

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental laboratoris kuantitatif ini dirancang hanya dengan kelompok *post test only control group design*. Untuk mengukur aktivitas antioksidan, perlakuan diberikan dengan kombinasi madu lebah kelulut (*Trigona* spp.) dan ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menggunakan metode DPPH. Selain itu, perlakuan diberikan terhadap larva *Artemia salina* Leach. Untuk mengetahui aktivitas toksiknya memungkinkannya dilakukan dengan menggunakan teknik BSLT.

B. Subjek dan Objek Penelitian

Larva *Artemia salina* (Nauplius) yang digunakan sebagai subyek dalam penelitian ini, dilakukan uji sitotoksik pada 30 ekor larva. Larva ini dibeli dari toko Iwak Guppy Samarinda dengan merek Supreme Plus dan ditetaskan sendiri. Dalam penelitian ini, kriteria eksklusi adalah larva udang mati dalam waktu 24 jam setelah menetas. Uji sitotoksik melibatkan empat kelompok, masing-masing tiga kelompok yang berbeda dalam konsentrasi, dan satu kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan). Larva *Artemia salina* yang digunakan sebanyak sepuluh ekor, masing-masing dibagi menjadi empat kelompok dengan tiga kali pengulangan. (Hidayat dkk., 2018; Mirzaei dkk., 2013).

Uji kombinasi madu lebah kelulut dan ekstrak daun belimbing wuluh dan kontrol positif dengan vitamin C dilakukan secara *in vitro* pada lima kelompok uji antioksidan dengan konsentrasi pengenceran yang berbeda dari nanogel madu lebah kelulut dan ekstrak daun belimbing wuluh menggunakan metode DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (C₁₈H₁₂N₅O₆).

Madu lebah kelulut (*Trigona* spp.) diperoleh dari daerah Tanah Merah, Lempake Kota Samarinda. Daun belimbing wuluh diperoleh dari daerah Anggur, Samarinda Ulu.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian uji sitotoksik dan antioksidan dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur. Penelitian dilakukan dalam rentang waktu 3 bulan.

D. Definisi Operasional

Tabel 1.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
1.	Konsentrasi madu lebah kelulut dan ekstrak etanol daun belimbing wuluh	Konsentrasi larutan yang diuji	Rumus : $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$		Numerik	10, 30, 50, 70, dan 90 ppm
2.	Absorbansi sampel	Nilai absorbansi masing-masing sampel	Menggunakan spektrofotometer	Spektrofotometri UV-Vis	Numerik	Nanometer (nm)
3.	IC ₅₀	Nilai yang menunjukkan kemampuan ekstrak dalam menghambat aktivitas radikal bebas hingga 50%	Menggunakan persamaan regresi linear sederhana		Kategorik ordinal	sangat kuat <50 ppm, kuat 50-100 ppm, Sedang 100-150 ppm, lemah 150-200 ppm, dan sangat lemah >200 ppm

4.	LC ₅₀	Nilai yang menunjukkan ekstrak dapat mematikan 50% larva <i>Artemia salina</i>	Persamaan regresi linear dengan analisa probit		Kategorik Ordinal	Sangat toksik <30 ppm, toksik 30-1000 ppm, dan tidak toksik >1000 ppm
5.	Presentase kematian larva <i>Artemia salina</i>	Total larva yang mati setelah 24 jam dibandingkan dengan total larva uji	$\frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$		Numerik	Dikategorikan menggunakan tabel probit kemudian dijadikan variable terikat dalam analisis probit

E. Instrument Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada saat formulasi sediaan nanogel yaitu wadah gel, neraca analitik (*Fujitsu*), *Magnetic stirrer* (*Dlab MS-H280-Pro*), aluminium foil, *hotplate*, pH meter (*Suncare USA Thecnology*), *Particle size analyzer* (*Microtrac*), *Viskosimeter* (*Anton Paar ViscoQC 100*), Mortir, Stamper, Kompresor listrik, beaker glass (*Iwaki*), gelas ukur (*Iwaki*), batang pengaduk.

