

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium untuk memperoleh data hasil formula nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu ekstraksi, uji kualitatif ekstrak, pembuatan nanoemulsi, pembuatan nanoemulgel, uji sifat fisik sediaan, uji stabilitas sediaan, dan uji aktivitas antioksidan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasetika dan Formulasi Prodi Farmasi, Fakultas Sains Teknologi dan Kesehatan, Universitas Sahid Surakarta. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan September 2020 sampai dengan bulan Maret 2021

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1. Populasi

Populasi pada penelitian ini yaitu biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang diambil didaerah Wonosobo, Jawa Tengah.

3.2.2. Sampel

Sampel pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol 96% biji kopi robusta (*Coffea canephora*)

3.3 Instrumen Penelitian

3.3.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain toples maserasi, alat gelas (Pyrex), timbangan analit (OHAUS), *rotary evaporator* (Dragonlab), flakon, *waterbath* (Mettler), penangas air (Matrix), *hotplate stirrer* (Thermo), sonikator (Digital pro), sentrifugasi (DS Lab), *refrigerator* (RSA), spektrofotometer UV-Vis (GenesysTM), *moisture analyzer* (OHAUS).

3.3.2. Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang diambil dari daerah Wonosobo (Jawa Tengah), etanol 96% (Mitra medika). Bahan formula Nanoemulgel terdiri dari Isopropil miristat (Brataco), tween 80 (Agung jaya), gliserin (Agung jaya), propilenglikol (Agung jaya), metil paraben (Agung jaya), *Hidroxy Propyl Methyl Cellulose* (Brataco), carbopol (Agung jaya) dan *aquadest*. Bahan analisis aktivitas antioksidan meliputi serbuk DPPH (Smartlab), etanol p.a (Emsure), dan vitamin C.

3.4 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat tiga variabel penelitian meliputi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol

- a. Variabel bebas : Perbandingan komposisi dalam nanoemulgel yang meliputi surfaktan *co*-surfaktan, fase minyak, dan *gelling agent*

- b. Variabel tergantung : Formula optimum nanoemulgel, nilai stabilitas fisik nanoemulgel, nilai IC_{50} formula *nanoemulgel* dengan berbagai konsentrasi gelling agent, analisis data
- c. Variabel terkendali : Metode ekstraksi, metode pembuatan nanoemulgel, metode uji ekstrak, metode uji antioksidan, metode uji karakteristik nanoemulsi ekstrak biji kopi robusta , metode uji stabilitas fisik nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta.

3.5 Definisi Operasional Variabel

- a. Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) adalah ekstrak yang diperoleh menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%
- b. Nanoemulsi ekstrak biji kopi robusta merupakan sistem transparan, tembus cahaya, yang merupakan dispersi minyak dalam air (m/a)
- c. Nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta merupakan sediaan nanoemulsi yang diinkorporasikan kedalam gel yang mengandung zat aktif berupa ekstrak etanol biji kopi robusta dengan variasi konsentrasi *gelling agent*.
- d. *Gelling agent* merupakan senyawa basis yang dibutuhkan dalam formulasi gel sebagai bahan pembentuk gel dalam sediaan. *Gelling agent* yang digunakan pada penelitian ini yaitu variasi HPMC dan carbopol dengan perbandingan (1 gram:0,5 gram; 1,5 gram:0,75 gram; 2 gram:1 gram)
- e. Aktivitas antioksidan adalah kemampuan dalam menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan tubuh akibat radikal bebas dengan melengkapi

adanya kekurangan elektron pada radikal bebas tersebut yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} dalam satuan ppm (Setiawati and Sukmawati, 2019).

