

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

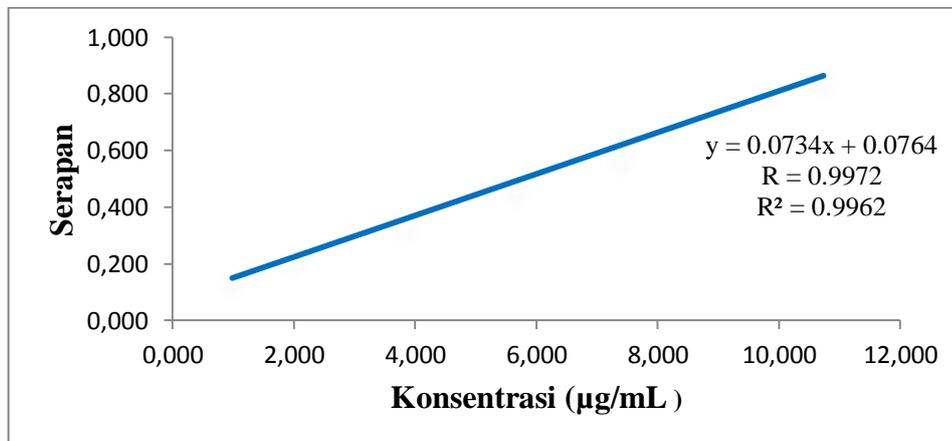
A. Pembuatan Kurva Kalibrasi

1. Penentuan panjang gelombang maksimum pitavastatin.

Panjang gelombang maksimum pitavastatin dilakukan dengan *scanning* larutan induk pitavastatin dengan konsentrasi 10 µg/mL pada panjang gelombang 200-300 nm menggunakan spektro UV-Vis. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari panjang gelombang yang memiliki serapan terbesar. Hasil panjang gelombang maksimum sebesar 245 nm, serapan 0,729 dengan pelarut metanol pro analisis. Hasil panjang gelombang pitavastatin tertera pada lampiran 5.

2. Kurva Kalibrasi

Hasil serapan yang diperoleh dibuat plot antara konsentrasi dengan serapan yang dihasilkan. Grafik antara konsentrasi pitavastatin dengan serapan ditunjukkan pada gambar 10.



Gambar 10. Kurva kalibrasi pitavastatin pelarut metanol.

Pembuatan tujuh seri konsentrasi pitavastatin yaitu 1, 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 µg/mL dari larutan baku 100 µg/mL, pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebanyak tiga kali replikasi. Persamaan regresi linear antara konsentrasi dan serapan diperoleh persamaan regresi linear yaitu $y = 0,0764 + 0,0734x$, dimana x adalah konsentrasi dan y adalah serapan, dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9972. Persamaan regresi linear yang diperoleh telah

memenuhi standar parameter linearitas yaitu memiliki nilai koefisien korelasi mendekati 0,999 dengan tujuh seri konsentrasi yang berbeda (Miller 1983).

B. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis bertujuan untuk melakukan penilaian terhadap metode analisis tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa metode tersebut memenuhi persyaratan untuk digunakan (Harmita 2004). Menurut United State Pharmacopeia (USP), validasi metode digunakan untuk menjamin bahwa metode analisis yang digunakan akurat, spesifik, reproduibel dan tahan pada kisaran analit yang dianalisis (Gandjar & Rohman 2012). Hasil verifikasi analisis dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Parameter validasi metode analisis kurva kalibrasi pitavastatin.

Parameter	Hasil
Koefisien determinasi (R^2)	0,9962
Koefisien relasi (R)	0,9972
Perolehan kembali (<i>Recovery</i>)	95.9%±0,08
Simpangan baku relatif (RSD)	0,016%

1. Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan metode analisis yang memberikan respon secara langsung atau dengan matematik, untuk mendapatkan hasil dari variabel data (absorbansi dan kurva kalibrasi) dimana secara langsung proporsional dengan konsentrasi, serta untuk mengetahui kemampuan standar dalam mendeteksi analit (Chan *et al.* 2004).

