

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Percobaan Pendahuluan

Percobaan pendahuluan bertujuan membuat *drug delivery system* yaitu nanofitosom dari fisetin. Pembuatan nanofitosom fisetin dilakukan dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi sehingga akan didapatkan sediaan nanofitosom yang homogen dengan ukuran partikel yang masuk dalam range nanometer yaitu 10-1000 nm. Nanofitosom dibuat dengan perbandingan konsentrasi fosfatidilkolin untuk mendapatkan sediaan yang stabil dan homogen. Sediaan dibuat dengan komponen fisetin sebagai zat aktif, fosfatidilkolin sebagai fosfolipid yang masing masing keduanya dilarutkan dengan etanol 96% dan kolesterol sebagai surfaktan yang dilarutkan dengan kloroform, kemudian dicampurkan hingga homogen dengan *magnetic stirer* lalu seluruh pelarut diuapkan dengan cara dievap hingga terbentuk lapisan tipis dan dihidrasi dengan *phosphat buffer saline pH 7,4* lalu disonikasi yang dimaksudkan untuk memperkecil ukuran partikel dari vesikel multilamellar besar menjadi vesikel unilamellar yang kecil (Pradhan *et al.* 2016).

Percobaan pendahuluan yang dilakukan adalah pada saat proses sonikasi yaitu dengan menggunakan alat sonikator *bath* dan dengan menggunakan alat sonikator *probe*. Sonikator *bath* dapat digunakan untuk bahan yang bersifat non volatil dan memiliki volume yang besar dan memerlukan wadah ketika dilakukan sonikasi sehingga alat tidak secara langsung bersentuhan dengan sediaan. Proses penggunaan sonikator *bath* lebih lama dibandingkan dengan sonikator *probe*. Pada penggunaan sonikator *probe* mempunyai kelebihan bahwa daya yang digunakan dapat dikontrol, lalu alat sudah menggunakan *probe* yang telah dimodifikasi, maka tidak ada kontaminasi oleh fragmen logam dari *probe* yang dicelup kedalam larutan uji. Namun kekurangannya yaitu ukuran wadah yang digunakan terbatas.

Perbedaan penggunaan antara sonikator *bath* dan sonikator *probe* adalah pada posisi sampel uji. Pada sonikator *bath* sampel memerlukan wadah sehingga sampel uji tidak bersentuhan langsung dengan alat, sedangkan pada sonikator

probe sampel uji langsung bersentuhan dengan alat (*probe*). Hal tersebut akan berpengaruh pada lamanya waktu sonikasi dan ukuran partikel yang dihasilkan. Sehingga sonikator *probe* lebih dipilih karena lebih cepat dan amplitudo yang digunakan dapat *disetting* sesuai yang diinginkan. Semakin lama waktu yang digunakan untuk sonikasi maka ukuran partikel cenderung lebih homogen dan mengecil yang akhirnya menuju ukuran nanopartikel yang stabil serta penggumpalan pun semakin berkurang. Hal ini disebabkan karena gelombang ultrasonik pada metode sonikasi dapat dapat memisahkan penggumpalan partikel (*agglomeration*) dan terjadi dispersi sempurna dengan penambahan surfaktan sebagai penstabil. Namun jika menggunakan waktu yang terlalu lama juga tidak disarankan karena akan dapat membuat nanopartikel rusak menjadi terlalu kecil dan justru akan dapat menggendap terlalu cepat dan tidak menjadi sediaan yang stabil.

B. Pembuatan Nano Fitosom Fisetin

Pembuatan nanofitosom fisetin menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi. Pemilihan metode hidrasi lapis tipis ini dikarenakan pada proses pembuatannya metode ini lebih cepat, mudah dan sederhana. Metode sonikasi dilakukan karena sangat berperan dalam pembentukan nanofitosom, karena dengan menggunakan gelombang ultrasonik sangat efektif pada proses pembentukan materi berukuran nano. Gelombang ultrasonik dapat menyebabkan efek kavitasi yang berfungsi memisahkan penggumpalan (*agglomerasi*) antar partikel.

