

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian ini dilakukan dalam 2 tahap yaitu, pertama ekstraksi biji jinten hitam, optimasi ekstrak biji jinten hitam dalam formulasi *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dan analisis hasil optimasi formulasi SNEDDS. Penelitian tahap pertama merupakan penelitian dalam proyek lain yang dilakukan secara berkelompok. Penelitian tahap dua yaitu, pengujian aktivitas antioksidan pada SNEDDS ekstrak biji jinten hitam dengan metode DPPH.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dimulai sejak bulan Juni 2019 dan berlangsung di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Kimia Penelitian Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Sleman dan Laboratorium Biologi Sistemika Tumbuhan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Ekstrak biji jinten hitam formulasi SNEDDS, non SNEDDS, dan kuersetin.

3.3.2 Variabel Terikat

Aktivitas antioksidan dari ekstrak biji jinten hitam formulasi, SNEDDS non SNEDDS, dan kuersetin.

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan adalah kemampuan senyawa uji (SNEDDS dan non SNEDDS) untuk menangkap radikal bebas DPPH dibandingkan dengan larutan kontrol kuersetin yang diinterpretasikan dalam nilai *Inhibitory Concentration 50%* (IC₅₀).

3.4.2 Ekstrak Biji Jinten Hitam Formulasi SNEDDS

Ekstrak biji jinten hitam murni adalah larutan yang diperoleh dari proses ekstraksi biji jinten hitam dengan pelarut etanol. Kemudian ditambahkan

komponen fase minyak, surfaktan, ko-surfaktan dan diformulasikan ke dalam bentuk SNEDDS.

3.4.3 Ekstrak Biji Jinten Hitam Non SNEDDS

Ekstrak biji jinten hitam murni adalah larutan yang diperoleh dari proses ekstraksi biji jinten hitam dengan pelarut etanol menggunakan metode sokletasi.

3.4.4 *Inhibitory Concentration* (IC₅₀)

Inhibitory Concentration 50% (IC₅₀) atau konsentrasi inhibisi 50% adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi senyawa uji (mikrogram/mililiter) yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas DPPH.

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *micropipette* (Thermo Scientific dan Finnipipette), *Particle Size Analyser* (HORIBA SZ 100), Sonikator (Branson 5510), Spektrofotometer UV-Vis (Hitachi Spectrophotometer UV-Vis UH5300), *magnetic stirrer*, timbangan analitik (Melter Toledo XS205 Duel Range), vortex, seperangkat alat franz diffusion cell (Permegear®) dan seperangkat alat-alat gelas (Pyrex).

3.5.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji jinten hitam (*Nigella sativa L.*), etanol (Merck), minyak biji jinten hitam, Tween 80 (KAO Indo Chem), dan PEG 400 (idCHEM Co., Ltd), bubuk *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH) (Sigma Aldrich), metanol (Merck), aquades (Merck), kuersetin (Sigma Aldrich).

3.6 Tahapan Penelitian

3.6.1 Pengumpulan Bahan Penelitian

Biji jinten hitam diperoleh dari Pasar Tradisional Beringharjo, Yogyakarta. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan kriteria biji berwarna hitam, kering (tidak lembab atau basah) dan segar, yaitu waktu pengambilan biji oleh pedagang dekat dengan waktu pembelian dengan estimasi waktu 12 jam sebelum pembelian. Bahan penelitian lainnya diperoleh dari Toko Ilmu Kimia Yogyakarta.

3.6.2 Uji Determinasi Biji Jinten Hitam

Uji determinasi merupakan uji yang dilakukan untuk mengidentifikasi dan memastikan bahwa biji yang diperoleh dari Pasar Tradisional Beringharjo tersebut benar-benar *Nigella sativa L.* Uji determinasi tersebut dilakukan di Laboratorium Biologi Sistemika Tumbuhan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Biji Jinten Hitam

Ekstrak biji jinten hitam diperoleh dari Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia. Pembuatan ekstrak biji jinten hitam diawali dengan proses penjemuran biji jinten hitam hingga kering. Setelah biji benar-benar kering sampel dihaluskan dengan binder hingga berbentuk serbuk. Sebanyak 1 Kg biji jinten hitam direndam dalam 6 Liter larutan etanol 96% selama 3 hari. Kemudian larutan diekstraksi dengan metode sokletasi, yaitu penyaringan berulang dengan menggunakan pelarut etanol yang dipanaskan selama 4 jam. Hasil ekstraksi yang didapatkan kemudian di evaporator untuk menghilangkan pelarut (Erkan *et al.*, 2008).