Nilai koefisien relasi merupakan indikator kualitas dari parameter linieritas yang menggambarkan respon analitik terhadap konsentrasi yang diukur (Anonim, 1994). Hasil validasi analisis menunjukkan bahwa nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9962. Nilai koefisien relasi yang dipersyaratkan oleh *Association of Official Analytical Chemis* (AOAC) adalah $> 0,99$. Berdasarkan nilai koefisien korelasi kurva kalibrasi pitavastatin dalam metanol sebesar 0,9972. Hal ini menunjukkan bahwa hasil koefisien korelasi menunjukkan hasil yang baik karena $> 0,99$ dan menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proporsional antara respon analitik dengan konsentrasi yang diukur.

2. Penetapan presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relative (RSD) dan sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik (Gandjar & Rohman 2007). Hasil perhitungan nilai simpangan baku relative (RSD) untuk validasi metode analisis kurva kalibrasi pitavastatin dalam metanol sebesar 0,016%, nilai tersebut menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan memiliki presisi yang baik karena nilai yang didapat $\leq 2\%$ (Harvey 2000).

3. Penetapan akurasi

Akurasi merupakan kedekatan hasil uji antara hasil yang diperoleh dengan nilai sebenarnya atau dengan nilai referensinya, selain itu akurasi juga dapat menggambarkan kesalahan sistematik dari suatu hasil pengukuran (Chan *et al.* 2004). Penetapan proses akurasi peneliti menggunakan tiga macam konsentrasi yaitu 80%, 100% dan 120%. Berdasarkan hasil yang diperoleh, nilai *recovery* pitavastatin dalam metanol sebesar 95,9%. Nilai *recovery* yang diperoleh berdasarkan *Association of Official Analytical Chemists* (2002) yaitu antara 85-115% sehingga metode yang digunakan memiliki akurasi yang baik.

C. Formula SNEDDS Pitavastatin

Tabel 2. Formula optimum SNEDDS pitavastatin (Kuncahyo *et al.* 2019).

Bahan	Formula optimum	
	%	mL
Capriyol	23,37	2,337
Tween 80	36,59	3,659
Trancutol P	40,04	4,004
Volume sediaan		10

D. Uji karakteristik SNEEDS *supersaturable* Pitavastatin

Pengujian karakteristik SNEDDS pitavastatin bertujuan untuk mengetahui bahwa sediaan nanoemulsi memenuhi syarat dan stabilitas. Parameter uji karakteristik nanoemulsi antara lain waktu emulsifikasi, *drug loading*, persen transmitan (%T), ukuran droplet, zeta potensial dan uji difusi franz. Beberapa syarat sediaan nanoemulsi yang stabil yaitu memiliki pengamatan visual yang jernih, tidak terjadi pemisahan antar fase, memiliki tipe emulsi o/w, waktu

emulsifikasi terbentuknya nanoemulsi kurang dari satu menit, persen transmittan mendekati transmittan air 100%, nilai *drug loading* yang tinggi > 90%, ukuran droplet berkisar antara 50-100 nm dan zeta potensial yang baik bermuatan negati. Hasil karakteristik nanoemulsi tertera pada tabel 3.

Tabel 3. Parameter pengujian karakteristik nanoemulsi.

Parameter	Liquid SNEDDS	Solid SNEDDS
<i>Emulsification time</i> *	5,30±0,19	8,56±0,23
Persen transmittan*	97,3±0,26	63,3±0,32
<i>Drug loading</i> **	108,12±7,70	28,99±1,48
Ukuran partikel	69,7 nm	185,2 nm
Zeta potensial	-34,2 mV	-38,9 mV
PDI	0,783	0,455

*: *liquid* dan *solid* SNEDDS di analisis dengan nilai SPSS versi 21

** : tidak bisa dibandingkan

Karakterisasi berupa waktu emulsifikasi, *drug loading* dan transmittan ketiganya saling berkaitan. Hasil dari karakterisasi ketiganya tersebut tidak selalu berbanding lurus, jika waktu emulsifikasinya bagus tidak selalu karakteristik *drug loading* dan transmittannya bagus, hal ini dikarenakan dari komposisi setiap bahan dalam formula.