Komponen yang digunakan dalam proses pembuatan nanofitosom fisetin adalah fosfatidilkolin yang dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 10 ml dengan menggunakan alat *magnetic stirer* kecepatan 2000 rpm dan suhu 30°C selama 5 menit. Serbuk fisetin 10 mg juga dilarutkan kedalam etanol 10 ml dengan *magnetic stirer* hingga terlarut seluruhnya. Kolesterol dilarutkan dengan menggunakan kloroform 10 tetes 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 stirrer* hingga 10 menit untuk memastikan seluruh komponen tercampur dengan sempurna. Kemudian larutan tersebut ditempatkan pada labu alas bulat yang bersih dan kering lalu dievapor 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.

Pembentukan fitosom terjadi saat lapisan tipis (*film*) pada dinding labu dihidrasi dengan menggunakan larutan *phospat buffer saline* (pH 7,4) 20 ml. Hidrasi adalah proses masuknya air ke dalam vesikel, dengan menggunakan fase air. Hidrasi akan mengembangkan vesikel dan mengoptimalkan penjerapan zat aktif. Zat aktif yang terjerap dapat berasal dari senyawa yang memiliki berat molekul yang besar maupun kecil. Zat aktif dapat terjerap dalam fitosom karena terjadi interaksi antara zat aktif dengan bagian hidrofilik atau campuran keduanya. Pada proses hidrasi juga dengan alat *rotary evaporator* suhu 40°C kecepatan 60 rpm selama 15 menit hingga seluruh lapisan terhidrasi sempurna. Vesikel yang dihasilkan dibiarkan 24 jam pada suhu kamar dengan tujuan menghilangkan residu uap pelarut yang mungkin masih ada. Tahap selanjutnya dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* 30°C kecepatan 2000 rpm selama 5 menit dan disonifikasi menggunakan sonikator *probe* 3 menit (3 *cycle*) dengan amplitudo sebesar 50% untuk membentuk vesikel yang lebih kecil sehingga ukuran partikel masuk dalam ukuran nano yaitu 10-1000 nm.

C. Verifikasi Metode

1. Pembuatan Kurva Baku

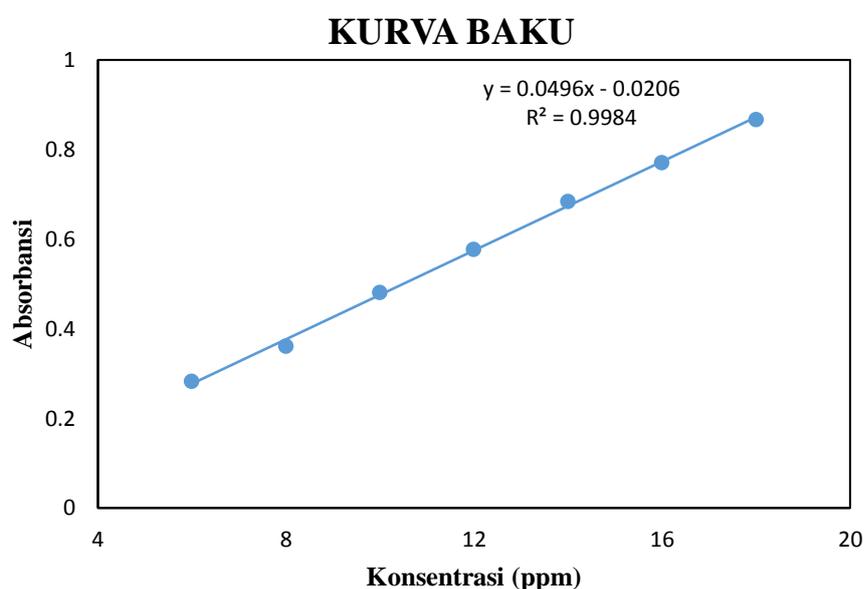
1.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Panjang gelombang maksimum biasanya digunakan untuk analisis kuantitatif dan merupakan panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Pada panjang gelombang maksimum kepekaannya juga maksimal karena pada panjang gelombang maksimum tersebut perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi larutan adalah yang paling besar. Panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara

membuat larutan induk 100 ppm dengan menimbang 10 mg serbuk fisetin dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 5 ml dalam labu takar 100 ml hingga larut dengan sempurna, selanjutnya ditambahkan dengan dapar fosfat pH 7,4 hingga tanda batas. Kemudian dari larutan untuk dipipet 1 ml lalu dimasukkan kedalam labu takar 10 ml dan ditambah dengan dapar phospat pH 7,4 sampai tanda batas sehingga didapat larutan stok dengan konsentrasi 10 ppm, selanjutnya larutan baku diuji dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm sampai didapatkan absorbansi yang stabil dan konstan. Hasil pengukuran menunjukkan puncak serapan pada panjang gelombang 364 nm dengan serapan sebesar 0,5294. Menurut Bothiraja (2014) panjang gelombang maksimum fisetin adalah sebesar 361 nm. Perbedaan hasil panjang gelombang yang didapatkan dengan literatur dapat dipengaruhi oleh proses preparasi dan kondisi lingkungan. Perubahan panjang gelombang maksimum juga disebabkan karena adanya gugus auksokrom pada fisetin yang terikat pada gugus kromofor sehingga mengakibatkan pergeseran pita absorbansi menuju panjang gelombang yang lebih besar (Tulandi *et al.* 2015). Hasil tersebut tidak berbeda signifikan sehingga panjang gelombang tersebut selanjutnya dapat digunakan untuk menentukan kurva kalibrasi dan efisiensi penjerapan fisetin dalam nanofitosom.

1.2 Penentuan *Operating Time*. Waktu operational atau *Operating Time* merupakan waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk bereaksi dengan senyawa lain hingga terbentuk senyawa produk yang stabil. Kestabilan senyawa ketika bereaksi dapat dilihat dari saat mulai direaksikan hingga tercapai serapan yang stabil atau nilai absorbansi konstan. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan baku fisetin pada panjang gelombang maksimum fisetin yaitu 364 nm mulai dari menit ke-0 sampai menit ke-30. Hasil serapan stabil ditunjukkan pada menit ke 17-26 dengan serapan sebesar 0,532.

1.3 Kurva Baku. Pembuatan kurva kalibrasi menggunakan 7 seri konsentrasi yaitu 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm, 16 ppm, dan 18 ppm dari larutan baku 100 ppm dengan menggunakan medium dapar phospat pH 7,4. Seri konsentrasi tersebut diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum fisetin yaitu 364

nm. Kemudian hasil yang diperoleh dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi, sehingga akan diketahui kurva baku dengan garis lurus. Dengan adanya kurva baku, maka dapat digunakan untuk mencari persamaan *regresi linier* sehingga dapat digunakan dalam pencarian suatu kadar yang absorbansinya telah terukur. Hasil persamaan yang diperoleh yaitu $y = 0,04961x - 0,02057$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,99922. Hasil kurva baku dari fisetin dapat dilihat dari gambar 10.



Gambar 1. Kurva baku fisetin

Hasil persamaan regresi linier tersebut memiliki koefisien korelasi 0,99922 yang mendekati 1 sehingga data variabel x dan y memiliki korelasi linier positif kuat dan data dapat dipakai untuk analisis (Utama 2016).

1. Linieritas

Metode analisis biasanya didasarkan pada literatur yang sudah ada menggunakan instrumen yang atau hampir sama (Rohman 2007). Oleh karena itu perlu dilakukan validasi metode yang diawali dengan pembuatan kurva kalibrasi dan linieritas. Linieritas adalah kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji secara langsung dan proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Untuk mengetahui linieritas suatu metode parameter yang paling umum digunakan yaitu dengan koefisien korelasi. Menurut Sarwono

(2009) jika nilai koefisien korelasi $0,75 < r \leq 0,99$ maka artinya korelasi sangat kuat. Hasil nilai korelasi yang diperoleh dari penelitian ini yaitu sebesar 0,999 sehingga menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proporsional antara respon analitik dengan konsentrasi yang diukur karena nilai korelasi $\leq 0,99$.

