

**FORMULASI NANOEMULSI EKSTRAK
TERPURIFIKASI BUAH TOMAT (*Solanum
lycopersicum* L.) DAN UJI SITOTOKSIK TERHADAP
SEL HeLa**

SKRIPSI



Oleh :

FEVI WAHYUNI

NIM : 1904117

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA
PADANG
2023**

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tomat adalah salah satu komoditi hortikultura yang bernilai ekonomi tinggi. Selain memiliki rasa manis-asam, tomat banyak mengandung vitamin C, A, dan E serta kalium, kalsium, dan garam mineral. Tomat juga kaya akan likopen, kandungan likopen dalam tomat berperan penting bagi kesehatan manusia, yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan dua kali lebih kuat dari α -tokoferol atau vitamin E (Mappiratu, 2016).

Likopen merupakan salah satu kandungan kimia paling banyak dalam tomat, dalam 100 gram tomat rata-rata mengandung likopen sebanyak 3-5 mg (Giovannucci, 1999). Peningkatan aktivitas senyawa aktif bahan alam dapat dilakukan melalui purifikasi. Purifikasi merupakan metode untuk mendapatkan komponen bahan alam murni bebas dari komponen kimia lain yang tidak dibutuhkan (Vifta, 2020).

Likopen merupakan senyawa antioksidan kuat yang berpotensi menahan radikal bebas. Sejumlah penelitian *in vitro* membuktikan bahwa likopen mempunyai aktivitas antioksidan yang berfungsi sebagai pelindung dari efek perusak radikal bebas (Sulastri *et al.*, 2016). Banyak penelitian telah dilakukan untuk memastikan efek likopen pada risiko perkembangan berbagai penyakit kronis dan keluhan kesehatan pada wanita. Studi ini dilakukan terhadap pertumbuhan kanker payudara, kanker ovarium, kanker serviks, penyakit kardiovaskular dan preeklamsia (Kailaku *et al.*, 2007). Peng *et al.* (1998) menyatakan bahwa wanita yang jarang mengonsumsi buah dan sayur yang

mengandung likopen lebih rentan terhadap kanker serviks dibandingkan dengan wanita yang sering mengonsumsi sayur dan buah yang mengandung likopen.

Likopen tidak stabil terhadap oksigen, panas dan cahaya sehingga membatasi penggunaannya dalam produk pangan, pangan fungsional dan farmasi (Yuan *et al.*, 2008). Salah satu cara untuk meningkatkan stabilitas obat adalah dengan membuat sediaan menggunakan teknologi nano. Nanoemulsi adalah sistem emulsi yang transparan, tembus cahaya dan merupakan dispersi minyak air yang distabilkan oleh lapisan film dari surfaktan atau molekul surfaktan yang memiliki ukuran droplet 50-500 nm (Shakeel, dkk., 2008).

Nanoemulsi memiliki stabilitas kinetik yang tinggi karena memiliki ukuran droplet yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan emulsi konvensional yang memiliki ukuran droplet lebih dari 1000 nm. Ukuran droplet nanoemulsi yang kecil dapat dengan mudah menembus melewati lapisan kulit dan dapat meningkatkan penetrasi bahan aktif, yaitu likopen (Sandra dkk., 2016). Menurut Inggriani dan Husni (2016) penghantaran obat dalam bentuk nano untuk pengobatan kanker terbukti efektif karena dapat menargetkan obat ke sel secara spesifik. Namun ada penelitian yang menyatakan bahwa ukuran partikel yang lebih kecil memiliki penghantaran obat yang lebih baik dengan toksisitas yang lebih tinggi (Noorani, 2015).

Uji sitotoksik secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi aktivitas antineoplastik suatu senyawa. Penggunaan uji pada kultur sel merupakan salah satu cara penentuan *in vitro* untuk mendapatkan obat sitotoksik. Sistem ini adalah tes kuantitatif dengan menentukan kematian sel (Haryoto *et al.*, 2013).

Salah satu cara menentukan toksisitas senyawa adalah dengan metode MTT assay. Prinsip uji sitotoksitas metode MTT adalah kemampuan sel hidup mereduksi garam MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] menjadi kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Kemampuan mereduksi ini ditunjukkan oleh enzim suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria pada sel yang viable / sel hidup (Chapdelaine, 2006).

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dilakukan penelitian formulasi sediaan nanoemulsi dari ekstrak terpurifikasi buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.) serta sitotoksitasnya terhadap sel HeLa (*cell line* kanker serviks) yang dinyatakan dengan nilai IC50.

1.2 Rumusan Penelitian

1. Apakah ekstrak terpurifikasi buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.) dapat dijadikan sediaan nanoemulsi?
2. Apakah sediaan nanoemulsi ekstrak terpurifikasi buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.) memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Membuat formulasi nanoemulsi ekstrak terpurifikasi buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.)
2. Mengetahui efek sitotoksik sediaan nanoemulsi ekstrak terpurifikasi buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.) terhadap sel HeLa.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Menambah informasi kefarmasian terutama mengenai manfaat likopen dalam buah tomat.

2. Memberikan informasi mengenai keefektifan likopen dibuat dalam sediaan nanoemulsi.
3. Memperoleh pengetahuan mengenai potensi buah tomat sebagai obat untuk kanker leher rahim

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan botani

Tomat (*Solanum lycopersicum* syn. *Lycopersicum esculentum*) adalah tumbuhan keluarga *Solanaceae*, berasal dari Amerika Tengah dan Selatan, dari Meksiko sampai Peru. Kata tomat berasal dari bahasa Aztek, salah satu suku Indian yaitu xitomate atau xitotomate. Tanaman tomat menyebar ke seluruh Amerika, terutama ke wilayah yang beriklim tropik, sebagai gulma. Penyebaran tanaman tomat ini dilakukan oleh burung yang makan buah tomat dan kotorannya tersebar kemana-mana. Penyebaran tomat ke Eropa dan Asia dilakukan oleh orang Spanyol. Tomat ditanam di Indonesia sesudah kedatangan orang Belanda. Dengan demikian, tanaman tomat sudah tersebar ke seluruh dunia, baik di daerah tropik maupun subtropik (Tambunan, 2015).

2.1.1 Klasifikasi tomat (*Solanum lycopersicum* L.)



(sumber : <https://saprotan-utama.com>)

Gambar 1. Buah tomat

Adapun klasifikasi dari Buah Tomat menurut (Van Steenis, 1992) adalah sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae

Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Solanales
Famili	: Solanaceae
Genus	: Solanum
Spesies	: <i>Solanum lycopersicum</i> L.

2.1.2 Morfologi tomat

Terna setahun, tumbuh tegak atau bersandar pada tanaman lain, tinggi 0,5-2,5 m, bercabang banyak, berambut, dan berbau kuat. Batang bulat menebal pada buku-bukunya berambut kasar warnanya hijau keputihan. Daun majemuk menyirip, letak berseling, bentuknya bundar telur sampai memanjang, ujung runcing, pangkal membulat, helaian daun besar, tepinya bergerigi, panjang 10 sampai 40 cm, warnanya hijau muda (Nugroho, 2007).