Minyak capriyol berperan dalam proses melarutkan pitavastatin sehingga dihasilkan *drug loading* yang dihasilkan tinggi, akan tetapi penambahannya minyak capriyol yang tinggi akan menyebabkan emulsi yang terbentuk tidak transparan sehingga waktu emulsifikasi yang dihasilkan lama dan % transmittan yang dihasilkan kecil, adanya penambahan tween 80 dan Transcutol P yang berperan dalam membantu minyak capriyol dalam melarutkan pitavastatin, hal ini dikarenakan surfaktan dan ko-surfaktan memiliki struktur kimia yang bersifat hidrofobik. Sehingga minyak capriyol dengan jumlah kecil sudah bisa melarutkan pitavastatin dengan bantuan surfaktan dan ko-surfaktan. Sehingga *Drug loading* yang dihasilkan tinggi, waktu emulsifikasi cepat dan transmittan baik.

1. Waktu emulsifikasi

Pengujian waktu emulsifikasi menggambarkan waktu yang dibutuhkan SNEDDS untuk membentuk nanoemulsi ketika bertemu dengan cairan dalam saluran cerna. Emulsi dikatakan baik jika emulsifikasi terjadi dengan waktu cepat dalam waktu kurang dari satu menit. Hasil yang diperoleh pada tabel 3 tersebut

menunjukkan waktu emulsifikasi 5,30 detik pada media aquadestilata 10 mL dengan rata-rata waktu yang dibutuhkan untuk membentuk nanoemulsi kurang dari satu menit, sehingga *liquid* SNEDDS pitavastatin memiliki waktu emulsifikasi yang baik dalam membentuk emulsi.

2. % Transmitan.

Pengukuran % transmitan merupakan salah satu faktor yang sangat penting untuk melihat sifat fisik nanoemulsi yang terbentuk yaitu untuk mengukur kejernihan nanoemulsi. Pengukuran dilakukan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 633 nm menggunakan aquadestilata sebagai blanko. Apabila hasil % transmitan mendekati transmitan aquadestilata yaitu 100% maka sampel memiliki kejernihan menyerupai air. Hasil yang tertera pada tabel 3 menunjukkan bahwa transmitan *liquid* SNEDDS yaitu 97,3% memiliki karakteristik yang jernih mendekati transmitan air, sehingga ukuran partikel tersebut tergolong nanoemulsi.