2. Penentuan *Limit Of Detection* (LOD) dan *Limit Of Quantitation* (LOQ)

Setelah mendapatkan kurva kalibrasi yang memenuhi persyaratan analisis, selanjutnya data yang diperoleh dari konsentrasi tiap analit yang memberikan absorbansi berbeda untuk diolah untuk menentukan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitas (LOQ). Batas deteksi (LOD) merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi namun tidak perlu dengan kuantitas (Harmita 2004) dan batas deteksi yang diperoleh adalah 0,6156 ppm. Sedangkan batas kuantitas (LOQ) merupakan konsentrasi terkecil analit yang dapat diukur secara kuantitatif. Hasil batas kuantitas (LOQ) yaitu sebesar 1,86537 ppm.

Limit Of Detection (LOD) dan *Limit Of Quantitation* (LOQ) menunjukkan kesensitifan dari suatu metode, yaitu semakin kecil nilai dari LOD dan LOQ maka semakin sensitif metode yang digunakan (Harvey 2000). Penentuan LOD dan LOQ dihitung berdasarkan standart deviasi (SD) respon dan kemiringan (slope) kurva baku pada level yang mendekati LOD sesuai dengan rumus. Standart deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standart deviasi blanko pada standart residual garis regresi linier atau standart deviasi intersep-y pada garis regresi (Gandjar & Rohman 2012). Hasil verifikasi metode analisis ditunjukkan pada tabel

Tabel 1. Parameter verifikasi metode analisis kurva kalibrasi fisetin

Parameter	Hasil
r	0,999
Batas Deteksi (LOD)	0,6156 ppm
Batas Kuantifikasi (LOQ)	1,8654 ppm

Hasil verifikasi metode analisis menunjukkan serapan dipengaruhi oleh fisetin sebesar 99,922 %. Pada penentuan batas deteksi menunjukkan jumlah analit terkecil yang masih dapat dideteksi yaitu dengan konsentrasi 0,6156 ppm dan apabila dimasukkan kedalam persamaan regresi linier $y = 0,04961x - 0,02057$ yaitu memiliki nilai serapan LOD sebesar 0,00996. Sedangkan pada penentuan batas deteksi menunjukkan jumlah analit terkecil yang masih dapat diukur secara

kuantitatif yaitu dengan konsentrasi 1,8654 ppm dan apabila dimasukkan dalam persamaan regresi linier $y = 0,04961x - 0,02057$ diperoleh nilai serapan yaitu sebesar 0,07197.

D. Karakterisasi Fisetin Nano Fitosom

1. Penetapan Ukuran Partikel dan Distribusi Ukuran Partikel

Pengujian ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel nanofitosom dilakukan dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* pada kelima formula. Dari hasil pengujian akan didapatkan nilai diameter rata-rata partikel dan indeks polidispersitas dari nanofitosom yang dibuat dan dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 2. Data Ukuran Partikel dan Distribusi Ukuran Partikel

Formula	Ukuran partikel \pm SD (nm)	Indeks Polidispersitas \pm SD
1	8811,00 \pm 1400,383	0,971 \pm 0,050
2	231,50 \pm 32,111	0,549 \pm 0,034
3	152,67 \pm 7,656	0,394 \pm 0,024
4	147,20 \pm 2,066	0,336 \pm 0,022
5	136,87 \pm 0,971	0,225 \pm 0,004

Parameter pertama yang digunakan dalam melakukan karakterisasi sediaan nanofitosom dalam penelitian ini yaitu ukuran partikel. Hasil pengukuran ukuran partikel rata-rata pada F1, F2, F3, F4 dan F5 berturut-turut sebesar 88110nm; 231,50 nm; 152,67 nm; 147,20 nm; dan 136,87 nm. Dari data hasil pengukuran tersebut ukuran partikel menjadi semakin kecil dengan bertambahnya konsentrasi fosfatidilkolin yang digunakan pada proses pembentukan nanofitosom. Formula dengan konsentrasi fosfatidilkolin yang tinggi maka dapat meningkatkan ikatan fisetin dalam kompleks nanofitosom dan menghasilkan ukuran partikel yang semakin kecil. Konsentrasi penggunaan fosfatidilkolin juga tergantung oleh zat aktifnya yang stabil ketika dicampur dengan fosfatidilkolin. Karena proses terjadinya ikatan kuat kompleks nanofitosom yaitu 1 molekul obat diikat oleh 1 fosfatidilkolin maka diharapkan akan diketahui formula yang paling bagus kestabilannya dalam mengikat fisetin.

