

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen dengan desain penelitian. Desain penelitian dibuat dari peneliti untuk menjawab pertanyaan penelitian. Desain penelitian eksperimen merupakan penelitian pra-eksperimental (*pre-experimental design*), atau bisa disebut dengan desain penelitian yang umum tetapi tidak menggunakan kelompok kontrol (Creshwell, 2003).

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat mempengaruhi atau variabel yang menjadi sebab timbulnya variabel terikat. Pada penelitian ini variabel bebas daun Cep-cepan yang digunakan sebagai sediaan SNEDDS.

3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yaitu variabel yang menjadi akibat dari adanya pengaruh variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu uji karakteristik, uji stabilitas sediaan SNEDDS. Serta uji karbohidrat dan uji lemak sediaan tofu, dimana pengujian ini sebagai akibat dari sediaan SNEDDS dan tofu ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*).

3.2.3 Definisi Operasional Variabel

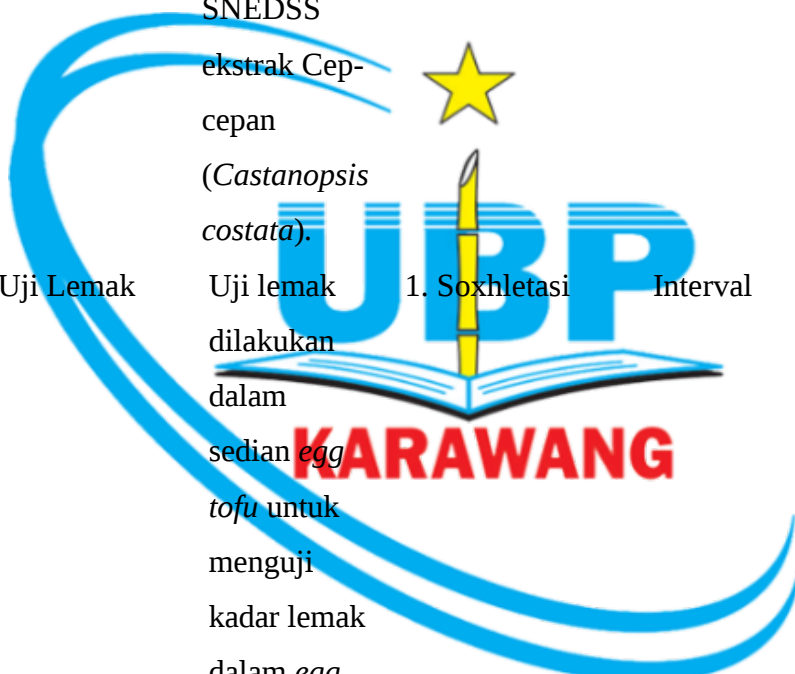
Seperangkat petunjuk yang lengkap tentang apa yang harus diamati dan mengukur suatu variabel atau konsep seperti yang ditunjukkan pada **tabel 3.1** tabel definisi operasional variabel sebagai berikut:

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1	Tanaman Cep-cepan (<i>Castanopsis</i> <i>costata</i>) yang digunakan sebagai sediaan SNEDDS	Tanaman Cep-cepan (<i>Castanopsis</i> <i>costata</i>) diambil ekstrak kentalnya untuk zat aktif sediaan SNEDDS.	Pengujiannya meliputi pengujian maserasi tanaman, serta pengambilan ekstrak etanol 96% menggunakan rotary evaporator.	-	-
Variabel Terikat					
1	Uji Karakteristik	Uji karakteristik dilakukan untuk menguji suatu sediaan SNEDDS yang baik.	1. SEM (<i>Scanning</i> <i>Electron</i> <i>Microscope</i>) 2. PSA (<i>Partikel</i> <i>Size</i> <i>Analyzer</i>)	Rasio	1. Hasil Tinggi 2. 3. Hasil Rendah
2	Uji Stabilitas	Uji stabilitas dilakukan untuk menguji tingkat kestabilan suatu sediaan SNEDDS yang baik.	1. Sentrifugasi 2. Oven 3. Freezer 4. PSA (<i>Partikel</i> <i>Size</i> <i>Analyzer</i>) 5. Viskometer 6. pH Meter	Rasio	1. Hasil Tinggi 2. Hasil Rendah

