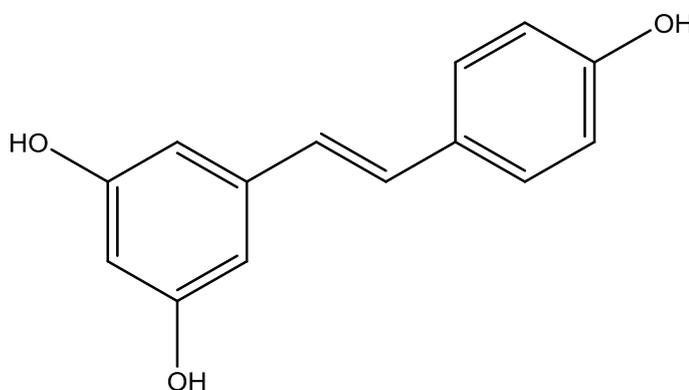


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Resveratrol

Tahun 1939 Michio Takaoka pertama kali mengisolasi resveratrol dari *white hellebore root* (*Veratrum grandiflorum*). Resveratrol terbukti memiliki sifat fisiologis yang berguna dalam pengobatan manusia. Nama resveratrol berasal dari kata: *res* - nama senyawa, resorsinol, merupakan turunan dari *resveratrol-veratr*-nama tanaman *Veratrum* dan *-ol-* menunjukkan adanya gugus hidroksil. Resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene) adalah senyawa polifenol yang ada dalam anggur, kacang tanah dan makanan lain yang biasa dikonsumsi oleh manusia (Sonia *et al.* 2014). Senyawa polifenol ini telah secara luas diteliti karena memiliki efek antioksidan. Resveratrol menunjukkan potensi yang kuat untuk menghilangkan radikal bebas, karena mempunyai tiga kelompok hidroksil pada posisi 3, 4 dan 5 dalam strukturnya serta adanya cincin aromatik dan ikatan ganda dalam molekul (Gerszon *et al.* 2014).



Gambar 1. Struktur molekul resveratrol (Sonia *et al.* 2014).

Resveratrol sangat efektif terhadap oksigen reaktif (ROS) dan nitrogen (RNS) serta radikal organik sekunder yang terbentuk sebagai hasil dari reaksi biomolekul dengan ROS dan RNS. Resveratrol meningkatkan ekspresi enzim tertentu yang bertanggung jawab untuk menjaga keseimbangan oksidasi-reduksi dalam sel, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, hemeoxygenase, glutathion peroksidase, mengurangi aktivitas enzim yang berperan dominan dalam ROS, seperti xantin oksidase. Senyawa polifenol sebagai *chelatorion* logam yang

efektif sehingga dapat melawan radikal bebas misalnya reaksi fenton (Gerszon *et al.* 2014).

Resveratrol (*Chemical Abstracts Service Registry Number CAS 501-36-0*) adalah bubuk padat putih dengan rumus molekul $C_{14}H_{12}O_3$, berat molekul 228,25 g/mol dan titik lebur antara 253 dan 255 °C. Resveratrol adalah senyawa yang larut dalam lemak dan juga dalam etanol pada ~50 mg/mLQ (~200 mM) dan dalam DMSO di ~16 mg/mL (~70 mM). Hidrosolubilitasnya ~3 mg/100 mL (~0.13 mM) membuatnya tidak larut dalam air dan log P-nya adalah 3.1. Kelarutan air yang buruk, resveratrol menunjukkan permeabilitas membran yang tinggi (Amri *et al.* 2011).

B. Nano Lipid Carrier (NLC)

1. Pengertian NLC

Sistem pembawa NLC merupakan generasi baru dari *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN) yang dapat digunakan sebagai pembawa obat untuk penghantaran topikal. NLC merupakan sistem penghantaran obat yang terdiri dari campuran lipid padat dan lipid cair, membentuk matrik inti lipid yang distabilkan oleh surfaktan. Ukuran partikel NLC pada rentang 10-100 nm. Keuntungan dari NLC yaitu ukuran partikel lipid yang kecil dapat meningkatkan penyerapan hingga ke stratum korneum dan dapat meningkatkan laju pelepasan obat yang dapat dikendalikan, dapat memberikan hasil penyerapan yang baik, meminimalkan kerusakan senyawa aktif selama penyimpanan, Sistem dispersi NLC memiliki viskositas rendah dan nyaman untuk digunakan pada kulit dan mengurangi toksisitas dan iritasi lokal (Annisa *et al.* 2016).

NLC sebagai sistem penghantaran obat telah menarik banyak perhatian bagi para penelitian. NLC memiliki jumlah muatan obat yang lebih tinggi untuk sejumlah senyawa aktif dan dapat meminimalkan kerusakan senyawa aktif selama penyimpanan. Sistem dispersi NLC memiliki viskositas rendah dan nyaman untuk digunakan pada kulit. Viskositas mempengaruhi mobilitas dan kemudahan pergerakan bahan aktif untuk lepas dari pembawa. Meningkatnya viskositas sediaan maka akan semakin besar hambatan pelepasan yang berakibat semakin

lama waktu difusi bahan aktif, sebaliknya semakin encer sediaan mobilitas molekul bahan aktif akan meningkat sehingga tidak ada hambatan dalam pelepasan (Annisa *et al.* 2015).