Keseragaman ukuran partikel dapat diketahui pada nilai indeks polidispersitas. Indeks polidispersitas juga nilai yang digunakan untuk menunjukkan penyebaran distribusi ukuran partikel. Nilai indeks polidispersitas

terbaik yaitu berada pada range 0-0,5, sehingga semakin kecil nilai indeks polidispersitas maka semakin seragam ukuran partikel suatu sampel (Yuan 2008). Pada tabel data diatas nilai indeks polidispersitas (*polydispersity index*) dari distribusi ukuran partikel nanofitosom pada F1, F2, F3, F4 dan F5 berturut –turut yaitu sebesar 0,971; 0,549; 0,394; 0,336 dan 0,225. Sehingga formula yang diuji untuk parameter karakterisasi selanjutnya yaitu formula 3, 4 dan 5 karena yang memiliki ukuran partikel yang kecil dan dengan nilai indeks polidispersitas yang baik yaitu dibawah 0,5 dengan range antara 0,2-0,3.

2. Efisiensi Penjerapan

Tujuan dari dilakukannya uji efisiensi penjerapan ini adalah untuk mengetahui jumlah fisetin yang terjerap di dalam nanofitosom. Suatu sistem penghantaran obat harus memiliki kapasitas permuatan obat yang tinggi dan bertahan lama. Efisiensi penjerapan pada umumnya dinyatakan dalam persen obat yang terjerap dalam fase lemak terhadap obat yang ditambahkan. Pada pengujian efisiensi penjerapan ini, sampel nanofitosom fisetin disentrifugasi menggunakan alat sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 50 menit. Proses sentrifugasi ini bertujuan memisahkan antara fisetin yang terjerap pada kompleks nanofitosom dan fisetin yang tidak terjerap. Jumlah obat yang bebas ditentukan pada supernatan yang kemudian diambil 1 ml lalu dibaca kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum fisetin yaitu 364 nm. Kemudian absorbansi yang dihasilkan dihitung dengan dimasukkan rumus. Hasil efisiensi penjerapan dapat dilihat pada tabel 5 dan dengan data perhitungan pada lampiran.

Tabel 3. Data Efisiensi Penjerapan dan Jumlah Obat yang Terjerap

Formula	Absorbansi	% EE	Jumlah yang terjerap (mg)
3	0,787	83,72	8,372
4	0,610	87,29	8,73
5	0,554	88,42	8,842

Setelah dilakukan pengujian ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel maka selanjutnya dilanjutkan untuk parameter karakterisasi nano fitosom yaitu pengujian efisiensi penjerapan hanya dilakukan pada formula ketiga, keempat dan kelima yang memiliki ukuran partikel lebih kecil dan juga yang memiliki indeks

polidispersitas yang memenuhi syarat yaitu $< 0,5$. Adapun hasil efisiensi penjerapan nanofitosom fisetin dari ketiga formula tersebut berturut-turut adalah 83,7%; 87,29%; dan 88,42%. Dengan jumlah obat yang terjerap dari formula 3, formula 4 dan formula 5 yaitu berturut-turut 8,372 mg; 8,73 mg; 8,842 mg dari total jumlah serbuk fisetin yang digunakan yaitu 10 mg. Dari ketiga formula yang memiliki efisiensi penjerapan yang paling bagus yaitu formula 5 sebesar 88,42% setara dengan 8,842 mg dari total 10 mg, hal ini disebabkan karena adanya peningkatan konsentrasi fosfatidilkolin yang menghasilkan nanofitosom dengan kemampuan menjerap fisetin yang lebih besar dengan ukuran nanofitosom yang semakin kecil yaitu sebesar 136,87 nm. Peningkatan konsentrasi fosfatidilkolin dengan kata lain dalam formula tersebut ketersediaan fosfatidilkolin lebih banyak sehingga dibanding formula lain interaksi antara fisetin dengan fosfatidilkolin semakin tinggi dan dapat meningkatkan ikatan fisetin dalam kompleks nanofitosom dan menghasilkan ukuran partikel yang semakin kecil.