Bunga majemuk terdiri dari 4 - 14 bunga, letak bunga di antara buku, pada ruas, menggantung, bunga berkumpul dalam rangkaian berupa tandan, bertangkai, mahkota berbentuk bintang, warnanya kuning. buahnya buah buni, berdaging, kulitnya tipis, licin mengkilap, beragam bentuk, warnanya kuning atau merah. Biji tomat berukuran kecil lebar 2 - 4 mm, panjang 3 - 5 mm, bentuknya seperti ginjal dengan berbulu (Nugroho, 2007)

2.1.3 Kandungan kimia tomat

Tomat termasuk salah satu jenis sayuran berbentuk buah yang mengandung karotenoid jenis likopen sebagai pemberi warna merah pada buah (Noviyandari, dkk., 2019: 323). Tomat salah satu jenis buah yang memiliki senyawa polifenol, likopen, karotenoid, dan vitamin C yang dapat bertindak sebagai antioksidan (Eveline, dkk., 2014: 22). Jenis karotenoid pada tomat yang dominan adalah pigmen likopen sedangkan polifenol sebagian besar terdiri dari flavonoid. Kandungan senyawa dalam buah tomat diantaranya solanim (0,007%), saponin,

asam folat, asam malat, asam sitrat, bioflavonoid (termasuk likopen, α dan β -karoten), lemak, protein, vitamin dan mineral. Ekstrak buah tomat mengandung lebih banyak likopen yaitu 50-116 $\mu\text{g/g}$ berat basah (Junnaeni, 2019: 759).

Tomat memiliki komposisi zat yang cukup lengkap seperti vitamin A dan vitamin C (Handrian, 2013: 335). Kandungan nutrisi buah tomat dalam 100 gram adalah vitamin C, A, E, K dan B-6, folat, *lycopene*, β -*carotene* dan lutein (Dewi, 2018: 123).

2.1.4 Manfaat tomat

Buah tomat berkhasiat sebagai antiseptik laksatif mengatasi gangguan pencernaan radang saluran nafas dan usus buntu tomatin dapat berkhasiat anti radang dan menurunkan permeabilitas pembuluh darah. Likopen dapat mencegah timbulnya tumor dan mengurangi resiko terkena penyakit jantung (Nugroho, 2007).

2.2 Tinjauan kimia

2.2.1 Likopen

Likopen adalah pigmen yang disintesis oleh tanaman dan mikroorganisme, yang memberi warna merah kekuningan pada buah dan sayuran, dan termasuk dalam kelompok karotenoid (Asroruddin, 2004). Seperti karotenoid lainnya, likopen memiliki bioavailabilitas yang bergantung pada sumber asupan makanan, ukuran partikel, dan lokasi karotenoid dalam kloroplast (Nugroho, 2007).

Secara struktural rumus kimia likopen $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ adalah lipofilik tetraterpen dengan ikatan rangkap terkonjugasi (faktor warna merah) dan struktur likopen pada tumbuhan adalah isomers all-trans. Likopen dalam tubuh (darah, cairan, dan

jaringan) dominan adalah isomer cis yang lebih mudah larut dalam air dan lebih banyak tersedia secara hayati (Annisa, 2021).

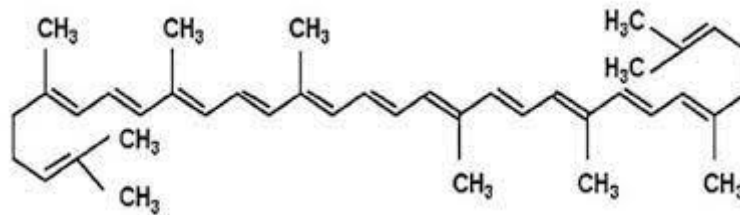
Likopen merupakan pigmen merah di beberapa sayuran dan buah yang memiliki kandungan penting sebagai makanan diet untuk manusia karena nilai *nutraceutical*, epidemiologi dan farmasi. Zat pewarna alami yang banyak digunakan dalam industri makanan sebagai pewarna makanan (Annisa, 2021). Likopen memberi banyak manfaat bagi manusia antara lain untuk menjaga kesehatan kulit, rambut, dan juga mencegah beberapa penyakit seperti penyakit jantung, kanker prostat dan stroke (Suyuti, *et al.*, 2018: 52). Tubuh manusia tidak dapat mensintesis likopen, sehingga untuk memenuhi kebutuhannya dari luar tubuh melalui makanan. Likopen dalam tubuh manusia disimpan dalam hati, paru-paru, kelenjar prostat dan kulit (Tristiyantri, *et al.*, 2013: 12). Likopen adalah karotenoid paling banyak yang terdapat pada buah tomat. Zat aktif yang terkandung pada buah tomat ini akan lebih bermanfaat jika bisa diolah menjadi sediaan farmasi. Untuk dikembangkan menjadi suatu sediaan perlu dilakukan proses ekstraksi buah tomat terlebih dahulu.

Menurut Malik dkk., (2013) Proses ekstraksi dengan pelarut organik menghasilkan ekstrak kasar (crude extract) sehingga dalam beberapa penelusuran senyawa aktif penting dilakukan purifikasi untuk mengeliminasi komponen yang dianggap sebagai pengganggu seperti lemak, klorofil, dll.

Penggunaan ekstrak terpurifikasi adalah alternatif untuk meminimalkan massa ekstrak untuk tujuan praktis pembuatan sediaan secara farmasetik karena beberapa komponen yang terkandung dapat dikurangi dengan proses ini. Hal ini untuk menjaga beberapa kandungan kimia ekstrak yang efeknya sinergis sehingga

memaksimalkan proses pengobatan karena dalam beberapa kasus, komponen kimia yang sudah diisolasi justru menunjukkan efek yang berkurang (Malik dkk., 2013).

2.2.2. Karakteristik Kimia Likopen



Gambar 2. Struktur Kimia Likopen (Mirahmadi, dkk., 2020)

Rumus molekul	: $C_{40}H_{56}$
Berat molekul	: 536,88
Pemeriaan	: kristal seperti jarum, panjang kecoklatan
Kelarutan	: tidak larut dalam air, larut dalam benzene, n-heksan, metilen klorida dan pelarut organik lain.
Jarak lebur	: $172^{\circ}\text{C} - 175^{\circ}\text{C}$
λ_{max}	: 446-506 nm
Penyimpanan	: temperatur $2^{\circ}\text{C}-8^{\circ}\text{C}$

2.2.3. Kestabilan Likopen saat Penyimpanan

Dalam studi oleh sharma dan maguer (1996) likopen yang terkandung dalam tomat dilaporkan menurun dibawah pemanasan yang berbeda. Faktor lainnya seperti asam, gula, udara, dan cahaya juga meningkatkan degradasi likopen. Selama penyimpanan, beku-kering sampel lebih rentan terhadap hilangnya likopen bila dibandingkan dengan sampel dikeringkan dalam oven antara 25°C dan 75°C (oikonomakos, I. 2006).