Campuran lipid padat dengan lipid cair adalah generasi baru nanopartikel. Berbeda dengan SLN kurang teratur yang dihasilkan dari lipid padat atau campuran lipid padat, penggabungan lipid cair menjadi lipid padat menyebabkan gangguan urutan kristal besar. Hasilnya matriks partikel lipid menunjukkan ketidaksempurnaan pada kristal dan menyisakan ruang yang cukup untuk menampung molekul obat, dengan demikian, meningkatkan kapasitas pemuatan obat. Jumlah lipid cair dapat dikendalikan dengan ditambahkan ke formulasi, sistem penghantaran NLC berbentuk solid pada suhu tubuh dan pelepasan obat yang dikendalikan dapat dicapai. Metode konvensional untuk NLC dengan homogenisasi tekanan tinggi. Jumlah cairan lipid ditambahkan ke NLC, lipid cair bisa dalam bentuk molekul atau kluster minyak yang dimasukkan ke dalam matriks padat NLC dan membentuk partikel homogen. Persiapan NLC dengan homogenisasi tekanan tinggi termasuk beberapa proses penting kondisi, seperti suhu tinggi, tekanan tinggi dan surfaktan tinggi konsentrasi. Suhu yang tinggi dapat menyebabkan konsentrasi surfaktan tinggi sehingga pada suhu tertentu diyakini menghasilkan *rilis burst* (Hu *et al.* 2005).

2. Komponen NLC

2.1 Lipid padat dan lipid cair. Istilah lipid secara umum digunakan untuk struktur trigliserida, gliserida, asam lemak, steroid dan lilin. Sistem NLC, digunakan kombinasi lipid padat (lemak) dan lipid cair (minyak) yang termasuk dalam kategori *Generally Recognized as Safe Status* (GRAS) seperti tristearin, campuran mono-, di-, dan triasilgliserol, asam lemak, dan *beeswax* (Souto 2007). Minyak atau lipid cair pada sistem NLC ini memberikan kelebihan sistem NLC dalam hal pengebakan obat karena pada umumnya bahan obat lebih larut dalam minyak dari pada lipid padat (Tamjidi *et al.* 2013) dan adanya minyak dapat menurunkan keteraturan kisi kristal matriks lipid disebabkan oleh perbedaan panjang rantai karbon lipid padat dan minyak (Souto 2007).

Tabel 1. Contoh-contoh lipid padat (asam lemak jenuh) (Hard 1983).

Nama	Struktur	Sumber
Asam Butirat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2$	Lemak Susu
Asam Miristat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$	Lemak hewani dan nabati
Asam Palmitat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$	Lemak hewani dan nabati
Asam Stearat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}_2\text{H}$	Lemak hewani dan nabati

Tabel 2. Contoh – contoh dari lipid cair (asam lemak tak jenuh) (Hard 1983).

Nama	Struktur	Sumber
Asam Palmitoleat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Lemak hewani dan nabati
Asam Oleat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Lemak hewani dan nabati
Asam Linoleat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Minyak nabati
Asam Linolenat	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Minyak biji rami

Asam lemak jenuh merupakan asam lemak yang mengandung ikatan tunggal pada rantai hidrokarbonnya. Asam lemak jenuh mempunyai rantai zig-zag yang dapat cocok satu sama lain, sehingga gaya tarik *van der Waals* tinggi, sehingga biasanya berwujud padat. Asam lemak tak jenuh merupakan asam lemak yang mengandung satu ikatan rangkap pada rantai hidrokarbonnya. Asam lemak dengan lebih dari satu ikatan rangkap tidak lazim, terutama terdapat pada minyak nabati, minyak ini disebut poliunsaturat. Trigliserida tak jenuh ganda (poliunsaturat) cenderung berbentuk minyak (Souto 2007).

2.2 Surfaktan. Surfaktan atau zat aktif permukaan adalah molekul yang struktur kimianya terdiri dari dua bagian yang mempunyai perbedaan afinitas terhadap berbagai pelarut, yaitu bagian hidrofilik dan hidrofobik. Bagian hidrofobik terdiri dari rantai panjang hidrokarbon, mempunyai afinitas terhadap minyak atau pelarut non polar. Hidrofilik dapat berupa gugus ion, gugus polar, atau gugus yang larut dalam air. Bagian ini merupakan bagian yang memiliki afinitas terhadap air atau pelarut polar (Mayer 2006).

Jumlah surfaktan merupakan hal yang penting. Jika digunakan terlalu banyak dari yang dikehendaki, baik dilihat dari kemungkinan toksisitas dan berkurangnya absorpsi dan aktivitas, jumlah yang tidak mencukupi akan mengakibatkan mengendapnya zat-zat yang terlarut. Jumlah bahan yang dapat

dilakukan oleh sejumlah surfaktan tertentu merupakan fungsi karakteristik polar-nonpolar dari surfaktan tersebut biasanya dinyatakan dalam HLB (Keseimbangan Hidrofil-Lipofil). Harga HLB memberi informasi tentang keseimbangan hidrofil-lipofil, yang dihasilkan dari ukuran dan kekuatan gugus lipofil dan hidrofil. Harga HLB memiliki skala 0-20. Surfaktan yang memiliki harga HLB rendah lebih larut dalam minyak atau bersifat hidrofobik sedangkan surfaktan yang memiliki harga HLB tinggi lebih larut dalam air atau bersifat hidrofilik (Mayers 2006).