7. Termometer

3	Uji Karbohidrat	Untuk menguji karbohidrat dalam sediaan <i>egg tofu</i> yang mengandung sediaan SNEDSS ekstrak Cep- cepan (<i>Castanopsis costata</i>).	1. Titrasi	Interval	1. Nilai berturut-turut
4.	Uji Lemak	Uji lemak dilakukan dalam sediaan <i>egg tofu</i> untuk menguji kadar lemak dalam <i>egg tofu</i> yang mengandung sediaan SNEDSS ekstrak daun Cep- cepan (<i>Castanopsis costata</i>).	1. Soxhletasi	Interval	1. Nilai berturut-turut



3.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) yang diperoleh dari Hutan Tangkahan taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara yang banyak dihuni oleh suku Karo. Daun Cep-cep (*Castanopsis costata*) ini dibuat menjadi ekstrak etanol daun Cep-cep (*Castanopsis costata*). Bahan lain yang digunakan asam oleat, span 20, PEG 400, aqua de ion, warter for injection, methanol, aquadest, kacang kedelai, telur ayam negri, tepung maizena, Le Mineral, Garam, *egg tofu*, pereaksi petroleum eter (PE), sirup, larutan luff-schoorl, KI 20%, H_2SO_4 26,5%, indikator amilum, Na-tiosulfat dan aquadest.

3.4 Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan adalah maserator, rotatory evaporator (Eyela OSB-2100), vakum pump elektrik, water bath (CECIL), neraca analitik (SHIMADZU), gelas ukur (PYREX), gelas kimia (PYREX), labu ukur (PYREX), pipet tetes, water bath (CECIL), tabung reaksi (PYREX), cawan porselin, vial, Spektrofotometer UV-Vis (THERMO SCIENTIFIC), Cuvet (QUARTZ), sentrifugasi (GEMMYCO), blender (TUC TAC), kompor portable (OMICKO), Kukusan (TUPPERWARE), balloon wihsk (JIB SILICONE), saringan (Viento), spatula (TUPPERWARE), panci (GM BEAR), plastik 6x20 cm (TOMAT), karet gelang (OMIGO), magnetic stirrer (SPINBAR MIXER PTFE WHITE), rak tabung reaksi, pH meter (NEOMET), oven (OXONE), Kulkas (SANKEN), Freezer (SHARP), thermometer, mikro pipet (LICHEN), tip biru, viskometer (LAMY RHEOLOGI INSTRUMEN), temperator (HTC-2 DIGITAL HYGROMETER) blue tip (ONEMED).

3.5 Lokasi Penelitian

Penelitian ini di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Instrumen, Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini dilakukan selama Agustus-Desember 2022. Serta tanaman yang digunakan ini di determinasi terlebih dahulu untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang digunakan. Determinasi ini dilakukan di Herbarium Fakultas Mipa, Universitas Padjajaran, Jatinangor. Pengujian ukuran partikel

dilakukan di PT. DKSH Indonesia Jakarta Selatan dan Pengujian SEM di PT. Cipta Mikro Material, Bogor Jawa Barat.

3.6 Prosedur Percobaan

3.6.1 Formulasi SNEDDS

Formulasi SNEDDS terdiri dari minyak (asam oleat), surfaktan (span 20) dan kosurfaktan (PEG 400) dengan penambahan ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) sebanyak 50 mg.

3.6.2 Pemilihan Formulasi SNEDDS

Tujuan dari pemilihan formulasi SNEDDS untuk mencari sediaan SNEDDS yang baik kelarutannya. Metodenya SNEDDS dicampurkan dengan 50 mg ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) lalu dicampurkan dengan minyak (asam oleat), surfaktan (span 20) dan kosurfaktan (PEG 400). Selanjutnya, sediaan tadi di vortex selama 2 menit, di, sonifikasi selama 10 menit, di waterbath dengan suhu 45 °C dan di magnetic stirrer selama 5 menit, ulangi perlakuan selama 2 kali. Hasil dari SNEDDS yang baik yaitu campurannya homogen dan larut dengan baik. Dalam penelitian ini digunakan ekstrak sebanyak 50 mg dilihat dari *solid dispersion technique* yang digunakan pada dosis ekstrak sediaan SNEDDS sebanyak 50 mg (Indratmoko *et al.*, 2021).

