

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah bagian yang memuat semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah formulasi nanosuspensi ekstrak biji kelor dengan menggunakan variasi jenis penstabil.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam analisis. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah formulasi nanosuspensi ekstrak biji kelor dengan variasi jenis penstabil yaitu *Poloxamer 188*, *Poloxamer 407* dan *Sodium Lauryl Sulfat (SLS)*.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung. Variabel dalam penelitian ini adalah formula nanosuspensi ekstrak biji kelor yang dibuat dengan variasi jenis penstabil serta pengujian nanosuspensi ekstrak biji kelor meliputi ukuran partikel, zeta potensial, stabilitas sediaan, dan aktivitas antioksidan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan dalam berbagai variabel, antara lain: variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi jenis penstabil.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara cepat. Variabel terkontrol adalah proses pembuatan ekstrak dan nanosuspensi yang terkontrol dengan metode nanopresipitasi, kontrol yang dilakukan diantaranya suhu, lama pembuatan, rpm, *pulse*, serta waktu *on off* alat.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini meliputi ukuran partikel, zeta potensial, uji pH, viskositas, stabilitas sediaan, dan aktivitas antioksidan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama biji kelor (*Moringa oleifera*) adalah biji yang diambil setelah biji jatuh dari pohonnya dengan kondisi biji yang bersih, dan kering yang diperoleh dari Mojokerto, Jawa Timur.

Kedua serbuk biji kelor adalah serbuk dari biji kelor yang telah dipilih kemudian dicuci bersih dan dilakukan pengeringan menggunakan oven suhu 40°C–50°C dibuat dalam bentuk serbuk dengan cara digiling, diayak dengan menggunakan ayakan 40 mesh.

Ketiga ekstrak biji kelor adalah ekstrak yang dibuat dengan metode soxhletasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40°C–50°C.

Keempat, formulasi nanosuspensi meliputi tiga formula yaitu ekstrak biji kelor (100mg) dengan formulasi Poloxamer 188 1%, formula 2 berisi Poloxamer 407 1%, formula 3 kombinasi SLS 0,5% : Poloxamer 188 0,5%, formula 4 kombinasi SLS 0,5% : Poloxamer 407 0,5%, formula 5 kombinasi SLS 0,5% : Tween 0,5%, formula 6 berisi Tween 80 1%.

Kelima, uji antioksidan pada nanosuspensi menggunakan DPPH menentukan jumlah zat aktif dapat memberikan aktivitas antioksidan dan menunjukkan stabilitas dalam sistem nanosuspensi.

Keenam, uji stabilitas pada nanosuspensi dengan uji stabilitas dipercepat untuk mengetahui formula yang paling stabil.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah rotari evaporator, alat-alat gelas (Pyrex, Jepang), alat-alat non gelas, Moisture Balance Ohaus (Amerika), Timbangan analitik Ohaus PA213 dan Spektrofotometri UV-Vis Shimadzu 1800

(Tokyo, Jepang), pH meter (Singapura), Viskometer Oswald (Pyrex), Magnetic Stirrer (Inggris), dan alat-alat non gelas lainnya.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Biji Kelor yang diperoleh dari Mojokerto-Jawa Timur, Poloxamer 188 (Merck), Poloxamer 407 (Merck), SLS (Merck), Tween 80 (Merck), Etanol, DPPH, dan aquadestilata.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi

Sebelum dilakukan penelitian ini, harus memastikan kebenaran biji kelor (*Moringa oleifera*) dengan cara determinasi. Determinasi biji kelor dilakukan di UPT Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pembuatan simplisia

Digunakan biji kelor yang dipilih dalam keadaan segar, bersih, dan bebas dari pengotor. Biji kelor yang telah dipilih kemudian dicuci menggunakan air hingga bersih. Kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven suhu 40°C – 50°C sampai kering. Biji kelor yang sudah kering dibuat dalam bentuk serbuk dengan cara digiling, kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 40, diukur kelembapan dengan alat *moisture balance* (Puspitasari, 2016).

3. Penetapan kelembapan serbuk biji kelor

Penetapan kelembapan serbuk biji kelor dilakukan menggunakan alat *moisture balance*, setelah alat dinyalakan atur suhu menjadi 105°C. Kemudian serbuk biji kelor ditimbang sebanyak 2 gram pada alat *moisture balance*. Tutup rapat alat dan tunggu hingga diperoleh kadar kelembapan serbuk biji kelor yang konstan dengan replikasi sebanyak 3 kali (Depkes 2000). Prinsip kerja alat yaitu dilakukan pemanasan terhadap serbuk sampai bobot konstan yang dinyatakan dalam persen. Kandungan kadar lembab yang berada dalam serbuk diuji untuk memberikan batasan maksimum (rentang) besarnya kandungan air dalam serbuk.