3.6 Jalannya Penelitian

3.6.1. Determinasi Biji Kopi Robusta

Biji kopi robusta dilakukan determinasi di UPT Laboratorium Universitas Setia Budi Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo-Solo

3.6.2. Pembuatan Serbuk Biji Kopi Robusta

Tanaman biji kopi robusta sebanyak 2,0 Kg dikumpulkan, disortasi awal, kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu disortasi basah dan ditiriskan, kemudian diangin-anginkan sampai kering dan dihaluskan sampai menjadi serbuk simplisia kopi (Utami *et al.*, 2018)

3.6.3. Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dan Perhitungan Rendemen Ekstrak

Biji kopi robusta yang telah diserbukkan dilakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Maserasi dilakukan dengan perendaman serbuk biji kopi robusta sebanyak 200 gram dengan pelarut etanol 96% sebanyak 2 L direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam (Utami *et al.*, 2018). Maserat yang diperoleh dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring, kemudian dilakukan penguapan etanol menggunakan *rotary evaporator*, pengentalan dilakukan diatas

waterbath hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh dihitung rendemen yang diperoleh (Agpri, 2018).

Rendemen ekstrak etanol biji kopi robusta dihitung dengan cara :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\%$$

3.6.4. Uji Kualitas Ekstrak

a. Uji Organoleptis Ekstrak

Ekstrak yang diperoleh diamati warna, bau dan konsistensi (Saryanti, 2016).

b. Uji Kadar Air Ekstrak

Penetapan kadar air ekstrak dilakukan dengan menggunakan alat *moisture analyzer*. Sebanyak 1,0 gram ekstrak biji kopi robusta diletakkan pada pan aluminium kosong yang telah dibersihkan, kemudian diratakan. Bagian penutup ditutup sehingga alat akan memanaskan sampel hingga menunjukkan nilai kadar air sampel yang terbaca konstan (Lindani, 2016).

c. Uji Susut Pengerinan Ekstrak

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang dalam wadah yang telah ditara. Dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam di dalam oven dan setelah itu ditimbang. Pengerinan dilanjutkan dan ditimbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari

0,25% Kadar air dihitung dalam persen terhadap berat sampel awal
(Depkes RI, 2000)

Keterangan :
$$\text{Susut pengeringan (\%)} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

a = berat awal simplisia (gram)

b = berat akhir simplisia (gram)

d. Skrining Fitokimia

1) Identifikasi Flavonoid

Sebanyak 2 gram ekstrak ditimbang, kemudian dilarutkan dengan etanol, kemudian disaring. Filtrat kemudian ditambahkan sedikit serbuk magnesium dan 5-6 tetes asam klorida pekat. Warna merah atau jingga yang timbul menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Hanani, 2015).

2) Identifikasi Alkaloid

Ekstrak ditimbang 500 mg lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air dan dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit, kemudian didinginkan dan disaring sehingga menghasilkan filtrat atau larutan ekstrak. Filtrat selanjutnya digunakan untuk mengidentifikasi alkaloid sebagai berikut (Hanani, 2015).

- a) Filtrat diteteskan pada kaca arloji kemudian ditambahkan 2 tetes reagen Mayer. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna putih.
- b) Filtrat diteteskan pada kaca arloji kemudian ditambahkan 2 tetes reagen Dragendroff. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga coklat.

3) Identifikasi Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditimbang lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 10 mL air panas lalu didinginkan. Setelah dingin, tabung reaksi dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Senyawa saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil dengan penambahan asam klorida (Hanani, 2015).

4) Identifikasi Tanin

Sebanyak 2 gram ekstrak diekstraksi dengan etanol 80% (30 mL) selama 15 menit, kemudian disaring. Filtrat yang didapat diuapkan diatas penangas. Filtrat ditambahkan larutan 3% besi (III) klorida, terjadi warna hijau biru hingga kehitaman (Hanani, 2015).

