

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi Dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah seluruh subyek atau obyek yang memiliki karakteristik tertentu, jelas dan lengkap dalam ruang lingkup yang akan diteliti. Dengan kata lain populasi adalah kumpulan dari keseluruhan pengukuran obyek atau individu yang sedang dikaji. Populasi sampel yang digunakan yaitu serbuk fisetin (Sigma Aldrich, USA) yang dibuat dengan komponen fosfatidilkolin dan kolesterol menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian dari subyek dalam populasi yang diteliti meliputi ciri-ciri, jenis dan keberadaannya sudah tentu mampu secara *representative* dapat mewakili atau menggambarkan populasi sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sejumlah serbuk fisetin murni yang dibuat nanofitosom fisetin dengan komponen lipid fosfatidilkolin dan kolesterol menggunakan berbagai variasi konsentrasi tertentu dan dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung. Variabel utama dalam penelitian ini adalah formula dari nanofitosom fisetin yang dibuat dengan fosfatidilkolin dan kolesterol dengan berbagai variasi konsentrasi.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah karakteristik, stabilitas dan mutu fisik dari nanofitosom fisetin (ukuran partikel).

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah metode pembuatan nanofitosom fisetin (alat dan lama sonikasi).

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan dalam berbagai variabel antara lain variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat.

Variabel bebas merupakan variabel yang tidak dipengaruhi variabel lain namun sebaliknya yaitu variabel pengaruh karena variabel ini mempengaruhi variabel lain, sehingga sifatnya mempengaruhi atau menjadi sebab-perubahannya atau timbulnya variabel dependen (variabel terikat). Dalam penelitian ini variabel bebasnya yaitu variasi konsentrasi fosfatidilkolin yang digunakan dalam pembuatan nanofitosom fisetin.

Variabel terikat atau dependen merupakan variabel yang dipengaruhi sering disebut dengan variabel hasil, akibat atau variabel jawaban. Variabel terikat dari penelitian ini yaitu pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian meliputi karakterisasi nanofitosom fisetin yaitu ukuran partikel, zeta potensial dan efisiensi penjerapan.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat yaitu proses pembuatan nanofitosom fisetin dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Zat aktif fisetin dengan kombinasi komponen fosfatidilkolin dan kolesterol dengan berbagai variasi. Menentukan ukuran partikel nanofitosom fisetin yaitu kurang dari 1000 nm. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan dari zat aktif, pelepasan, dan stabilitas dari nanofitosom fisetin. Pengukuran ukuran partikel menggunakan alat PSA.

Zeta potensial adalah parameter muatan listrik antara partikel koloid. Zeta potensial menunjukkan tingkatan tolak menolak antara partikel yang bermuatan sama saling berdekatan semakin tinggi nilai zeta potensial maka akan semakin mencegah terjadinya flokulasi, sehingga dengan mengurangi nilai zeta potensial

akan memungkinkan partikel untuk saling tarik menarik dan terjadi flokulasi. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui dan mengkarakterisasi sifat muatan permukaan partikel yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Potensial zeta mencerminkan potensi muatan dari partikel dan dipengaruhi oleh komposisi dari partikel dan medium tempat nanopartikel terdispersi. Dalam penelitian ini alat yang digunakan untuk mengukur nilai zeta potensial adalah zeta potensiometer.

Pengujian Efisiensi Penjerapan merupakan analisis yang digunakan untuk mengetahui zat aktif yang terjerap dalam sistem pembawa fitosom dengan cara melakukan sentrifugasi fitosom kemudian diukur dengan alat spektrofotometri UV-Vis dan dihitung sebagai obat yang tidak terjerap.

C. Alat dan Bahan

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah yang digunakan dalam penelitian ini adalah fisetin (Shaanxi Dideu Medichem Co. Ltd, Cina), fosfatidilkolin (Lipoid, Jerman), kolesterol (PT. Bratachem, Indonesia), etanol (Merk), dan kloroform (Merk).