Penggunaan surfaktan terbagi atas tiga golongan, yaitu sebagai bahan pembasah, bahan pengemulsi dan bahan pelarut. Penggunaan surfaktan bertujuan untuk meningkatkan kestabilan emulsi dengan cara menurunkan tegangan antarmuka, antara fasa minyak dan fasa air.

2.3 Penggolongan Surfaktan. Sifat ionik dari molekul dalam larutan, surfaktan digolongkan menjadi 4 tipe surfaktan yaitu,

2.3.1 Surfaktan anionik. Surfaktan anionik merupakan surfaktan dengan bagian aktif pada permukaannya mengandung muatan negatif.

2.3.2 Surfaktan kationik. Surfaktan kationik merupakan surfaktan dengan bagian aktif pada permukaannya mengandung muatan positif. Surfaktan ini terionisasi dalam air serta bagian aktif pada permukaannya adalah bagian kationnya.

2.3.3 Surfaktan nonionik. Surfaktan anionik adalah surfaktan yang tidak terionisasi di dalam air yaitu surfaktan yang bagian aktif permukaannya tidak mengandung muatan apapun.

2.3.4 Surfaktan ampoterik. Surfaktan ini dapat berperan sebagai non ionik, kationik, dan anionik di dalam larutan, jadi surfaktan ini mengandung muatan negatif maupun muatan positif pada bagian aktif pada permukaannya.

2.4 Surfaktan yang digunakan. Pembuatan sediaan NLC merupakan variasi konsentrasi dari surfaktan nonionik yaitu tween 80. Tween 80 dan asam oleat dalam sistem NLC menghasilkan kapasitas pemuatan obat yang lebih tinggi. Surfaktan non ionik direkomendasikan karena memiliki potensi kecil dalam menimbulkan sensitivitas pada kulit (Kovacevic *et al.* 2011). Tween 80 memiliki

ukuran *droplet* yang lebih kecil karena tween 80 memiliki ujung rantai hidrofobik yang tidak jenuh, Semakin panjang rantai hidrofobik maka kelarutan obat semakin besar. Tween 80 semakin kecil ukuran droplet yang dihasilkan maka penurunan tegangan permukaan semakin besar dan penurunan energi bebas permukaan juga semakin besar (Komaiko 2016).

C. Metode Pembuatan Nanolipid Carriers (NLC)

1. *Emulsification*

Lipid padat dan cair dipanaskan kemudian dicampur. Obat-obatan ditambahkan membentuk fase organik. Fasa organik ditambahkan ke fasa air yang mengandung surfaktan dan diaduk untuk membentuk emulsi kasar. Homogenisasi bertekanan tinggi selanjutnya diterapkan untuk membentuk NLC. Keuntungan karena tidak ada residu pelarut organik, tidak ada pelepasan di waktu awal, dan dispersi dengan konsentrasi lipid yang tinggi. Kerugian dari metode ini adalah itu tidak sepenuhnya cocok untuk produksi industri dan ada pelarut organik sisa (Li *et al.*2017).

2. *Ultrasonication*

Metode lipid padat, lipid cair, dan campuran obat sebagai fase minyak ditambahkan dan terdispersi dalam larutan surfaktan berair dengan pemeriksaan *ultrasonication*. Sampel kemudian didinginkan bawah dan dipadatkan untuk membentuk NLC. Emulsi stabil terbentuk, fasa minyak diuapkan dengan memanaskan di bawah tekanan yang dikurangi, atau dengan penguapan sambil terus diaduk. Panas selama persiapan harus dihindari karena memiliki keuntungan paling penting dari metode ini. Masalah toksikologi dapat terjadi hasil dari residu pelarut dari produk yang diperoleh dengan metode ini. Kerugian dari metode ini adalah kualitas dispersi rendah. Kualitas dispersi diproduksi oleh metode ini sering dipengaruhi oleh kehadiran mikropartikel, yang mengarah ke fisik ketidakstabilan pada penyimpanan. Konsentrasi lipid rendah (<1%) dan konsentrasi surfaktan relatif tinggi (Li *et al.*2017).

3. *High Shear Homogenization and Ultrasound*

Metode ini merupakan teknik dispers yang mudah dan paling sering digunakan. Metode ini leburan lipid didispersikan pada fase air pada suhu yang

sama dengan pengadukan mekanik atau sonikasi (Singhal *et al* 2011). Pengaruh kecepatan pengadukan, waktu emulsifikasi dan kondisi pendinginan terhadap ukuran partikel dan nilai zeta potensial. Peningkatan kecepatan pengadukan lebih berpengaruh pada nilai *Polydispersity Index* (PI) dibanding pada penurunan ukuran partikel. Metode ini, kualitas dispersi masih kurang baik karena masih dijumpai mikropartikel dan untuk penggunaan metode *ultrasound*, terdapat kemungkinan kontaminasi logam (Singhal *et al* 2011).

4. High Pressure Homogenization (HPH)

Metode untuk persiapan dapat digunakan dalam produksi massal dan teknik pendispersi yang tidak melibatkan pelarut organik. Metode-metode ini dapat dibagi menjadi protokol homogenisasi suhu tinggi, tekanan tinggi dan suhu rendah. Metode homogenisasi suhu tinggi, tekanan tinggi adalah yang lebih umum diadopsi dan melibatkan peleburan pertama bahan lipid padat sebelum mencampurnya dengan lipid cair dan obat-obatan. Pencampuran cairan leleh yang tersebar di seluruh fase berair mengandung surfaktan (Liet *al.* 2017).

