

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain penelitian ekperimental laboratorium dengan sampel minyak biji anggur (*Vitis vinifera L. Seed Oil*). Tahapan penelitian ini diantaranya skrining fitokimia, pembuatan nanoliposom, pembuatan formulasi sediaan serum, uji karakteristik, uji stabilitas fisik, dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

B. LOKASI PENELITIAN

1. Skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
2. Pembuatan nanoliposom dan serum dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pengujian ukuran partikel nanoliposom dan aktivitas antioksidan serum dilakukan di Laboratorium Analisis Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. SUBJEK PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan sampel minyak biji anggur (*Vitis vinifera L. Seed Oil*) yang diperoleh dari TSbali Official Store/PT. Tamba Sanjiwani yang digunakan sebagai bahan dasar pembuatan serum nanoliposom minyak biji anggur dengan metode DPPH.

D. 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 komposisi minyak biji anggur, lesitin soya, tween 80, kloroform dan PBS pH 7,4 menggunakan metode hidrasi lipid.
3. Serum nanoliposom minyak biji anggur merupakan sediaan serum yang mengandung nanoliposom minyak biji anggur dengan konsentrasi pada formula 1 sebanyak 6,25 gram dan pada formula 2 sebanyak 12,5 gram.
4. Karakteristik nanoliposom minyak biji anggur meliputi pH, uji ukuran partikel dan indeks polidispersitas (PDI).
5. Karakteristik fisik serum nanoliposom minyak biji anggur meliputi organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar dan daya lekat dan sentrifugasi.
6. Stabilitas serum nanoliposom merupakan kondisi dimana karakteristik fisik sediaan serum tidak mengalami perubahan sesudah dan sebelum *cycling test*
7. Aktivitas antioksidan nanoserum minyak biji anggur ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} dari hasil dianalisis menggunakan metode DPPH.

E. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel penelitian yang mempengaruhi variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bobot nanoliposom minyak biji anggur sebanyak 6,25 gram dan 12,5 gram.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah variabel yang dapat berubah karena adanya variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah karakteristik fisik, aktivitas antioksidan serum nanoliposom minyak biji anggur menggunakan metode DPPH yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} .

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah alat, suhu dan kondisi laboratorium.

F. ALAT DAN BAHAN

1. Alat :

Tabung reaksi (Pyrex), pipet tetes, pipet volume (Iwaki), pipet filler (D&N), neraca analitik (Ohaus), beaker glass (Pyrex), pH meter (Ohaus), gelas ukur (Iwaki), pipet volume (Pyrex), pipet filler (D&N), batang pengaduk, gelas ukur (Iwaki), rotary evaporator (RE-2000E), kulkas (Sharp), botol kaca gelap (Indrasari), PSA (Malvern v2.2), mortir dan stemper (One med), *ultra turrax* (IKA), viscometer (*Brook Field*), jangka sorong (MO150), *objek glass* (OneLab), *stopwatch*

(Diamond), alat uji daya lekat, beban 50 sampai 250 gram, labu takar (Iwaki), tabung reaksi (Pyrex), spectrometer UV-Vis (UV-1800 series), pipet filler (D&N).

2. Bahan :

Minyak biji anggur (TSbali Official Store), aquadest (PT. Smart Lab), FeCl₃, etanol, HCl pekat, serbuk magnesium, H₂SO₄, natrium dihydrogen fosfat (Nitra Kimia), dinatrium hydrogen fosfat (Nitra Kimia), NaCl (Nitra Kimia), aquadest bebas CO₂, minyak biji anggur (TSbali Official Store), lestin soya (Farmasetis), kloroform (Bani Usaha Mandiri), tween 80 (Farmasetis), PBS, aquadest (Bani Usaha Mandiri), nanoliposom minyak biji anggur, nanoliposom minyak biji anggur, gel aloe vera (Herborist), propilenglikol (Farmasetis), TEA (Farmasetis), Metil paraben (Farmasetis), BHT (Farmasetis), serum nanoliposom minyak biji anggur, aquadest, DPPH (Sigma-Aldrich), etanol p.a (Bani Usaha Mandiri), vitamin C (Nitra kimia).