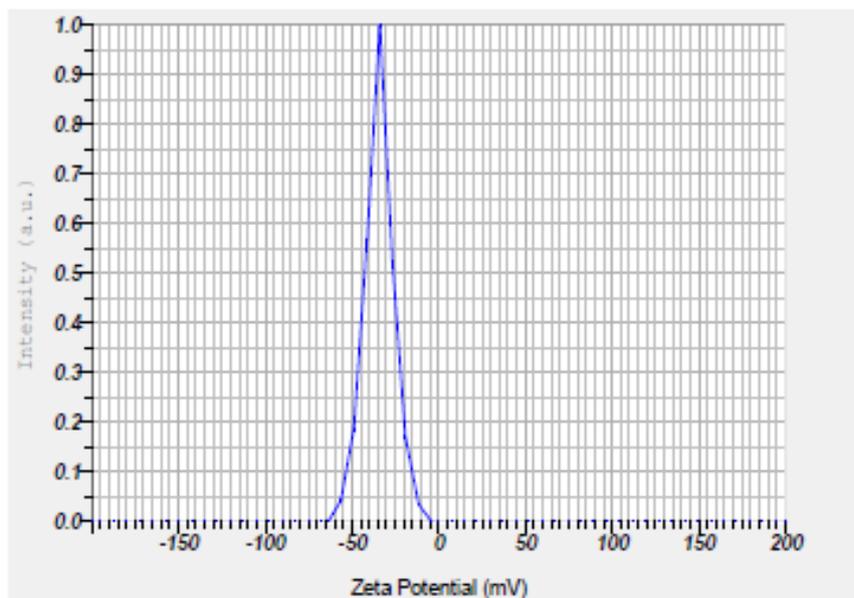
3. Drug loading

Penentuan kadar dilakukan replikasi pembacaan serapan secara triplo, kadar obat diperoleh dari persamaan regresi linear $y = 0,0923 + 0,0638x$, dimana nilai y adalah serapan rata-rata sampel formula SNEDDS dan nilai x adalah nilai kadar obat (mg/mL). Hasil *Drug loading liquid* SNEDDS pitavastatin yaitu 108,12 mg/mL, sehingga *liquid* SNEDDS pitavastatin menghasilkan *Drug loading* yang tinggi.

4. Zeta potensial

Zeta potensial mencerminkan potensi muatan dari partikel dan dipengaruhi oleh komposisi dari partikel dan medium tempat sampel terdistribusi. Nanoemulsi yang memiliki zeta potensial di atas -30 mV lebih stabil karena muatan pada permukaan nanoemulsi mencegah terjadinya agregasi antar partikel. Pada sediaan *liquid* SNEDDS pitavastatin ini memiliki zeta potensial -34,2 mV yang berarti sediaan nanoemulsi *liquid* SNEDDS pitavastatin stabil.

Zeta Potential (Mean) : -34.2 mV
Electrophoretic Mobility Mean : -0.000265 cm²/Vs

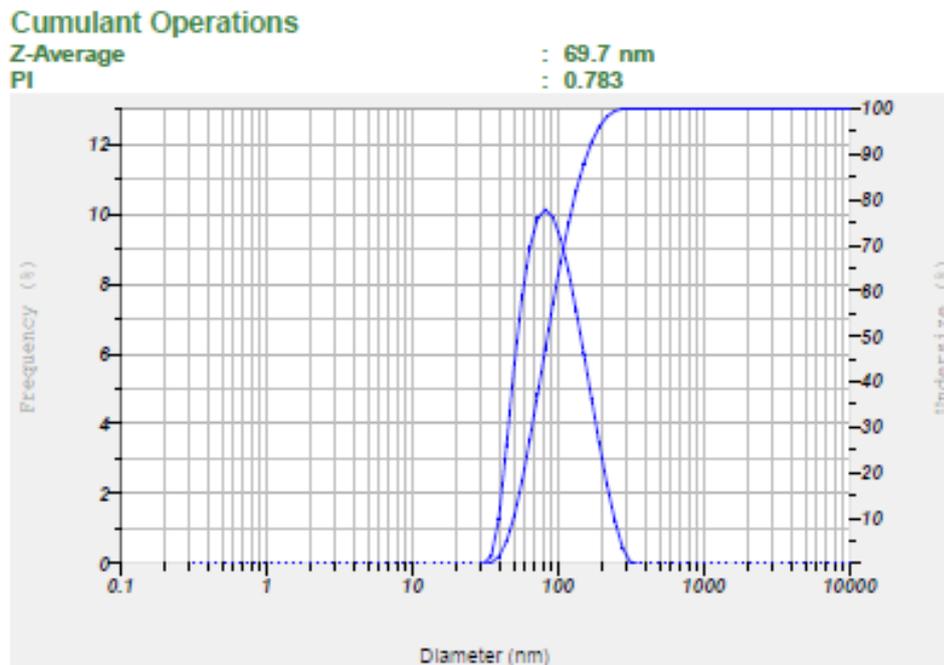


Gambar 11. Zeta potensial *liquid* SNEDDS pitavastatin

E. Partikel Size Analyzer (PSA) *Liquid* SNEDDS Pitavastatin

Ukuran partikel merupakan faktor kritis dalam *self-emulsification* karena menentukan kecepatan obat untuk terabsorpsi secara optimal (Benita 2006) serta stabilitas nanoemulsi (Rai *et al.* 2010). Ukuran partikel yang kecil akan memperluas permukaan kontak partikel dengan cairan lambung sehingga pelepasan obat lebih cepat dibandingkan dengan ukuran droplet yang besar (Nasim *et al.* 2013), semakin kecil ukuran partikel maka semakin mudah obat mencapai sel dan semakin meningkat absorpsinya di dalam tubuh.

