

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

SKRIPSI



Oleh :

USWATUN CHASANAHA
NIM : 1904094

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

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tomat merupakan salah satu tanaman yang mengandung senyawa polifenol, asam askorbat, potasium, vitamin A, vitamin C dan karotenoid. Karotenoid yang dominan adalah likopen (Eveline dkk.,2014). Pada penelitian (Fadilah, 2012) kadar likopen yang diperoleh dari 30 kg tomat sebesar 21,83%; 5,14/100g pada penelitian (Maulida & Naufal, 2014). Likopen berbentuk kristal seperti jarum, likopen larut dalam kloroform, benzene, n-heksana dan pelarut organik lainnya. Likopen merupakan nutrisi yang sangat penting bagi tubuh manusia yaitu sebagai penyedia provitamin dan aktivitas antioksidan. Likopen mampu mengurangi penyakit seperti kanker, osteoporesis, kencing manis dan kardiovaskular (Argarwal dan Rao, 2000).

Penelitian-penelitian sebelumnya mengindikasikan bahwa wanita yang mengkonsumsi likopen rendah lebih rentan terkena kanker serviks dan kanker ovarium dibandingkan dengan yang mengkonsumsi likopen tinggi (Peng, dkk., 1998). Pada penelitian (Aktepe dkk., 2021) likopen memperkuat efek dari cisplatin pada sel kanker serviks manusia dengan protein dan faktor transkripsi sedangkan pada penelitian (Shejawal, dkk., 2021) menyatakan hasil analisis nanopartikel likopen yang diekstraksi dari tomat menunjukkan aktivitas sitotoksik yang baik terhadap sel kanker kolon, HT29 dan sel kanker serviks HeLa *cell line* juga dapat memberikan pengobatan antikanker potensial untuk terapi kanker.

Likopen merupakan senyawa hidrokarbon yang menjadikannya bersifat non polar. Likopen dapat mengalami penurunan bioavailabilitas karena adanya cahaya (Liu dkk., 2015). Salah satu sediaan farmasi yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah akibat bioavailabilitas dari bahan aktif adalah nanoemulsi yang

termasuk salah satu nanopartikel (Sari dkk., 2015). Nanoemulsi merupakan sediaan yang terdiri dari minyak, surfaktan dan kosurfaktan dengan komposisi yang sesuai sehingga menghasilkan campuran yang stabil (Gurpret & Singh, 2018).

Nanoemulsi merupakan sistem emulsi transparan dari dispersi antara minyak dan air yang distabilkan oleh interfisial film molekul surfaktan dan kosurfaktan dan memiliki ukuran droplet kurang dari 200 nm (Aulton, 2013). Sistem penghantaran sediaan berukuran nano berguna untuk membawa, melindungi dan melepaskan senyawa bioaktif serta meningkatkan bioavailabilitas senyawa lipofilik (Shafiq dkk., 2007). Nanoemulsi memiliki keuntungan yaitu meningkatkan bioavailabilitas, dapat meningkatkan penyerapan, membantu melarutkan obat lipofilik, tidak menunjukkan masalah seperti *creaming*, *coalescence*, flokulasi dan sedimentasi. Nanoemulsi memiliki luas permukaan yang besar dan energi yang bebas, sehingga menjadikannya sistem transportasi yang efektif, jumlah kebutuhan energi yang lebih sedikit dan stabil secara termodinamika (Kumar dkk, 2017).

Nanoemulsi termasuk ke dalam salah satu sistem penghantaran obat nanopartikel. Nanopartikel memiliki kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal, kemampuan untuk menembus sel lebih tinggi, baik melalui difusi maupun opsonifikasi dan fleksibilitasnya. Nanoemulsi meningkatkan efisiensi penetrasi liposom yang telah diketahui dapat menembus berbagai membran lipid dengan baik sehingga dapat digunakan dalam sistem penghantaran obat untuk kanker (Martien dkk., 2012).

Berdasarkan uraian di atas dilakukan formulasi nanoemulsi dari ekstrak semi polar terpurifikasi buah tomat (*Solanum Lycopersicum L.*) dan uji sitotoksik terhadap sel kanker HeLa dengan metode kolorimetrik Microtetrazolium (MTT)

assay dengan membaca absorbansi dari formazan yang dihasilkan dengan menggunakan ELISA reader, dan hasilnya digunakan untuk mengukur besarnya nilai IC₅₀. Penelitian ini dikembangkan untuk menghasilkan formulasi nanoemulsi yang sesuai sehingga diharapkan memiliki aktivitas dan efektivitas yang baik terhadap sel kanker serviks.

1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah ekstrak semi polar terpurifikasi buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.) dapat di formulasikan dalam bentuk nanoemulsi ?
2. Bagaimana efek sitotoksik nanoemulsi dari ekstrak semi polar terpurifikasi buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.) terhadap sel HeLa dengan metode MTT assay?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk memformulasikan nanoemulsi dari ekstrak semi polar terpurifikasi buah tomat (*Solanum Lycopersicum* L.).
2. Untuk mengetahui efek sitotoksik dari nanoemulsi ekstrak semi polar terpurifikasi buah tomat (*Solanum Lycopersicum* L.) terhadap sel HeLa dengan metoda MTT assay.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Manfaat bagi ilmu pengetahuan

1. Dapat melakukan pengembangan ilmu pengetahuan dalam bidang farmasi tentang formulasi nanoemulsi.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang aktivitas buah tomat dari sediaan nanoemulsi untuk menghambat pertumbuhan sel kanker serviks.

2. Manfaat Bagi Peneliti

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dan pengalaman peneliti dalam mengaplikasikan ilmu pengetahuan yang telah diperoleh setelah perkuliahan.

3. Manfaat Bagi Masyarakat

Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi tambahan informasi bagi masyarakat khususnya dibidang teknologi farmasi dengan mengembangkan formula dari penelitian sediaan nanoemulsi.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani Tomat (*Solanum lycopersicum* L.)

2.1.1 Klasifikasi Tomat (Jones, 2008)



Gambar 1. Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* L.) (Jones, 2008)

Klasifikasi tanaman tomat (*Solanum lycopersicum* L.) sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Divisi	: Spermatophyta (Tumbuhan berbiji)
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae (biji berkeping dua)
Ordo	: Solanes (tubiflorae)
Famili	: Solanaceae
Genus	: Lycopersico
Spesies	: <i>Solanum lycopersicum</i> L.

2.1.2 Morfologi Tomat (*Solanum lycopersicum* L.)

Tanaman tomat (*solanum lycopersicum* L.) merupakan tanaman perdu atau semak yang menjalar pada permukaan tanah dengan panjang mencapai $\pm$ 2 meter. Tanaman tomat dalam pembudidayaannya dijajarkan pada kayu atau bamboo karena bersifat mejalar sehingga dapat tumbuh vertikal. Berdasarkan morfologinya, tanaman tomat terdiri dari akar, batang, daun, bunga, buah dan biji. Tanaman tomat

memiliki akar tunggang dengan akar samping yang banyak dan dangkal. Tomat memiliki batang yang bulat, menebal pada buku-bukunya, berwarna hijau keputihan, terdapat bulu kasar pada batang. Daun tomat majemuk menyirip, duduk daunnya teratur secara spiral dengan filotaksis 2/5, bentuknya bulat telur sampai memanjang, ujung runcing, pangkal membulat, helaian daun yang besar tepinya berlekuk, panjangnya 10-40 cm dan berwarna hijau (Siddiq, 2010).