4. Pembuatan ekstrak biji kelor

Metode soxhletasi pembuatan ekstrak biji kelor menggunakan 800 g serbuk biji kelor. Penelitian ini menggunakan pelarut etanol 70%. Pembuatan ekstrak biji kelor dengan metode soxhletasi dilakukan dengan cara menimbang 50 g serbuk

kering simplisia dalam satu kali proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan dalam satu kali proses ekstraksi sebanyak 1,5 sirkulasi. Sekali proses ekstraksi diperlukan hingga 8 kali sirkulasi hingga pelarut dalam timbal jernih kembali. Hasil filtrat dikumpulkan, lalu diuapkan dengan vakum atau rotaapor hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen yang diperoleh dihitung dengan persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan (Kemenkes RI 2017).

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

5. Penetapan kadar air ekstrak biji kelor

Penetapan kadar air ekstrak biji kelor dilakukan dengan metode gravimetri. Sebanyak kurang lebih 1 gram ekstrak ditimbang seksama dalam wadah yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2000).

6. Identifikasi senyawa ekstrak biji kelor

6.1 Flavonoid. Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Harborne 1996).

6.2 Tanin. Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan 10 tetes FeCl₃ 1%. Ekstrak positif mengandung fenol apabila menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat (Harborne 1996).

6.3 Alkaloid. Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan 2 mL kloroform dan 2 mL ammonia lalu disaring. Filtrat ditambahkan 3 sampai 5 tetes H₂SO₄ pekat lalu dikocok hingga terbentuk dua lapisan. Fraksi asam diambil, kemudian ditambahkan pereaksi Mayer dan Dragendorff masing-masing 4-5 tetes. Apabila terbentuk endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid, dengan pereaksi Mayer memberikan endapan berwarna putih, dan pereaksi Dragendorff memberikan endapan berwarna kuning-merah (Harborne 1996)

6.4 Saponin. Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan 10 mL air sambil dikocok selama 1 menit, lalu ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Bila busa yang terbentuk tetap stabil \pm 7 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin (Harborne 1996).

6.5 Steroid/ Triterpenoid. Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan CH₃COOH glasial sebanyak 10 tetes dan 2 tetes H₂SO₄. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Steroid memberikan warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Harborne 1996).

7. Pengujian pendahuluan basis formula nanosuspensi

Tujuan pengujian pendahuluan yaitu untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada bahan penstabil yang digunakan dalam formula. Percobaan pendahuluan yang dilakukan adalah *screening* kadar antioksidan pada semua basis yang digunakan pada formula (Poloxamer 188, Poloxamer 407, SLS, dan Tween 80) masing-masing 1% tiap 10 ml pelarut etanol. Tiap formula diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan diinkubasi selama 30 menit sebelum dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm.

8. Pembuatan nanosuspensi dengan metode nanopresipitasi-sonikasi

Ditimbang sebanyak 100 mg ekstrak biji kelor kemudian dilarutkan kedalam 20 ml etanol dengan bantuan magnetic stirrer untuk membuat fase organik. Penstabil dilarutkan dalam aquades dengan bantuan magnetic stirrer sebagai fase air. Fase organik ditambahkan kedalam fase air dengan bantuan magnetic stirrer sampai terbentuk dispersi koloidal.

Tabel 1. Tabel formula nanosuspensi ekstrak biji kelor (*Moringa oleifera* L)

Bahan	Formula					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Ekstrak biji kelor (mg)	100	100	100	100	100	100
Etanol (ml)	20	20	20	20	20	20
Poloxamer 188 (mg)	100	-	50	-	-	-
Poloxamer 407 (mg)	-	100	-	50	-	-
SLS (mg)	-	-	50	50	50	-
Tween 80 (ml)	-	-	-	-	0,1	0,2
Aquades (ml)	10	10	10	10	10	10

Formula 1 menggunakan penstabil Poloxamer 188 dengan konsentrasi 1%, formula 2 menggunakan penstabil Poloxamer 407 dengan konsentrasi 1%, formula 3 menggunakan penstabil kombinasi antara SLS : Poloxamer 188 dengan konsentrasi 0,5% : 0,5%, formula 4 menggunakan penstabil kombinasi antara SLS : Poloxamer 407 dengan konsentrasi 0,5% : 0,5%, formula 5 menggunakan penstabil kombinasi antara SLS : Tween dengan konsentrasi 0,5 : 0,5%, dan formula 6 menggunakan penstabil Tween 80 dengan konsentrasi 1%..

9. Karakterisasi nanosuspensi

9.1 Ukuran partikel. Diukur diameter partikel yang terdispersi sebanyak 3 ml sediaan nanosuspensi dari masing-masing formulasi menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) (Bhatia, 2016).