3.6.4 Pembuatan Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Biji Jinten Hitam

Penentuan formula optimal SNEDDS biji jinten hitam dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia. Berdasarkan penelitian sebelumnya, komposisi formula optimal SNEDDS yang diperoleh dari analisis menggunakan *Software Design Expert* versi 10 adalah Minyak Biji Jinten Hitam (MBJH) 0,532 mL, Tween 80 (surfaktan) 2,047 mL, dan PEG 400 (ko-surfaktan) 0,258 mL (Putri, 2018). Berdasarkan hasil penelitian tersebut selanjutnya dibuat 3 variasi konsentrasi yang akan diuji yaitu:

Tabel 2. Ketiga formula SNEDDS yang akan dibuat dalam penelitian ini.

Konsentrasi Uji	MBJH (mL)	Tween 80 (mL)	PEG 400 (mL)
1	0,532	2,047	0,258
2	0,266	2,047	0,258
3	0,133	2,047	0,258

3.6.5 Penentuan Ukuran Globul dan Zeta Potensial

Penentuan ukuran globul dan zeta potensial dilakukan dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). SNEDDS Biji Jinten Hitam diencerkan dalam air dengan rasio 1:25 di atas *magnetic stirer* sampai terbentuk nanoemulsi. Kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur menggunakan *Particle Size Analyzer*. Pengukuran globul dan zeta potensial ini dilakukan oleh laboran di Laboratorium Pengujian Obat, Makanan, dan Kosmetik Universitas Islam Indonesia.

3.6.6 Uji Stabilitas

Uji stabilitas yang digunakan pada penelitian ini dengan 3 uji yaitu uji *Heating Stability*, uji *Freeze-Thaw*, dan uji sentrifugasi. Pengujian *Heating Stability* menggunakan oven dengan suhu 60°C – 100°C. Sampel disimpan selama 5 jam, lalu dilakukan pengamatan karakterisasi fisik meliputi pengamatan organoleptis (Talegaonkar *et al.*, 2008). Pengujian *Freeze-Thaw* dengan cara sediaan disimpan dalam suhu 4°C selama 24 jam, lalu dipindahkan pada suhu 40°C selama 24 jam (1 siklus). Pengujian dilakukan sebanyak 3 siklus (Hasrawati *et al.*, 2016). Terakhir, uji sentrifugasi dilakukan dengan cara sebanyak 2 ml sediaan dimasukkan ke dalam *eppendorf* kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit, lalu dilakukan pengamatan karakterisasi fisik meliputi pengamatan organoleptis (Fitriani *et al.*, 2016).

3.6.7 Pembuatan Larutan Stok DPPH

Larutan stok DPPH 50 ppm dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml metanol absolut, lalu diaduk dan dihomogenkan. Larutan stok DPPH dijaga pada suhu kamar, terlindung dari cahaya dan dibuat segar setiap akan digunakan (Handayani *et al.*, 2014).

3.6.8 Pembuatan Larutan Kontrol Kuersetin

Larutan kontrol merupakan larutan kuersetin dengan konsentrasi 10 ppm. Larutan kuersetin 10 ppm dibuat dengan cara menimbang sebanyak 1 mg kuersetin kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml metanol absolut dan dihomogenkan (Handayani *et al.*, 2014). Setelah itu dibuat 2 variasi konsentrasi lainnya, yaitu 8 dan 6 ppm yang dibuat dengan cara masing-masing larutan stok

dipipet 8 dan 6 mL, lalu ditambahkan dengan metanol sampai volume 10 mL. Kuersetin dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif yang telah terbukti memiliki daya antioksidan kuat dengan nilai $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ (Handayani *et al.*, 2014).