2.2.4. Isolasi Likopen

Isolasi adalah suatu cara untuk mengambil satu senyawa aktif yang terdapat di dalam tanaman untuk mengetahui senyawa yang berkhasiat dalam tanaman tersebut. Isolasi metabolit sekunder dari suatu tumbuhan terdiri atas tahapan penyiapan simplisia/sampel, ekstraksi, fraksinasi, pemurnian, dan karakterisasi senyawa isolat. Isolasi metabolit sekunder dari berbagai bagian tumbuhan memiliki tingkat kesulitan yang berbeda-beda. Beberapa faktor yang mempengaruhi tingkat kesulitan tersebut adalah ada tidaknya metabolit sekunder mayor dalam sampel dan jauh dekatnya R_f antara berbagai komponen dalam sampel. Faktor-faktor inilah yang harus dipertimbangkan sebelum merancang sebuah prosedur isolasi (Dewi, dkk., 2019).

Isolasi senyawa likopen pada buah tomat telah banyak dilakukan dengan prosedur yang berbeda-beda. Penelitian yang telah dilakukan Tarigan *et al.* (2016) konsentrat likopen telah berhasil diekstraksi dari buah tomat segar dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut heksana dan etil asetat dengan kadar 2,7 mg/150 ml dan 3,2 mg/150 ml. Christianty *et al.* (2015) mengekstrak likopen dari jus buah tomat lewat matang dengan metode cair-cair menggunakan pelarut campuran heksana : etil asetat (1:1) menghasilkan rendemen likopen terekstrak 2550 µg/110 g sampel (Dewi, dkk., 2019).

2.2.5. Uji Kualitatif Likopen

Menurut penelitian yang dilakukan Arifulloh dkk., (2016) uji kualitatif likopen dilakukan dengan cara membandingkan spektrum likopen standar dalam literatur dengan spektrum likopen hasil pengukuran. Secara umum serapan maksimum karotenoid berada pada tiga panjang gelombang yang dimunculkan

dalam bentuk tiga puncak spektrum. Senyawa dengan jumlah ikatan rangkap terkonjugasi yang lebih banyak memiliki nilai panjang gelombang maksimum (λ_{max}) lebih tinggi. Likopen dengan 11 ikatan rangkap terkonjugasi menyerap pada panjang gelombang yang paling tinggi dibandingkan karotenoid lainnya. Spektrum UV-tampak likopen khas pada daerah 400-550 nm, dengan 3 puncak utama di sekitar 444, 470, dan 502 nm.

2.2.6. Uji Kuantitatif Likopen

Penelitian yang dilakukan Fadillah (2012) pengujian kuantitatif dilakukan dengan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Hasil isolasi dari likopen dilarutkan dalam etil asetat-metanol (1:1 v/v) ke dalam labu ukur 10 ml. Diperoleh larutan hasil isolasi dengan konsentrasi 1500 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian pipet 3,5 ml ke dalam labu ukur 100 ml. Diperoleh larutan hasil isolasi dengan konsentrasi 52 $\mu\text{g/mL}$. ambil sebanyak 20 μl menggunakan *syringe*. Lalu suntikkan ke dalam KCKT dengan kondisi analisis optimum yang didapat sebelumnya. Kadar likopen dihitung dengan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi yang diperoleh.

2.2.7. Penetapan Kadar Likopen

Tomat segar dihaluskan dengan blender kemudian ditimbang 5 gram, masukkan ke dalam Erlenmeyer bertutup yang dilapisi dengan kertas aluminium foil pada bagian luar & terlindungi dari cahaya tambahkan 50 ml larutan (heksana : aseton : etanol = 2 : 1 : 1) v/v , dikocok selama 30 menit dengan magnetik stirer, pindahkan ke corong pisah kemudian tambahkan 10 ml air suling kemudian dikocok lagi selama 15 menit. Pisahkan lapisan polar dan lapisan non polar, ambil semua lapisan atas (non polar) masukkan dalam labu ukur 100 ml tambahkan

pelarut organik sampai tanda batas. Kadar likopen total ditentukan dari lapisan non polar (bagian atas) dengan spektrofotometer UV – Vis pada panjang gelombang maksimum 471 nm, dimana $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3450$ (Andayani, 2008).

2.3 Tinjauan Farmakologi

Likopen merupakan suatu antioksidan yang sangat kuat, kemampuannya mengendalikan singlet oksigen (oksigen dalam bentuk radikal bebas) 100 kali lebih efisien daripada vitamin E atau 12500 kali dari pada glutathione. Singlet oksigen merupakan prooksidan yang terbentuk akibat radiasi sinar ultra violet dan dapat menyebabkan penuaan dan kerusakan kulit. Selain sebagai anti penuaan kulit, lycopene juga memiliki manfaat untuk mencegah penyakit kardiovaskular, kencing manis, osteoporosis, infertiliti, dan kanker (kanker kolon, payudara, endometrial, paru-paru, pankreas, dan terutama kanker prostat). Ini semua diakibatkan banyaknya ikatan rangkap dalam molekulnya. Sebagai antioksidan, likopen dapat melindungi DNA, di samping sel darah merah, sel tubuh, dan hati. (Hu Weilian et al., 2013).

Bioavailabilitas likopen dipengaruhi oleh beberapa bentuk molekul, jumlah likopen dalam makanan, kandungan matriks bahan makanan, medium lemak atau minyak, efek serat makanan, dan interaksi dengan karotenoid. Metabolisme likopen terjadi bersamaan dengan metabolisme lemak (Asroruddin, 2004).

2.4 Tinjauan Farmasetik

2.4.1 Nanoemulsi

Nanoemulsi merupakan sediaan yang stabil secara termodinamik, dispersi transparan dari minyak dan air yang distabilisasi oleh interfisial film molekul surfaktan dan ko-surfaktan dan memiliki ukuran droplet kurang dari 100 nm

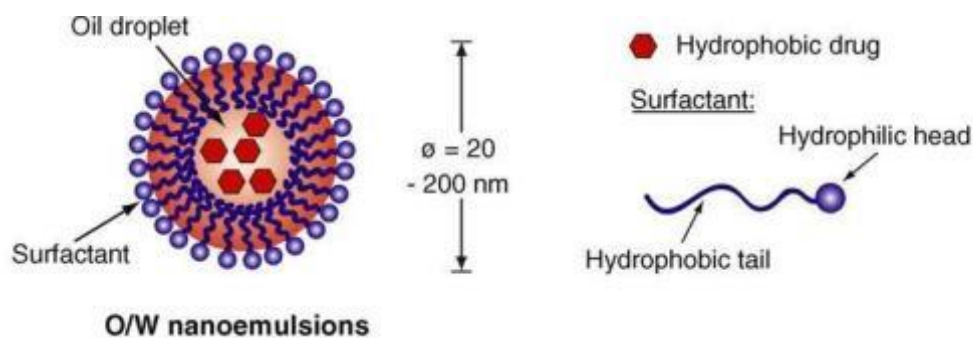
(Mardiyanto, 2018). Keuntungan nanoemulsi ialah dapat meningkatkan absorpsi, membantu melarutkan obat yang bersifat lipofilik, meningkatkan bioavailabilitas, dapat digunakan untuk pemberian obat rute oral, topikal, dan intravena, tidak menimbulkan masalah inheren, kriming, flokulasi, koalesen, dan sedimentasi, memiliki tegangan permukaan yang tinggi, dan energi bebas yang menjadikan nanoemulsi sebagai sistem transport yang efektif, membutuhkan jumlah energi yang relatif sedikit, dan stabil secara termodinamik (Kumar & Soni, 2017).