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat untuk memperkecil ukuran partikel *homogenizer sonicator* (QSonica, newtown, U.S.A), alat untuk menghomogenkan larutan *magnetic stirer* (IKA C-MAG *Thermo Scientific*, China), alat uji ukuran partikel dan zeta potensial *Particle Size Analyzer* (Malvern), *sentrifuge* (Hettich, EBA 200), pH meter (Eutech Instruments, Ecoscan hand-held series, Singapura), Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10s, Thermo scientific), timbangan analitik (Ohaus), alat-alat gelas alat (Iwaki Pyrex, Jepang) dan non gelas yang terdapat di laboratorium.

D. Jalannya Penelitian

Tabel 1. Komposisi formula nanofitosom fisetin

Komposisi	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
Fisetin (mg)	10	10	10	10	10
Fosfatidilkolin (mg)	26,315	52,631	78,946	105,262	131,577
Kolesterol (mg)	2,649	2,649	2,649	2,649	2,649
Etanol 96% (ml)	20	20	20	20	20
Kloroform (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Keterangan:

Formula 1 menggunakan perbandingan Fisetin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:1:0,2)

Formula 2 menggunakan perbandingan Fisetin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:2:0,2)

Formula 3 menggunakan perbandingan Fisetin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:3:0,2)

Formula 4 menggunakan perbandingan Fisetin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:4:0,2)

Formula 5 menggunakan perbandingan Fisetin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:5:0,2)

1. Percobaan pendahuluan

Percobaan pendahuluan dilakukan untuk menentukan kondisi percobaan terbaik dan komposisi bahan yang sesuai untuk menghasilkan sediaan fitosom yang stabil. Pembuatan fitosom ini menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.

2. Pembuatan nano fitosom fisetin

Dalam pembuatan fisetin fitosom menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi, fosfatidilkolin dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 10 ml dengan menggunakan alat *magnetic stirer* kecepatan 2000 rpm dan suhu 30°C. Serbuk fisetin 10 mg juga dilarutkan kedalam etanol 10 ml dengan *magnetic stirer* hingga terlarut seluruhnya selama 5 menit. Kolesterol dilarutkan dengan menggunakan kloroform 0,5 ml hingga larut sempurna. Hal pertama yang dicampurkan yaitu larutan fosfatidilkolin yang masih dalam keadaan diatas *magnetic stirer* ditambah dengan perlahan lahan larutan fisetin, kemudian yang terakhir dimasukkan yaitu larutan kolesterol. Larutan di *magnetic stirer* hingga 10 menit untuk memastikan seluruh komponen tercampur dengan sempurna. Kemudian larutan tersebut ditempatkan pada labu alas bulat yang bersih dan kering lalu dievaporasi untuk menguapkan pelarut organik dengan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan kecepatan 65 rpm dan dengan suhu 40°C selama 50 menit hingga terbentuk lapisan tipis pada dinding labu alas bulat dan seluruh pelarut menguap habis. *Film* yang terbentuk akan terhidrasi oleh larutan. Dilarutkan dalam *phospat buffer saline* (pH 7,4) 20 ml dengan *rotary evaporator* 40°C kecepatan 60 rpm selama

20 menit hingga seluruh lapisan terhidrasi. Vesikel yang dihasilkan dibiarkan 24 jam pada suhu ruang kemudian dihomogenkan dengan magnetic stirrer 30°C kecepatan 2000 rpm selama 5 menit dan disonikasi menggunakan sonikator probe 3 menit (3 *cycle*) dengan amplitudo sebesar 50% untuk membentuk vesikel yang lebih kecil.

3. Karakterisasi fisetin fitosom

3.1 Pengamatan secara visual. Pengamatan organoleptik serbuk fisetin meliputi warna, bau, dan konsistensi. Pengamatan dispersi nanofitosom ada atau tidaknya endapan partikel pada sediaan.

3.2 Penetapan distribusi ukuran partikel dan potensial zeta. Untuk mengetahui ukuran sediaan nanopartikel dilakukan pengukuran ukuran dan distribusi nanopartikel menggunakan PSA, Prinsip dari alat ini yaitu *Laser Diffraction* yang ketika partikel-partikel melewati berkas sinar laser dan cahaya dihamburkan oleh partikel-partikel tersebut dikumpulkan melebihi rentang sudut yang berhadapan langsung. Distribusi dari intensitas yang dihamburkan ini yang akan dianalisis oleh komputer sebagai hasil distribusi ukuran partikel. Untuk mengetahui nilai zeta potensial dapat diukur dengan menggunakan alat zeta potensiometer yang digunakan untuk memprediksi stabilitas koloid. Pilih formula yang memenuhi range ukuran nano lalu dilanjutkan ke tahap karakteristik selanjutnya.