Pada pemilihan formulasi SNEDDS ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) metode diagram terner yang digunakan untuk mengetahui perubahan kesetimbangan dari fase campuran serta pengidentifikasian daerah mikroemulsi ataupun nanoemulsi campuran minyak, surfaktan dan kosurfaktan yang bisa dimanfaatkan untuk mengetahui formulasi optimal yang mempunyai karakteristik baik dan pengembangan sistem penghantaran obat yang baik (Syed and Peh, 2014).

Tabel 3.2 Formulasi Sediaan SNEDDS

Bahan	Ekstrak	Formulasi %	Kegunaan
-------	---------	-------------	----------

	Cep- cepan	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	
Minyak (Asam Oleat)	50 mg	<u>14</u>	14	13	15	12	10	10	15	Pembawa zat aktif (Indratmoko, 2021).
Surfaktan (Span 20)		<u>62</u>	62	63	60	61	64	63	62	Sebagai polimer (Indratmoko, 2021).
Ko- Surfaktan (Peg 400)		<u>24</u>	24	24	25	27	26	27	23	Sebagai polimer (Indratmoko, 2021).

3.7 Uji Fisika SNEDDS

3.7.1 Penentuan Nilai Transmittan

Pengujian nilai % transmittan digunakan untuk menguji kejernihan suatu sediaan SNEDDS. SNEDDS diencerkan dengan 100 mL aqua de ion dengan 100 μ l SNEDDS lalu digunakan aqua de ion untuk blangko dengan menggunakan spektrovotometri UV-Vis dengan Panjang gelombang 650 nm. Untuk hasil nilai transmittan yang baik harus mendekati 100% (Huda dan Wahyuningsih, 2018).

3.7.2 Uji Ukuran Partikel

Pengujian ukuran partikel bertujuan untuk mengetahui kadar partikel dalam suatu sediaan. Uji ukuran partikel dilakukan dengan menggunakan alat Particle Size Analyzer (PSA) dengan mengencerkan 100 μ l SNEDDS dengan 100 mL aquadest dan dimasukkan dalam kuvet, lalu untuk hasil yang baik ada pada kisaran 20-200 nm (Handayani *et al.*, 2018).

3.7.3 Uji Viskositas

Pengujian viskositas dilakukan untuk melihat kekentalan sediaan SNEDDS. Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan viscometer dengan spindle

64 dengan memasukkan 50 mL sediaan SNEDDS dalam beaker glass. Hasil dari uji viskositas yang baik yaitu sekitar 30-40 cP (Husni *et al.*, 2019).

3.7.4 Uji pH

Uji pH dilakukan untuk melihat kadar pH dalam suatu sediaan memenuhi persyaratan parameter pH. Dengan menggunakan pH meter, pH masing-masing formula diukur dengan 10 mL sediaan SNEDDS dimasukkan kedalam beaker glass dan pH meter menampilkan hasil (Husni *et al.*, 2019). Hasil yang baik untuk pH sediaan SNEDDS yaitu sekitar 1,4-7,0 (Putri *et al.*, 2021)

3.8 Uji Stabilitas

3.8.1 Uji Sentrifugasi

Uji sentrifugasi dilakukan untuk menguji kestabilan pada sediaan SNEDDS dan efek guncangan pada suatu sediaan. Pengujian sentrifugasi dilakukan dengan menggunakan sediaan SNEDDS 100 μ L dengan aqua de ion sebanyak 100 mL dan dimasukkan kedalam sentrifugator pada kecepatan 3500 ppm selama 30 menit. Uji sentrifugasi dilakukan untuk menguji kestabilan pada sediaan SNEDDS dan efek guncangan pada suatu sediaan. Untuk hasil dari uji sentrifugasi yang baik yaitu sediaan tidak memisah (Alisa, 2017).

3.8.2 Uji Heating Colling Cycle

Pengujian siklus *Heating colling cycle* atau uji siklus panas-dingin dilakukan untuk menguji seberapa stabil sediaan SNEDDS jika dalam keadaan panas ataupun dingin. Pengujian *Heating colling cycle* dilakukan yaitu dengan memasukkan SNEDDS 5 mL kedalam tabung vial dalam kulkas dengan suhu 4°C, lalu dimasukkan dalam suhu 40°C dalam oven dengan penyimpanan tidak kurang dari 48 jam yang dilakukan sebanyak 6 siklus, lalu di sentrifugasi dalam 3500 rpm selama 30 menit dan amati fase yang terjadi. Hasil dari uji *Heating colling cycle* yang baik yaitu dengan dilihatnya sediaan tetap stabil dan tidak terjadi pemisahan (Alisa, 2017).