Nanoemulsi mengandung komponen utama, yaitu : Obat yang memiliki kelarutan rendah; fase minyak seperti asam oleat, minyak zaitun, minyak jarak; fase air, yaitu metanol dan etanol; surfaktan, yaitu tween 80, tween 20, dan span 20; serta ko-surfaktan, contohnya PEG 200, PEG 400, polisorbat 80 (Kumar & Soni, 2017). Pada jenis obat topikal, nanoemulsi dapat meningkatkan permeasi transdermal dari berbagai obat dibandingkan dengan formulasi topikal konvensional seperti emulsi dan gel (Sari, dkk., 2018).

Nanoemulsi membantu obat lipofilik agar terabsorpsi lebih cepat dan lebih baik dibandingkan dengan larutan minyak. Diameter droplet sistem bergantung dari tipe minyak, konten fase minyak, tipe surfaktan, dan temperatur . Fase minyak yang digunakan akan mempengaruhi ukuran droplet dan stabilitas nanoemulsi yang terbentuk. Fase minyak dalam nanoemulsi berperan sebagai pembawa yang dapat melarutkan zat aktif yang bersifat lipofilik. Fase minyak membentuk droplet dalam medium dispersi dengan adanya bantuan surfaktan dan ko-surfaktan (Sari, dkk., 2018).

Nanoemulsi dapat dibuat menggunakan 2 jenis metode, yaitu metode emulsifikasi energi tinggi, yaitu ultrasonikasi, mikrofluidisasi, dan homogenisasi

bertekanan tinggi (Patel *et al.*, 2013) dan emulsifikasi energi rendah, yaitu emulsifikasi spontan dan fase inversi (*phase inversion*) (Debnath *et al.*, 2011). Nanoemulsi dapat terbentuk secara spontan maupun tidak spontan bergantung pada energi yang diberikan saat proses pembentukan. Secara spontan (emulsifikasi energi rendah), nanoemulsi terbentuk dengan mencampurkan fase minyak dan fase air secara perlahan menggunakan stirrer (Bouchemal *et al.*, 2004). Secara tidak spontan (emulsifikasi energi tinggi) membutuhkan energi mekanik bertekanan tinggi dari luar untuk dapat memecah ukuran droplet menjadi lebih kecil. Struktur droplet pada tipe M/A terdiri atas surfaktan, kosurfaktan, dan fase minyak yang membawa obat atau zat aktif yang bersifat hidrofobik. Bagian hidrofobik pada ekor surfaktan akan melingkupi fase minyak sedangkan bagian kepalanya akan bersifat hidrofilik akan berada pada bagian luar seperti yang ditunjukkan pada gambar (Chen *et al.*, 2010).



Gambar 3 . Bentuk droplet nanoemulsi tipe O/W (Chen *et al.*, 2010)

2.4.2 Komponen Nanoemulsi

1. Fase Minyak

Komponen minyak berpengaruh ada kemampuannya untuk menembus wilayah ekor dari surfaktan. Panjang rantai atom asam lemak akan berpengaruh pada lipofilitas minyak dan *Hidrophilic- Lipophilic Balance* (HLB). Semakin panjang

rantai hidrokarbon dari asam lemak maka lipofilitas minyak meningkat dan dapat meningkatkan kelarutan obat yang bersifat lipofil, sehingga berpengaruh pada kelarutan system nanoemulsi. Diketahui pula asam lemak dengan rantai atom C yang lebih pendek menghasilkan ukuran droplet nanoemulsi yang lebih kecil (Wooster *et al.*, 2008). Kriteria utama untuk pemilihan minyak adalah bahwa obat harus memiliki kelarutan yang tinggi di dalamnya (pathan *et al.*, 2012). Contoh dari fase minyak yaitu asam oleat, minyak zaitun, minyak kelapa.

2. Surfaktan

Surfaktan merupakan senyawa yang memiliki gugus lipofil dan hidrofili dalam molekulnya yang dapat menurunkan tegangan permukaan. Surfaktan dapat menurunkan tegangan permukaan antara fase minyak dan air, menghasilkan jumlah energi yang dibutuhkan untuk merusak globul dan menghasilkan ukuran globul yang lebih kecil. Surfaktan yang banyak digunakan antara lain: Span 80, Brij 35, Brij 85 (Santos *et al.*, 2008), tween 80 dan tween 20 (Kumar *et al.*, 2010).

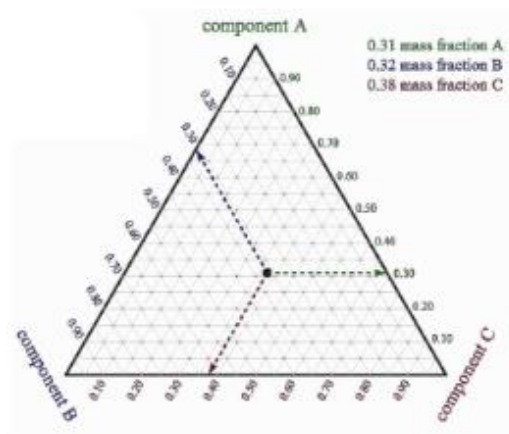
3. Kosurfaktan

Kosurfaktan berfungsi untuk membantu surfaktan menurunkan tegangan permukaan (Santos *et al.*, 2008) dengan mengisi celah-celah diantara molekul-molekul surfaktan pada permukaan droplet. Untuk mengisi celah-celah diantara molekul-molekul surfaktan tersebut diperlukan molekul yang relative kecil. Secara luas molekul yang dapat berfungsi sebagai kosurfaktan meliputi surfaktan nonionik, alkohol, asam alkanoat, alkanediol dan alkil amina, etanol, butanol. (Lawrence *et al.*, 2000). Contoh kosurfaktan yaitu PEG 200, PEG 400, polisorbat 80.

2.4.3 Diagram Fase Terner

Diagram terner adalah diagram yang memiliki bentuk segitiga sama sisi yang mana sudutnya ditempati oleh komponen zat. Sisi dari segitiga sama sisi tersebut terbagi dalam ukuran yang menyatakan bagian 100% zat yang ada pada setiap sudutnya. Untuk menentukan posisi titik dalam diagram segitiga yang menunjukkan jumlah kadar dari masing-masing komponen (Levine, 2009). Fasa adalah kondisi materi yang seragam diseluruh bagiannya, bukan hanya dalam komposisi kimia dalam keadaan fisiknya. Dalam kesetimbangan fase harus memiliki temperatur dan tekanan yang sama, yang tidak terpisah oleh suatu dinding keras atau suatu antar permukaan yang memiliki lengkung berarti (Dogra, 2009).