Alat yang digunakan pada saat uji antioksidan dan uji sitotoksik yaitu spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10s UV-Vis*), labu ukur (*Iwaki*), vortex (*Scilogex MX-S*), botol vial, Akuarium, Aerator (*Aquara ASP-288A*), Gelas ukur (*Iwaki*), Spatula, Mikropipet (*Scilogex*), Pipet Pasteur, Lampu 60 watt (*Philip*), Kaca Pembesar.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada saat formulasi nanogel yaitu Madu lebah kelulut, Ekstrak daun belimbing wuluh, Aquadest, Carbophol 940, TEA, Nipagin, Nipasol, Propilenglikol, dan Tween 80.

Adapun bahan yang digunakan pada saat uji sitotoksik dan uji antioksidan yaitu Larva *Artemia salina* L., Garam, Madu lebah kelulut, Ekstrak daun belimbing wuluh, Nanogel madu lebah kelulut dan daun belimbing wuluh, DPPH, Asam askorbat, Aquadest, Metanol.

F. Metode Pengumpulan Data

Untuk mengukur pengujian antioksidan, absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer. Kemudian, hasil data ini dimasukkan ke dalam *Microsoft Excel* versi 2010 untuk menghitung nilai IC₅₀. Pengujian sitotoksik dimulai dengan menghitung larva *Artemia salina* yang hidup dan mati secara manual. Kemudian, nilai LC₅₀ dihitung dengan menggunakan *Microsoft Excel* 2010, melakukan perumusan probit sederhana untuk membandingkan nilai LC₅₀ dengan perhitungan analisis probit, dan kemudian menentukan normalitas distribusi dengan menggunakan perangkat lunak *IBM Software Package used for Statistical Analysis (SPSS) Statistics version 22*.

G. Teknik Analisis Data

Studi observasi langsung dilakukan pada sampel madu lebah kelulut dan ekstrak daun belimbing wuluh dengan berbagai konsentrasi dan larutan kontrol. Sebuah studi *cross-sectional* digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dari sampel dalam satu waktu. Selanjutnya, data dimasukkan untuk mendapatkan hasil persentase penghambat menggunakan rumus tertentu. Rumus yang digunakan sebagai berikut :

$$\% \text{Absorbansi} = \frac{\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban sampel}} \times 100\%$$

Selanjutnya, data diolah dengan *Microsoft Excel* untuk menghasilkan persamaan regresi linear untuk menentukan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ yang lebih kecil menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih kuat, dan nilai IC₅₀ yang lebih tinggi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih rendah. Hasil IC₅₀ dibandingkan dengan klasifikasi aktivitas antioksidan untuk mendapatkan informasi tambahan..

Pengujian sitotoksik dilakukan dengan menentukan persentase kematian larva *Artemia salina* pada tiap tabung reaksi dengan menggunakan rumus :

$$\%Kematian = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva mati} + \text{Jumlah larva hidup}} \times 100\%$$

Selanjutnya, data yang diperoleh digunakan untuk analisis LC₅₀. Hal ini dilakukan dengan melakukan analisis probit menggunakan *Microsoft Excel* 2010 untuk menentukan nilai LC₅₀, serta melakukan perumusan probit sederhana untuk membandingkan hasil LC₅₀ dengan perhitungan analisis probit, dan kemudian menentukan normalitas distribusi data menggunakan perangkat lunak *IBM Software Package used for Statistical Analysis (SPSS) Statistics version 22*.

H. Alur Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

Daun belimbing wuluh diperoleh dari daerah perkebunan di Samarinda. Daun belimbing wuluh yang telah diperoleh dikeringkan dengan oven dan dihaluskan di Lab Kimia Bahan Alam UMKT, lalu dilakukan maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Maserat yang dihasilkan dilakukan pemekatan maserat menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C dengan 200 rpm (Febriyanti, 2021).

2. Uji Antioksidan Kombinasi Madu Lebah Kelulut dan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 1,98 mg dilarutkan menggunakan methanol p.a dan dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL hingga volume dicukupkan dengan methanol p.a hingga tanda batas, kemudian di labu ukur diberikan alumunium foil dan ditempatkan dalam ruang gelap (Haveni dkk., 2019).

b. Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Dalam pengujian antioksidan dengan kombinasi madu lebah kelulut dan ekstrak daun belimbing wuluh berdasarkan penelitian terdahulu yaitu Wimpy (2017) tentang uji aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak sarang semut dan ekstrak keladi tikus dengan metode DPPH. Kombinasi madu lebah kelulut dan ekstrak daun belimbing wuluh selanjutnya dibuat dalam beberapa perbandingan seperti yang ditunjukkan pada tabel 3.2