Bunga tanaman tomat terdiri dari 4-14 bunga. Bunga tomat merupakan bunga banci (hermaprodite) dengan garis tengah ± 2 cm. Mahkota berjumlah 6, bagian pangkalnya membentuk tabung pendek sepanjang ± 1 cm, berwarna kuning. Benang sari berjumlah 6, bertangkai pendek dengan kepala sepanjang ± 5 mm, dan berwarna kuning cerah. Benang sari mengelilingi putik bunga. Buah tomat berdaging, buni, kulitnya tipis licin mengkilap, beragam dalam bentuk maupun ukurannya, warna kuning atau merah. Biji buah tomat banyak, berbentuk pipih dan berwarna kuning kecoklatan (Siddiq, 2010).

2.1.3 Nama Daerah Tomat

Tomat memiliki beberapa nama daerah seperti di pulau Jawa yaitu kemir, leunca komir (sunda), rantai bali, rantai gandel, rante, ranti kenong, rante raja, terong sebrang, tomat (jawa). Di Sumatera yaitu terong kaluwat, reteng, cung asam. Di Sulawesi nama daerahnya kamantes, samate, samatet, temantes, antes, tomato, tomate, tamati (Siddiq, 2010).

2.1.4 Manfaat Tomat

Tomat merupakan salah satu tanaman yang mengandung senyawa polifenol, asam askorbat, potasium, dan karotenoid. Karotenoid yang dominan adalah likopen (Eveline dkk., 2014). Likopen juga telah terbukti mampu mengurangi penyakit

kronis seperti kanker, osteoporosis, kencing manis dan kardiovaskular (Argarwal dan Rao, 2000). Selain itu, buah tomat banyak mengandung vitamin dan mineral yang bermanfaat untuk kesehatan tubuh manusia. Buah tomat juga mengandung sejumlah karbohidrat, lemak, protein dan kalori. Tomat memiliki kandungan gizi dan nutrisi diantaranya kalori (19 kal), lemak (90,2 g), karbohidrat (4,0 g), vitamin A (1.496 SI), Vitamin B (0,05 mg), Vitamin C (38 mg) dan air (95 g). Kulit tomat berwarna jingga kemerahan mengandung karoten yang tinggi dan berperan sebagai provitamin A. Vitamin C pada buah tomat berfungsi sebagai antioksidan dan antiklerosis dan berkaitan dengan pembentukan kolagen yang merupakan senyawa protein yang membantu integritas struktur sel disemua jaringan ikat, seperti pada gigi, membran kulit dan urat pada otot. Selain itu Vitamin C juga berperan dalam penyembuhan luka dan memelihara kesehatan gigi dan gusi (Yuniastri dkk., 2020).

Buah tomat juga bermanfaat untuk memelihara kesehatan mata, menjaga kesehatan kulit, meningkatkan sistem imun dan melindungi tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas salah satunya penyakit kanker. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang sangat reaktif dan tidak stabil karena mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilannya, radikal bebas bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung secara terus menerus di dalam tubuh dan jika tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, kardiovaskular, penuaan dini dan penyakit lainnya. Oleh karena itu tubuh memerlukan antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas yaitu tomat salah satu tanaman yang mengandung antioksidan tinggi (Maulida & Naufal, 2014).

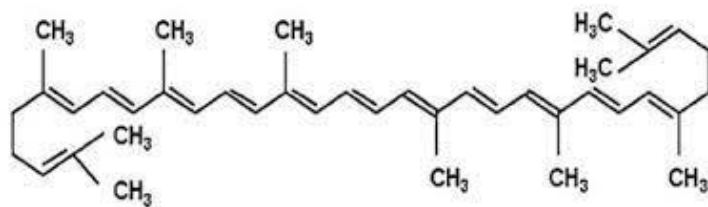
2.2 Tinjauan Kimia

2.2.1 Kandungan Kimia Tomat

Kandungan kimia dalam 100 g buah tomat adalah 3,6 g karbohidrat, 1 g protein, 0,2 g lemak, 10 g kalsium, 16 mg fosfor, 0,6 mg zat besi, 1700 IU vitamin A, 0,1 mg vitamin B, dan 21 mg vitamin C. Selain itu, Kandungan kimia pada tomat yaitu alkaloid solanin, saponin, asam folat, asam sitrat, bioflavonoid, klorin, sulfur, alkaloid dan senyawa tomatin yang berfungsi sebagai anti inflamasi dan antiradang (Dobrin dkk., 2019). Tomat merupakan salah satu tanaman yang mengandung senyawa polifenol, asam askorbat, potasium, vitamin A, vitamin C dan karotenoid. Karotenoid yang dominan adalah likopen (Evelin dkk., 2014).

2.2.2 Likopen

Likopen merupakan senyawa karotenoid asiklis dengan 13 ikatan rangkap. Likopen memiliki rumus molekul $C_{40}H_{56}$, berat molekul 536,87 dan titik cair 172°C - 173°C . Tubuh manusia tidak dapat mensintesa likopen, sehingga untuk memenuhi kebutuhan likopen manusia harus mengonsumsi makanan yang mengandung likopen. Di dalam tubuh likopen disimpan di dalam hati, paru-paru, kulit, dan kelenjar prostat (Tristiyanti, 2013).



Gambar 2. Struktur likopen (Christiyanti, 2015)

Likopen atau yang sering disebut α -carotene merupakan suatu karotenoid pigmen merah terang yang banyak ditemukan dalam buah tomat dan buah lain yang berwarna merah. Likopen merupakan karotenoid yang sangat dibutuhkan tubuh dan

merupakan salah satu antioksidan yang kuat. Kemampuannya mengendalikan radikal bebas 100 kali lebih efisien dibandingkan vitamin E. Selain sebagai anti aging, likopen juga bermanfaat untuk mencegah penyakit kanker, kardiovaskular, kencing manis, osteoporosis dan infertility (Maulida & Naufal, 2014).

2.2.3 Isolasi Likopen

Untuk mendapatkan suatu produk yang murni dari campuran reaksi dapat dilakukan isolasi karena hasil reaksi yang masih berada dalam campuran mungkin saja mengandung pelarut, reagen atau bercampur dengan hasil reaksi lain yang tidak diinginkan. Isolasi likopen digunakan perbandingan bahan-bahan yang digunakan yaitu 50 % oleoresin, 30 % propilenglikol, 10 % kalium hidroksida dan air. Reaksi saponifikasi dapat juga menggunakan NaOH atau alkali lainnya (Fadilah, 2012).

2.2.4 Penetapan Kadar Likopen

Penetapan kadar likopen dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis sesuai panjang gelombang maksimum dari larutan likopen yang sudah ditetapkan sebelumnya kemudian diukur absorbansi dari larutan sampel buah tomat. Panjang gelombang yang digunakan dalam penetapan kadar likopen yaitu 468,5 nm. Dilakukan pengukuran larutan standar likopen untuk memperoleh kurva kalibrasi dan persamaan regresi (Putri, 2016).

2.2.5 Uji Kualitatif dan Kuantitatif Likopen

Uji kualitatif likopen dapat dilakukan menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dengan fase diam nya *silica* gel dan fase gerak eluen. Parameter yang dilihat adalah jumlah bercak yang timbul. kemudian diamati perubahan warna pada suhu ruangan dan dibawah sinar UV dan dihitung nilai R_f . (Putri, 2016). Uji kuantitatif likopen dapat dilakukan dengan cara menginkubasi

campuran dari larutan uji dan absorbansinya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (Nurfadila, 2016).