Diagram fase segitiga digunakan untuk menunjukkan kesetimbangan fase dengan sistem komposisi, yang mana setiap sudutnya menggambarkan komponen yang murni (Alberty, 1983). Berikut gambaran komposisi dalam diagram terner



Gambar 4. Diagram Fase Terner (Alberty, 1983)

- Titik sudut A : Komposisi A murni
- Titik sudut B : Komposisi B murni
- Titik sudut C : Komposisi C murni
- Titik pada sisi AB : Campuran biner A dan B

Titik pada sisi BC : Campuran biner B dan C
Titik pada sisi AC : Campuran biner A dan C
Titik dalam segitiga : Campuran terner A, B, dan C

2.5 Preformulasi Nanoemusi

1. Virgin Coconut Oil (VCO)

Minyak Kelapa Murni (Virgin Coconut Oil atau VCO) merupakan produk olahan asli Indonesia yang terbuat dari daging kelapa segar yang diolah pada suhu rendah atau tanpa melalui pemanasan, sehingga kandungan yang penting dalam minyak tetap dapat dipertahankan (Tanasale, 2013).

Kandungan utama VCO adalah asam lemak jenuh sekitar 90% dan asam lemak tak jenuh sekitar 10%. Asam lemak jenuh VCO didominasi oleh asam laurat. VCO mengandung $\pm$ 53% asam laurat dan sekitar 7% asam kaprilat. Keduanya merupakan asam lemak rantai sedang yang biasa disebut Medium Chain Fatty Acid (MCFA). VCO mengandung 92% lemak jenuh, 6% lemak mono tidak jenuh dan 2% lemak poli tidak jenuh (Pratiwi, dkk., 2018). Kandungan antioksidan di dalam VCO pun sangat tinggi seperti α - tokoferol dan polifenol. Kandungan tokoferol (0,5 mg/100 g minyak kelapa murni) dapat bersifat sebagai antioksidan dan dapat mengurangi tekanan oksidatif (suatu keadaan dimana tingkat oksigen reaktif intermediat (reactive oxygen intermediate/ROI) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen) yang diakibatkan oleh paparan sinar UV (Hernanto dkk., 2008).

2. Tween 80

Tween 80 juga dikenal sebagai polisorbitat 80 (polioksietilen 20 sorbitan monoleat). Tween 80 adalah surfaktan non-ionik yang deskripsinya dalam bentuk larutan minyak kuning, larut dalam etanol dan air, tidak larut dalam minyak

mineral dan minyak nabati, memiliki nilai HLB 15. Polisorbat stabil dalam elektrolit, asam lemah dan basa. Polisorbat biasanya digunakan dalam kosmetik, produk makanan, formulasi oral, parenteral, dan topikal umumnya dianggap sebagai bahan yang tidak beracun dan tidak menyebabkan iritasi (Rowe *et al.*, 2009).

3. Polyethylene glycol-400 (PEG-400)

PEG secara luas digunakan dalam berbagai sediaan kefarmasian yang mencakup parenteral, topikal, ophthalmic, oral dan rektal. PEG dengan berat molekul 200-600 adalah cairan, BM diatas 1000 pada suhu ruangan berbentuk padat. Pada salut film film coating PEG dapat digunakan sebagai plasticizer, mikroenkapsulasi dan menutupi lapisan tablet salut film. Pada BM diatas 6000 PEG dapat berfungsi sebagai lubricants pelicin. PEG dengan BM 400 dapat digunakan sebagai plasticizer yang baik dan praktis karena bentuknya yang cair. PEG-400 banyak digunakan dalam formulasi dan memiliki sifat yang tidak beracun dan tidak mengiritasi. (Rowe, 2009).

PEG merupakan salah satu jenis bahan pembawa yang sering digunakan sebagai bahan tambahan dalam formulasi untuk meningkatkan kelarutan obat yang sukar larut (Sinko, 2006).

2.6 Monografi Bahan Pembuat Nanoemulsi

2.6.1 Tween 80

(Depkes, 1995; Rowe, 2006)

Pemerian	: Cairan seperti minyak, jernih berwarna kuning muda hingga coklat muda, bau khas lemah, rasa pahit dan hangat.
Kelarutan	: Sangat mudah larut dalam air; larutan tidak berbau dan praktis tidak berwarna; larut dalam etanol, dalam etil asetat; tidak larut dalam minyak mineral.

Bobot jenis : 1,06 – 1,09 g/ml.
Kekentalan : 300-500 sentitokes pada suhu 25°C
Konsentrasi : Emulgator M/A = 1-15%, Emulgator A/M = 1-10%
Penyimpanan : Dalam wadah yang tertutup rapat
Khasiat : Pengemulsi, Surfaktan, Pelarut, Pembasah, dan Pensuspensi

2.6.2 Virgin Coconut Oil (VCO)

(Rowe, 2006)

Pemerian : Minyak bening tidak berwarna atau kuning muda, sedikit bau khas kelapa dan rasanya ringan
Khasiat : Emollient, dasar salep
Penyimpanan : Wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya

2.6.3 Polyethylene glycol-400 (PEG-400)

(Depkes, 1975)

Rumus Molekul: $H(O-CH_2-CH_2)_nOH$.

Berat Molekul : 380-420.

Pemerian : Cairan kental jernih; tidak berwarna atau praktis tidak berwarna; bau khas lemah; agak higroskopis.

Kelarutan : Larut dalam air, dalam etanol 95% P, dalam glikol lain.

Titik Beku : 4° C sampai 8° C.

Bobot Jenis : 1,110-1,140

Kekentalan : 6,8 cS – 8,0 cS

Penyimpanan : Wadah tertutup rapat

2.7 Kanker Serviks

Serviks (leher rahim) adalah bagian bawah atau ujung terendah dari rahim (uterus) yang menempel pada bagian atas vagina. Serviks merupakan organ yang menghubungkan rahim dengan vagina (Nurlelawati et al., 2018). Kanker serviks atau kanker leher rahim adalah keganasan yang dimulai pada sel-sel serviks (leher rahim). Kanker serviks terjadi sangat lambat mulai dari lapisan serviks. Awalnya,

beberapa sel normal berubah menjadi sel pra-kanker, kemudian berubah menjadi sel kanker (Huzeiry, 2020).