3.8.3 Uji *Freeze Thaw Cycle*

Formulasi yang stabil pada siklus *Heating colling cycle* selanjutnya dilakukan dengan menguji *Freeze thaw cycle*, uji *Freeze thaw cycle* tujuannya seperti *Heating colling cycle* yaitu untuk menjaga kestabilan suatu sediaan SNEDDS. Metode percobaannya yaitu SNEDDS sebanyak 5 mL disimpan pada suhu -21°C dan 25°C dengan bergantian, lakukan penyimpanan tidak kurang dari 48 jam dan lakukan sebanyak 6 siklus. Selanjutnya sentrifugasi pada 3500 rpm selama 30 menit lalu amati fase yang terjadi, untuk hasil terbaik dilihat apakah ada pemisahan pada sediaan atau tidak (Alisa, 2017).

3.8.4 Uji Ketahanan

Dari hasil formulasi uji *freeze thaw cycle* yang stabil, lalu dilakukan uji ketahanan. Uji ketahanan dilakukan untuk menguji kembali sediaan dari awal untuk mengetahui apakah kestabilannya tetap atau menurun, pengujian dilakukan dengan melakukan pelarutan sediaan SNEDDS sebanyak 100 μL dengan aqua de ion sebanyak 100 mL lalu di evaluasi nilai % transmittan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan ukuran partikel menggunakan *Particle Size Analyzer*. Untuk hasil yang baik didapatkan tidak jauh berbeda dari hasil yang sebelumnya pada pengujian pertama dilakukan (Alisa, 2017).

3.8.5 Uji Penyimpanan Dipercepat

Dari hasil formulasi uji ketahanan yang stabil, selanjutnya dilakukan uji penyimpanan dipercepat selama 1 bulan. Uji penyimpanan dipercepat dilakukan untuk mengetahui stabil atau tidaknya sediaan dengan didiamkan dengan penyimpanan $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$, sediaan SNEDDS lalu dimasukkan dalam climatic chamber sebanyak 5 mL sediaan dalam vial, lalu lakukan uji, viskositas, % transmittan dan ukuran partikel pada hari ke 0, 7, 14, 21, dan 28 dalam SNEDDS ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) sebanyak 100 μ dengan 100 mL SNEDDS, pada uji ini hasil yang baik didapat jika sediaan masih sama dan tidak jauh berbeda turun ataupun naiknya dari uji sebelum pengujian stabilitas dilakukan (Alisa, 2017).

3.9 Karakterisasi SNEDDS

Karakterisasi yang dilakukan pada penelitian ini terbagi menjadi 2 bagian diantaranya terdiri dari SEM (*Scanning Electron Microscopy*) dan PSA (*Partikel Size Analyzer*):

3.9.1 *Scanning Electron Microscopy* (SEM)

Uji SEM dilakukan untuk mengetahui struktur mikro maupun morfologi suatu sediaan skala mikro atau nano dengan menggunakan mikroskop electron, pengujian dilakukan dengan sampel difiksasi pada aluminium oleh cakram lengket dengan dua sisi karbon konduktif, lalu dilapisi dengan lapisan tipis lapisan emas pallidum. Selanjutnya, berkas electron dipindai diatas specimen untuk menghasilkan gambar dari formulasi SNEDDS. (Teaima *et al.*, 2022).

3.9.2 *Particle Size Analyzer* (PSA)

Uji karakterisasi menggunakan PSA (*Partikel Size Analyzer*) untuk mengetahui berapa ukuran partikel banyak digunakan untuk menguji sampel-sampel dalam ukuran nanometer dan submicron ukuran partikel yang terbaca adalah ukuran dari partikel tunggal (*single particle*). Hasil pengujian PSA (*Partikel Size Analyzer*) yang baik akan didapat sesuai dengan kebutuhan sediaan yang dilakukan pengujian karakterisasi menggunakan PSA (*Partikel Size Analyzer*) (Hoten *et al.*, 2020). Pengujian dilakukan dengan mengencerkan 100µl SNEDDS dengan 100 mL aquadest dan dimasukkan dalam kuvet, lalu untuk hasil yang baik ada pada kisaran 20-200 nm (Handayani *et al.*, 2018).