2.2.6 Karakterisasi Senyawa

1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan metode kromatografi paling sederhana yang banyak digunakan. Peralatan dan bahan yang dibutuhkan untuk melaksanakan pemisahan dan analisis sampel dengan metode KLT cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (*chamber*) yang berisi pelarut dan lempeng KLT. Dengan metode optimasi metode dan menggunakan instrumen komersial yang tersedia, pemisahan yang efisien dan kuantifikasi yang akurat dapat dicapai.

Analisis dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dapat dilakukan dengan menotolkan alikuot kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT), untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel dikeringkan. Selanjutnya ujung fase diam yang terdapat pada zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di dalam *chamber*. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen sampel bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam. Hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan, fase diam diambil, fase gerak yang ada di dalam lempeng dikeringkan, dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung dibawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok. Dalam mengidentifikasi noda-

noda dalam kromatografi menggunakan nilai R_f (Retodation Factor) yang didefenisikan sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh noda}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik awal dibagi dengan jarak yang ditempuh pelarut. Nilai R_f yang baik menunjukkan pemisahan yang cukup baik berada pada rentang 0,2-0,8 cm (Wulandari, 2011)..

2. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri merupakan alat untuk mengukur transmittan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrum UV-Vis memiliki bentuk yang lebar dan hanya sedikit informasi tentang struktur yang bisa didapatkan dari spektrum ini. Spektrofotometri UV-Vis sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit didalam bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum lambert-Beer (Dachriyanus, 2004).

Spektrofotometri Visible adalah suatu metode analisa yang didasarkan pada pengukuran sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detektor fototube. Absorpsi radiasi oleh suatu sampel dapat diukur pada berbagai panjang gelombang dan dialirkan oleh suatu perekam untuk menghasilkan spektrum tertentu yang khas untuk komponen yang berbeda. Sinar ultraviolet memiliki panjang gelombang antara 200-400 nm, sedangkan sinar tampak (*visible*) mempunyai panjang gelombang 400-800 nm (Dachriyanus, 2004).

3. Spektrofotometer Infra Merah (IR)

Spektrofotometri infra merah merupakan suatu metode untuk mengamati suatu interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang terdapat pada daerah panjang gelombang 0,75-1000 μm . Spektrofotometri infra merah digunakan untuk menentukan suatu gugus fungsi suatu senyawa organik dan untuk mengetahui informasi struktur dari suatu senyawa organik dengan cara membandingkan daerah sidik jarinya (Dachriyanus, 2004). Prinsip kerja Spektrofotometri IR berupa radiasi melewati sampel dan larutan pembanding, kemudian melewati monokromator yang terdiri dari alat pendispersi berupa prisma dan cermin yang berfungsi untuk memantulkan dan memfokuskan sinar. Selanjutnya sinar dipancarkan ke cuplikan yang dapat menyerap energi, setelah itu radiasi IR ditangkap oleh detektor, kemudian sinar yang dihasilkan dari detektor membentuk puncak-puncak absorpsi berupa grafik (khopkar, 2010).

2.3 Tinjauan Farmakologi

Buah tomat mengandung likopen yang mampu mengendalikan radikal bebas 100 kali lebih efisien daripada vitamin E atau 12.500 kali dari pada glutathione. Likopen bersifat lipofilik dan hidrofilik yang dapat digunakan sebagai anti penuaan kulit bekerja dengan cara mengikat radikal bebas dan memperbaiki degradasi struktur utama matriks ekstrak vaskuler (Selamet dkk., 2013). Likopen merupakan nutrisi yang sangat penting bagi tubuh manusia yaitu sebagai penyedia provitamin dan aktivitas antioksidan. Likopen telah terbukti mampu mengurangi penyakit kronis seperti kanker, osteoporosis, kencing manis dan kardiovaskular (Argawal dan Rao, 2000). Berbagai karotenoid, termasuk likopen telah diteliti untuk melihat hubungannya dengan kanker serviks. Hanya likopen yang

menunjukkan adanya efek protektif terhadap kanker serviks (Peng, dkk., 1998). Pada penelitian (Aktepe dkk., 2021) likopen memperkuat efek dari cisplatin pada sel kanker serviks manusia dengan protein dan faktor transkripsi.

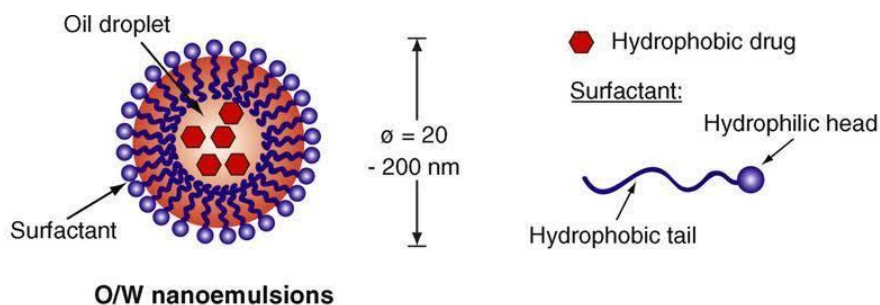
Selain mengandung likopen tomat juga mengandung vitamin C dan vitamin E yang juga bersifat sebagai antioksidan. Vitamin C yang terkandung dalam buah tomat juga mempunyai efek multifungsi, tergantung pada kondisinya. Vitamin C dapat berfungsi sebagai antioksidan, pengikat logam, proantioksidan, pereduksi dan penangkap oksigen. Vitamin E yang terkandung dalam buah tomat berfungsi sebagai antioksidan yang mampu menghambat terjadinya kerusakan akibat pembentukan radikal bebas pada membran sel, mencegah peroksidasi lipid dan meningkatkan aktivitas antioksidan lainnya (Dasrul, 2013).

Tomat juga memiliki indeks terapi nutrisi unggulan yang berkhasiat untuk mengatasi hipertensi. Tomat merupakan sumber likopen yang bermanfaat untuk menurunkan tekanan darah. Beberapa studi telah menguji likopen terbukti efektif menurunkan tekanan darah jika dikonsumsi secara rutin. Menurut hasil uji laboratorium konsumsi likopen yang memadai akan mendorong produksi nitrogen monoksida yang bermanfaat untuk menurunkan tekanan darah (Yusfar, 2018). Selain itu, likopen yang terkandung di dalam buah tomat juga dapat menurunkan kadar gula darah melalui penghambatan terjadinya resistensi hormon insulin yang akhirnya toleransi sel pada gula darah menjadi naik dan dapat mencegah peningkatan kadar glukosa gula darah (Susanti, 2018).

2.4 Tinjauan Farmasetika

2.4.1 Nanoemulsi

Nanoemulsi merupakan sistem penghantaran obat yang terdiri atas fase air dan minyak yang distabilkan dengan surfaktan dan kosurfaktan dengan ukuran rata-rata droplet yaitu <200 nm (Aulton, 2013). Nanoemulsi juga dikenal sebagai emulsi submikron yang merupakan sistem partikel koloid berukuran submikron yang dianggap sebagai dispersi isotropik stabil secara termodinamik dan kinetik. Nanoemulsi diklasifikasikan ke dalam 2 kategori yaitu tipe O/W (minyak terdispersi dalam fase air), tipe air dalam minyak (W/O) (air terdispersi dalam fase minyak). Transformasi diantara kedua jenis ini dapat dicapai dengan mengubah komponen emulsi. Beberapa emulsi juga merupakan jenis nanoemulsi, di mana emulsi O/W dan W/O hadir secara bersamaan dalam satu sistem. Untuk menstabilkan kedua emulsi ini, surfaktan hidrofilik dan lipofilik digunakan secara bersamaan (Gurpret & Singh, 2018).