3.6.9 Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum DPPH

Pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH dilakukan di Laboratorium Kimia Penelitian Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia. Mula-mula larutan stok DPPH dibuat menjadi 10 ppm dengan memipet sebanyak 1 ml ke dalam vial lalu dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan metanol, dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometri UV-Visibel. Hasil panjang gelombang maksimum DPPH yang diperoleh dari penelitian terdahulu biasanya berkisar antara 515 nm – 520 nm (Molyneux, 2004).

3.6.10 Pengujian Aktivitas Antioksidan SNEDDS Ekstrak Biji Jinten Hitam

Setelah panjang gelombang maksimum DPPH sudah dapat ditetapkan, dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan cara menambahkan sebanyak 1 ml larutan sampel ke dalam 4 ml larutan stok DPPH (50 ppm) pada tabung reaksi. Kemudian dihomogenisasi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Lalu dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer dengan penentuan nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimal DPPH. Hal yang sama dilakukan pada ekstrak biji jinten hitam (non SNEDDS) dan kuersetin sebagai kontrol positif. Pengujian diulangi sebanyak 3 kali untuk mendapatkan data yang valid.

3.6.11 Penetapan *Inhibitory Concentration* (IC_{50})

Nilai *Inhibitory concentration* (IC_{50}) atau konsentrasi inhibisi merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak biji jinten hitam (mikrogram/mililiter) yang mampu menghambat 50% oksidasi. Nilai IC_{50} didapatkan dengan membuat persamaan garis regresi linear yang menghubungkan antara konsentrasi masing-masing sampel terhadap persen inhibisi antioksidan baik pada larutan ekstrak SNEDDS, non SNEDDS maupun kuersetin.

Perhitungan nilai persen inhibisi antioksidan menggunakan rumus yang telah ditentukan berikut ini (Dudonne' *et al.*, 2009):

$$\text{Persen Inhibisi Antioksidan (\%)} = [(Ac-As)/Ac] \times 100\%$$

Keterangan :

Ac : nilai absorbansi larutan kontrol

As : nilai absorbansi larutan sampel

Data nilai persen inhibisi antioksidan masing-masing sampel serta variasi konsentrasinya kemudian dimasukkan kedalam rumus persamaan garis regresi linier, yaitu : $y=ax+b$. Di mana sumbu "x" mewakili konsentrasi sampel dan sumbu "y" mewakili persen inhibisi antioksidan, sedangkan "a" merupakan konstanta dan "b" merupakan angka koefisien regresi (Aminah *et al.*, 2019).

3.7 Analisis Data

Semua data aktivitas antioksidan ekstrak biji jinten hitam formulasi SNEDDS, non SNEDDS, dan kuersetin dianalisis dengan regresi linier dan *one way ANOVA* menggunakan *software SPSS* versi 21.

3.8 Etika Penelitian

Terlebih dahulu melakukan pengajuan surat ijin etik penelitian (*ethical clearance*) dan surat ijin pelaksanaan penelitian di lokasi tempat penelitian berlangsung yaitu di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Kimia Penelitian Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Sleman dan Laboratorium Biologi Sistemika Tumbuhan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, sebelum pelaksanaan penelitian.

Karena penelitian ini berkaitan erat dengan laboratorium, ada beberapa aspek yang perlu menjadi perhatian, salah satunya yaitu etika ketika bekerja di laboratorium. Etika penelitian laboratorium memiliki tujuan untuk menjamin:

1. Kesehatan, keselamatan dan kesejahteraan orang yang bekerja di laboratorium, alat pelindung diri / APD.

2. Mencegah orang lain terkena resiko pekerjaan laboratorium yang menyebabkan terganggunya kesehatan akibat kegiatan laboratorium.
3. Mengontrol penyimpanan dan penggunaan bahan yang mudah terbakar, beracun dan atau infeksius.
4. Mengontrol pelepasan bahan pekerjaan laboratorium berbahaya ke udara, tanah dan air agar tidak menimbulkan efek negatif pada lingkungan.