Campuran bentuk ke awal emulsi dengan dampak kecepatan tinggi dan ekspansi dekompresi di bawah gaya geser yang sangat tinggi, tetesan cairan secara bertahap dipecah menjadi partikel nano. Suhu tinggi mengurangi viskositas cairan campuran, mengurangi ukuran partikel tetapi meningkatkan kemungkinan degradasi obat dan pembawa. Metode ini dapat berhasil digunakan untuk obat yang tidak larut dan yang lipofilik, tetapi tidak sepenuhnya cocok untuk obat hidrofilik. Keuntungan dari menghindari pelarut organik dan produksi skala besar (Li *et al.* 2017).

5. Emulsification Solven Evaporation

Metode ini, dengan bahan-bahan lipofilik dan bahan aktif yang hidrofob dilarutkan dalam pelarut organik yang tidak campur dengan air. Larutan tersebut diemulsifikasikan ke dalam fase air menggunakan *High Speed Homogenizer* untuk meningkatkan efisiensi *emulsifikasi*, emulsi yang terbentuk dilewatkan pada *microfluidizer*. Penguapan pelarut organik pada tahap akhir dilakukan dengan pengadukan mekanik pada suhu kamar sehingga diperoleh presipitasi lipid nanopartikel (Singhal *et al.* 2011).

D. Karakterisasi *Nanolipid Carriers* (NLC)

1. Pengukuran efisiensi penjerapan

Efisiensi penjerapan atau *entrapment efficiency* (E_e) adalah presentase bahan aktif yang terjerap didalam partikel lipid. Bahan aktif yang bersifat lipofilik biasanya memiliki nilai E_e antara 90-98% (Rahmawan *et al.* 2012). Pengukuran persen efisiensi penjerapan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Efisiensi penjerapan merupakan langkah yang digunakan untuk mengetahui seberapa besar persentase zat aktif yang terjerap di dalam sistem NLC. Hasil penentuan % EP dapat diketahui dengan menggunakan rumus berikut : (Annisa *et al.* 2015).

$$\% \text{ Entrapment Efficiency} = \frac{(W_a - W_s)}{W_a} \times 100\% \dots\dots\dots$$

$$\text{Drug Loading} = \frac{(W_a - W_s)}{W_a - W_s + W_1} \times 100\% \dots\dots\dots$$

Keterangan :

EE = efisiensi penjerapan

DL = Kandungan Obat

W_a = massa obat yang ditambahkan kedalam formula

W_s = analisa bobot obat dalam supernatan

W₁ = penambahan bobot lipid (Sethuraman *et al.* 2017).

2. Pelepasan obat

Profil pelepasan obat obat merupakan suatu parameter penting untuk desain dan evaluasi suatu sistem penghantaran obat. Pelepasan obat dari partikel lipid terjadi secara difusi dan bersamaan dengan degradasi partikel lipid dalam tubuh. Modifikasi profil pelepasan obat sebagai fungsi dari matriks lipid, kadar surfaktan, dan parameter produksi dapat dilakukan untuk mendapatkan profil pelepasan yang diinginkan. Pengaruh faktor-faktor profil pelepasan obat dari NLC dapat dibuat menjadi pelepasan tertunda, pelepasan dipercepat atau keduanya jika diinginkan terdapat dosis inisial pada penggunaan obat (Muller *et al* 2000).

Profil pelepasan bahan obat dari matriks lipid dapat diatur berdasarkan sifat dasar lipid, suhu produksi, dan konsentrasi surfaktan yang digunakan. Suhu yang tinggi dan konsentrasi surfaktan yang tinggi dapat menghasilkan profil pelepasan segera (*burst release*). Kelarutan bahan obat dalam fase air pada suhu kamar juga mempengaruhi profil pelepasan obat. Kelarutan obat pada fase air

menurun selama proses pendinginan, obat akan mengalami re-partisi kedalam fase lipid yang juga mengalami penurunan suhu, inti partikel lipid yang mengalami kristalisasi selama pendinginan tidak dapat menampung obat, sehingga obat akan berada pada permukaan partikel lipid dan menghasilkan pelepasan segera (*burst release*) (Muller *et al* 2000).

Sistem NLC terdapat penambahan lipid cair pada sistem yang memiliki kelebihan dalam hal penyerapan akibat penurunan modifikasi keteraturan kisi kristal dan karena bahan obat pada umumnya memiliki kelarutan yang lebih besar pada lipid cair/minyak dibandingkan lipid padat. Kapasitas penyerapan yang tinggi lebih baik ini juga dapat menghasilkan profil pelepasan *prolonged release* (Chent *et al* 2010).