3.3 Uji stabilitas nanofitosom fisetin setelah penyimpanan. Sediaan disimpan pada suhu ruang yaitu 27°C selama 21 hari secara visual diamati terdapat atau tidaknya endapan pada sediaan. Formula yang paling stabil (tidak ada endapan) dilakukan pengukuran PSA lebih lanjut.

4. Efisiensi Penjerapan

Efisiensi penjerapan nanofitosom fisetin dilakukan dengan cara memisahkannya obat yang tidak terjerap pada medium pendispers menggunakan alat sentrifuse. Formula terpilih disentrifuse menggunakan alat sentrifuse kolom selama 50 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Tujuan dari pengujian efisiensi penjerapan ini yaitu untuk memisahkan obat yang tidak terjerap, dengan mengambil supernatan (obat yang tidak terjerap), lalu supernatan tersebut diambil

1 ml lalu dibaca menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimal yang sesuai dan dihitung kadar penjerapan obatnya.

4.1 Pembuatan larutan induk. Larutan baku induk dibuat dengan menimbang teliti 10 mg serbuk fisetin dilarutkan dengan etanol 96% secukupnya pada labu takar 100 ml, lalu ditambahkan larutan dapar fosfat pH 7,4 hingga tepat tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm.

4.2 Penetapan panjang gelombang maksimum. Larutan induk fisetin dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Hasil optimasi untuk pengukuran senyawa flavonoid (kuersetin, fisetin) terdapat pada panjang gelombang maksimal yaitu 361 nm. Panjang gelombang maksimum ditujukan dengan nilai serapan yang paling tinggi.

4.3 Penetapan *operating time*. Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui kestabilan reaksi suatu senyawa. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk fisetin pada panjang gelombang maksimum, dibaca serapannya mulai dari menit 0 sampai 30 menit hingga didapat absorbansi yang stabil dengan berturut-turut 2 kali atau lebih memiliki nilai yang sama.

4.4 Kurva baku. Larutan baku dibuat dengan konsentrasi 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm, 16 ppm, dan 18 ppm. Larutan induk fisetin dipipet sebanyak 0,6 ml ; 0,8 ml ; 1 ml ; 1,2 ml ; 1,4 ml ; 1,6 ml dan 1,8 ml kemudian ditambahkan dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 masing-masing dalam labu takar ad 10 ml. Seri larutan tersebut kemudian dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum fisetin yaitu 364 nm. Serapan yang diperoleh dibuat kurva *regresi linier* antara seri konsentrasi larutan induk fisetin dengan serapan/absorbansinya sehingga diperoleh persamaan *regresi linier*. Penentuan konsentrasi (x) untuk setiap pengukuran diperoleh dengan cara menghitung nilai (x) yang diperoleh pada persamaan *regresi linier* kurva standar yang diperoleh, dimana (y) adalah nilai absorbansi larutan.

5. Verifikasi metode analisis

5.1 Linearitas. Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan induk fisetin yaitu 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm, 16 ppm, dan 18 ppm pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat persamaan garis *regresi linier* antara absorbansi terhadap konsentrasi larutan induk dan ditentukan koefisien korelasi (nilai r). Hasil ini selanjutnya digunakan untuk menentukan linearitas yaitu dengan membandingkan nilai r hitung dengan nilai r tabel pada taraf kepercayaan 95 %.