Pengukuran ukuran *liquid* SNEDDS pitavastatin diperoleh sebesar 69,7 nm. Nilai PDI merupakan nilai standar deviasi dari rata-rata ukuran partikel yang menggambarkan keseragaman ukuran nanoemulsi. Apabila hasil yang didapat < 1 maka dapat diartikan keseragaman ukuran partikel yang baik. Nilai PDI pada *liquid* SNEDDS pitavastatin dengan adsorben *mesoporous* manitol sebesar 0,783.



Gambar 12. Ukuran partikel *liquid* SNEDDS pitavastatin.

F. Pembuatan *Solid* SNEDDS Pitavastatin

Teknik pembuatan *liquid* SNEDDS *supersaturable* menjadi *solid* SNEDDS menggunakan *adsorbtion to carier mesoporous*. Teknik ini merupakan teknik paling sederhana karena menggunakan *solidifying agent* ke dalam formula SNEDDS kemudian diaduk sampai homogen. Tujuan menggunakan teknik ini yaitu mendapatkan keseragaman ukuran serbuk yang baik dan dapat terabsorpsi hingga 70% w/w dengan pembawa yang sesuai (Katteboina 2009). Pembuatan *solid* SNEDDS pitavastatin dilakukan dengan teknik *adsoption to solid carier* dengan adsorben *mesoporous* manitol yang mempunyai sifat hidrofobik dan serta mudah dalam melepaskan obat (Paudel *et al.* 2013).

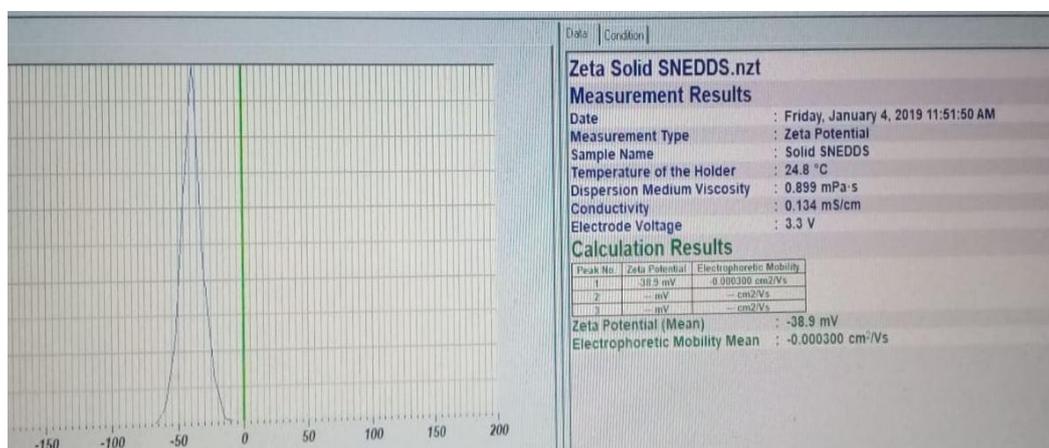
Penambahan adsorben *mesoporous* manitol ditambahkan sedikit demi sedikit sampai didapatkan serbuk yang homogen. Karakterisasi *solid* SNEDDS pitavastatin dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan sediaan nanoemulsi sesuai dengan persyaratan. Hasil yang diperoleh dari karakterisasi *solid* SNEDDS pitavastatin *emulsification time* 8,56 detik, % *transmitan* sebesar 63,3% dan *drug loading* sebesar 28,99 mg/g. Apabila dibandingkan dengan hasil sebelum dilakukan solidifikasi, hasil dari masing-masing karakterisasi yang mengalami

penurunan yaitu *emulsification time* dan % *transmitan*. Hasil karakterisasi *emulsification time* 5,30 detik menjadi lebih lama yaitu 8,56 detik yang disebabkan sifat adsorben aerosil lebih hidrofobik sehingga kemampuan dalam berinteraksi dengan air rendah dan waktu yang dibutuhkan untuk terjadi emulsi, % *transmitan* sebelum di solidifikasi sebesar 97,3% setelah disolidkan turun menjadi 63,37% disebabkan sulitnya aerosil menyerap air sehingga hasilnya lebih keruh, sedangkan *drug loading* yang sebesar 108,12 mg/mL menurun menjadi 28,99 mg/g.