G. PROSEDUR KERJA

1. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia minyak biji anggur meliputi uji terpenoid, uji flavonoid, uji saponin dan uji fenolik. Prosedur kerja skrining fitokimia sebagai berikut:

a. Uji Terpenoid

Minyak biji anggur sebanyak 1 mL minyak dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang kemudian ditambahkan CH₃COOH 10

tetes dan H_2SO_4 pekat sebanyak 2 tetes. Larutan kemudian dikocok perlahan dan dibiarkan beberapa menit. Minyak biji anggur positif mengandung steroid jika berubah warna menjadi biru sampai hijau menunjukkan hasil positif uji steroid sedangkan jika minyak biji anggur berubah warna menjadi merah kecoklatan sampai ungu maka hasil positif uji terpenoid (Manongko *et al.*, 2020).

b. Uji Flavonoid

Minyak biji anggur dilarutkan terlebih dahulu dengan etanol kemudian diambil sedikit larutannya dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan Mg. Larutan kemudian ditambahkan HCl pekat sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi. Minyak biji anggur positif mengandung flavonoid jika terjadi perubahan warna menjadi kuning, jingga atau hijau (Prananda *et al.*, 2015).

c. Uji Saponin

Minyak biji anggur sebanyak 2 mL ditambahkan 2 mL NaOH, kemudian dididihkan dengan 20 mL air dalam penangas air. Filtrat dikocokkan didiamkan selama 15 menit. Terbentuknya busa yang stabil berarti positif terdapat saponin (Palupi *et al.*, 2016).

d. Uji fenolik

Uji fenolik dilakukan dengan sebanyak 1 mL minyak, dilarutkan dengan etanol., lalu ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Larutan

berubah menjadi warna hijau, biru atau ungu menunjukkan adanya senyawa fenol (Prananda *et al.*, 2015).

2. Formulasi Nanoliposom Minyak Biji Anggur

Bahan yang dibutuhkan untuk membuat nanoliposom minyak biji anggur yaitu minyak biji anggur, lesitin soya, tween 80, kloroform, dan PBS. Adapun cara pembuatan PBS dan nanoliposom minyak biji anggur sebagai berikut:

a. Prosedur Kerja Pembuatan Aquadest Bebas CO₂

Aquades sebanyak 250 mL dididihkan selama 15 menit (terhitung dimulai saat air mendidih), kemudian ditutup dengan aluminium foil, dicegah hubungan dengan udara semaksimal mungkin. Aquadest didinginkan tanpa membuka penutup dan segera digunakan (Puspitasari *et al.*, 2022).

b. Prosedur Kerja Pembuatan PBS (*Phosfat Buffer Sol*)

Natrium dihidrogen fosfat sebanyak 0,8 gram dimasukkan ke dalam *beaker glass*. Natrium dihidrogen fosfat dilarutkan dengan aquadest bebas CO₂ 100 mL kemudian pipet 20 mL dimasukkan ke dalam beakerglass. Dinatrium hidrogen fosfat sebanyak 0,9 gram dimasukkan ke dalam *beaker glass*. Dinatrium hidrogen fosfat dilarutkan dengan aquadest bebas CO₂ 100 mL dipipet 90 mL dimasukkan ke dalam beakerglass yang sama dengan natrium dihidrogen fosfat. NaCl sebanyak 0,54 gram ditambahkan ke dalam campuran tersebut aduk hingga homogen (Zhang *et al.*, 2018).

c. Formulasi Nanoliposom Minyak Biji Anggur.

Formula nanoliposom minyak biji anggur dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Formula Nanoliposom Minyak Biji Anggur
(Panahi *et al.*, 2017)

Bahan	Jumlah	Keterangan
Minyak Biji Anggur	1,875 mL	Zat aktif
Lesitin soya	3,94 gram	Fosfolipid
Tween 80	0,349 mL	Surfaktan
Kloroform	15 mL	Pelarut organik
PBS	30 mL	<i>Buffer</i>

Pembuatan nanoliposom minyak biji anggur dengan cara lesitin soya dan tween 80 dimasukkan ke dalam *beaker glass*. Kloroform ditambahkan kemudian diaduk dengan batang pengaduk. Campuran bahan di evaporasi dengan *rotary evaporator* dan vakum selama 1 jam pada suhu 40°C dengan kecepatan 150 rpm sampai terbentuk lapisan tipis. Campuran selanjutnya disimpan dalam labu selama 24 jam pada suhu 4°C (Zhang *et al.*, 2018). Campuran yang telah didinginkan kemudian ditambahkan minyak biji anggur dan PBS. Campuran dievaporasi dengan *rotary evaporator* dan divacum 1 jam pada suhu 40°C sampai terbentuk emulsi. Emulsi dipindahkan ke *beaker glass* dan dihomogenkan di *ultra turrax* selama 60 menit dengan kecepatan 10.000 rpm untuk memperkecil ukuran partikel dan menghomogenkan sediaan (Zhang *et al.*, 2018).