Sistem NLC obat ini memiliki dua pelepasan yaitu kelarutan pada fase air untuk bahan obat yang tidak terjepit matriks, dan mekanisme difusi untuk bahan obat yang terjepit matriks lipid. Bahan obat yang terlepas dari fase air, pelepasannya bergantung terhadap kelarutannya dalam fase air, maka persamaan yang digunakan untuk menentukan jumlah kumulatif (Q) sampel yang terdifusi per luas area membran dihitung dengan rumus berikut.

$$Q = \frac{(C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \cdot S)}{A} \dots\dots\dots$$

Keterangan :

- Q = Jumlah kumulatif sampel yang terpenetrasi per luas area difusi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
 C_n = Konsentrasi sampel ($\mu\text{g}/\text{mL}$) pada sampling menit ke-n
 V = Volume sel difusi (mL)
 C_i n-1 i=1 = Jumlah konsentrasi sampel ($\mu\text{g}/\text{mL}$) pada sampling pertama (menit ke-(n-1)) hingga sebelum menit ke-n
 S = Volume sampling (mL)
 A = Luas area membran (m^2)

Kemudian dihitung kecepatan penetrasi tiap satuan waktu (fluks) dengan rumus berikut :

$$J = \frac{M}{S \times t} \dots\dots\dots$$

Keterangan :

- J = Fluks ($\mu\text{g}/\text{cm}^2;\text{jam}^{-1}$)
 M = Luas area (cm^2)
 S = Jumlah kumulatif sampel yang melalui membran (μg)
 t = Waktu (jam)

Harga laju pelepasan (fluks) resveratrol dianalisis dengan statistik menggunakan ANOVA untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna antar

sediaan uji. Jika harga t hitung $< t$ tabel berarti tidak ada perbedaan bermakna antar sediaan, sedangkan bila t hitung $> t$ tabel berarti ada perbedaan bermakna antar sediaan (Purwanti *et al.* 2013).

Pelepasan bahan aktif dari matriks menggunakan persamaan yang dikembangkan oleh Higuchi berdasarkan hukum Fick pertama dan kemudian diterapkan untuk difusi obat padat yang terdispersi dalam bentuk matriks yang homogen (Chen *et al.* 2010).

3. Pengujian antioksidan

Secara kimia senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*elektron donor*). Pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat di hambat. Kegunaan antioksidan adalah menghentikan atau memutus reaksi berantai dari radikal bebas yang terdapat dalam tubuh sehingga dapat mencegah kerusakan sel-sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas (Yuyun 2011).

4. Mekanisme Kerja Antioksidan

Antioksidan akan menghentikan proses kerusakan dengan cara memberikan elektron ke radikal bebas. Antioksidan akan melengkapi kekurangan elektron pada senyawa radikal bebas dengan berperan sebagai penyumbang radikal hydrogen maupun akseptor radikal bebas. Antioksidan akan menetralkan radikal bebas, sehingga tidak mempunyai kemampuan lagi untuk berikatan dengan elektron dari sel (Rosari *et al.* 2013).

5. Sumber Antioksidan

Antioksidan dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti dari makanan, minuman, supplement, dan dapat dimanfaatkan sebagai kosmetik dalam perawatan kecantikan. Sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi 2 kelompok, yaitu antioksidan sintetis dimana antioksidan ini diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia dan antioksidan alami yang dihasilkan dari ekstraksi bahan alami. Antioksidan dari senyawa kimia anatara lain berasal dari golongan polifenol, bioflavanoid, vitamin C, vitamin E, beta-karoten, katekin, dan

resveratrol. Antioksidan alami banyak terdapat dalam tanaman pada seluruh bagian dari tanaman seperti akar, daun, bunga, biji dan batang (Sonia *et al.* 2014).

6. Metode pengujian antioksidan

Pengujian kapasitas antioksidan suatu senyawa dilakukan secara bertahap sebagai berikut : Uji in vitro menggunakan materi biologis, misalnya mengukur viabilitas sel (teknik kultur sel), pembentukan dien terkonjugasi dan kadar TBARS dari isolat LDL, dan lain-lain. Uji in vivo pada model hewan percobaan, misalnya aktifitas enzim antioksidan, kadar TBARS (Badarinath *et al.* 2010).

Metode yang paling umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah dengan menggunakan radikal bebas *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH). Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH adalah metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain. Hasil pengukuran dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasarkan pada jenis radikal yang dihambat. Metode lain selain DPPH membutuhkan reagen kimia yang cukup banyak, waktu analisis yang lama, biaya yang mahal dan tidak selalu dapat diaplikasikan pada semua sampel (Badarinath *et al.* 2010).

DPPH berupa serbuk kristal berwarna gelap terdiri dari molekul radikal bebas yang stabil. DPPH mempunyai berat molekul 394,32 dengan rumus molekul $C_{18}H_{12}N_5O_6$ larut dalam air. Penyimpanan dalam wadah tertutup baik pada suhu - 20 °C (Molyneux 2004). DPPH berperan sebagai radikal bebas yang akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga DPPH akan berubah menjadi *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* yang bersifat non-radikal. Peningkatan jumlah *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* akan ditandai dengan berubahnya warna ungu tua menjadi warna merah muda atau kuning pucat dan bisa diamati dan dilihat menggunakan spektrofotometer sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Molyneux 2004).

Gugus kromofor dan auksokrom pada radikal bebas DPPH memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm. Warna DPPH akan berubah dari ungu menjadi kuning seiring penambahan antioksidan yaitu saat elektron tunggal DPPH berpasangan dengan hidrogen dari antioksidan. Hasil

dekolorisasi oleh antioksidan setara dengan jumlah elektron yang tertangkap. Aktivitas antioksidan diperoleh dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH melalui pengukuran absorbansi larutan uji (Bajpai *et al.* 2005).

Aktivitas penangkapan radikal bebas dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) aktivitas antioksidan. Nilai ini diperoleh dengan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100 \dots\dots\dots$$

Keterangan :
 % inhibisi : besarnya hambatan serapan
 Abs DPPH : absorbansi kontrol
 Abs sampel : absorbansi sampel (Lung and Destiani 2015).