Drug loading yang kecil akan mengakibatkan volume pemberian akan semakin besar. Data hasil karakterisasi *solid* SNEDS pitavastatin dapat dilihat pada tabel 3. Penurunan nilai *drug loading* disebabkan karena komponen minyak, surfaktan dan ko-surfaktan setelah pemberian adsorben *mesoporous* manitol, dalam melarutkan pitavastatin kecil.

G. Zeta potensial *solid* SNEDDS pitavastatin

Zeta potensial mencerminkan potensi muatan dari partikel dan dipengaruhi oleh komposisi dari partikel dan medium tempat sampel terdistribusi. Nanoemulsi yang memiliki zeta potensial di atas -30 mV lebih stabil karena muatan pada permukaan nanoemulsi mencegah terjadinya agregasi antar partikel. Pada sediaan *solid* SNEDDS pitavastatin ini memiliki zeta potensial -38,9 mV yang berarti sediaan nanoemulsi *solid* SNEDDS pitavastatin stabil.

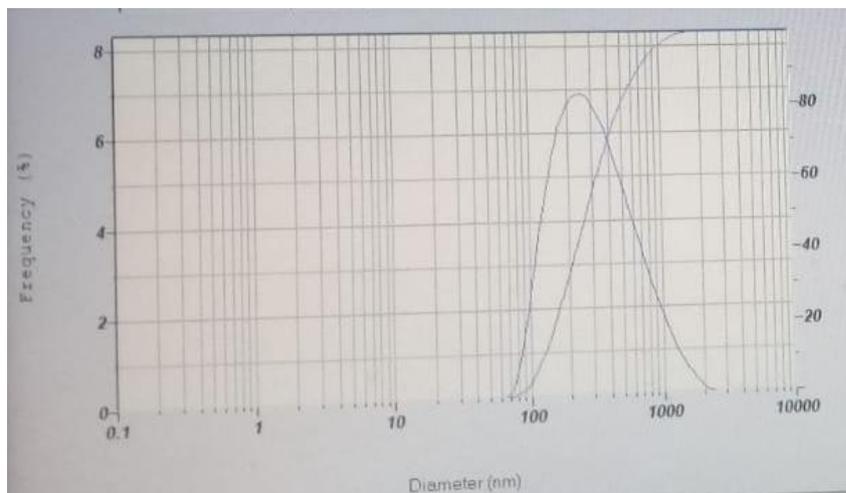


Gambar 13. Zeta potensial *solid* SNEDDS pitavastatin

H. Partikel Size Analyzer (PSA) *Solid* SNEDDS Pitavastatin

Ukuran partikel merupakan faktor kritis dalam *self-emulsification* karena menentukan kecepatan obat untuk terabsorpsi secara optimal (Benita 2006) serta stabilitas nanoemulsi (Rai *et al.* 2010). Ukuran partikel yang kecil akan memperluas permukaan kontak partikel dengan cairan lambung sehingga pelepasan obat lebih cepat dibandingkan dengan ukuran droplet yang besar (Nasim *et al.* 2013), semakin kecil ukuran partikel semakin cepat obat mencapai sel sasaran.

Pengukuran ukuran *solid* SNEDDS pitavastatin diperoleh sebesar 185,2 nm. Nilai PDI merupakan nilai standar deviasi dari rata-rata ukuran partikel yang menggambarkan keseragaman ukuran nanoemulsi. Apabila hasil yang didapat < 1 maka dapat diartikan keseragaman ukuran partikel yang baik. Nilai PDI pada *solid* SNEDDS pitavastatin dengan adsorben *mesoporous* manitol sebesar 0,455.