3. Uji Karakteristik Fisik Nanoliposom Minyak Biji Anggur

Uji karakteristik fisik nanoliposom minyak biji anggur meliputi uji pH dan uji PSA (*Particle Size Analyzer*). Adapun prosedur kerja uji karakteristik fisik nanoliposom minyak biji anggur sebagai berikut:

a. Uji pH

Uji pH pada sediaan nanoliposom minyak biji anggur menggunakan alat pH meter. Sediaan yang aman dan tidak menimbulkan iritasi pada kulit dapat dilihat dengan pengujian pH. Uji pH diawali dengan alat pH meter dikalibrasi dengan larutan dapar standar terlebih dahulu, kemudian pH meter dicelupkan dalam sediaan. Nanoliposom minyak biji anggur sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 100 ml aquadest. Nanoliposom memenuhi syarat jika pH dalam rentang 4,5 -8 (Liu *et al.*, 2023).

b. Uji PSA (*Particle Size Analyzer*)

Pemeriksaan ukuran partikel dan indeks polidispersitas (PDI) menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*). Nanoliposom memenuhi persyaratan jika ukuran partikel dalam rentang 1-100 nm. Nilai indeks polidispersitas (PDI) $< 0,05$ menunjukkan sampel monodispersi, nilai $< 0,08$ hampir monodispersi, nilai $0,08 - 0,7$ menunjukkan nilai tengah PDI dimana algoritma didistribusi beroperasi dengan baik dan nilai $> 0,7$ menunjukkan sampel superdispersi (Garg *et al.*, 2018).

4. Formulasi dan Pembuatan Serum Nanoliposom Minyak Biji Anggur.

Nanoliposom yang telah dibuat dan diuji karakteristik fisiknya kemudian diformulasikan menjadi serum. Adapun bahan yang digunakan untuk membuat serum yaitu nanoliposom minyak biji anggur, gel aloe vera, propilenglikol, karbopol, TEA, metil paraben, BHT dan aquadest. Berikut formulasi dan prosedur kerja pembuatan serum nanoliposom minyak biji anggur:

Tabel 3. 2 Formula Serum Nanoliposom Minyak Biji Anggur
(Joshua *et al.*, 2018)

Bahan	Formula 1 (g)	Formula 2 (g)	Keterangan
Nanoliposom MBA	6,25	12,5	Zat aktif
Gel aloe vera	5	5	<i>Gelling agent</i>
Propilenglikol	5	5	Humektan
Karbopol	0,5	0,5	<i>Gelling agent</i>
TEA	0,2	0,2	Surfaktan
Metil paraben	0,2	0,2	Pengawet
BHT	0,1	0,1	Stabilisator
Aquadest	ad 100 mL	ad 100 mL	Pelarut

Cara pembuatan serum nanoliposom dengan mengembangkan karbopol dengan air selama 24 jam (campuran 1). Propilenglikol dan TEA ditambahkan dalam campuran 1 dan dihomogenkan dengan *ultra turax* (campuran 2). Metil paraben dilarutkan dengan 50 mL air mendidih dan BHT dilarutkan dalam 10 mL aquadest. Larutan metil paraben dan BHT dimasukkan kedalam campuran 2 (campuran 3). Nanoliposom minyak biji anggur, gel aloe vera dan sisa aquadest ditambahkan kedalam campuran 3 kemudian di *ultra turrax* hingga homogen (Zhang *et al.*, 2018).