3. Uji Stabilitas Nanofitosom Fisetin Setelah Penyimpanan

3.1 Pengamatan Secara Visual. Kelima formula pada tahap ini dilakukan pengamatan mengenai stabilitas sediaan nanofitosom fisetin selama proses penyimpanan. Sediaan disimpan pada suhu 27°C pada suhu ruangan dibiarkan dalam kondisi tertutup selama 3 minggu. Kelima formula berwarna kuning dan semakin hari menjadi kuning kecoklatan serta berbau khas. Pada formula 1, 2 dan 3 hingga minggu kedua terlihat terjadi pengendapan pada sediaan. Pada formula ke 4 terjadi endapan pada minggu ketiga. Namun berbeda dengan formula kelima yang masih stabil seperti kondisi awal yang tidak nampak ada endapan pada sediaannya. Adapun hasilnya dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 4. Stabilitas Nanofitosom Fisetin

Formula	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3
1	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
2	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
3	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
4	Tidak ada endapan	Tidak ada endapan	Ada endapan
5	Tidak ada endapan	Tidak ada endapan	Tidak ada endapan

Hal tersebut terjadi karena partikel yang tidak terdistribusi secara homogen, serta masih ada fisetin yang mungkin belum terjerap seluruhnya

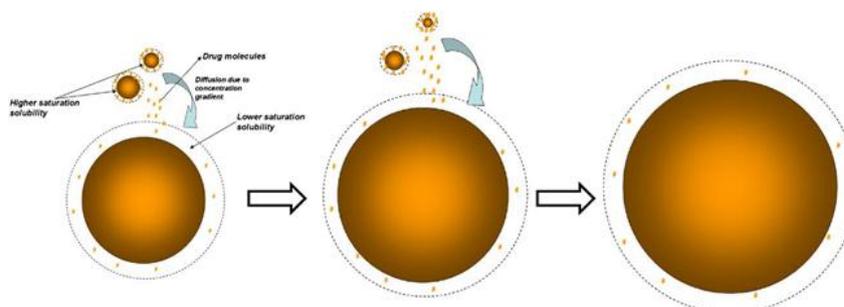
kedalam fosfatidilkolin sehingga ikatan antar partikel lemah atau juga bisa terjadi karena suhu kamar yang kurang stabil dan berubah-ubah sehingga memudahkan penggabungan antar partikel yang menyebabkan rusaknya gerak *brown*. Gerak brown sendiri yaitu gerak *zig-zag* atau acak pada partikel koloid yang terjadi karena saling terbenturnya secara tak beraturan partikel 1 dengan yang lainnya dalam medium pendispersi. Dengan adanya gerak *brown* ini maka partikel koloid terhindar dari pengendapan dan proses *agglomerasi* karena partikel terus-menerus akan bergerak.

3.2 Analisis Ukuran dan Distribusi Partikel Sebelum dan Sesudah Penyimpanan. Pengujian stabilitas hanya dilakukan pada formula 5 disuhu kamar dan diamati selama 3 minggu, uji stabilitas meliputi ukuran partikel, indeks polidispersitas dan zeta potensial.

Tabel 5. Data ukuran partikel, distribusi ukuran partikel dan zeta potensial

Formula	Ukuran Partikel (nm)		Indeks Polidispersitas		Zeta Potensial (mV)	
	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah
F5	136,87	776,9	0,225	0,378	-4,37	-10

Distribusi ukuran partikel dan ukuran partikel nanopartikel fisetin sesudah penyimpanan dapat dilihat pada tabel diatas. Setelah penyimpanan sediaan nanofitosom mengalami kenaikan ukuran partikel dan penurunan nilai indeks polidispersitas. Kenaikan ukuran partikel ini terjadi karena ketidakstabilan fisika dari dispersi nanofitosomnya sendiri selama penyimpanan. Peningkatan ukuran partikel setelah penyimpanan dapat dijelaskan melalui mekanisme *Ostwald ripening*. Ukuran partikel kecil (nm) memiliki kelarutan yang lebih tinggi daripada ukuran partikel yang besar (μm), sehingga zat aktif akan berdifusi ke ukuran yang lebih besar dan ukuran partikel yang lebih besar akan semakin besar dan ukuran partikel yang berukuran kecil akan semakin kecil (Wu 2010). Mekanisme *Ostwald ripening* dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 2. Mekanisme *ostwald ripening* (Wu 2010)