3.10 Prosedur Percobaan

3.10.1 Formulasi *Egg Tofu*

Formulasi *egg tofu* terdiri dari susu kedelai, meizena, telur ayam, garam, air mineral dan sediaan SNEDDS yang mengandung ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) sebanyak 50 mg.

3.10.2 Pemilihan Formulasi *Egg Tofu*

Tujuan dari pemilihan formulasi *egg tofu* untuk mencari sediaan *egg tofu* yang baik jika dikombinasikan dengan sediaan SNEDDS ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*). Formulasi sediaan *egg tofu* ditunjukkan pada **tabel 3.3** formulasi sediaan *egg tofu* dengan metodenya rendam kacang kedelai selama 4 jam lalu dibelender kacang kedelai dengan air kemudian saring selanjutnya rebus sari kedelai selama 15 menit suhu 100°C hingga mendidih dan pecahkan telur sebanyak 4 butir tambahkan tepung meizena dan beri garam, kocok kuat dan saring lalu pisahkan berdasarkan kebutuhan dan konsentrasi. Kemudian masukan sediaan SNEDDS ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) dalam sediaan *egg tofu* yang sudah jadi lalu masukan dalam wadah plastik *egg tofu* dan kukus selama 20 menit suhu 90° C setelah itu masukan ke dalam prezzzer.

Tabel 3.3 Formulasi Sediaan *Egg Tofu*

No	Bahan	Jumlah Formulasi
1.	Kacang kedelai	200 gr
2.	Telur ayam	4 butir (200 gr)
3.	Meizena	13 gr
4.	Garam	qs
5.	Air mineral	400 mL
6.	Sediaan SNEDDS ekstrak daun Cep-cepan(<i>Castanopsis costata</i>)	5 ml SNEDSS/ 140 mL egg toffu

3.11 Uji Kadar Lemak

Uji kadar lemak dilakukan untuk mengetahui seberapa banyak lemak yang terkandung dalam sediaan *egg tofu* yang mengandung sediaan SNEDDS ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*). Uji kadar lemak dilakukan dengan

menggunakan ekstraksi soxhlet 5 gram sampel egg ofu lalu dilakukan pelarut lemak (PE ± 200 mL) lakukan refluks selama 4-6 jam sampai pelarut turun ke labu lalu hasil ekstraksi dipindahkan dalam beaker glass. Hilangkan pelarut dengan menganin-anginkan dalam lemari asam sampai pelarut berkurang (± 30 menit) lalu oven pada suhu 100°C . Sesudah di oven, hasil ekstraksi di dinginkan dalam eksikator selama 15 menit dan ditimbang lakukan sebanyak 3 kali pengulangan sampai diperoleh berat yang konstan. Untuk hasil kadar lemak *egg tofu* yang baik sekitar 70 kalori.