Gambar 3. Bentuk Droplet Nanoemulsi Tipe O/W (Chen dkk., 2010)

Sistem penghantaran obat nanoemulsi secara efektif dapat mengatasi kelemahan bioavailabilitas yang rendah terkait dengan obat yang bersifat hidrofobik dan memiliki metabolisme lintas pertama yang tinggi. Nanoemulsi memiliki keuntungan yaitu meningkatkan penyerapan, meningkatkan bioavailabilitas, membantu melarutkan obat lipofilik, tidak menunjukkan masalah

seperti *creaming*, *coalesce*, flokulasi dan sedimentasi. Nanoemulsi memiliki luas permukaan yang besar dan energi yang bebas, sehingga menjadikannya sistem transportasi yang efektif, jumlah kebutuhan energi yang lebih sedikit dan stabil secara termodinamika. Dalam nanoemulsi, salah satu cairan membentuk fase terdispersi dan cairan lainnya membentuk media pendispersi (Kumar, dkk, 2019).

Umumnya sediaan nanomulsi memiliki komponen yang digunakan seperti minyak, surfaktan dan kosurfaktan. Pemilihan eksipien dalam nanoemulsi tidak boleh mengiritasi kulit. Minyak adalah komponen yang penting dalam formulasi nanoemulsi karena dapat melarutkan bahan aktif yang bersifat lipofilik. Surfaktan terbagi atas surfaktan ionik dan surfaktan anionik, tetapi yang umum digunakan yaitu surfaktan non ionik karena memiliki toksisitas yang rendah dibandingkan dengan surfaktan ionik. Dalam beberapa kasus, penggunaan surfaktan saja tidak cukup mampu untuk mengurangi tegangan antar muka antara minyak dan air, sehingga dibutuhkan kosurfaktan untuk membantu menurunkan tegangan permukaan antara fase minyak dan fase air, dan juga dapat meningkatkan fluiditas pada antar muka sehingga dapat meningkatkan entropi sistem (Gupta, dkk., 2010).

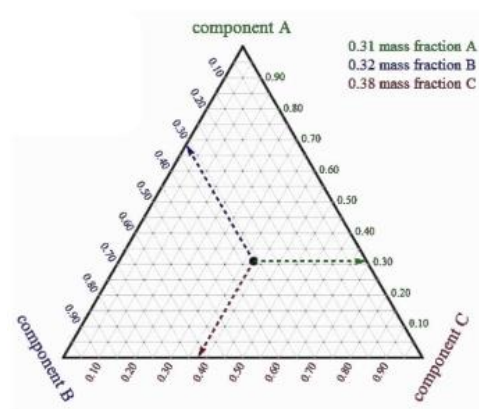
2.4.2 Komponen Nanoemulsi

Komponen nanoemulsi yaitu fase minyak, fase air, surfaktan, kosurfaktan lipid, pelarut bersama yang larut dalam air. Dalam formulasi nanoemulsi, fase minyak dapat mencakup trigliserida, minyak nabati, minyak mineral, asam lemak bebas, dan lain-lain. Pemilihan fase minyak umumnya didasarkan pada kelarutan obat. Surfaktan yang umum digunakan dalam sistem penghantaran obat nanoemulsi adalah span, tween, lauril makro golgliserida dan polisakarida. Tegangan antar muka negatif yang rendah diperlukan dalam pembentukan nanoemulsi, untuk

tujuan ini kosurfaktan digunakan bersama surfaktan. Kosurfaktan yang umum digunakan dalam nanoemulsi adalah polietilen glikol, Propilen glikol, etanol, etilen glikol, gliserin dan propanol (kumar, dkk., 2019).

2.4.3 Diagram Fase Ternern

Diagram yang mempunyai bentuk seperti segitiga sama sisi yang mana sudutnya ditempati oleh beberapa komponen zat disebut dengan diagram fase ternern. Setiap sisi dari segitiga sama sisi tersebut terbagi atas beberapa ukuran yang menyatakan 100% bagian zat yang ada pada setiap sudutnya. Jumlah kadar dari masing-masing komponen dapat ditentukan berdasarkan posisi titik dalam diagram segitiga tersebut (Levine, 2009).



Gambar 4. Diagram ternern (Alberty, 1983)

2.4.4 Preformulasi Nanoemulsi

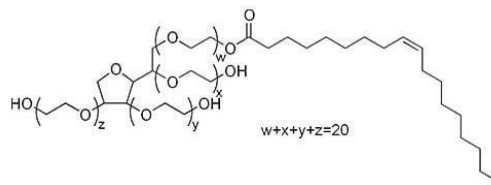
a. VCO (Virgin Coconut Oil)

Virgin coconut oil merupakan produk olahan dari daging buah kelapa yang sudah tua, tidak berasa, bau khas kelapa dan warnanya jernih (Aziz, dkk., 2017). VCO mengandung asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh. Asam lemak jenuh pada VCO yaitu asam kaprat (50,50%), asam miristat (16,18%), asam kaprat (8,6%), asam kaprilat (6,1%) dan asam kaproat (0,2%). Asam lemak tak jenuh pada

VCO adalah asam oleat (6,50%), asam linoleat (2,70%), dan asam palmitoleat (0,20%). Selain itu VCO juga mengandung asam laurat tinggi yang merupakan suatu lemak jenuh berantai sedang. Asam laurat di dalam tubuh akan dirubah menjadi senyawa monogliserida yang mempunyai sifat antibakteri, antiprotozoal dan antivirus (Purnamasari dkk., 2012). Minyak kelapa murni atau VCO dalam mikroemulsi dapat dibuat dalam bentuk sediaan yang stabil. Pada penelitian (Octarika, 2017) tentang formulasi sistem nanoemulsi meloxicam menggunakan VCO sebagai minyak menyatakan bahwa VCO berpengaruh terhadap laju pelepasan, laju pelepasan semakin besar seiring bertambahnya konsentrasi VCO. Pada penelitian tentang optimasi pembuatan nanoemulsi *virgin coconut oil* yang dilakukan oleh (Listyorini, dkk., 2018) menyatakan bahwa sistem koloid nanoemulsi stabil, tidak terjadi pemisahan fase dan jernih.

b. Tween 80

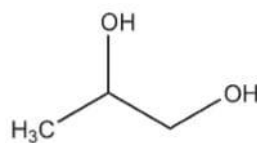
Tween 80 disebut juga sebagai polisorbat 80. Tween 80 adalah salah satu surfaktan non ionik yang pemerianannya berupa larutan minyak berwarna kuning, larut dalam etanol dan air, tidak larut dalam minyak nabati dan minyak mineral, tween 80 memiliki HLB 15. Tween 80 stabil pada elektrolit, basa dan asam lemah. Reaksi penyabunan bertahap dapat terjadi pada lingkungan dengan pH asam kuat dan basa. Polisorbat biasanya digunakan dalam kosmetik, formulasi oral, parenteral, topikal dan pada produk makanan. Umumnya tween 80 dianggap sebagai material yang tidak mengiritasi dan tidak toksik (Rowe, dkk., 2009).



