

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah askorbil palmitat. Askorbil palmitat diketahui kadar bioaktifnya yang dibuat dengan komponen lipid fosfatidilkolin dan kolesterol.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang ingin digunakan dalam melakukan penelitian. Yang ciri-ciri dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan ciri-ciri dan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah askorbil palmitat yang dibuat nanofitosom dengan komponen lipid fosfatidilkolin dan kolesterol dengan berbagai variasi konsentrasi tertentu.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

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

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

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

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel utama diklasifikasikan ke dalam beberapa variabel yang bermacam-macam yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dapat dirubah dan direncanakan untuk diketahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fosfatidilkolin yang digunakan dalam pembuatan nanofitosom askorbil palmitat.

Variabel tergantung adalah variabel yang dapat berubah karena variable bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah karakterisasi nanofitosom askorbil palmitat yaitu ukuran partikel, zeta potensial, dan efisiensi penjerapan.

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

### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

Zat aktif askorbil palmitat adalah zat aktif yang dibuat menjadi nanofitosom dengan konsentrasi fosfatidilkolin yang berbeda. Menentukan ukuran partikel pada nanofitosom askorbil palmitat yaitu kurang dari 100 nm. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari nanofitosom askorbil palmitat. Ukuran partikel merupakan uji untuk mengetahui ukuran partikel dari nanofitosom askorbil palmitat yang dibuat, pengukuran ukuran partikel dilakukan dengan alat PSA (*Particle Size Analyzer*).

Zeta potensial adalah prediktor yang baik dari fenomena glasi karena potensial zeta mengatur derajat tolak-menolak antara partikel-partikel yang terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan. Potensial zeta merupakan uji 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. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Zeta Analyzer*.

Analisis morfologi adalah analisis yang digunakan untuk membandingkan bentuk dan morfologi askorbil palmitat standar dengan nanofitosom yang mengandung askorbil palmitat. Analisis morfologi dilakukan dengan menggunakan

TEM. Uji efisiensi penjerapan untuk mengetahui banyaknya askorbil palmitat yang terjerap pada fitosom. Proses pembuatan nanofitosom askorbil palmitat dengan kombinasi metode hidrasi lapis tipis dengan sonikasi.

### **C. Bahan dan Alat**

#### **1. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah askorbil palmitat, fosfatidilkolin (Lipoid, Jerman), kolesterol (Sigma-Aldrich, USA), kloroform (Merck), etanol 96% (Merck), PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4 aquadestilata (PT. Bratachem, Indonesia).

#### **2. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat untuk memperkecil ukuran partikel *homogenizer sonicator* (QSonica, Newtown, U.S.A), alat uji ukuran partikel dan zeta potensial *particle size analyzer* (Malvern), *magnetic stirrer* (Thermo Scientific, China), *sentrifuge* (SPLC Series, Gemmy 8 Hole, Taiwan), pH meter (Eutech Instruments, Ecoscan hand-held series, Singapura), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 2450), timbangan analitik (Ohaus), alat-alat gelas alat (Pyrex, Jepang) dan non gelas yang terdapat di laboratorium.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Percobaan Pendahuluan**

Percobaan pendahuluan dilakukan untuk menentukan kondisi percobaan terbaik dan komposisi bahan yang sesuai untuk menghasilkan sediaan nanofitosom askorbil palmitat yang stabil dan homogen dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.