3.6.5. Formulasi Nanoemulgel Ekstrak Biji Kopi Robusta

a. Formulasi Nanoemulsi Ekstrak Biji Kopi Robusta

Formulasi nanoemulsi membutuhkan ekstrak etanol biji kopi robusta sebanyak 90 mg. Komponen nanoemulsi yang digunakan pada formula nanoemulsi dapat dilihat pada tabel 3.1. Sebanyak 90 mg ekstrak etanol biji kopi robusta dilarutkan pada 9 mL etanol 96% dan diaduk menggunakan *hotplate stirrer* pada suhu 50°C selama satu menit dengan kecepatan 3800 rpm . Fase minyak dibuat dengan menambahkan 6 mL isopropil miristat (IPM) pada larutan ekstrak hingga homogen. Fase minyak dicampur dengan 27,5 mL tween 80 dan 18,5 mL etanol 96% pada suhu 50°C dengan kecepatan pengadukan 3800 rpm selama 5 menit (hingga homogen). Larutan tersebut ditambahkan 39 mL *aquadest* tetes demi tetes disertai pengadukan hingga homogen. Kemudian disonikator selama 15 menit pada suhu 45°C. Nanoemulsi didiamkan 24 jam hingga jernih (Syed and Peh, 2014).

Tabel 3.1. Komposisi formula nanoemulsi yang telah dilakukan optimasi oleh Afzalur (2018)

Bahan	Formula (mL)
IPM (Isopropil Miristat)	6
Tween 80	27,5
Etanol 96%	27,5
Aquadest (mL)	39

Nanoemulsi ekstrak biji kopi robusta selanjutnya dilakukan beberapa uji meliputi :

1) Uji Transmittansi

Nanoemulsi ekstrak biji kopi robusta pada setiap formula dilakukan uji pengukuran nilai transmittansi dengan menambahkan 1 mL nanoemulsi ad 50 mL *aquadest*. Pengukuran nilai transmittansi dilakukan dengan bantuan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang *visible* yaitu 650 nm dan *aquadestt* sebagai blanko yang memiliki nilai transmittansi lebih dari 100% (Azizah, 2015).

2) Uji Sentrifugasi

Uji sentrifugasi nanoemulsi dalam tabung sentrifugasi dimasukkan kedalam sentrifugator dengan kecepatan putaran 3800 rpm selama 30 menit. Uji sentrifugasi bertujuan untuk mengetahui kestabilan sediaan nanoemulsi dengan cara mengamati pemisahan fase setelah disentrifugasi. Uji ini diperlukan untuk mengetahui efek guncangan pada saat transport produk terhadap tampilan fisik produk (Panjaitan *et al.*, 2015).

3) Uji *Droplet Size*

Distribusi ukuran partikel dan rata-rata droplet nanoemulsi diukur dengan *Dynamic Light Scattering* (DLS). Sebanyak 3 mL nanoemulsi diisikan pada kuvet dan dimasukkan pada *Particle Size Analyzer* (PSA) untuk diukur ukuran dropletnya (Juniatik *et al.*, 2017). Uji PSA dilakukan di Laboratorium Pengujian Obat, Makanan, dan

Kosmetika Universitas Islam Indonesia (LPOMK UII) Jl. Kaliurang
Km. 14,5, Yogyakarta.

c) Formulasi Nanoemulgel Ekstrak Biji Kopi Robusta

Formula nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta dibuat dengan variasi *gelling agent* yaitu HPMC dan Carbopol dengan perbandingan konsentrasi sesuai dengan tabel III. Massa gel dibentuk dengan sejumlah HPMC dan carbopol 940 ditaburkan pada *aquadest* panas, kemudian dibiarkan sesuai dengan waktu optimum masing-masing basis gel mengembang dan diaduk hingga terbentuk massa gel. Setelah mengembang, pada basis Carbopol ditambahkan trietanolamin sampai terbentuk masa gel yang jernih. Metil paraben dilarutkan dalam gliserin aduk hingga larut dalam *beaker glass* (Campuran 1). Sebagian propilenglikol ditambahkan lalu diaduk hingga homogen. Campuran 1 ditambahkan dalam basis gel sambil di aduk hingga homogen. Sisa propilenglikol ditambahkan dalam campuran basis kemudian diaduk hingga homogen. Ekstrak yang sudah dibuat dalam bentuk nanoemulsi dicampurkan ke dalam basis gel dan diaduk sampai homogen. *Aquadest* ditambahkan sedikit demi sedikit sampai 100% dan diaduk sampai homogen. Formulasi nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Baviskar *et al* (2013).