5. Uji Karakteristik Fisik Serum Nanoliposom

Uji karakteristik fisik serum nanoliposom meliputi organoleptis, uji homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, daya lekat, dan sentrifugasi. Berikut cara kerja uji karakteristik fisik serum nanoliposom minyak biji anggur:

a. Uji Organoleptis

Pengujian ini dilakukan dengan melibatkan panca indera meliputi pengamatan terhadap bentuk konsistensi, warna dan bau (Fitria *et al.*, 2022).

b. Uji homogenitas

Bahan-bahan dalam formula tercampur dengan merata menunjukkan sediaan serum nanoliposom minyak biji anggur tersebut homogen. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan *object glass*. Sediaan serum nanoliposom minyak biji anggur diambil secukupnya kemudian dioleskan pada *object glass* dan diamati secara visual. Apabila tidak terdapat butiran – butiran kasar pada *object glass* maka sediaan serum nanoliposom minyak biji anggur tersebut homogen (Fitria *et al.*, 2022).

c. Uji pH

Pemeriksaan pH pada sediaan serum nanoliposom minyak biji anggur menggunakan alat pH meter. Sediaan serum nanoliposom minyak biji anggur yang aman dan tidak menimbulkan iritasi pada kulit dapat dilihat dengan pengujian pH. Uji pH diawali dengan alat

pH meter dikalibrasi dengan larutan dapar standar terlebih dahulu,. Serum nanoliposom minyak biji anggur sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 100 mL aquadest kemudian pH meter dicelupkan dalam sediaan. Sediaan serum nanoliposom minyak biji anggur yang baik adalah sediaan yang sesuai dengan kriteria pH kulit yaitu 4,5-6,5 (Fitria *et al.*, 2022).

d. Uji Daya Lekat

Serum nanoliposom minyak biji anggur sebanyak 0,5 gram serum dan diletakkan diatas *object glass*. *Objek glass* yang lain diletakkan di atas serum nanoliposom minyak biji anggur tersebut selanjutnya ditekan dengan beban 1000 gram selama 1 menit. Beban seberat 80 gram dilepaskan dan dicatat waktunya hingga kedua *objek glass* terlepas. Syarat daya lekat >1 detik (Fitria *et al.*, 2022).

e. Uji daya sebar

Serum nanoliposom minyak biji anggur sebanyak 0,5 gram ditimbang dan diletakkan ditengah alat kaca penutup yang sudah ditimbang bobotnya, kemudiaan diletakkan di atas sediaan dan di diamkan selama 1 menit. Diameter sediaan serum diukur penyebarannya dengan rata-rata diameter dari beberapa sisi, beban uji daya sebar hingga 250 gram. Sediaan serum yang baik adalah sediaan yang memiliki daya sebar 5 – 7 cm (Fitria *et al.*, 2022).

f. Uji Viskositas

Langkah uji viskositas terlebih dahulu memasang spindel no 64 pada gantungan spindel, kemudian spindle diturunkan sampai spindel tercelup ke dalam sampel yang akan diukur viskositasnya hingga tanda batas. Alat viskometer dinyalakan dengan kecepatan 50 rpm selama 1 menit. Viskositas sediaan serum yang baik berada direntang 800 – 3.000 cP (Fitria *et al.*, 2022).

g. Uji Sentrifugasi

Serum nanoliposom minyak biji anggur dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi sebanyak 10 mL kemudian ditutup menggunakan kassa. Tabung sentrifugasi dimasukkan ke dalam alat sentrifugasi kemudian atur kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Sediaan serum nanoliposom minyak biji anggur memenuhi persyaratan uji sentrifugasi apabila tidak terjadi pemisahan (Sinaga *et al.*, 2015).

h. *Cycling Test*

Pengujian stabilitas dengan metode *Cycling test*. Satu siklus sediaan serum disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam di kulkas lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu 40°C selama 24 jam di climatic chamber. Percobaan ini diulang sebanyak 6 siklus dan diamati terjadinya perubahan fisik dari sediaan pada awal dan akhir pengujian meliputi organoleptis dan homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, sentrifugasi (Zam Zam *et al.*, 2022).