Tabel 3.2 Perbandingan uji antioksidan kombinasi madu lebah kelulut dan ekstrak daun belimbing wuluh

Perbandingan	Aktivitas antioksidan	
	Berat Madu (mg)	Berat Ekstrak (mg)
1 : 0	100	0
2 : 1	50	25
1 : 1	50	50
1 : 2	25	50
0 : 1	0	100

Setelah diketahui perbandingan masing-masing sampel, lalu ditimbang kombinasi sampel sesuai dengan berat yang telah ditentukan dan dilarutkan dengan 10 mL metanol, dilakukan pengenceran pada masing-masing perbandingan hingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi (10, 30, 50, 70, 90 ppm). Pengujian antioksidan masing-masing konsentrasi diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 0,01 mL, 0,03 mL, 0,05 mL, 0,07 mL, 0,09 mL, hasil campuran dihomogenkan menggunakan *vortex* dan ditambahkan DPPH

0,1 mM sebanyak 3 mL dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dengan kondisi gelap, selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Dihitung nilai IC_{50} menggunakan persamaan regresi linier dengan hubungan antara konsentrasi dan % inhibisi (Wimpy dkk., 2017).

3. Formulasi Sediaan Nanogel Madu Lebah Kelulut (*Trigona spp.*) dan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*)

Sebelum dilakukan formulasi sediaan nanogel dilakukan penentuan komposisi bahan nanogel. komposisi bahan dapat diambil berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu Harahap (2018) seperti tertera pada tabel 3.3

Tabel 3.3 Komposisi Formulasi Nanogel

Komposisi	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Madu lebah kelulut	0,05	0,05	0,05
Ekstrak daun belimbing wuluh	0,025	0,025	0,025
Carbopol 940	0,5	1,0	1,5
Propilenglikol	4	4	4
Metil Paraben	0,2	0,2	0,2
Propil Paraben	0,02	0,02	0,02
TEA	0,3	0,3	0,3
Aquadest	q.s	q.s	q.s

4. Prosedur Pembuatan Sediaan Nanogel

Membuat dasar basis gel, kemudahan pembuatan emulsi, dan menggabungkan keduanya sehingga membentuk nanogel adalah tiga langkah utama dalam membuat formulasi nanogel. Pembuatan basis gel dipilih Carbopol 940 sebagai agen pembentuk gel dan dikembangkan dengan menggunakan aquadest yang panas lalu digerus didalam mortar hingga homogen. Lalu ditambahkan metil paraben dan propil paraben sebagai pengawet pada sediaan nanogel. Selanjutnya dilakukan pembuatan emulsi yang terdiri dari fase minyak atau organik dan fase air. Fase organik terdiri dari kombinasi madu lebah kelulut dan daun

belimbing wuluh dilarutkan kedalam aquadest, dan ditambahkan propilenglikol dicampur menggunakan magnetic stirrer selama 15 menit dengan suhu 35°C dengan kecepatan 1000 rpm. Pada fase air terdiri dari Tween 80 dilarutkan dengan aquadest dicampur menggunakan magnetic stirrer selama 1 jam dengan suhu 35°C dengan kecepatan 1000 rpm. Lalu fase organik didispersikan kedalam fase air dan ditambahkan TEA. Dilakukan pengadukan dengan magnetic stirrer selama 1 jam dengan suhu 35°C dengan kecepatan 1000 rpm hingga membentuk emulsi. Emulsi yang terbentuk dari penggabungan fase organik dan fase air dilakukan pengujian *Particle Size Analyzer* (PSA) untuk menentukan emulsi tersebut telah memiliki ukuran nano. Setelah didapatkan hasil uji PSA yang baik maka nanoemulsi yang telah terbentuk didispersikan kembali dalam basis gel hingga menjadi nanogel (Harahap, 2021).