Tabel 3.2. Formula nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta dengan variasi *gelling agent*

Bahan	Berat Bahan (gram)				
	F1	F2	F3	F4	F5
Nanoemulsi ekstrak biji kopi robusta	1	1	1	1	1
HPMC	2	-	1	1,5	2,0
Carbopol	-	0,5	0,5	0,75	1
TEA	1	1	1	1	1
Propilenglikol	10	10	10	10	10
Gliserin	15	15	15	15	15
Metil Paraben	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Aquadest</i>	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Kontrol positif yang digunakan yaitu vitamin C sedangkan kontrol negatif dibuat tanpa zat aktif berdasarkan formula nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta yang paling stabil.

3.6.6. Uji Stabilitas Fisik Nanoemulgel Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta

Masing-masing formula nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta dilakukan uji *freeze thaw*. Formula nanoemulgel disimpan dalam kondisi suhu -10°C selama 24 jam dan pada kondisi suhu $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, pengujian *freeze and thaw* dilakukan sebanyak tiga siklus (Avachat and Patel, 2015; Yuliani *et al.*, 2016). Pengamatan stabilitas fisik dilakukan sebelum *freeze thaw* dan sesudah *freeze thaw* meliputi:

a. Uji Organoleptis

Sediaan nanoemulgel diamati organoleptis meliputi warna, bau, terjadi atau tidaknya sineresis (Kuncari *et al.*, 2014).

b. Uji pH

Pengukuran pH sediaan nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta menggunakan *universal pH stick*.

c. Uji Daya Lekat

Sebanyak 0,1 gram sediaan dioleskan di atas kaca objek yang telah ditentukan luasnya yaitu 2 x 2 cm, di atas sediaan tersebut diletakkan kaca objek yang lain dan ditindih dengan beban 1 kg selama 5 menit. Kaca objek dipasang pada alat uji, beban seberat 80 gram dilepaskan dan dicatat waktunya hingga kedua kaca objek tersebut lepas (Zulkarnain *et al.*, 2013).

d. Uji Daya Sebar

Sebanyak 0,5 gram gel diletakan dalam kaca bulat, kaca lainnya diletakan di atasnya dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah itu, ditambahkan 150 gram beban didiamkan 1 menit dan diukur diameter konstan (Astuti *et al.*, 2010)

e. Uji Viskositas

Sediaan dimasukkan ke dalam wadah berbentuk tabung, lalu dipasang rotor dan pastikan bahwa rotor terendam dalam sediaan uji. Alat *viscotester* dinyalakan dan dipastikan bahwa rotor dapat berputar. Diamati jarum penunjuk dari viskosimeter yang mengarah ke angka pada skala viskositas untuk rotor yang tersedia, ketika jarum menunjukkan ke

arah yang stabil, maka angka itulah merupakan viskositasnya dan dicatat dalam satuan CPs (Zulkarnain *et al.*, 2013).

3.6.7. Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

a. Larutan DPPH 1 mM

Serbuk DPPH ditimbang tepat 39,432 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dilarutkan dengan etanol p.a hingga tanda batas (sebelumnya labu ukur sudah dilapisi aluminium foil) (Utami *et al.*, 2018).

b. Larutan blanko

Sebanyak 1 mL larutan DPPH 1 mM dipipet kemudian ditambahkan etanol p.a sampai 10 ml, kemudian dihomogenkan. Larutan blanko diinkubasi pada suhu sekitar 25-30°C selama 30 menit (Utami *et al.*, 2018).

c. Larutan standar induk vitamin C 100 ppm

Sebanyak 100 mg asam askorbat ditimbang lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a sampai batas (1000 ppm). Untuk mendapatkan larutan induk vitamin C 100 ppm, dilakukan dengan cara memipet 10 mL vitamin C (1000 ppm) dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan etanol sampai pada batas 100 ppm (Utami *et al.*, 2018).

d. Penentuan panjang gelombang maksimum

Sebanyak kurang lebih 8 mL etanol p.a dipipet, kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM lalu diencerkan sampai batas dengan etanol p.a pada labu ukur 10 mL dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 500-600 nm (sebelumnya labu ukur sudah dilapisi alumunium foil) (Utami *et al.*, 2018).

e. Penentuan waktu inkubasi optimum

Dipipet sebanyak 1 mL larutan induk standar vitamin C 100 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL. Ditambahkan kurang lebih 4 mL etanol p.a dan 1 mL larutan DPPH 1 mM. Lalu diencerkan dengan etanol p.a sampai tanda batas dan dihomogenkan. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum dan diukur pada waktu 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 menit sehingga didapat waktu serapan optimum yang stabil (sebelumnya labu ukur sudah dilapisi alumunium foil) (Utami *et al.*, 2018).

f. Pembuatan deret larutan standar vitamin C

Deret standar asam askorbat dibuat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dari larutan induk 100 ppm dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL. Ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM dan diencerkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Diinkubasi pada waktu inkubasi optimum

dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Utami *et al.*, 2018).

g. Pembuatan variasi larutan uji

Pembuatan variasi larutan uji dibuat dengan terlebih dahulu membuat larutan induk 1000 ppm yaitu dengan melarutkan 50 mg ekstrak kopi robusta. Masing-masing dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Deret standar dibuat dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm dari larutan induk kedalam labu ukur 10 mL. Ditambahkan 4 mL etanol p.a dan 1 mL larutan DPPH 1 mM dan diencerkan menggunakan etanol p.a hingga tanda batas dan homogenkan. Deret larutan uji didiamkan selama waktu optimum pada suhu kamar. Diukur absorban pada panjang gelombang maksimum (sebelumnya labu ukur sudah dilapisi aluminium foil) (Utami *et al.*, 2018).

h. Pengujian antioksidan dengan metode DPPH

Deret larutan uji, deret larutan kontrol positif vitamin C dan blanko diukur serapan pada spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Nilai presentase hambatan DPPH dihitung menggunakan nilai IC (*Inhibitor Concentration*) 50 diperoleh dari potongan garis antara 50% daya hambat dengan sumbu konsentrasi menggunakan persamaan linier ($y = bx + a$), dimana $y = 50$ dan x menunjukkan IC_{50} (Molyneux, 2004).

3.7. Analisis Data

3.5.1. Pendekatan secara teoritis

Data yang diperoleh dari hasil pengujian dibandingkan dengan pustaka jurnal.

3.5.2. Pendekatan statistik

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan program SPSS 21. Pada setiap formula nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta dilakukan uji *Shapiro-Wilk*, apabila data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *Paired T-test* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan setiap formula antara sebelum *freeze thaw* dan sesudah *freeze thaw*. Pada antar formula nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta dilakukan uji Shapiro Wilk untuk mengetahui normalitas data dan dilakukan uji homogenitas. Apabila data normal dan homogen maka dilanjutkan uji *One Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan kelima formula pada setiap evaluasi fisik sediaan dan uji aktivitas antioksidan nanoemulgel ekstrak biji kopi robusta. Namun jika data tidak normal dan tidak homogen maka dilanjutkan uji *Kruskal Wallis*. Apabila hasil data uji *One Way Anova* mengalami perbedaan signifikan, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui formula manakah yang memberikan perbedaan signifikan.