2. Uji aktivitas antioksidan serum nanoliposom

a. Pembuatan larutan DPPH

Larutan induk DPPH dibuat dalam jumlah 1.000 ppm dengan cara menimbang DPPH sebanyak 10 mg dilarutkan dengan etanol p.a sampai 10 mL dalam labu ukur 10 mL. Larutan DPPH 20 ppm dibuat dengan memipet larutan induk DPPH 1.000 ppm sebanyak 2 mL kemudian dicukupkan dengan etanol p.a sampai 100 mL dalam labu ukur 100 mL (Munteanu *et al.*, 2021).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH diambil 1 mL menggunakan pipet. Larutan DPPH dicukupkan volume hingga 5 mL dengan etanol p.a. ukur absorbansi panjang gelombang 400-600 nm (Munteanu *et al.*, 2021).

c. Pengukuran *Operating Time*

Larutan DPPH 1 mL cukupkan volume menggunakan etanol p.a sampai 5 mL homogenkan selama 1 menit. Absorbansi dibaca pada menit ke-1 sampai menit ke-30 pada panjang gelombang maksimum (Munteanu *et al.* 2021).

d. Pengukuran aktivitas antioksidan blangko

Pengujian dilakukan dengan memipet 4 mL DPPH dan 1 mL etanol p.a kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C pada ruangan gelap. DPPH diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal (Munteanu *et al.*, 2021).

e. Pembuatan larutan sampel minyak biji anggur

Larutan induk minyak biji anggur 100 ppm dibuat dengan cara menimbang sebanyak 10 mg minyak biji anggur, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 100 mL. Minyak biji anggur dibuat variasi jumlah 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm dan 8 ppm, 10 ppm.

f. Pengujian aktivitas antioksidan minyak biji anggur

Pengujian dilakukan dengan memipet 1 mL larutan sampel minyak biji anggur dari berbagai jumlah minyak biji anggur yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm kemudian masing-masing ditambahkan 4 mL DPPH. Larutan divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C pada ruangan gelap. Minyak biji anggur diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal. Hasil yang akan diperoleh kurva persamaan regresi linier $Y = Bx + A$ untuk menghitung IC_{50}

g. Pembuatan larutan sampel serum nanoliposom

Serum nanoliposom minyak biji anggur sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 100 mL. serum nanoliposom dibuat variasi jumlah 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm (Munteanu *et al.*, 2021).

h. Pengujian aktivitas antioksidan serum nanoliposom minyak biji anggur

Pengujian dilakukan dengan memipet 1 mL larutan sampel dari berbagai jumlah serum nanoliposom minyak biji anggur 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm kemudian masing-masing ditambahkan 4 mL DPPH. Larutan serum nanoliposom minyak biji anggur divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C pada ruangan gelap. Serum nanoliposom minyak biji anggur diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal (516,8 nm). Hasil yang akan diperoleh kurva persamaan regresi linier $Y = Bx + A$ untuk menghitung IC_{50} .

i. Pembuatan larutan pembanding

Larutan stok 100 ppm dibuat dengan cara menimbang sebanyak 10 mg vitamin C kemudian dilarutkan dengan etanol p.a dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 100 mL. vitamin C dibuat variasi jumlah 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm (Munteanu *et al.*, 2021).

j. Pengujian aktivitas antioksidan sampel pembanding vitamin C

Pengujian dilakukan dengan memipet 1 mL larutan vitamin C dari berbagai jumlah yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Larutan vitamin C masing-masing ditambahkan 4 ml DPPH kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C pada ruangan gelap. Vitamin C diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal. Hasil

yang akan diperoleh kurva persamaan regresi linier $Y = Bx + A$ untuk menghitung IC_{50} (Munteanu *et al.*, 2021).

H. ANALISIS DATA

Data karakteristik fisik dari pengujian pH, viskositas dan daya sebar serta aktivitas antioksidan normal dan homogen, sehingga dilanjutkan dengan uji parametrik anova satu jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Pengujian karakteristik fisik berupa daya lekat tidak normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan non parametrik *Kruskal Wallis*. Aktivitas antioksidan sediaan serum nanoliposom minyak biji anggur (*Vitis vinifera L. Seed Oil*) yang diolah menggunakan SPSS 26 diuji normalitas data nilai signifikan ($p > 0,05$). Hasil *cycling test* serum nanoliposom minyak biji anggur berupa pH, viskositas dan daya sebar normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji parametrik *Paired Samples t-test*. Hasil uji daya lekat tidak normal dianalisis dengan uji non parametrik *Wilcoxon Signed Ranks Test*.