Gambar 5. Rumus Bangun Tween 80 (Rowe, 2009)

c. Propilen Glikol

Propilen glikol dapat digunakan sebagai humektan, pelarut, stabilizer untuk vitamin, kosolven, *plasticizer*, desinfektan dan pengawet. Propilen glikol merupakan pelarut yang lebih baik dibandingkan dengan gliserin. Aktivitas antiseptiknya setara dengan etanol dan dapat menghambat pertumbuhan jamur. Biasanya propilen glikol digunakan dalam formulasi farmasetika dan secara umum dianggap sebagai material yang nontoksik. Konsentrasi propilen glikol yang digunakan sebagai pelarut dan kosolven pada penggunaan topikal adalah 5-80%. Propilen glikol juga dapat digunakan untuk meningkatkan efikasi dari paraben sebagai bahan pengawet (Rowe, dkk., 2009).



Gambar 6. Struktur Kimia Propilenglikol (Rowe, 2009)

2.4.5 Monografi Bahan Pembuat Nanoemulsi

a. Virgin Coconut Oil (VCO) (Rowe, 2006)

Pemerian : Minyak bening tidak berwarna atau kuning muda, sedikit bau khas kelapa dan rasanya ringan

Penyimpanan : Wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya

Khasiat : Dasar salep, emollient

b. Tween 80 (Depkes, 1995)

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 : Antara 1,06 – 1,09 g/ml

Kekentalan : Antara 300-500 sentistokes pada suhu 25°C

Khasiat : Surfaktan, pengemulsi, pensuspensi

Penyimpanan : Dalam wadah yang tertutup rapat

c. Propilen Glikol (Depkes, 1995)

Pemerian : Cairan kental jernih, tidak berwarna, rasa khas, praktis tidak berbau, menyerap air pada udara lembab

Kelarutan : Dapat bercampur dengan air, dengan aseton, dan dengan kloroform, larut dalam eter dan dalam beberapa minyak esensial, tetapi tidak dapat bercampur dengan minyak lemak

Berat molekul : 76,09

Bobot Jenis : 1,035 dan 1,037

Penyimpanan : Dalam wadah tertutup rapat

2.5 Kanker serviks

Kanker serviks adalah kanker pada mulut rahim yang merupakan kanker yang menyerang bagian ujung bawah rahim yang menonjol ke vagina. Kanker serviks dapat menyebar melalui pembuluh darah, pembuluh limfa atau langsung ke organ vital lain. Terjadinya kanker serviks awalnya dimulai dengan terjadinya

mutasi sel secara bertahap, tetapi progresif dan berkembang menjadi karsinoma (Delarosa, 2021). Kanker serviks merupakan penyakit dimana sel-sel ganas terbentuk dan tumbuh perlahan di jaringan serviks, melalui transformasi sel epitel. Transformasi informasi ini menghasilkan displasia epitel dengan munculnya sel-sel abnormal yang merupakan bentuk awal dari lesi prakanker.

Resiko munculnya kanker ini adalah terus-menerus terinfeksi jenis Human papilomavirus (HPV) penyebab kanker yang ditularkan secara seksual, tidak hanya melalui penetrasi, tetapi juga melalui kontak kulit ke kulit pada area genital. Infeksi dengan tipe HPV resiko tinggi adalah penyebab utama dari hampir semua kasus kanker serviks, tetapi infeksi ini tidak selalu menyebabkan kanker. Pada penelitian (Evriarti & Andi, 2019) menyatakan bahwa HPV dalam menyebabkan kanker serviks dengan melibatkan serangkaian protein non-struktural seperti protein E6 dan E7 yang mengakibatkan kegagalan apoptosis serta pembelahan sel yang tak terkendali sehingga berujung pada terbentuknya sel kanker.

Bentuk awal kanker serviks mungkin tidak memiliki tanda atau gejala, tetapi dapat dideteksi melalui tes Pap regular yaitu prosedur yang terdiri dari pengambilan sel dari serviks untuk dilihat dibawah mikroskop. Jika lesi prakanker tidak diobati maka dapat berkembang menjadi kanker dalam proses yang dapat memakan waktu sekitar satu sampai dua dekade. Ketika kanker serviks sudah berkembang, akan ada tanda dan gejala seperti pendarahan vagina, keputihan yang tidak biasa, nyeri panggul dan lainnya (Concencao, 2019).

2.6 Sel HeLa

HeLa cell line atau kultur sel HeLa adalah Continous cell line yang diturunkan dari sel epitel kanker serviks dari seorang wanita yang menderita kanker

serviks bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951. Sel ini dipercaya berasal dari sel kanker serviks Ms. Lacks. Sel HeLa bersifat immortal tidak dapat mati karena tua dan dapat membelah diri secara tidak terbatas (Delarosa, 2021).

Sel HeLa diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (serviks) manusia. Secara morfologi Sel HeLa merupakan sel epitelial yang sudah dimasuki oleh virus HPV (*Human Papilloma Virus*) tipe 18. Sel ini dapat digunakan untuk tes antitumor, uji sitotoksitas, transformasi uji tumorigenitas, biologi sel dan invasi bakteri. Kultur sel HeLa lebih mudah ditangani, mampu memproduksi banyak sel karena tumbuh lebih cepat. Selain itu, kultur kanker sel HeLa mempunyai gen p53 yang dapat diinduksi dengan senyawa yang diujikan sehingga terjadi apoptosis sel. Media yang digunakan pada kultur sel HeLa salah satunya yaitu RPMI 1640-serum. RPMI mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh sel seperti asam amino, vitamin, glukosa, garam-garam organik. Serum mengandung lipid untuk pertumbuhan sel, albumin sebagai protein transport, hormon yang memicu pertumbuhan sel dan mineral sebagai kofaktor enzim (Anggrianti, 2008).

2.7 Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik merupakan pengujian toksisitas secara *in vitro* terhadap kultur sel untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Senyawa ini merupakan salah satu uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel (Haryoto, 2013). Salah satu metode yang sering digunakan untuk menetapkan jumlah kematian sel yaitu metode MTT assay (Syamaun, 2017). Untuk mengetahui suatu senyawa bersifat toksik dapat dinyatakan dalam nilai IC_{50} . Nilai IC_{50}

merupakan konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, dimana nilai IC₅₀ memiliki kategori sebagai berikut.

Tabel 1. Rentang Nilai IC₅₀ dalam Uji Sitotoksitas (Jun, dkk., 2003)

Nilai IC ₅₀	Intensitas
< 50 µg/mL	Sangat kuat
50-100 µg/mL	Kuat
101-250 µg/mL	Sedang
250-500 µg/mL	Lemah
>500 µg/mL	Tidak aktif

2.7.1 Metoda MTT assay

MTT adalah salah satu uji in vitro menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi tingkat ketoksikan suatu senyawa. Prinsip dari metoda MTT ini adalah adanya reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT yang berwarna kuning menjadi kristal formazan yang berwarna ungu dan tidak larut air (Arifianti dkk., 2014). Untuk melarutkan kristal berwarna ini dapat dilakukan penambahan reagen stopper yang bersifat detergenik kemudian absorbansinya akan diukur menggunakan ELISA reader. Uji MTT digunakan untuk mengukur aktivitas selular berdasarkan kemampuan enzim mitokondria reduktase. Enzim ini bereaksi dengan MTT dan akan membentuk kristal formazan yang berwarna ungu (Syamaun, 2017).