Penyebab paling utama terjadinya kanker serviks belum diketahui. Tetapi dalam beberapa tahun terakhir, para ilmuwan dalam penelitiannya mengatakan bahwa virus yang disebut HPV merupakan penyebab perkembangan kanker serviks pada wanita lebih meningkat (ACS, 2014). HPV (Human Papiloma Virus) adalah DNA virus yang menimbulkan poliferasi pada permukaan epidermal dan mukosa. Penelitian menunjukkan bahwa 10-30 % wanita pada usia 30'an tahun yang sexually active pernah menderita infeksi HPV (termasuk infeksi pada daerah vulva) lebih beresiko tinggi terkena kanker serviks. Karsinogenesis pada kanker serviks sudah dimulai sejak seseorang terinfeksi HPV yang merupakan faktor inisiator dari kanker serviks yang menyebabkan terjadinya gangguan sel serviks (Rasjidi, 2009). Pada sebagian besar kasus, infeksi HPV berlangsung tanpa gejala dan bersifat menetap (Arisusilo, 2012).

2.7.1 Sel HeLa

Kultur sel HeLa atau *HeLa cell line* merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (serviks) seorang wanita bernama Henrietta Lacks yang merupakan penderita kanker leher rahim dan meninggal akibat kanker pada tahun 1951. Penelitian sel HeLa pertama kali dilakukan di laboratorium kultur jaringan oleh Dr George O Gay di Johns Hopkins (Baltimore, Maryland) (Huzeiry, 2020).

Sel HeLa tidak dapat mati karena tua (immortal) serta dapat membelah secara tidak terkendali dan terbatas selama terpenuhinya kondisi dasar yang dapat mendukung sel untuk tetap hidup. Strain-strain baru dari sel HeLa telah

dikembangkan dalam berbagai macam kultur sel, tapi semua sel HeLa berasal dari keturunan yang sama. Sel HeLa dapat tumbuh dengan cepat dalam media kultur. DMEM merupakan media yang digunakan untuk kultur sel HeLa. DMEM mengandung konsentrasi tinggi asam amino, vitamin, serta glukosa yang menjadi nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan sel (Rohanova, *et al.*, 2014). Sel HeLa telah mengalami transformasi yang disebabkan oleh infeksi human papilloma virus 18 dan berbeda dengan sel leher rahim yang normal (Huzeiry, 2020).

2.8 Uji sitotoksik

Toksisitas didefinisikan sebagai segala hal yang memiliki efek berbahaya dari zat kimia atau obat pada organisme target. Uji toksisitas terdiri dari dua jenis, yaitu toksisitas umum (akut, subakut/subkronis, kronis) dan toksisitas khusus (teratogenik, mutagenik dan karsinogenik). Tujuan uji ini adalah untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung terhadap kultur jaringan. Ada berbagai metoda untuk menilai sitotoksisitas suatu bahan antara lain esei MTT, agar *overlay*, filter molekul, pembebasan isotop kromium, dan metoda pewamaan eksklusi dengan *trypan blue* (Siregar & hadijono, 2000).

2.8.1 Metode MTT assay

MTT assay merupakan metode pengukuran viabilitas sel untuk menguji kelangsungan hidup sel selama apoptosis. Metode ini pada awalnya dijelaskan untuk mengukur poliferasi sel dalam uji sitotoksik. Metode MTT assay telah sangat banyak digunakan dalam skrining obat dan pengujian sensitivitas obat untuk berbagai lini sel tumor. Keuntungan utama dari metode MTT assay yaitu metode ini merupakan metode yang cepat dan kuantitatif untuk mengukur jumlah sel yang masih hidup. Pengujian ini didasarkan pada kemampuan sel untuk

mereduksi senyawa garam kuning muda menjadi produk formazan berwarna biru tua (Hannun & Boustany, 1998).

MTT assay didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi formazan yang berwarna biru-ungu dan tidak larut. Produk formazan dilarutkan dalam pelarut, dan intensitas warna diukur dengan spektrofotometer. Untuk mengukur intensitas warna digunakan pembaca mikroskop 96-sumur yang biasa digunakan untuk ELISA. Jumlah formazan yang dihasilkan dan kemudian diukur setelah dilarutkan, berbanding secara proporsional dengan jumlah sel, walaupun absorbansi absolut berbeda antara berbagai galur sel. Makin pekat warnanya, makin tinggi nilai absorbansinya, dan ini berarti makin banyak jumlah selnya (Siregar & Hadijono, 2000). Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel yang artinya semakin besar intensitas warna ungu, maka semakin banyak jumlah sel yang hidup. Kemudian nilai absorbansi diukur menggunakan *ELISA reader* (CCRC, 2013). Uji sitotoksik ini untuk mengetahui potensi antikanker suatu ekstrak ataupun senyawa yang dinyatakan dengan IC₅₀, yang merupakan konsentrasi larutan uji yang dapat membunuh 50% populasi sel (Suzery & Cahyono, 2014).

2.9 ELISA reader

ELISA reader merupakan salah satu instrumen yang cara kerjanya mirip dengan spektrofotometer UV-Vis dengan sensitivitas dan spesifitas yang lebih tinggi. Pada umumnya ELISA digunakan sebagai metode atau teknik biokimia dengan prinsip reaksi kompleks antigen-antibodi dengan melibatkan peran enzim dan substrat sebagai indikator dalam reaksi (Maryam, 2020).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan suatu teknik biokimia untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. ELISA dipakai untuk pengujian semua antigen, hapten atau antibody. Prinsip kerja dari teknik ELISA adalah berdasarkan reaksi spesifik antara antibody dan antigen dengan menggunakan enzim sebagai penanda (marker). Enzim tersebut akan memberikan suatu tanda terdapatnya suatu antigen jika antigen tersebut sudah bereaksi dengan antibodi. Reaksi tersebut memerlukan antibody spesifik yang berikatan dengan antigen (Baker dkk, 2007)

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu Dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan selama 6 bulan pada bulan Mei - November tahun 2022 di Laboratorium Penelitian Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia (UPERTIS), PT. DKSH Indonesia dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

3.2 Alat Dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *PSA/Particle Size Analyzer* (Malvern), magnetic stirrer, kaca arloji, gelas ukur, cawan penguap, corong, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, botol semprot, batang pengaduk, beker gelas (Pyrex), spatel, timbangan analitik (OHAUS), kaca objek, piknometer, viskometer *Brookfield* (Brookfield Engineering Laboratories) ,pH meter (Jenway 3510), oven (Mettler UN30), sentrifugator (Gemmy), mikropipet, 96 *well plate*, tempat buangan media bekas, *culture dish*, *elisa reader*, *hemocytometer*, *counter*, *conical tube*, *BSC*, inkubator CO₂, *conical eppendorf*, *waterbath*, dan *mikrotube*, pipet volume

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ekstrak terpurifikasi buah tomat (diambil dari penelitian sebelumnya), aquadest, N-Heksana, VCO, tween 80, PEG 400, metilen blue, nipagin, media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), sel HeLa, PBS (*Phosphat Buffer Salin*), Tripsin-EDTA 0,25%, SDS 10%, garam MTT, aluminium foil, dan *reagen stopper*.