5.2 Penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan batas kuantifikasi (LOQ). Batas deteksi dan batas kuantifikasi penetapan kadar fisetin ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan membuat tujuh seri konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai b (*slope*) pada persamaan regresi linier $y = a+bx$, sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x).

$$\text{LOQ} = \frac{10 Sy/x}{b} \dots\dots\dots 5$$

$$\text{LOD} = \frac{3,3 Sy/x}{b} \dots\dots\dots 6$$

6. Pengujian antioksidan

6.1 Pembuatan larutan stok DPPH 0,4 mM. Serbuk DPPH ditimbang dengan seksama sebanyak 15,8 mg kemudian dilarutkan dengan etanol pro analisa sampai tanda batas labu takar 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM (Hasanah 2016). Konsentrasi mM dihitung terhadap BM (Bobot Molekul) DPPH sebesar 394,32 g/mol. Labu takar dilapisi dengan aluminium foil agar terhindar cahaya. Pembuatan larutan DPPH harus dibuat baru dan secukupnya karena DPPH tidak stabil saat sudah menjadi larutan.

6.2 Pembuatan larutan stok Fisetin. Fisetin ditimbang dengan seksama sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan etanol pro analisa sampai tanda batas labu takar 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Larutan fisetin konsentrasi 100 ppm diencerkan menjadi 10 ppm. Setelah itu dibuat seri pengenceran yaitu 1 ppm; 2 ppm; 4 ppm; 8 ppm; 10 ppm dan 14 ppm.

6.3 Penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan stok DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambah etanol pro analisa 4 ml didalam vial yang sudah ditutup dengan aluminium foil. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang DPPH maksimal dengan serapan 515 – 520 nm (Molyneux 2004). Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang saat sampel memiliki absorbansi (serapan) maksimum.

6.4 Penentuan operating time (OT). Larutan DPPH 0,4 mM dipipet 1 ml dan dimasukkan kedalam vial yang dilapisi aluminium foil, lalu ditambah 1 ml larutan fisetin dan 3 ml etanol pro analisa. Penentuan OT dilakukan pada panjang gelombang maksimum dalam interval waktu 1 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil dan tidak ada penurunan absorbansi.

6.5 Uji aktivitas antioksidan. Larutan stok fisetin dibuat 6 seri pengenceran masing-masing diambil 1 ml, kemudian ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,4 mM kedalam vial yang dilapisi aluminium foil dan di tambahkan etanol p.a 3 ml. Campuran diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh sebelumnya. Kemudian membaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Absorbansi blanko dapat diperoleh dengan mengukur absorbansi campuran 1 ml larutan DPPH 0,4 mM dan 4 ml etanol pro analisa pada panjang gelombang maksimum DPPH. Setiap pengujian dilakukan 3 kali pengulangan. Pengujian dilakukan sebelum (senyawa tunggal fisetin) dan setelah menjadi nanofitosom. Data hasil pengukuran absorbansi dianalisa presentase aktivitas antioksidannya menggunakan persamaan berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \dots\dots\dots 7$$

Hasil persen (%) inhibisi tersebut disubstitusikan dalam persamaan linear untuk menghitung nilai IC₅₀. IC₅₀ didefinisikan sebagai jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan konsentrasi awal DPPH sebesar 50%. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui aktivitas senyawa tunggal fisetin dan aktivitas fisetin setelah menjadi sediaan nanofitosom.