Gambar 14. Ukuran partikel *solid* SNEDDS pitavastatin dengan adsorben *mesoporous* manitol.

I. *Scanning Electron Microscopy* (SEM) *Solid* SNEDDS Pitavastatin

Scanning electron microscopy (SEM) digunakan untuk mengamati morfologi permukaan dari partikel dengan mudah dan efisien. Pengujian SEM ini bertujuan untuk memperlihatkan perbandingan morfologi permukaan pitavastatin murni dengan *solid* SNEDDS pitavastatin dengan adsorben *mesoporous* manitol. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pitavastatin murni memiliki bentuk seperti

batang, sedangkan hasil *solid* SNEDDS pitavastatin bentuk bongkahan bulat berpori pada perbesaran 1000x dan 5000x, yang memperlihatkan adsorben *mesoporous* manitol menyelimuti permukaan pitavastatin. Hal ini menunjukkan bahwa pitavastatin terdispersi ke dalam adsorben *mesoporous* manitol sehingga partikel menyatu membentuk gumpalan besar dan bentuknya berubah dari batang menjadi bongkahan bulat berpori. Hasil SEM dari pitavastatin murni, adsorben *mesoporous* manitol dan *solid* SNEDDS dapat dilihat di lampiran 19.

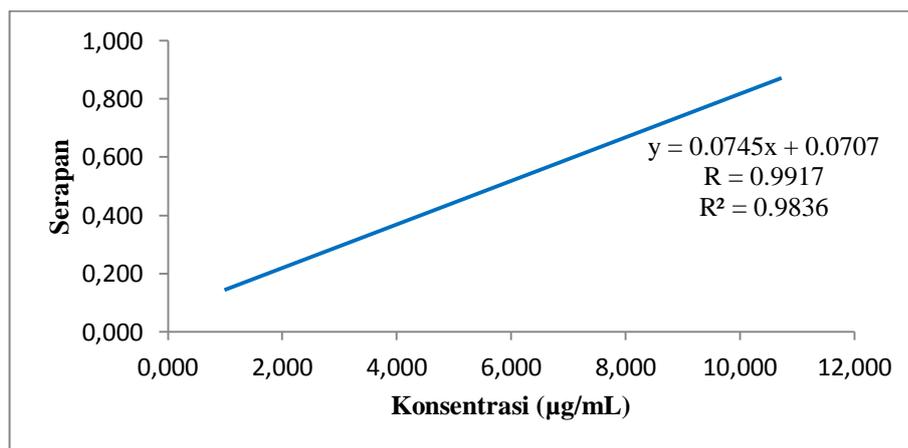
J. Hasil Pengujian Difusi

1. Penentuan panjang gelombang maksimum pitavastatin dengan pelarut Dapar Phospat pH 7,4

Panjang gelombang maksimum diperoleh dari panjang gelombang yang memiliki serapan terbesar. Hasil panjang gelombang maksimum pitavastatin yang diperoleh yaitu 245 nm dengan nilai serapan sebesar 0,721. Hasil panjang gelombang maksimum pitavastatin pada lampiran 12.

2. Kurva kalibrasi pitavastatin dengan pelarut Dapar Phospat pH 7,4

Hasil serapan yang diperoleh dibuat plot antara konsentrasi dengan serapan yang dihasilkan. Grafik antara konsentrasi pitavastatin dan serapan ditunjukkan pada lampiran 11.