5. Evaluasi Stabilitas Sediaan Nanogel

Penggunaan berbagai jenis, konsentrasi bahan tambahan dan ekstrak dalam pembuatan nanogel akan berdampak pada stabilitas fisik formulasi, sehingga diperlukan uji stabilitas suatu sediaan. Uji stabilitas fisik dilakukan untuk menjamin bahwa formulasi sediaan dapat mempertahankan kualitas aslinya secara terus-menerus sehingga memenuhi parameter kriteria selama penyimpanan. Ketidakstabilan fisik dari sediaan gel dapat dilihat dari perubahan warna, bau, terjadi pemisahan fase, sineresis, perubahan konsistensi, terbentuknya suatu gas, dan perubahan fisik lainnya. Untuk mengetahui dengan cepat nilai kestabilan suatu sediaan suatu produk farmasi atau kosmetik dapat dilakukan dengan uji stabilitas dipercepat (Sayuti, 2015).

a. Pengujian Organoleptik Sediaan

Evaluasi organoleptik sediaan dilakukan dengan melihat bentuk, warna, dan bau dari sediaan (Tutik, 2021).

b. Uji pH

Uji pH dilakukan untuk mengetahui tingkat keasaman dari sediaan agar tidak menyebabkan iritasi kulit. Standar pH sediaan yang sesuai dengan pH kulit yaitu dalam interval 4,5-6,5 (Sayuti, 2015).

c. Pemeriksaan Homogenitas Sediaan

Homogenitas sediaan dilakukan dengan meletakkan sedikit gel tertentu pada kaca objek dan memeriksa secara visual ada atau tidaknya butiran kasar (Tutik, 2021).

d. Pengujian Daya Sebar

Pengujian dilakukan dengan meletakkan sediaan sebanyak 1 gram di atas kaca berukuran 20x20 cm, selanjutnya ditutupi dengan kaca yang lain dan diletakan pemberat di atas kaca hingga bobot mencapai 125 gram, lalu diukur diameter setelah 1 menit. Persyaratan daya sebar yaitu 5-7 cm (Tutik, 2021).

e. Pengujian Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan memasukan sediaan kedalam beakerglass dan dipilih nomor spindle yang sesuai. Pengujian viskositas dilakukan dengan 3 kali pengulangan dengan menggunakan viskometer Anton Paar ViscoQC 100. Pengujian viskositas dilakukan setelah sediaan selesai dibuat dan dengan pengukuran setiap minggu sekali selama 4 minggu (Slamet dkk., 2020).

6. Uji Sitotoksik Nanogel Madu Lebah Kelulut dan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh**a. Penyiapan Larva Udang**

Untuk menetasakan larva udang dilakukan dengan merendam telur *Artemia salina* sebanyak 50 mg menggunakan air laut buatan sebanyak 2 L dalam wadah kaca. Air laut buatan dibuat dengan melarutkan 40 gram garam dalam 2 L air lalu disaring. Kemudian, diberi penerangan lampu pijar 40-60 watt dan diaerasi selama 48 jam (Muaja dkk., 2013).

b. Pembuatan Konsentrasi Sampel dan Kontrol

Ditimbang Nanogel madu lebah kelulut dan ekstrak belimbing wuluh sebanyak 200 mg kemudian dilarutkan dalam pelarut metanol hingga 100 mL sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok sebesar 2000 ppm. Untuk membuat konsentrasi 10 ppm, 100 ppm, dan 500 ppm, dilakukan dengan dipipet larutan stok ke dalam botol vial masing-masing 25 ppm, 250 ppm, dan 1.250 ppm menggunakan mikropipet, kemudian diangin-anginkan hingga pelarutnya menguap (Irma, 2017).

c. Pelaksanaan Uji Sitotoksik

Pengujian sitotoksik dari nanogel dilakukan dengan dipipet setiap larutan konsentrasi nanogel dari larutan stok ke dalam botol vial yang kemudian diuapkan dengan cara diangin-anginkan hingga pelarutnya hilang. Selanjutnya botol vial diisi dengan air laut 1 mL lalu dimasukkan 10 ekor *Artemia salina* berumur 48 jam yang telah bergerak aktif dengan cara dipilih secara acak kemudian dimasukkan ke dalam botol vial yang berisi sampel yang bebas pelarut menggunakan pipet tetes kemudian ditambahkan air laut sampai 5 mL. Ditambahkan 1 tetes suspensi ragi *Saccharomyces cereviceae* (3 mg/10 ml air laut) sebagai makanan *Artemia salina* ke dalam botol vial. Botol vial diletakkan di bawah lampu penerangan 24 jam. Lalu, setelah 24 jam jumlah larva yang hidup dihitung dengan bantuan kaca pembesar. Dihitung persen kematian larva menggunakan analisis probit untuk menentukan nilai LC_{50} (Irma, 2017).