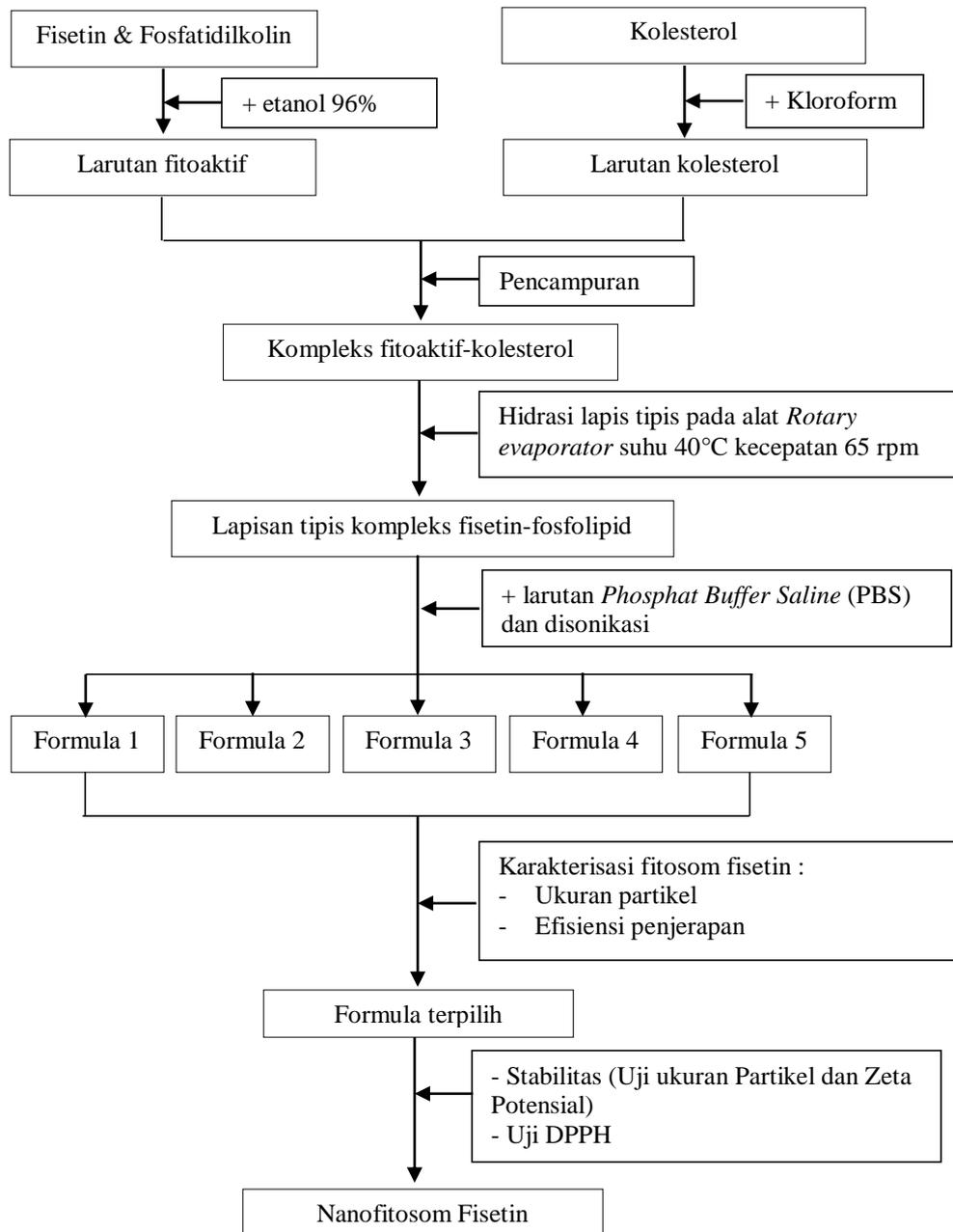
E. Analisis Hasil

Analisis hasil pengujian berbagai parameter antara lain yaitu ukuran partikel, zeta potensial, efisiensi penjerapan, stabilitas dan daya antioksidan. Analisis hasil dilakukan untuk mengetahui suatu data terhadap terjadinya kesalahan dalam penelitian, penyimpangan dari aturan baku yang sudah ditentukan. Analisis hasil suatu pengujian yang mengacu pada parameter dapat dilakukan dengan cara, data yang diperoleh dari penelitian dilakukan analisis dan dilihat kesesuaiannya dengan persyaratan baku yang telah menjadi ketentuan dari sediaan nanofitosom fisetin, misalnya pengacuan data hasil pengujian dengan referensi secara teori yang ada, dengan demikian hasil penelitian dengan referensi teori tersebut dibandingkan satu sama lainnya. Pengacuan terhadap referensi teori dilakukan untuk menghindari adanya kesalahan dalam penelitian.