2.7.2 Prinsip Kerja ELISA Reader

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) merupakan salah satu analisis kuantitatif yang digunakan dalam identifikasi keberadaan dan konsentrasi molekul dalam cairan biologis dengan menunjukkan reaksi antigen-antibodi melalui perubahan warna yang diperoleh dengan menggunakan konjugat enzim. Semakin besar konsentrasi antigen/antibodi, semakin banyak pula cahaya yang akan diserap oleh sampel sehingga menghasilkan pembacaan absorbansi yang lebih

besar pula. Nilai absorbansi ini kemudian dijadikan untuk menafsirkan hasil diagnosa ELISA. Rentang absorbansi yang dapat direkam yaitu 350 nm sampai 700 nm dan biasanya titik absorbansi berada pada rentang 445 nm sampai 455 nm. Metode ELISA memiliki keunggulan yaitu serbaguna, tepat, dan memiliki sensitivitas yang tinggi yaitu 98,87% (Thiha dkk., 2015).

BAB. III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan selama 6 bulan dari bulan Mei sampai Desember 2022 di Laboratorium Penelitian Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia (UPERTIS), Laboratorium Biomedik Universitas Andalas (UNAND), dan Laboratorium Kimia Universitas Negeri Padang, PT. Diethelm keller Siber Hegner (DKSH) Jakarta Selatan.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Chamber, plat KLT, kertas saring, Spektrofotometer UV-Vis (Genesys), Spektrofotometer IR (PerkinElmer), PSA/*Particle Size Analyzer*, magnetic stirrer, hot plate, cawan penguap (Pyrex), waterbatch (penangas air), kaca arloji, gelas ukur (Iwaki), oven (Memmert), rak tabung reaksi, tabung reaksi, corong (pyrex), botol semprot, pipet tetes, batang pengaduk, *beaker glass* (Iwaki), vial, spatel, kaca objek, piknometer (Iwaki), timbangan analitik (Adventurtm), buret, viskometer *brookfield* (KU-3 Viscometer), pH meter (Jenway), sentrifugator (Onamed), lemari pendingin, *plat well* (Biologix), Pipet tips (Biologix), ELISA *reader* (Bio-Rad), *micropipet* (Eppendorf) .

3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini ekstrak terpurifikasi buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.) dari peneliti sebelumnya, *Virgin Coconut Oil* (VCO) tween 80, propilen glikol, aquadest, garam MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium bromida), sodium dodesil sulfat (SDS), Media Kultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (MK DMEM), PBS (*Phosphat Buffer Salin*), Tripsin-EDTA 0,25%, *reagen stopper*.

3.3 Prosedur dan Cara Kerja

3.3.1 Karakterisasi Ekstrak Terpurifikasi Buah Tomat

1. Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan menggunakan panca indra yang meliputi bentuk, warna, bau dan rasa dari sampel (Departemen Kesehatan RI, 1979).

2. Uji pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter dengan cara alat terlebih dahulu dikalibrasi dengan larutan dapar standar netral (7,0) dan larutan dapar pH asam (4,0) hingga alat menunjukkan harga pH. Setelah itu, elektroda dicuci dengan aquadest, lalu dikeringkan dengan tisu. Ekstrak terpurifikasi buah tomat ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dalam 10 ml aquadest. Kemudian elektroda dicelupkan dalam larutan tersebut, angka yang ditunjukkan pH meter merupakan pH sediaan. Pengukuran pH dilakukan sebanyak 3 kali lalu diambil nilai rata-ratanya (Departemen Kesehatan RI, 1995)

3. Analisis Profil Kimia dengan Kromatografi Lapis Tipis

Lempeng kromatografi lapis tipis dipanaskan didalam oven pada suhu 110°C selama 30 menit kemudian plat dipotong dengan ukuran 2x5 cm lalu dibuat garis lurus pada lempeng 0,5 cm pada bagian atas dan bawah, setelah itu disiapkan eluen dan dimasukkan kertas saring ke dalam *chamber* yang sudah berisi eluen, jika kertas saring sudah basah semua menandakan eluennya sudah jenuh. Selanjutnya diambil sedikit ekstrak terpurifikasi buah tomat lalu dilarutkan dengan pelarut N-heksan. Kemudian sampel dan pembanding yaitu likopen murni ditotolkan pada plat KLT

silika ukuran 2x5 cm yang sudah diberi garis dengan pensil (dan tangan tidak menyentuh permukaan plat yang mengandung silika gel). Jarak sampel yang satu dengan yang lainnya adalah 0,5 cm. Kemudian sampel dan pembanding (likopen murni) yang sudah ditotolkan dikering anginkan kemudian dimasukkan ke dalam wadah pengembang yang berisi eluen Toluena : Heksana (1:19 v/v). Noda dibiarkan mengembang sampai eluen berada pada batas yang sudah digarisi dengan pensil. Kemudian diambil dan dikering anginkan. Setelah itu dilihat spotnya dibawah sinar UV dan dihitung nilai Rfnya. Nilai Rf yang baik menunjukkan pemisahan yang cukup baik berkisar antara 0,2-0,8 cm (Arifulloh, 2016).

4. Analisis dengan Spektrofotometri UV-Vis

Ekstrak terpurifikasi buah tomat dilarutkan sebanyak 10 mg dalam 10 ml Kloroform sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm, lalu dipipet 7 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml kemudian ditambahkan dengan kloroform sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 700 ppm. Selanjutnya diukur absorbansi dan panjang gelombang larutan menggunakan spektrofotometer pada rentang panjang gelombang 200 sampai 800 nm (Lavecchia & Zuorro, 2008).

5. Analisis dengan Spektrofotometri IR

Ekstrak terpurifikasi buah tomat ditimbang sebanyak 1 mg lalu dimasukkan kedalam alat dan dianalisis pada rentang bilangan gelombang yaitu 4000-400 cm^{-1} . Kemudian ditunggu proses pembacaan data sehingga muncul kromatogram pada komputer (Ulfa, 2016).

3.3.2 Formula Nanoemulsi

3.3.2.1 Kontruksi Diagram Fase Terner

Rancangan fase terner sebagai berikut :

Tabel 2. Formula Optimasi 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
Air (%)	80	70	60	50	40	30
Total	100	100	100	100	100	100

Keterangan :

Minyak : VCO

S : Surfaktan (Tween 80)

KS : Kosurfaktan (Propilen glikol)

3.3.2.2 Variasi Konsentrasi Formula Basis Nanoemulsi:

Formula		Komponen (%)			
		VCO	Tween 80	Propilen glikol	Aquadest
A	1	2	14,4	3,6	100
	2	4	12,8	3,2	100
	3	6	11,2	2,8	100
	4	8	9,6	2,4	100
	5	10	8	2	100
	6	12	6,4	1,6	100
	7	14	4,8	1,2	100
	8	16	3,2	0,8	100
	9	18	1,6	0,4	100
B	1	3	21,6	5,4	100
	2	6	19,2	4,8	100
	3	9	16,8	4,2	100
	4	12	14,4	3,6	100
	5	15	12	3	100
	6	18	9,6	2,4	100
	7	21	7,2	1,8	100
	8	24	4,8	1,2	100
	9	27	2,4	0,6	100
C	1	4	28,8	7,2	100
	2	8	25,6	6,4	100