3.3. Formulasi Nanoemulsi

3.3.1 Konstruksi Diagram Fase Ternern

Pembuatan diagram fase ternern dilakukan dengan memplot 10 – 90 % (b/b) fase minyak, 90 – 10 % (b/b) surfaktan dan kosurfaktan. Perbandingan minyak dan s+ks adalah 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, rancangan fase ternern dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 1. Komposisi basis Nanoemulsi

Formula	A	B	C	D	E	F
Minyak + (S +KS)	20	30	40	50	60	70
Rasio Minyak : (S+KS)	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9
	2:8	2:8	2:8	2:8	2:8	2:8
	3:7	3:7	3:7	3:7	3:7	3:7
	4:6	4:6	4:6	4:6	4:6	4:6
	5:5	5:5	5:5	5:5	5:5	5:5
	6:4	6:4	6:4	6:4	6:4	6:4
	7:3	7:3	7:3	7:3	7:3	7:3
	8:2	8:2	8:2	8:2	8:2	8:2
	9:1	9:1	9:1	9:1	9:1	9:1
Air (%)	80	70	60	50	40	30
Total	100	100	100	100	100	100

3.3.2 Optimasi Nanoemulsi

Ditimbang masing-masing bahan. Fase minyak (VCO dan tween 80) dimasukkan dalam *beaker glass* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* pada suhu 70°C kecepatan 1400 rpm selama kurang lebih 60 menit. Ditambahkan PEG 400 secara perlahan kedalam fase minyak. Lalu ditambahkan aquadest secara perlahan menggunakan pipet tetes sampai terbentuk masa bewarna bening. Diamkan hingga dingin kemudian dimasukkan kedalam wadah sediaan. Setelah itu sediaan didiamkan hingga 24 jam untuk melihat kestabilan larutan nanoemulsi

dari kejernihan dan tidak terjadi pemisahan fase. Dari 54 formula dipilih basis yang jernih yang selanjutnya dilakukan evaluasi.

3.3.3 Formula Nanoemulsi Ekstrak Terpurifikasi Buah Tomat

Tabel 2. Formula Nanoemulsi Ekstrak Terpurifikasi Buah Tomat

Komposisi	sD1	sE1	sF1	sF2
Ekstrak Buah Tomat	0,01 g	0,01 g	0,01 g	0,01 g
VCO	4,9995 g	5,9994 g	6,9993 g	13,9986 g
Tween 80	35,9964 g	43,1956 g	50,3949 g	44,7955 g
PEG 400	8,9991 g	12,5987 g	12,5987 g	11,1988
Aquadest	49,995 mL	39,996 mL	29,997 mL	29,997 mL

3.3.4 Pembuatan Nanoemulsi Ekstrak Terpurifikasi Buah Tomat

Ditimbang masing-masing bahan. Fase minyak (VCO + ekstrak terpurifikasi buah tomat dan tween 80) dimasukkan dalam *beaker glass* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dengan suhu 70°C kecepatan 1400 rpm ($\pm$ 60 menit). Kemudian fase air (PEG 400) dimasukkan ke dalam fase minyak sedikit demi sedikit menggunakan pipet tetes lalu ditambahkan aquadest secara perlahan sampai terbentuk masa bewarna bening dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dengan suhu 70°C kecepatan 1400 rpm ($\pm$ 60 menit) hingga terbentuk masa bewarna bening. Diamkan hingga dingin kemudian dimasukkan kedalam wadah sediaan.

3.4 Evaluasi Nanoemulsi

1. Pemeriksaan Organoleptis

Uji ini untuk mengetahui dan mengidentifikasi karakteristik sistem nanoemulsi. Uji organoleptis dilakukan dengan cara mengamati tampilan fisik dari sediaan, meliputi bentuk, warna, bau, kejernihan, dan pemisahan fase. Pengujian dilakukan selama 6 minggu. Pengamatan ini dilakukan pada nanoemulsi yang disimpan pada suhu kamar (Depkes RI, 1995).

2. Pemeriksaan Homogenitas

Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan menggunakan kaca objek. Pengujian ini dilakukan dengan cara menggunakan 2 kaca objek. Ambil sediaan 1 tetes kemudian dioleskan pada kaca arloji dan diraba untuk melihat rata atau tidaknya sediaan (Depkes RI, 1979).

3. Penentuan Bobot Jenis

Bobot jenis diukur menggunakan piknometer. Bobot jenis sediaan diukur dengan perhitungan sebagai berikut (Depkes RI, 1995).

$$\text{Bobot jenis} = \frac{A2 - A \times \rho \text{ air}}{A1 - A}$$

Keterangan :

A : Piknometer Kosong

A1 : Piknometer Berisi Air

A2 : Piknometer Berisi Nanoemulsi

ρ Air : Massa Jenis Air

4. Uji pH

Uji pH dapat dilakukan dengan menggunakan pH meter pada suhu ruang. Kemudian 1 g sediaan dilarutkan dalam 10 ml aquadest aduk hingga homogen. Elektroda dicelupkan ke dalam sediaan yang telah dilarutkan tersebut hingga nilai pH muncul di layar. Hasil pH dicatat dan pengujian dilakukan selama 6 minggu (Florida, 2021).

5. Pemeriksaan Tipe Emulsi

Pemeriksaan tipe sediaan dilakukan dengan cara 0,5 g sediaan di letakkan di atas kaca objek kemudian di teteskan *metilen blue* sebanyak 1 tetes lalu aduk dan lihat penyebaran warnanya. Jika sediaan merupakan tipe minyak dalam air maka warna *metilen blue* akan larut di dalamnya dan berdifusi merata keseluruh bagian

dari air. Jika sediaan merupakan tipe air dalam minyak maka tidak larut dan tidak homogen (Depkes RI, 1985).

6. Uji sentrifugasi

Sebanyak 5 g sediaan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 30 menit kemudian dilakukan pengamatan. Nanoemulsi yang stabil dapat diamati dengan tidak terjadi pemisahan pada kedua fase atau tanda-tanda creaming (Florida, 2021).

7. Stabilitas sediaan

a. *freeze thaw*

Uji *freeze thaw* dilakukan dengan cara sediaan nanoemulsi ekstrak terpurifikasi di masukkan ke dalam vial kosong kemudian disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam lalu dipindahkan ke dalam oven bersuhu $40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (satu siklus). Uji stabilitas dilakukan sebanyak 6 siklus amati apakah terjadi pemisahan fase (Florida, 2021).

b. Pada Suhu Ruang

Dilakukan dengan cara sediaan nanoemulsi ekstrak terpurifikasi di masukkan ke dalam vial kosong kemudian di simpan pada suhu ruang selama 24 jam. Amati selama 6 minggu apakah terjadi pemisahan fase (Florida, 2021).

8. Penentuan Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan cara 50 g sediaan ditempatkan dalam viscometer brookfield, dan pengukuran viskositasnya dimulai saat jarum spindel bergerak dan stabil dengan kecepatan 30 rpm (Sulastri, 2017). Penentuan viskositas sediaan dilakukan pada minggu ke 1 dan minggu ke 6 pada suhu ruang (Florida, 2017).