Metode DPPH terdapat parameter terdapat parameter IC_{50} . Parameter IC_{50} merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi senyawa yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50% yang diperoleh melalui persamaan regresi. Kecilnya IC_{50} suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas (Rohman 2005). Ketentuan kekuatan antioksidan Secara spesifik ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Ketentuan kekuatan antioksidan

Nilai IC_{50}	Kekuatan
<50 ppm	Sangat kuat
50-100 ppm	Kuat
100-150 ppm	Sedang
150-200 ppm	Lemah
>200 ppm	Sangat Lemah

Sumber : Anggresani (2017).

7. Metode desain faktorial

Desain faktorial adalah suatu metode yang digunakan untuk mencari efek dari berbagai faktor atau kondisi terhadap hasil penelitian. Desain faktorial juga digunakan untuk menentukan secara serentak efek dari beberapa faktor sekaligus interaksinya. Desain faktorial merupakan aplikasi persamaan regresi yang memberikan model hubungan antara variable respon dengan satu atau lebih variable bebas. Desain faktorial dua level berarti ada dua faktor, misal A dan B yang masing-masing faktor diuji pada dua level yang berbeda yaitu level rendah dan level tinggi. Desain faktorial dapat didesain suatu percobaan untuk

mengetahui faktor yang dominan berpengaruh secara signifikan terhadap suatu respon (Shahidulla *et al.* 2015).

Desain faktorial mengandung beberapa istilah, yaitu faktorial, level, efek dan respon. Faktor adalah setiap besaran yang mempengaruhi harga kebutuhan produk, yang pada prinsipnya dapat dibedakan menjadi faktor kuantitatif dan kualitatif. Level adalah nilai atau tetapan untuk faktor. Desain faktorial digunakan level tinggi dan level rendah. Efek adalah perubahan respon yang disebabkan variasi tingkat faktor. Efek respon atau interaksi merupakan rata-rata respon pada level tinggi dikurangi rata-rata respon pada level rendah. Respon merupakan sifat atau hasil percobaan yang diamati dan dapat dikuantitatif (Shahidulla *et al.* 2015).

Optimasi campuran dua bahan (berarti terdapat dua faktor) dengan desain faktorial (*two level factorial design*) dilakukan berdasarkan rumus:

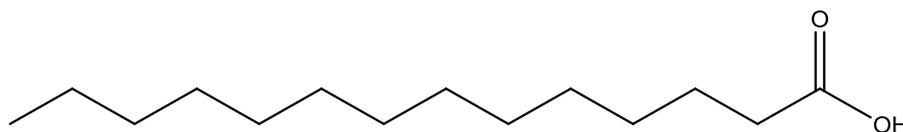
$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 \dots\dots\dots$$

Keterangan:	Y	= Respon hasil atau sifat yang diamati
	X ₁ , X ₂	= Level bagian A, level bagian B
	b ₀	= Rata-rata hasil semua percobaan
	b ₁ , b ₂ , b ₁₂	= Koefisien dapat dihitung dari hasil percobaan

Desain faktorial memiliki beberapa keuntungan yaitu memiliki efisiensi yang maksimum untuk memperkirakan efek yang dominan dalam menentukan respon. Keuntungan utama desain faktorial adalah dapat mengidentifikasi efek masing-masing faktor, maupun efek interaksi antar faktor. Metode ini ekonomis, dapat mengurangi jumlah penelitian jika dibandingkan dengan meneliti dua efek faktor secara terpisah (Shahidulla *et al.* 2015).

E. Studipreformulasi

1. Asam miristat

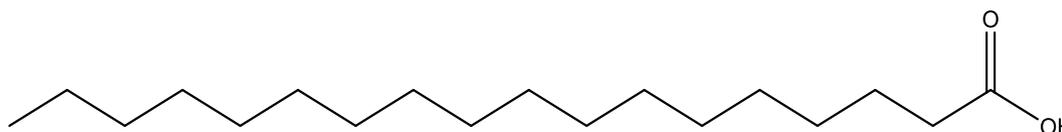


Gambar 2. Struktur molekul asam miristat (Rowe *et al.* 2009).

Asam miristat memiliki struktur kimia C₁₄H₂₈O₂. Titik leleh asam miristat 54,58°C, titik didih 326,28°C titik, nyala 1108°C, Berat molekul 228,37, Kelarutan dapat larut dalam aseton, benzena, kloroform, etanol(95%), eter, dan

pelarut aromatik dan diklorinasi, praktis tidak larut dalam air. Asam miristat sebagai padatan kristal putih berminyak. Gravitasi spesifik 0,860–0,870, kegunaan asam miristat *emulsifying agent*, penetrasi kulit, tablet dan pelumas kapsul. Penyimpanan bahan harus disimpan dalam wadah tertutup dengan baik dalam keadaan dingin, kering, tempat. Inkompatibilitas asam miristat tidak sesuai dengan oksidator kuat dan basa (Rowe *et al.* 2009).

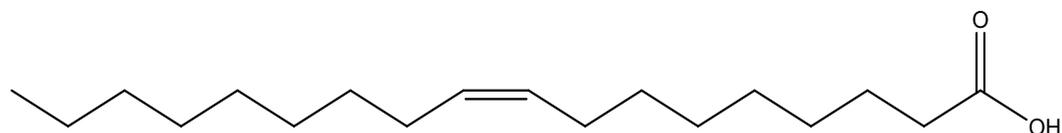
2. Asam stearat



Gambar 3. Struktur molekul asam stearat (Rowe *et al.* 2009).