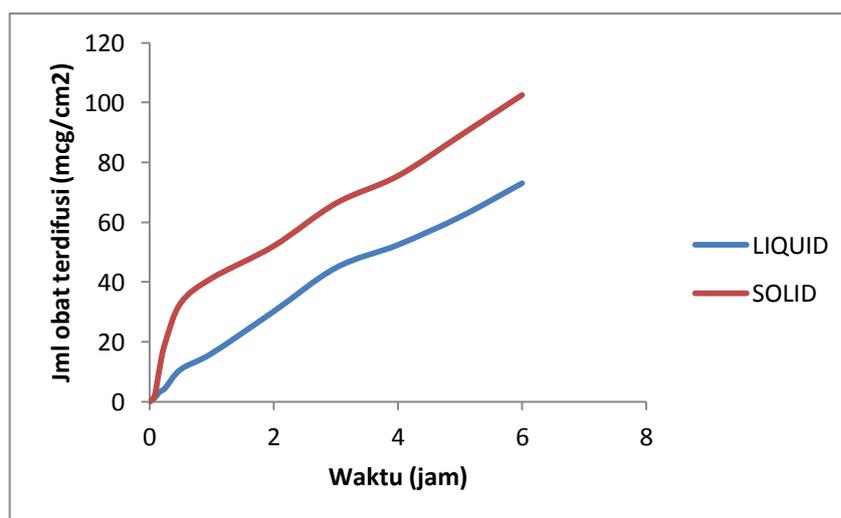
Gambar 15. Kurva kalibrasi pitavastatin dengan pelarut dapar pospat pH 7,4

Persamaan regresi linier antara konsentrasi dan serapan diperoleh persamaan regresi linier yaitu $y = 0,0707 + 0,0745x$, dimana x adalah konsentrasi dan y adalah serapan, dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9917.

Nilai koefisien korelasi yang lebih besar dari nilai r tabel maka persamaan regresi linier tersebut memiliki hubungan yang kuat.

3. Difusi Franz

Difusi obat dalam media difusi merupakan suatu bagian yang penting sebelum terjadi absorpsi sistemik di dalam tubuh. Obat yang kelarutannya kecil di dalam air menyebabkan jumlah obat yang diabsorpsi menjadi kecil (Shargel 1988). Pengujian difusi ini bertujuan untuk mengetahui gambaran obat pitavastatin terdifusi yang dibuat dalam bentuk *solid* SNEDDS pitavastatin yang dilakukan dengan *horizontal franz diffusion cells* dengan 2 kompartemen dibandingkan dengan profil difusi *liquid* SNEDDS pitavastatin dapat dilihat dari total kadar obat yang terdifusi sampai jam ke-6. Profil difusi obat dapat dilihat pada gambar 16.



Gambar 16. Profil difusi *Liquid* dan *Solid* SNEDDS Pitavastatin

Hasil pengujian difusi menunjukkan bahwa *solid* SNEDDS pitavastatin mengalami peningkatan jumlah obat yang terdifusi dalam satuan waktu, kemudian hasil dari area under curve (AUC) persentase *liquid* SNEDSS yang terdifusi pada menit jam ke-6 mencapai 86,21% sedangkan pada *solid* SNEDDS mencapai 132,64%. Hasil tersebut memberi gambaran bahwa sistem penghantaran obat *solid* SNEDDS dapat meningkatkan persentase obat yang terdifusi. Hasil difusi pada *solid* SNEDDS lebih tinggi dibandingkan hasil difusi *liquid* SNEDDS pitavastatin, hal ini disebabkan pada *liquid* SNEDDS pitavastatin terjadi

praesipitasi. Peristiwa praesipitasi pada *solid* SNEDDS tersebut dihilangkan oleh manitol sehingga kecepatan obat dalam melewati membran meningkat. Berdasarkan analisa SPSS menggunakan *Independent T-Test* pada *equal variacens assumed* nilai f yaitu 6,027 dengan nilai sig 0,034. Karena nilai sig < 0,05 maka H0 ditolak atau kedua varian antara *liquid* dan *solid* SNEDDS pitavastatin tidak sama pada pengujian difusi, sedangkan dilihat pada *equal variacens not assumed* nilai t yaitu -6,126 dengan nilai sig (*2-tiled*) 0,002. Karena nilai (*2-tiled*) , 0,05 maka H0 ditolak atau terdapat perbedaan yang signifikan antara *liquid* dan *solid* SNEDDS pitavastatin dalam jumlah obat terdifusi dan kecepatan terdifusi obat melewati membran.