	3	12	22,4	5,6	100
	4	16	19,2	4,8	100
	5	20	16	4	100
	6	24	12,8	3,2	100
	7	28	9,6	2,4	100
	8	32	6,4	1,6	100
	9	36	3,2	0,8	100
D	1	5	36	9	100
	2	10	32	8	100
	3	15	28	7	100
	4	20	24	6	100
	5	25	20	5	100
	6	30	16	4	100
	7	35	12	3	100
	8	40	8	2	100
	9	45	4	1	100
E	1	6	43,2	10,8	100
	2	12	38,4	9,6	100
	3	18	33,6	8,4	100
	4	24	28,8	7,2	100
	5	30	24	6	100
	6	36	19,2	4,8	100
	7	42	14,4	3,6	100
	8	48	9,6	2,4	100
	9	54	4,8	1,2	100
F	1	7	50,4	12,6	100
	2	14	44,8	11,2	100
	3	21	39,2	9,8	100
	4	28	33,6	8,4	100
	5	35	28	7	100
	6	42	22,4	5,6	100
	7	49	16,8	4,2	100
	8	56	11,2	2,8	100
	9	63	5,6	1,4	100

3.3.3. Pembuatan Optimasi Nanoemulsi

Masing-masing bahan ditimbang, fase minyak (VCO dan tween 80) dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* pada suhu 70°C pada kecepatan 1400 rpm selama 1 jam (60 menit). Kemudian ditambahkan propilen glikol ke dalam fase minyak. Lalu ditambahkan aquadest secara perlahan sampai terbentuk masa yang bening, didiamkan hingga dingin kemudian dimasukkan ke dalam wadah sediaan. Setelah itu, sediaan

didiamkan hingga 24 jam untuk melihat kestabilan larutan nanoemulsi dari kejernihan dan pemisahan fase. Selanjutnya dilakukan pengukuran ukuran partikel dan zeta potensial menggunakan PSA/*partice size analyzer*, dari optimasi semua formula akan dipilih formula terbaik untuk pembuatan nanoemulsi ekstrak semi polar terpurifikasi buah tomat (*Solanum lycopersicum L.*)

Tabel 3. Formula Nanoemulsi Ekstrak Semi Polar Terpurifikasi Buah Tomat (*Solanum lycopersicum L.*)

Komposisi	E1 (g)	F1 (g)
Ekstrak Buah Tomat	0,01	0,01
VCO	5,9994	6,9993
Tween 80	43,1956	50,3949
Propilen glikol	10,7989	12,5987
Aquadest	79,992	29,997

3.3.4 Pembuatan Nanoemulsi Ekstrak Semi Polar Terpurifikasi Buah Tomat (*Solanum lycopersicum L.*)

Masing-masing bahan ditimbang. Setelah ditimbang, fase minyak (VCO, ekstrak buah tomat, dan tween 80) dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dihomogenkan dengan magnetic stirrer dengan kecepatan 1400 rpm dalam waktu $\pm$ 60 menit pada suhu 70°C. Selanjutnya fase air propilen glikol ditambah aquadest dimasukkan ke dalam fase minyak sedikit demi sedikit dengan pipet tetes lalu dihomogenkan sampai terbentuk masa berwarna bening. Lalu didiamkan hingga dingin dan masukkan ke dalam wadah sediaan.

3.4 Evaluasi Nanoemulsi

3.4.1 Pemeriksaan Organoleptis

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

3.4.2 Pemeriksaan Homogenitas

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

3.4.3 Penentuan Bobot Jenis

Pengukuran bobot jenis dilakukan menggunakan piknometer. Piknometer yang sudah bersih dan kering ditimbang (A), kemudian piknometer yang kosong diisi air dan ditimbang (A1). Kemudian air dikeluarkan dari piknometer dan dibersihkan kembali. Sediaan nanoemulsi dimasukkan ke dalam piknometer lalu ditimbang (A2). Bobot jenis sediaan diukur dengan perhitungan sebagai berikut (Depkes RI, 1995).

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

3.4.4 Uji pH

Uji ini dilakukan menggunakan pH meter pada suhu ruang. Elektroda dikalibrasi terlebih dahulu dengan larutan dapar standar pH (4,01) dan (7,01). Alat elektroda dicuci hingga bersih dan dikeringkan. Sebanyak 1 g sediaan dilarutkan terlebih dahulu dalam 10 ml aquadest dan diaduk hingga homogen kemudian dicelupkan ke dalam sediaan yang sudah dilarutkan dengan aquadest dan diaduk sampai homogen maka angka yang ditunjukkan pH meter merupakan pH sediaan. Pengukuran pH dilakukan sebanyak 3 kali, lalu diambil nilai rata-ratanya (Depkes RI, 1995).

3.4.5 Pemeriksaan Tipe Emulsi

Pemeriksaan tipe emulsi dilakukan dengan menggunakan kaca objek dan metilen blue dengan cara sebanyak 0,5 g sediaan di letakkan di atas kaca objek lalu

teteskan metilen blue sebanyak 1 tetes kemudian diaduk dan diperhatikan penyebaran warnanya. Jika warna metilen blue larut di dalamnya dan berdifusi secara merata keseluruh bagian air maka sediaan merupakan tipe minyak dalam air. Jika metilen blue tidak larut dan tidak homogen maka sediaan merupakan tipe air dalam minyak (Depkes RI, 1985).

3.4.6 Uji Sentrifugasi

Uji sentrifugasi ini dilakukan dengan cara 5 g sediaan dimasukkan kedalam tabung sentrifugasi, selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 30 menit kemudian dilakukan pengamatan. Tidak terjadi pemisahan pada kedua fase atau tanda-tanda creaming menandakan nanoemulsi yang stabil (Nurhidayati, dkk., 2020).

3.4.7 Stabilitas Sediaan

a. Freeze thaw

Uji *Freeze thaw* dilakukan dengan cara sediaan nanoemulsi dari ekstrak terpurifikasi buah tomat dimasukkan ke dalam vial kosong kemudian disimpan pada suhu 4°C dalam waktu 24 jam lalu pindahkan ke dalam oven dengan suhu 40°±2° selama 24 jam (satu siklus). Uji stabilitas dilakukan sebanyak 6 siklus kemudian amati apakah terjadi pemisahan fase (Florida, 2021).

b. Pada Suhu Ruang

Pengujian pada suhu ruang dilakukan dengan cara sediaan nanoemulsi ekstrak buah tomat dimasukkan ke dalam vial kosong lalu disimpan pada suhu ruang selama 24 jam. Amati apakah terjadi pemisahan fase (Florida, 2021).

3.4.8 Penentuan Viskositas

Penentuan viskositas dilakukan dengan cara 50 g sediaan nanoemulsi di masukkan ke dalam viscometer *brookfield* dan pengukuran viskositasnya dimulai pada saat jarum rotor bergerak dan stabil dengan kecepatan 30 rpm. Penentuan viskositas sediaan dilakukan setelah selesai dibuat pada minggu ke-3 dan minggu ke-6 pada suhu ruang (Florida, 2021).