Asam stearat adalah campuran asam organik padat yang diperoleh dari lemak sebagian besar terdiri dari asam oktadekanoat, $C_{16}H_{36}O_2$ dan asam heksadekanoat, $C_{16}H_{32}O_2$. Asam stearat memiliki struktur kimia $C_{18}H_{38}O$. Suhu nyala otomatis $4508^{\circ}C$ titik didih $210,58^{\circ}C$. Kepadatan $0,884-0,906 \text{ g / cm}^3$, titik nyala $1918^{\circ}C$, titik beku $55-578^{\circ}C$, titik lebur $59,4-59,88^{\circ}C$ untuk material murni. Larut dalam kloroform, etanol (95%), eter, heksana, propilen glikol, benzena, aseton, dan minyak nabati. Praktis tidak larut dalam air. Tekanan uap $133,3 \text{ Pa}$ pada $150,38^{\circ}C$. Viskositas ($9,82 \text{ mPa}$ pada $648^{\circ}C$). Penyimpanan Stearil alkohol stabil terhadap asam dan alkali dan biasanya tidak menjadi tengik, harus disimpan dalam wadah tertutup baik, sejuk dan kering (Rowe *et al.* 2009).

3. Asam oleat

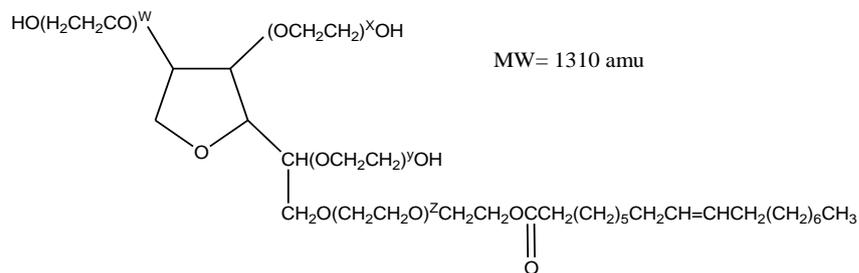


Gambar 4. Struktur molekul asam oleat (Rowe *et al.* 2009).

Asam oleat digunakan sebagai agen pengemulsi dalam makanan dan formulasi farmasi topikal. Penambah penetrasi dalam formulasi transdermal untuk meningkatkan bioavailabilitas obat yang larut dalam air yang buruk dalam formulasi tablet dan sebagai bagian dari kendaraan dalam kapsul gelatin lunak, dalam formulasi mikroemulsi topikal. Sistem pengantaran obat *self-emulsifying*

oral *patch* mukoadhesif oral dan dalam inhaler dosis terukur. Properti khas keasaman/alkalinitas $pH = 4,4$ (larutan berair jenuh), titik didih 2868°C pada $13,3$ kPa (100 mmHg) (dekomposisi pada 80 – 1008°C) Kepadatan $0,895$ g/cm^3 , titik nyala 1898°C , titik lebur 13 – 148°C . Asam oleat murni mengeras pada 48°C Indeks bias $n_D 26 = 1,4585$ Kelarutan dapat bercampur dengan benzena, kloroform, etanol (95%), Eter, heksana, dan minyak tetap dan mudah menguap, praktis tidak larut dalam air. Tekanan uap 133 Pa (1 mmHg) pada $176,58^{\circ}\text{C}$ viskositas (dinamis) 26 mPas (26 cP) pada 258°C . Kondisi stabilitas dan penyimpanan saat terpapar udara, asam oleat secara bertahap menyerap oksigen, menggelapkan warna, dan mengembangkan bau yang lebih khas. Dipanaskan pada 80 – 1008°C akan terurai. Asam oleat harus disimpan dalam wadah yang terisi penuh dan tertutup dengan baik, terlindungi dari cahaya, di tempat yang sejuk dan kering (Rowe *et al.* 2009).

4. Tween 80



Gambar 5. Struktur molekul Tween 80 (Rowe *et al.* 2009).

Tween 80 atau *Polysorbate 80* adalah ester oleat dari sorbitol dan anhidridanya berkopolimerisasi dengan lebih kurang 20 molekul etilen oksida untuk tiap molekul sorbitol dan anhidrida sorbitol. Tween 80 memiliki rumus kimia $\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$. Tween 80 merupakan cairan seperti minyak, jernih, bewarna kuning muda hingga cokelat muda, bau khas lemah, rasa pahit, dan hangat. Tween 80 larut dalam air dan etanol, tidak larut dalam minyak mineral (Rowe *et al.* 2009). Tween 80 merupakan surfaktan nonionik hidrofilik yang digunakan sebagai eksipien untuk menstabilkan suspensi dan emulsi. Tween 80 juga digunakan sebagai agen pelarut dan *wetting agent* pada krim, salep, dan *lotion* (Rowe *et al.* 2009).

F. Landasan Teori

Resveratrol adalah senyawa polifenol alami dari tumbuhan yang secara luas diteliti karena memiliki efek antioksidan resveratrol menunjukkan kemampuan luar biasa kuat untuk menghilangkan radikal bebas karena mempunyai tiga kelompok hidroksil pada posisi 3 4 dan 5 dalam strukturnya serta adanya cincin aromatik dan ikatan ganda dalam molekul (Joanna *et al.*2014). Resveratrol memiliki permeabilitas yang tinggi tetapi dalam kelarutan rendah sehingga pada pengembangan sistem penghantaran resveratrol ini dibuat *Nanostructured Lipid Carriers* (NLC) (Imtiaz *et al.* 2015).

