoc* yang dapat dilakukan adalah uji *Tukey's Multiple Range Test* yang membandingkan nilai rata-rata antar kelompok dengan mempertahankan nilai α yang telah ditentukan (Bolton and Bon, 2010). Jika nilai signifikansi dari hasil uji *Post-Hoc* kurang dari 0,05 maka rata-rata antar kelompok yang dibandingkan berbeda (Field, 2009). Pada penelitian ini nilai α yang digunakan adalah 0,05.