3.4.9 Zeta Potensial , Uji Ukuran Partikel dan PDI

Uji ini dilakukan dengan mendispersikan sebanyak 1 g sediaan dalam 5 mL aqua deion kemudian diukur Zeta Potensial, ukuran partikel dan PDI menggunakan PSA/*Particle Size Analyzer*. Prinsip kerja alat ini adalah adanya hamburan cahaya yang terjadi akibat penembakan sinar laser yang mengenai partikel dalam sampel. Cahaya yang dihamburkan akan dibaca oleh detektor foton sehingga dapat menentukan ukuran partikel (Florida, 2021).

3.5 Pembuatan Media Stok dan Media Komplit DMEM

Media padat DMEM disiapkan, kemudian dimasukkan ke dalam 950 mL *aquabidest* steril dalam beaker glass 1 liter di dalam LAF. Selanjutnya media bubuk dituang ke dalam *aquabidest* steril di dalam *beaker glass*, diaduk hingga rata. Bagian dalam pembungkus media bubuk dibilas dengan *aquabidest*, kemudian tuang cairannya ke dalam *beaker glass* di atas. ditambahkan NaHCO_3 sebanyak 2,2 gram untuk setiap liter media yang dibuat, diaduk rata. Selanjutnya *aquabidest* steril ditambahkan hingga volume 1 liter. Media padat dan NaHCO_3 diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga semua dapat larut. Penetrulan pH dilakukan (seharga 0,2-0,3 di bawah pH yang diinginkan) dengan menambahkan NaOH 1 N. Filtrasi media dilakukan dengan menggunakan filter 0,2 mikron, ditampung ke dalam botol duran

500 mL. Kemudian media diberi penanda dan disimpan dikulkas dengan suhu 4°C. Pembuatan media komplet DMEM dibuat dari 100 mL DMEM *stock* ditambah *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebanyak 10%, antibiotika penisilin-streptomisin 2% dan *Fungizone* (Amphoterasin) 0,5% (Seran, 2020).

3.6 Penumbuhan Sel

3.6.1 Sel HeLa

Alat dan bahan dipersiapkan dan dikondisikan pada suhu ruangan, kemudian diambil 10 mL media DMEM pada tabung konikel. Selanjutnya diambil ampul dalam freezer -80°C atau tangki nitrogen, lalu cairkan pada suhu kamar. Lalu ambil suspensi sel dalam ampul dan dimasukkan tetes demi tetes ke dalam media DMEM yang sudah disiapkan. Kemudian disentrifus selama 5 menit pada kecepatan 600 rpm. Selanjutnya dibuang supernatan dan ditambahkan 4 mL MK-DMEM dan resuspensi sampai homogen. Ditransfer masing-masing 2 mL ke dalam flask kultur baru. Kemudian ditambahkan 5 mL MK ke dalam masing-masing flask kultur dan dihomogenkan. Kondisi sel diamati dengan mikroskop interved. Dipastikan sel homogen pada seluruh permukaan sel kultur. Kemudian diberi identitas dan disimpan dalam inkubator CO₂ (Delarosa, 2021).

3.6.2 Subkultur Sel

Alat dan bahan dipersiapkan dan dikondisikan. Pekerjaan dilakukan di dalam LAF. Proses panen dilakukan dengan cara mengambil 500 µL pemanenan sel dan dimasukkan ke dalam flask kultur. Kemudian tambahkan sebanyak 6 mL MK dan dihomogenkan. Setelah itu, sel diinkubasi pada inkubator CO₂ dan diamati kondisi sel keesokkan harinya (Delarosa, 2021).

3.6.3 Pemanenan dan perhitungan Sel HeLa

Pemanenan ini dilakukan untuk melepas ikatan antar sel dan ikatan sel dengan matriks tanpa merusak sel tersebut. Pemanenan sel dilakukan dengan cara mengambil sel dari inkubator CO₂ kemudian diamati kondisi sel. Selanjutnya dibuang media menggunakan mikropipet steril lalu sel di cuci dengan PBS sebanyak 2 kali dengan setengah dari volume media awal. Setelah itu ditambahkan sebanyak 400 µL tripsin EDTA 0,25% secara merata untuk melepaskan sifat adheren pada sel kemudian di inkubasi selama 3 menit. Langkah selanjutnya ditambahkan media ± 5 mL untuk menginaktivasi tripsin. Kemudian diamati dibawah mikroskop, jika masih ada sel yang bergerombol maka diresuspensi. Lalu diletakkan sel dalam *conical* steril baru.

Perhitungan dilakukan dengan menggunakan metode hemositometri dengan alat hemositometer, sel harus terpisah dan tidak bergerombol. Perhitungan sel dilakukan untuk mengetahui homogenitas antara kelompok perlakuan. Perhitungan dilakukan dengan cara resuspensi sel dalam *conical tube* yang sudah di panen di ambil 10 µL lalu dipipet ke dalam hemositometer. Kemudian dihitung sel dibawah mikroskop *interved*, yang dihitung hanya sel yang hidup saja ditandai dengan bercak hitam sebagai mitokondria sel. Selanjutnya pindahkan sejumlah sel yang dibutuhkan ke dalam *conical* yang lain (Nurani, 2018).

3.7 Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Uji

Sediaan nanoemulsi ekstrak terpurifikasi buah tomat dilarutkan dalam dimetilsulfoksida (DMSO) sebanyak 1000 µg/mL kemudian dicukupkan dengan MK DMEM. Selanjutnya dibuat pengenceran sampai diperoleh larutan uji dengan

konsentrasi 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL. Semua pengenceran dilakukan dengan media MK DMEM.

3.8. Uji Sitotoksitas

3.8.1 Pewarnaan Menggunakan MTT

Pewarnaan sel menggunakan MTT bertujuan untuk melihat jumlah sel yang hidup supaya bisa dibaca oleh *ELISA reader* karena pembacaan berdasarkan pewarnaan reagen. Prinsip pewarnaan ini yaitu sel yang hidup akan membentuk serabut formazan yang berwarna ungu jika bereaksi dengan MTT sedangkan sel yang mati tidak akan bereaksi dan tidak berwarna. Reagen yang digunakan harus baru. Pewarnaan ini dilakukan dengan membuat reagen MTT dengan cara mengencerkan MTT dari konsentrasi 5 mg/mL menjadi 0,5 mg/mL dengan menggunakan media komplit (MK). Kemudian media didalam plate dibuang dengan cara ditap pada tissue dan kontrol medium diisi menggunakan MK DMEM dan kontrol sel menggunakan sel HeLa. Kemudian setelah semua plate terisi penuh dengan 5 konsentrasi nanoemulsi yaitu 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, kontrol sel dan kontrol media diinkubasi selama 3-6 jam. Setelah itu, ditambahkan 100 µL SDS stop berupa DMSO untuk melarutkan serabut formazan yang tertutup. Terakhir, dilakukan inkubasi selama 96 jam pada suhu ruang untuk menunggu reaksi pembentukan serabut formazan (Nurani, 2018).

3.8.2 Pembacaan Plate dengan *ELISA Reader*

Pembacaan plate menggunakan *ELISA reader* dapat mengabsorbansi pewarnaan sel berdasarkan intensitas warna yang dibentuk. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. Absorbansi yang dihasilkan kontrol sel tinggi dan pada kontrol medium rendah disebabkan serabut formazan yang dihasilkan dalam

kontrol medium tidak terbentuk sedangkan pada kontrol sel banyak. Kemudian dianalisis hasil absorbansi untuk mengetahui persentase sel hidup dengan menggunakan *microsoft excel* yang akan dinyatakan sebagai IC₅₀ (Nurani, 2018).

3.9 Analisa Data

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

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

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