Sistem pembawa NLC merupakan generasi baru dari *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN) yang dapat digunakan sebagai pembawa obat untuk penghantaran topikal. SLN menggabungkan keunggulan nanopartikel polimerik seperti pelepasan obat yang dikontrol dan mengurangi kehilangan kandungan obat, serta keuntungan emulsi dan liposom seperti toksisitas rendah, biokompatibilitas yang baik dan bioavailabilitas yang lebih tinggi. Keunggulan yang lebih baik dari SLN adalah bahwa matriks lipid terdiri dari komponen lipid fisiologis yang ditoleransi oleh tubuh, yang menurunkan potensi toksisitas akut dan kronis. Masalah untuk SLN, yaitu keterbatasan kapasitas pemuatan obat, kehilangan kandungan obat selama penyimpanan dan kandungan air yang tinggi dari dispersi SLN (70-95%). Dikembangkanlah *nanostructured lipid carriers* (NLC) untuk menangani masalah ini (Yuan *et al.*2007).

Sistem NLC resveratrol dibuat dengan menggunakan metode emulsifikasi. Metode emulsifikasi dapat memberikan kelebihan dibandingkan dengan metode lainnya yaitu lebih mudah dilakukan, memberikan hasil penyerapan yang baik dan sering digunakan untuk pembuatan NLC dengan berbagai obat (Annisa *et al.* 2016). Penggunaan metode sonikasi yaitu menggunakan gelombang ultrasonik dengan cara memecah ukuran partikel menjadi ukuran nano. Keuntungan metode ini yaitu karena tidak ada residu pelarut organik, tidak ada pelepasan pada waktu awal, dan dispersi dengan konsentrasi lipid yang tinggi (Li *et al* 2017).

Lipid cair menyebabkan proses kristalisasi, pada lipid padat dapat terjadi kristalisasi lebih awal kemudian lipid cair akan berada pada luar matriks bersama

bahan aktif sehingga dapat memicu kecepatan pelepasan obat. Penggunaan asam oleat sebagai minyak dalam sistem penghantaran NLC berperan penting dalam menurunkan proses kristalisasi dan meningkatkan penurunan modifikasi keteraturan kristal lipid padat (asam miristat dan stearat), serta faktor utama yang mempengaruhi kecepatan pelepasan bahan aktif dalam sistem NLC (Hu *et al.* 2005). Asam oleat merupakan asam lemak yang mudah teroksidasi, karena memiliki ikatan rangkap pada strukturnya, sehingga dengan adanya asam miristat dan stearat maka akan menutupi kekurangan dari asam oleat. Lipid cair pada sistem NLC ini selain meningkatkan pelepasan bahan aktif, juga berperan dalam hal penyerapan obat karena pada umumnya bahan obat lebih larut dalam lipid cair daripada lipid padat (Tamjidi *et al.* 2013), dan adanya minyak dapat menurunkan keteraturan kisi kristal matriks lipid yang disebabkan oleh perbedaan panjang rantai karbon lipid padat dan minyak (Souto 2007).

Penggunaan lipid padat asam miristat dan asam stearat memiliki keuntungan yaitu stabil dan tidak mudah teroksidasi kedua lemak tersebut dibedakan berdasarkan rantai panjang gugus karbon, semakin panjang rantai karbon maka semakin tinggi titik leburnya sehingga semakin cepat terpenetrasi pada stratum korneum (Hu *et al.* 2005). Kedua lipid padat tersebut tidak mempunyai ikatan rangkap sehingga akan lebih stabil, tidak mudah teroksidasi dan tidak berubah menjadi asam (Hu *et al.* 2005).

Lipid padat dan lipid cair, diperlukan juga surfaktan sebagai komponen penyusun sistem NLC, pemilihan surfaktan yang digunakan pada pembuatan sediaan NLC merupakan variasi konsentrasi dari surfaktan nonionik yaitu tween 80. Tween 80 dan asam oleat dalam sistem NLC menghasilkan kapasitas pemuatan obat yang lebih tinggi. Surfaktan non ionik direkomendasikan karena memiliki potensi kecil dalam menimbulkan sensitivitas pada kulit (Kovacevic *et al.* 2011). Tween merupakan ester asam lemak polioksietilensorbitan yang digunakan sebagai zat pengemulsi untuk membentuk emulsi M/A yang stabil (Rowe *et al.* 2009). Tween 80 memiliki ukuran *droplet* yang lebih kecil karena tween 80 memiliki ujung rantai hidrofobik yang tidak jenuh, Semakin panjang rantai hidrofobik maka kelarutan obat semakin besar. Tween 80 semakin kecil

ukuran droplet yang dihasilkan maka penurunan tegangan permukaan semakin besar dan penurunan energi bebas permukaan juga semakin besar (Komaiko 2016).

G. Hipotesis

Pertama, variasi konsentrasi tween 80 dan panjang rantai lipid padat berpengaruh terhadap efisiensi penjerapan, pelepasan obat dan aktivitas antioksidan NLC resveratrol.

Kedua, formula NLC resveratrol pada konsentrasi tertentu memiliki efisiensi penjerapan, pelepasan obat, dan aktifitas antioksidan yang paling baik.