9. Zeta Potensial, Uji Ukuran Partikel dan *polydispersi index* (PDI)

Sebanyak 1 g sediaan didispersikan dalam 5 mL akua deion lalu diukur Zeta Potensial, ukuran partikel dan *polydispersi index* menggunakan *PSA/Particle Size Analyzer* (Rachmawati *et al.*, 2014).

3.5 Pembuatan Media

Media padat DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) disiapkan, kemudian dimasukkan 950 mL *aquabidest* steril dalam gelas beker 1 liter di dalam LAF. Media bubuk dituang ke dalam *aquabidest* steril ke dalam gelas beker, aduk hingga rata. Bagian dalam pembungkus media bubuk dibilas dengan *aquabidest*, tuang cairannya kedalam gelas beker di atas. NaHCO_3 ditambahkan sebanyak 2,2 gram untuk setiap liter media yang dibuat, diaduk rata. *Aquabidest* steril ditambahkan hingga volume 1 liter. Media padat dan NaHCO_3 diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga semua dapat larut. *Adjusting pH* dilakukan (seharga 0,2-0,3 dibawah pH yang diinginkan) dengan menambahkan NaOH 1 N atau HCl 1 N. Filtrasi media dilakukan dengan menggunakan filter 0,2 mikron, tamping ke dalam botol duran 500 mL. Media diberi penanda dan simpan di kulkas dengan suhu 40°C. Pembuatan media komplit DMEM dibuat dari 100 mL DMEM *stock* ditambah *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebanyak 10%, antibiotika penisillin-streptomisin 2% dan *Fungizone* (Amphoteresin) 0,5% (Seran, dkk., 2020).

3.6 Kultur Sel

3.6.1 Sel HeLa

Alat dipersiapkan dan bahan dikondisikan pada suhu ruangan, lalu diambil 10 ml media DMEM pada tabung konikel. Diambil ampul dari freezer -80°C atau

tangki nitrogen, lalu dicairkan pada suhu kamar. Diambil suspensi sel dalam ampul dan dimasukkan tetes demi tetes ke dalam media DMEM yang telah disiapkan. Disentrifus pada kecepatan 600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 4 ml MK-DMEM dan resuspensi hingga homogen. Ditransfer masing-masing 2 ml ke dalam flask kultur baru. Ditambahkan 5 ml MK ke dalam masing-masing flask kultur dan dihomogenkan. Kondisi sel diamati dengan menggunakan mikroskop inverted. Sel dipastikan homogen pada seluruh permukaan flask kultur (tidak menggerombol pada bagian tertentu). Beri identitas pada flask kultur, kemudian simpan dalam inkubator CO₂ (Delarosa, 2021).

3.6.2 Subkultur Sel

Alat dipersiapkan dan dikondisikan bahan pada suhu ruangan, pengerjaan dilakukan di dalam LAF. Proses panen sel dilakukan dengan cara mengambil 500 µl panen sel dan dimasukkan ke dalam flask kultur. Sebanyak 6 ml MK ditambahkan dan dihomogenkan. Inkubasi sel pada inkubator CO₂ dan diamati kondisi sel pada keesokan harinya (Delarosa, 2021).

3.6.3 Panen Sel

Diambil sel dari incubator CO₂ lalu diamati kondisi sel jika pada mikroskop interved masih terdapat 80% mitokondria yang hidup, maka sel dapat dilanjutkan dipanen. Lalu dibuang media dengan mikropipet steril, lalu dicuci sel dengan 5 ml PBS sebanyak 2 kali dengan volume $\frac{1}{2}$ dari volume media awal. Langkah selanjutnya yaitu ditambahkan 400 µl tripsin EDTA 0,25% secara merata untuk melepaskan sifat aderen pada sel lalu diinkubasi selama 3 menit. Langkah selanjutnya yaitu ditambahkan media kurang lebih 5 ml untuk menginaktivasi

tripsin. Lalu diamati dalam mikroskop dan diresuspensi jika masih terdapat sel yang bergerombol. Lalu diletakkan sel dalam *conical* steril baru (Nuraini, 2018).

3.6.4 Perhitungan Sel

Resuspensi sel dalam *conical tube* yang telah dipanen lalu diambil 10 μ l panen sel dan dipipet ke dalam hemositometer. Dihitung jumlah sel dibawah mikroskop *interved* dengan menggunakan counter. Perhitungan dilakukan pada sel yang hidup saja ditandai dengan terdapatnya bercak hitam sebagai mitokondria sel. Sisi yang dihitung hanya bagian kanan dan bawah hemositometer. Langkah selanjutnya yaitu diambil volume panen sel, ditranfer ke tabung konikel baru dan ditambahkan MK sampai total volume yang diperlukan (Nuraini, 2018).

3.7 Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Uji

Sediaan nanoemulsi dilarutkan dalam DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sebanyak 1000 μ l, divortex agar sampel terlarut sempurna kemudian dicukupkan dengan media MK. Dibuat pengenceran selanjutnya sampai diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, dan 62,5 μ g/ml,. Semua pengenceran dilakukan dengan menggunakan media MK DMEM (Delarosa, 2021).

3.8 Uji sitotoksitas

3.8.1 Pewarnaan sel menggunakan MTT (Microtetrazolium)

Dibuat reagen MTT dengan cara mengencerkan MTT dari konsentrasi 5 mg/ml menjadi 0,5 mg/ml dengan MK (media komplit). Langkah selanjutnya yaitu dibuang media dalam plate dengan ditap pada tissue. Lalu diisi kontrol medium menggunakan MK DMEM dan kontrol sel menggunakan sel HeLa. Setelah semua plate terisi penuh dengan 5 konsentrasi ekstrak, kontrol sel dan

kontrol medium plate diinkubasi selama 3 - 6 jam. Langkah berikutnya yaitu ditambah 100 µl SDS stop untuk melarutkan serabut formazan yang tertutup. Langkah selanjutnya yaitu dilakukan inkubasi selama 72 jam pada suhu ruang untuk menunggu reaksi pembentukan serabut formazan (Nurani, 2018).

3.8.2 Pembacaan plat dengan ELISA reader

Pembacaan plate menggunakan *Elisa reader* pada prinsipnya dapat mengabsorbansi pewarnaan sel berdasarkan intensitas warna yang dibentuk. Panjang gelombang yang digunakan sekitar 595nm. Absorbansi yang dihasilkan kontrol medium rendah sedangkan pada kontrol sel tinggi karena serabut formazan yang dihasilkan dalam kontrol medium tidak terbentuk sedangkan pada kontrol sel banyak. Langkah selanjutnya yaitu dianalisis hasil absorbansi menggunakan *microsoft excel* untuk mengetahui presentase sel hidup yang akan dinyatakan sebagai IC₅₀ (Nurani, 2018).

3.9 Perhitungan Data

Data yang diperoleh dari uji sitotoksitas, sel dikonversi ke dalam persen sel hidup. Persen sel hidup dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ hidup} = \frac{\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

3.10 Analisa Data

Hasil dianalisis dengan menggunakan *microsoft excel*. Aktivitas sitotoksik dinyatakan dalam IC₅₀ (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel) (Delarosa, 2021).