Ostwald ripening tidak hanya dapat mengakibatkan kenaikan ukuran partikel namun juga mengakibatkan ketidakseragaman distribusi ukuran partikel sehingga ukuran partikel menjadi bervariasi. Ketidakseragaman ukuran partikel juga terjadi dengan turunnya nilai indeks polidispersitas, kemungkinan yang bisa terjadi yaitu selama proses penyimpanan partikel-partikel kecil dalam nanofitosom saling menempel satu dengan yang lainnya sehingga ukuran partikel menjadi lebih seragam dengan yang berukuran besar. Meskipun ukuran partikel menjadi lebih besar yaitu 776,9 nm namun angka tersebut masih masuk dalam range nanometer dan nilai indeks polidispersitasnya mengalami penurunan dari 0,225 menjadi 0,378 namun masih dalam kategori baik yang kurang dari nilai indeks polidispersitas $< 0,5$. Sehingga dapat dinyatakan bahwa fisetin dalam nanofitosom tidak stabil selama proses penyimpanan.

Pada tahap ini pengukuran potensial juga dilakukan. Potensial zeta dilakukan dengan tujuan mengetahui muatan dari partikel dalam medium spesifik. Pada formula 5 diketahui sebelum dilakukan penyimpanan memiliki nilai zeta potensial sebesar -4,37 mV, lalu setelah disimpan selama 21 hari dilakukan pengukuran zeta potensial kembali dan didapat nilai zeta potensial yaitu sebesar -10 mV. Nilai potensial zeta dari suatu partikel yang terlalu kecil akan terjadi gaya tarik menarik yang lebih besar dibandingkan gaya tolak menolaknya antar partikel sehingga menyebabkan terjadinya koagulasi atau flokulasi. Sebaliknya jika suatu nanopartikel memiliki nilai potensial zeta yang besar (yang idealnya +30 mV atau -30 mV) biasanya memiliki derajat stabilitas yang tinggi. Hasil dari potensial zeta ini menunjukkan bahwa nanofitosom dari fisetin tidak stabil, sehingga dapat dikatakan gaya tarik-menarik partikel yang terdapat dalam sediaan nanofitosom fisetin cenderung lebih besar dibandingkan dengan gaya tolak menolak partikel. Sehingga resiko partikel beragglomerasi cenderung besar.

E. Uji Antioksidan

1. Penentuan Panjang Gelombang

Penentuan panjang gelombang maksimum digunakan untuk mengetahui absorbansi maksimum zat aktif dibaca oleh spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum DPPH yang diperoleh yaitu sebesar 516 dengan nilai absorbansi maksimum yaitu 0,8619. Nilai ini sesuai dengan rentang panjang gelombang maksimum yang dimiliki DPPH yaitu antara 515-520 nm (Molyneux 2004). Panjang gelombang maksimum digunakan untuk pembacaan aktivitas peredaman radikal bebas oleh senyawa antioksidan. Adapun hasil penentuan panjang gelombang maksimum DPPH terdapat pada lampiran.

2. Penentuan *Operating Time*

Operating Time merupakan waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk bereaksi dengan senyawa lain hingga tercapai serapan atau absorbansi dengan nilai yang konstan. Penentuan *operating time* dilakukan pada larutan DPPH yang direaksikan dengan sampel fisetin serta sampel nanofitosom fisetin dengan panjang gelombang maksimumnya yaitu 516 nm. Hasil *operating time* untuk fisetin adalah 55-57 menit. Adapun hasil penentuan *operating time* terdapat pada lampiran.