Uji aktifitas antioksidan atau penangkap radikal DPPH senyawa tunggal fisetin dan nanofitosom fisetin dapat dihitung dengan menggunakan rumus persen peredaman yang selanjutnya untuk menghitung nilai IC_{50} . IC_{50} dihitung dengan persamaan *regresi linier* yang diperoleh dari pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis

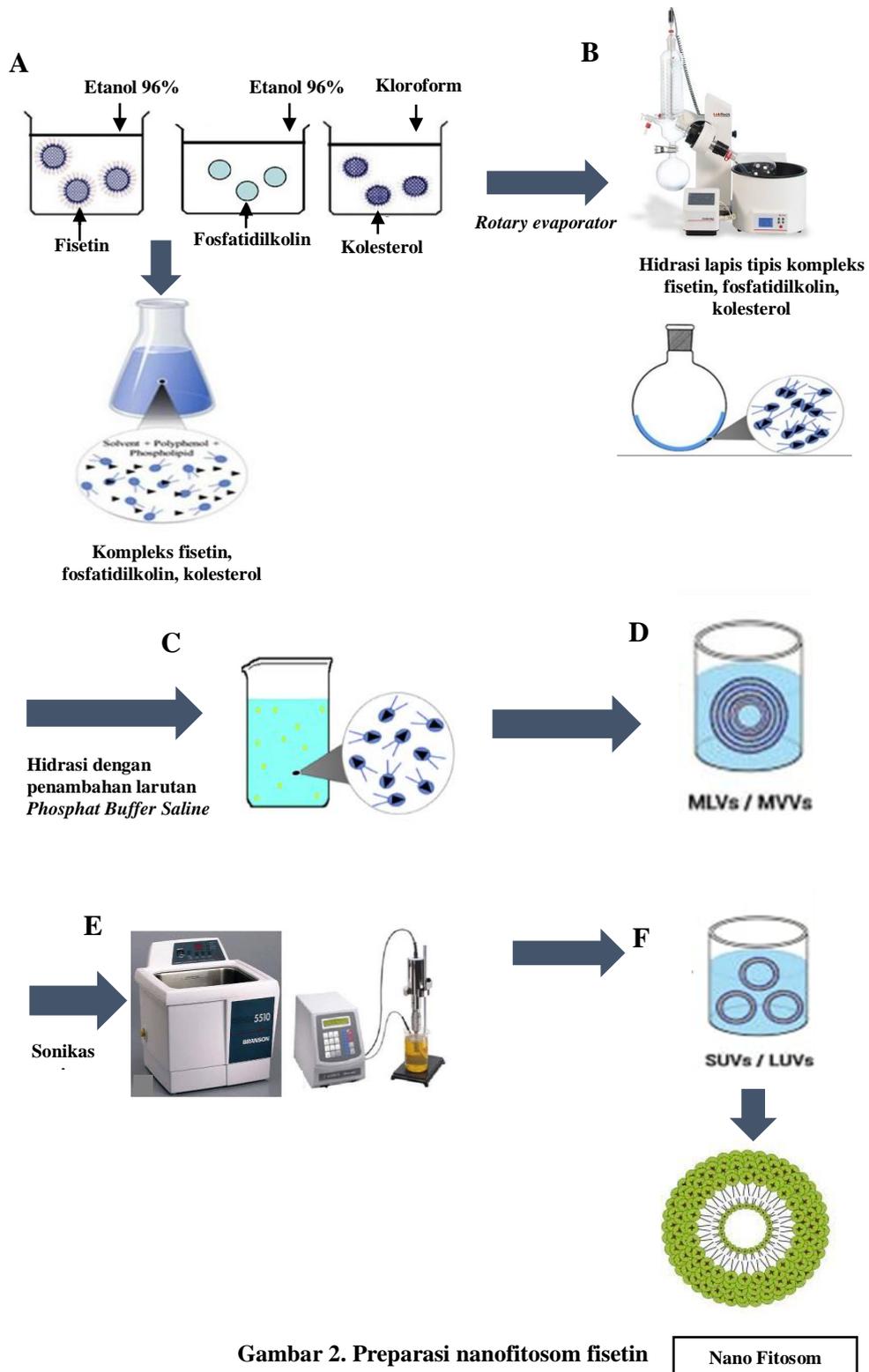
F. Skema Jalannya Penelitian

1. Skema kegiatan



Gambar 1. Skema jalannya penelitian

2. Diagram skematis pembuatan fitosom



Gambar 2. Preparasi nanofitosom fisetin