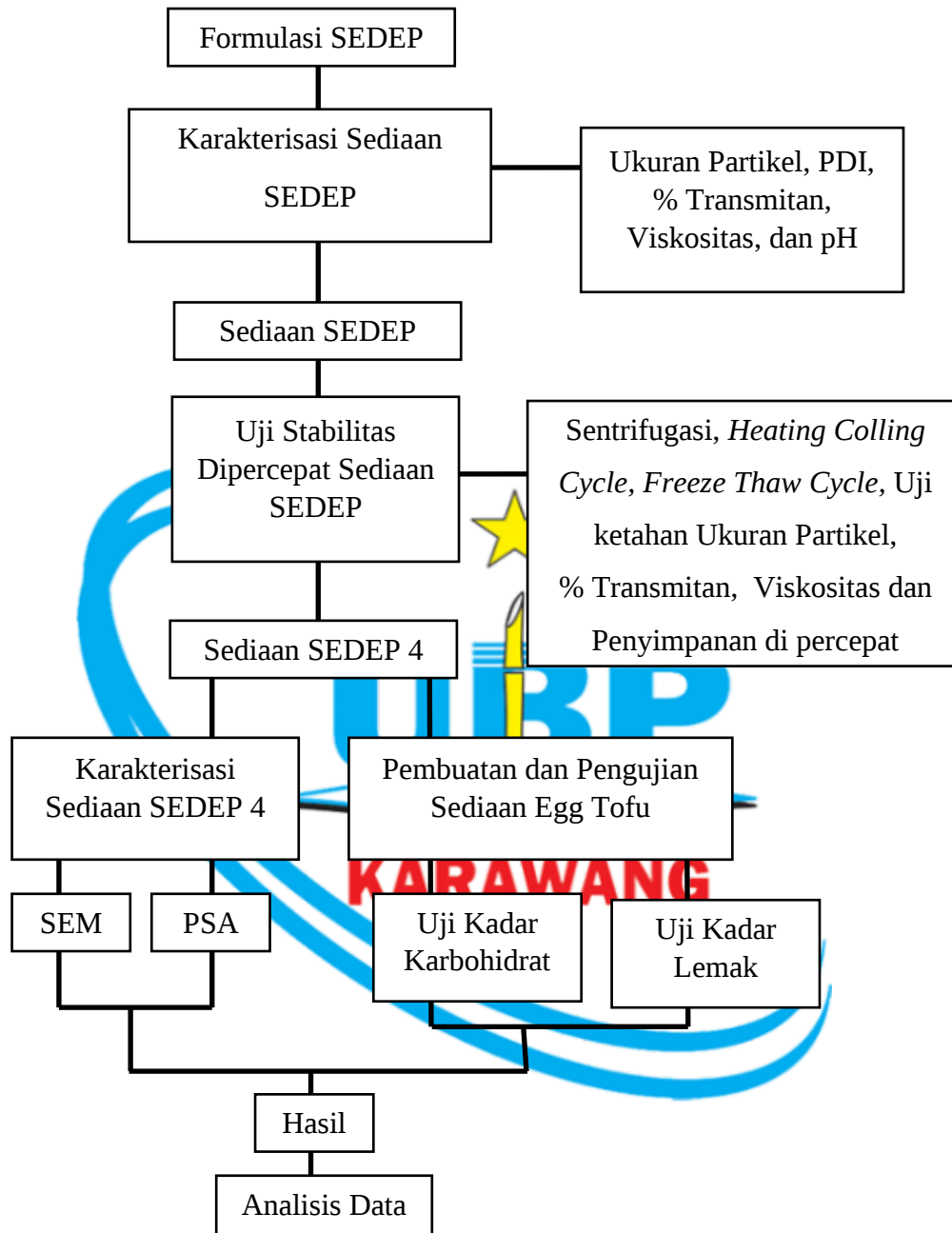
3.12 Uji Karbohidrat

Uji karbohidrat dilakukan untuk menguji seberapa besar karbohidrat yang sediaan *egg tofu* yang mengandung ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*). Yang pertama membuat larutan luff-schoorl dengan melarutkan 25 g $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 100 mL air, lalu larutkan 50 g asam stearate dalam 50 mL air dan 388 gram soda murni ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) lalu larutkan dalam 300-400 mL air mendidih. Selanjutnya dilakukan titrasi sampel, pertama lakukan preparasi sampel dengan melarutkan sampel 1 mL dalam 100 mL aquadest. Titrasi dilakukan dengan mengambil 2 mL larutan sampel C bila sirup pekat encerkan sirup 100 kali baru dipipet 2 mL. Lalu tambahkan 5 mL reagen luff-schoorl kemudian panaskan sampai mendidih pada heating mantle. Kemudian tambahkan 7 mL KI 20% dan 7 mL H_2SO_4 26% pelan-pelan. Tambahkan indikator amilum 2-3 tetes dan dititer dengan larutan Na-tiosulfat 0,1 N sampai terbentuk warna putih. Hasil dari uji karbohidrat yang baik pada sediaan *egg tofu* sekitar 23%.

3.13 Analisis Data

Analisis data dilakukan dari hasil uji stabilitas jadi dilakukan pengolahan data menggunakan statistik graphpad prism versi 8 dengan metode anova (Wahyuningsih dan Putranti, 2015) dengan analisis varian satu arah (ANOVA yang tingkat kepercayaannya sebesar 95%, jika $p < 0,05$ data dapat berbeda signifikan dan jika $p > 0,05$ yang didapat tidak berbeda signifikan (Sayuti, 2015).

3.14 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian