

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium dengan sampel minyak biji anggur (*Vitis vinifera seed oil*). Tahapan penelitian ini dimulai dari uji skrining fitokimia minyak biji anggur (*Vitis vinifera seed oil*), pembuatan formulasi nanoliposom minyak biji anggur (*Vitis vinifera seed oil*), uji karakteristik fisik nanoliposom dan uji aktivitas antioksidan nanoliposom minyak biji anggur.

B. Lokasi Penelitian

1. Uji skrining fitokimia minyak biji anggur (*Vitis vinifera seed oil*) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
2. Pembuatan dan uji karakteristik fisik nanoliposom minyak biji anggur (*Vitis vinifera seed Oil*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Aktivitas antioksidan nanoliposom minyak biji anggur (*Vitis vinifera seed oil*) diuji di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak biji anggur (*Vitis vinifera seed oil*) yang yang diperoleh dari Tsbali Official Store/PT. Tamba Sanjiwani, kemudian diformulasikan dalam bentuk nanoliposom minyak biji anggur dengan variasi bobot 1 gram, 2 gram dan 4 gram.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan faktor yang diuji dan dapat mempengaruhi atau menjadi penyebab perubahan yang terjadi pada variabel lainnya. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variasi bobot minyak biji anggur (*vitis Vinifera seed Oil*) dalam formulasi nanoliposom.

2. Variabel terikat

Variabel terikat merupakan faktor yang diukur dan dipengaruhi oleh adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu hasil uji karakteristik fisik nanoliposom yang meliputi organoleptik, pH, ukuran partikel, indeks polidispersitas dan aktivitas antioksidan dalam nilai IC₅₀.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali merupakan faktor yang dikendalikan oleh peneliti karena diduga dapat mempengaruhi hubungan variabel bebas dan variabel terikat. Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu suhu, kecepatan pengadukan, lama pengadukan.

E. Definisi Operasional

1. Minyak biji anggur diperoleh dari Tsbali Official Store/PT. Tamba Sanjiwani.
2. Nanoliposom minyak biji anggur merupakan minyak biji anggur yang diformulasikan dalam bentuk nanoliposom dengan variasi bobot minyak biji anggur 1 gram (F1), sebanyak 2 gram (F2) dan sebanyak 4 gram (F3). Nanoliposom dibuat menggunakan metode hidrasi lapis tipis.

3. Karakteristik fisik nanoliposom minyak biji anggur meliputi organoleptik, pH, ukuran partikel, dan indeks polidispersitas.
4. Aktivitas antioksidan nanoliposom minyak biji anggur dianalisis menggunakan metode DPPH dan ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} yang didapat dari persamaan regresi linear antara % aktivitas antioksidan dan konsentrasi sampel.

F. Alat Dan Bahan

Proses pembuatan nanoliposom minyak biji anggur menggunakan alat dan bahan sebagai berikut:

1. Alat

Tabung reaksi (Iwaki), neraca analitik (OHAUS), pipet tetes, pH meter (OHAUS), *Particle Size Analyzer (Malvern)*, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1900), pipet ukur (Mettler Toledo), *Erlenmeyer* (Iwaki), *beakerglass* (Iwaki), labu ukur (Iwaki), *Ultra-turax, beakerglass* (Iwaki), batang pengaduk (Iwaki), *Rotary Evaporator* (RE-2000E).

2. Bahan

Minyak Biji Anggur (PT. Tsbali), Nanoliposom minyak biji anggur, NaCl (pa), $AlCl_3$ (Pa), $FeCl_3$ (Merck), H_2SO_4 (Merck), aquadest, Lesitin soya (farmasetik/PT.MKR), Kolesterol (Sigma Aldrich/Sentra Kimia Labsains), Kloroform (Merck/PT. Bani Husada), Tween 80 (farmasetik/PT.MKR), PBS pH 7,4 (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaCl, Aqua bebas CO_2), Vitamin C (farmasetik/PT.MKR), etanol (pa/PT. Bani Husada), DPPH (Sigma Aldrich/Sentra Kimia Labsains).

G. Prosedur Kerja

1. Uji Skrining Fitokimia

b. Uji Flavonoid

Pengujian flavonoid dilakukan dengan sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan dengan AlCl_3 1%. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning atau jingga menunjukkan hasil positif flavonoid (Ningsih *et al.*, 2021).

c. Uji Fenolik

Sejumlah 0,5 sampel ditambahkan akuades panas kemudian diaduk. Setelah dingin ditambahkan lima tetes NaCl 10%, lalu diaduk sampai larut. Selanjutnya ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 5%, hasil positif ditunjukkan jika terbentuk warna hijau kehitaman (Fadillah *et al.*, 2017)

d. Uji Terpenoid

Uji senyawa metabolit terpenoid dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan H_2SO_4 pekat sebanyak 2 mL. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan beberapa menit selanjutnya jika terbentuk warna merah kecoklatan sampai ungu menunjukkan hasil positif uji terpenoid (Ningsih *et al.*, 2021).

2. Formula Nanoliposom

Nanoliposom minyak biji anggur terdiri dari minyak biji anggur, lesitin soya, kolesterol, kloroform, tween 80, dan PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,4. Formula nanoliposom didapatkan dari penelitian yang

dilakukan oleh (Purwanto *et al.*, 2020) yang kemudian dimodifikasi sebagai berikut:

Tabel 3.1. Formula Nanoliposom Minyak Biji Anggur

BAHAN	F1	F2	F3	FUNGSI
Minyak Biji Anggur (g)	1	2	4	Zat aktif
Lesitin soya (g)	2,7	2,7	2,7	Lipid Bilayer
Cholesterol (mg)	10	10	10	Eksipien bilayer
Kloroform (mL)	10	10	10	Pelarut organik
Tween 80 (mL)	0,5	0,5	0,5	Surfaktan
PBS pH 7,4 (mL) ad	30	30	30	Buffer

3. Pembuatan PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,4

Pembuatan PBS pH 7,4 diawali dengan pembuatan aquadest bebas CO₂. Aquadest bebas CO₂ dibuat dengan cara memanaskan aquadest hingga mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan. PBS pH 7,4 dibuat dengan cara melarutkan NaH₂PO₄ 0,8 gram kedalam aquadest bebas CO₂ 100 ml. Na₂HPO₄ 0,9 gram dilarutkan dengan aquadest bebas CO₂ 100 mL. Larutan NaH₂PO₄ dipipet sebanyak 20 mL dicampur dengan 90 mL larutan Na₂HPO₄ hingga homogen, lalu ditambahkan NaCl 0,4 gram. Larutan PBS yang sudah homogen dilakukan pengecekan pH (Sinaga and Umar, 2017).

4. Pembuatan Nanoliposom

Nanoliposom dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis. Lapisan nanoliposom dibuat dengan cara kolesterol, tween 80 dan lesitin soya dicampur dalam *beakerglass* kemudian dilarutkan dengan kloroform. Setelah terlarut masukan ke dalam labu alas bulat dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan kecepatan 150 rpm selama 60 menit hingga terbentuk lapisan. Lapisan lipid yang terbentuk ditambahkan

dengan minyak biji anggur kemudian dihidrasi dengan PBS pH 7,4 dan divakum dengan *rotary evaporator* suhu 50° C dengan kecepatan 150 rpm selama 60 menit. Liposom yang sudah terbentuk kemudian dilakukan homogenisasi ukuran partikel menggunakan *ultraturax* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit hingga ukurannya nano (Purwanto, Ariani and Pramitaningastuti, 2019).