9.2 Zeta potensial. Diukur nilai zeta potensialnya dengan diambil 3 ml sediaan nanosuspensi menggunakan *Particle size analyzer* (PSA) (Bhatia2016).

9.3 Uji pH. Alat uji pH meter dikalibrasikan terlebih dahulu kedalam pH 7 dan 4. Kemudian elektroda dari pH meter dicelupkan kedalam sampel, tunggu hingga pH konstan (Aremu dan Oduyela, 2015).

9.4 Uji Viskositas. Uji viskositas menggunakan viskometer Ostwald. Sampel dimasukkan kedalam viskometer yang lebih besar hingga setara atau seimbang. Hisap sampel melalui viscometer yang lebih kecil sampai tanda batas atas, kemudian lepaskan pipet dan catat waktu yang diperlukan hingga sampel melewati batas bawah.

9.5 Uji stabilitas penyimpanan. Sediaan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam kemudian disimpan pada suhu 40°C selama 24 jam. Dilakukan pembacaan ukuran partikel setelah berlangsung 6 siklus, indeks polidispersitas, dan nilai zeta potensial.

10. Uji aktivitas antioksidan

Sebanyak 100 mg ekstrak biji kelor dilarutkan dalam etanol dalam labu ukur 100 ml hingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm sebagai larutan induk. Kemudian dibuat dalam berbagai konsentrasi (40, 60, 80; 100; 150; dan 300 ppm), selanjutnya ditambahkan 1 ml DPPH dalam tabung reaksi dan kemudian

dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan di tambah etanol sampai tanda batas. Kemudian, diinkubasi sesuai waktu operating time. Serapan diukur pada panjang gelombang yang akan ditentukan. Selanjutnya dihitung hasil absorbansi untuk mendapatkan % inhibisi, dengan perhitungan:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansiDPPH} - \text{absorbansisampel}}{\text{absorbansiDPPH}} \times 100$$

Keterangan: % inhibisi : besarnya hambatan serapan

Abs DPPH : absorbansi blanko DPPH

Abs sampel : absorbansi sampel dengan penambahan DPPH

10.1 Penentuan panjang gelombang maksimum. Untuk uji aktivitas antioksidan sampel dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH. Larutan DPPH yang digunakan dibuat dalam pelarut etanol yang dibuat dengan menimbang 15,8 mg serbuk DPPH dimasukkan kedalam labu takar 100 ml kemudian ditambahkan etanol sampai tanda batas sehingga didapat larutan DPPH 0,4 mM. Larutan ini ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 480-600 nm.

10.2 Pengukuran serapan sampel nanosuspensi.

10.2.1 Pengukuran serapan nanosuspensi tanpa ekstrak.

Mengambil formulasi tanpa ekstrak sebanyak 1 ml kedalam tabung reaksi 5 ml kemudian ditambahkan 1 ml DPPH dan ditambahkan etanol sampai tanda batas, dikocok hingga homogen. Kemudian dilakukan inkubasi sesuai waktu operating time sebelum dibaca serapannya.

10.2.2 Pengukuran serapan nanosuspensi ekstrak biji kelor.

Sebanyak 3 formula berkonsentrasi 500 ppm dan dimasukkan kedalam labu takar 50 ml ditambah pelarut etanol proanalisis ad tanda batas. Sediaan nanosuspensi masing-masing dibuat seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 dan 250 ppm dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml kemudian ditambahkan pelarut etanol proanalisis ad tanda batas. Masing-masing dipipet dengan urutan konsentrasi 20 ppm sebanyak 0,4 ml; 40 ppm sebanyak 0,8 ml; 60 ppm sebanyak 1,2 ml; 80 ppm sebanyak 1,6 ml; 100 ppm sebanyak 2 ml; dan 250 ppm sebanyak 5 ml dan kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml kemudian ditambahkan pelarut

etanol proanalisis ad tanda batas. Kemudian diambil 1 ml larutan seri konsentrasi ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml DPPH kemudian ditambahkan etanol sampai tanda batas, dikocok hingga homogen kemudian diinkubasi sesuai waktu operating time sebelum dibaca serapannya.

E. Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan untuk mengetahui terjadinya kesalahan dalam penelitian, penyimpangan dari aturan baku yang sudah ditentukan. Analisis hasil suatu pengujian yang mengacu pada parameter dapat dilakukan dengan cara melihat kesesuaian dengan persyaratan baku yang telah menjadi ketentuan dari sediaan nanosuspensi, seperti mengacu hasil penelitian dengan referensi secara teori yang ada. Hasil penelitian dibandingkan dengan referensi teori untuk menghindari kesalahan dalam penelitian.