3. Uji Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas Senyawa Fisetin dan Nanofitosom fisetin

Metode dalam penentuan aktivitas antioksidan yaitu menggunakan metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil). DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dan tidak membentuk dimer akibat delokalisasi dari elektron bebas pada seluruh molekul. Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH dapat diamati berdasarkan dari hilangnya warna ungu akibat tereduksinya DPPH oleh antioksidan sehingga berubah menjadi warna kuning. Intensitas warna dari larutan uji diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yaitu 516 nm. Aktivitas antioksidan dapat diukur dengan menentukan nilai IC_{50} . IC_{50} didefinisikan sebagai jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan konsentrasi awal DPPH sebesar 50%.

Pengujian antioksidan hanya dilakukan pada formula 5, dipilih karena yang memiliki ukuran partikel dan efisiensi penyerapan yang paling baik diantara keempat formula lainnya. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas fisetin, nanofitosom fisetin dan basis dari nanofitosom. Tujuan penentuan aktivitas antioksidan ini adalah untuk mengetahui kemampuan antioksidan dari senyawa fisetin dan mengetahui apakah kemampuan antioksidan yang dimiliki fisetin masih tetap ada ketika dibuat dalam sistem penghantaran obat nanofitosom. Adapun hasil IC_{50} dari fisetin dan nanofitosom fisetin setelah dilakukan replikasi sebanyak 3 kali yaitu dapat dilihat pada tabel 8 dan data perhitungan pada lampiran.

Tabel 6. Nilai IC_{50} Fisetin dan Nanofitosom Fisetin

Nama	Nilai IC_{50}	Kekuatan
Fisetin	28,735 ppm	Sangat Kuat
Nanofitosom Fisetin	68,257 ppm	Kuat

Senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm. Menurut Badarinath (2010) juga sama, senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, berpotensi kuat apabila nilai IC_{50} antara 50-100 ppm, berpotensi sedang jika nilai IC_{50} antara 100-150 ppm dan dikatakan berpotensi lemah jika nilai IC_{50} antara 151-200 ppm.

Hasil yang diperoleh dari senyawa tunggal fisetin yang belum bercampur dengan zat pembawa menjadi sediaan nanofitosom menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 28,735 ppm yang termasuk dalam antioksidan sangat kuat. Menurut Khanduja (2003) fisetin merupakan senyawa golongan flavonoid yang memiliki 4 gugus hidroksil. Semakin banyak jumlahnya maka akan semakin banyak gugus hidroksil bebas yang dapat menyumbangkan hidrogen sehingga semakin banyak DPPH yang dapat direduksi.

Sedangkan nilai IC_{50} setelah menjadi sediaan nanofitosom yaitu sebesar 68,257 ppm yang termasuk dalam golongan antioksidan yang kuat. Hal ini membuktikan bahwa fisetin masih memiliki potensi antioksidan setelah menjadi sediaan nanofitosom. Namun antara senyawa fisetin tunggal dengan nanofitosom fisetin memberikan nilai IC_{50} yang berbeda, hal ini terjadi karena senyawa aktif

tidak stabil terhadap pengaruh cahaya dan panas (Husni *et al.* 2014). Kemungkinan faktor yang mempengaruhi perbedaan nilai IC_{50} atau tidak stabilnya nilai IC_{50} diantaranya yaitu proses pembuatan nanofitosom sendiri. Fisetin yang digunakan memiliki sifat yang tidak stabil terhadap panas, sedangkan proses tahapan pembuatan nanofitosom menggunakan *rotary evaporator* dengan waktu yang cukup lama dan dengan suhu panas, serta pada saat sedang berlangsungnya proses sonifikasi alat *probe* juga menghasilkan panas.

Zat pembawa nanofitosom juga dilakukan pengujian antioksidan bertujuan untuk mengetahui dan memastikan mempengaruhi atau tidaknya zat pembawa terhadap potensi antioksidan dari fisetin. Pengujian dilakukan dengan membaca serapan pada 3 konsentrasi untuk memastikan berpengaruh atau tidaknya. Adapun hasil yang didapat yaitu absorbansinya stabil berturut-turut 1,051 pada pembacaan konsentrasi 250 ppm; 125 ppm; dan 62,5ppm. Hal ini dapat dinyatakan bahwa zat pembawa dari nanofitosom tidak mempengaruhi potensi antioksidan fisetin saat dibuat menjadi sediaan nanofitosom.