5. Uji Karakteristik Fisik Nanoliposom

a. Organoleptik

Nanoliposom yang terbentuk diamati secara visual bentuk, bau dan warna yang dihasilkan dengan latar belakang hitam/putih (Salsabila, Rahmiyani and Sri Zustika, 2021).

b. pH

Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter. Syarat pH sediaan topikal yang baik adalah 4-8 (Chaerunisaa *et al.*, 2020).

c. Penentuan Ukuran Partikel

Penentuan ukuran partikel menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) yaitu dengan cara mengambil 3 mL nanoliposom kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diletakkan di dalam *holder* alat PSA (Munawiroh, Handayani and Nugroh, 2020).

e. Indeks Polidispersitas

Pengukuran indeks polidispersitas menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) yaitu dengan cara mengambil 3 mL nanoliposom

kemudian dimasukkan kuvet dan diletakkan di dalam *holder* alat PSA (Munawiroh, Handayani and Nugroh, 2020).

6. Penentuan Aktivitas Antioksidan Nanoliposom

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimal menggunakan larutan DPPH 20 ppm dilakukan dengan cara DPPH ditimbang 2 mg kemudian dilarutkan menggunakan pelarut etanol pa hingga volume 100 mL. Larutan DPPH 20 ppm diambil kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV Vis dengan panjang gelombang 400-600 nm.

b. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara memipet larutan DPPH 20 ppm sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dibaca absorbansinya sesuai panjang gelombang maksimal pada menit ke-1 sampai menit ke-30.

c. Pengukuran Absorbansi Blangko

Pengukuran larutan blangko dilakukan dengan memipet sebanyak 4 mL larutan DPPH 20 ppm kemudian ditambah etanol pa 1 mL. Larutan diinkubasi sesuai *operating time* kemudian dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal.

d. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Vitamin C

Larutan induk vitamin C 100 ppm dibuat dengan cara menimbang 10 mg vitamin C kemudian dilarutkan dengan etanol pa hingga volume 100 mL. Larutan induk 100 ppm dibuat seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm dengan pelarut etanol pa sampai 10 mL. Larutan seri konsentrasi masing-masing dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 4 mL larutan DPPH 20 ppm, diinkubasi hingga *operating time* dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimal.

e. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Minyak Biji Anggur

Larutan induk minyak biji anggur 100 ppm dibuat dengan cara menimbang 10 mg minyak biji anggur kemudian dilarutkan dengan etanol pa hingga volume 100 mL. Larutan induk 1000 ppm dibuat seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm dengan pelarut etanol pa dalam labu ukur 10 mL. Larutan seri konsentrasi masing-masing dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 4 mL larutan DPPH 20 ppm, diinkubasi hingga *operating time* dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimal.

f. Pengukuran aktivitas antioksidan nanoliposom

Larutan induk nanoliposom minyak biji anggur 100 ppm dibuat dengan cara menimbang 100 mg nanoliposom kemudian dilarutkan dengan etanol pa hingga volume 100 mL. Larutan induk

100 ppm dibuat seri konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm dengan pelarut etanol pa dalam labu ukur 10 mL. Larutan seri konsentrasi masing-masing dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 4 mL larutan DPPH 20 ppm, diinkubasi hingga *operating time* dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimal.

H. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan data karakteristik fisik dan aktivitas antioksidan dalam nilai IC_{50} dari nanoliposom minyak biji anggur (*Vitis vinifera*) yang diolah menggunakan *software Statistical Product and Service solutions (SPSS) versi 25*. Analisis normalitas data menggunakan metode *Shapiro Wilk* dengan kriteria $sig.>0,05$ maka data dikatakan normal. Uji homogenitas data menggunakan metode *levene test* dengan kriteria $sig.>0,05$ maka data terdistribusi dengan homogen. Uji lanjutan menggunakan anova satu jalan dengan taraf kepercayaan 95% dilakukan jika data yang dihasilkan normal dan homogen, jika data tidak normal maupun tidak homogen maka data dilanjutkan non parametrik.