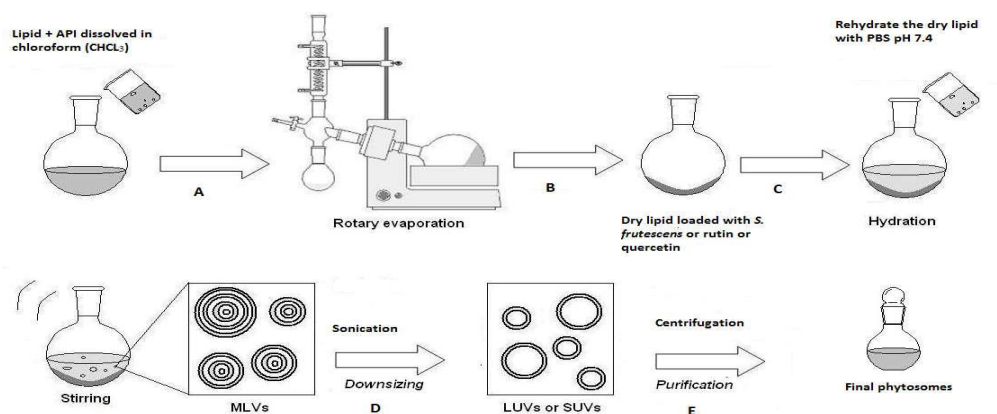
**Tabel 1. Komposisi Formula Nanofitosom Askorbil Palmitat**

Komposisi	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
Askorbil palmitat (mg)	10	10	10	10	10
Lipoid (mg)	18,34	36,68	55,02	73,37	91,71
Kolesterol (mg)	1,83	1,83	1,83	1,83	1,83
Kloroform (ml)	5	5	5	5	5
Etanol 96% (ml)	10	10	10	10	10
PBS <i>ad</i>	20	20	20	20	20

Ket : F1 menggunakan perbandingan askorbil palmitat : lipoid : kolesterol (1:1:0,2)  
 F2 menggunakan perbandingan askorbil palmitat : lipoid : kolesterol (1:2:0,2)  
 F3 menggunakan perbandingan askorbil palmitat : lipoid : kolesterol (1:3:0,2)  
 F4 menggunakan perbandingan askorbil palmitat : lipoid : kolesterol (1:4:0,2)  
 F5 menggunakan perbandingan askorbil palmitat : lipoid : kolesterol (1:5:0,2)

## 2. Pembuatan Nanofitosom Askorbil Palmitat

Pembuatan nanofitosom askorbil palmitat diawali dengan menimbang semua bahan sesuai formulasi, kemudian dilarutkan dengan kloroform dan etanol dalam labu alas bulat. Larutan kemudian diuapkan sampai kering dengan kondisi vakum dalam *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan putaran 60 rpm. Lapisan lipid yang terbentuk berupa film kering kemudian lapisan tipis dihidrasi dengan 20 ml PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4. Fitosom yang telah terbentuk diseragamkan ukurannya dengan penggunaan sonikasi *probe* (Maryana *et al.* 2016).

**Gambar 1. Skema Preparasi Nanofitosom.**

## 3. Karakterisasi Nanofitosom Askorbil Palmitat

### 3.1 Penetapan Distribusi Ukuran Partikel dan Potensial Zeta.

*Dispersi nanopartikel fitosom yang telah terbentuk dapat dianalisis ukuran*

partikel dan distribusi ukuran partikel dengan menggunakan alat 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 potensial zeta diukur menggunakan *zeta potensial analyzer* yang digunakan untuk memprediksi stabilitas koloid. Pilih formula yang memenuhi range ukuran nano lalu dilanjutkan ke tahap karakteristik selanjutnya.

**1.2 Uji Stabilitas Nanofitosom Askorbil Palmitat Setelah Penyimpanan.** Sediaan disimpan pada suhu ruang yaitu 25<sup>0</sup>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 vesikel ditentukan dengan memisahkan obat bebas dari vesikel penjerap obat dengan menggunakan teknik sentrifugasi. Suspensi nanofitosom disentrifugasi selama 50 menit pada 3000 rpm dengan tujuan untuk memisahkan obat yang tidak terjerap. Jumlah obat bebas (FD) ditentukan pada supernatan, supernatan hasil sentrifugasi ditetapkan kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Pham *et al.* 2012).

**4.1 Pembuatan Larutan Induk.** Pembuatan larutan induk askorbil palmitat dengan konsentrasi 100 ppm (mg/L) dapat dibuat dengan cara menimbang sejumlah 10 mg askorbil palmitat, kemudian dilarutkan dalam 10 ml etanol 96%, dimasukkan dalam labu takar 100 ml, dan ditambahkan *dapar phosphate pH 7,4* sampai tanda batas (El-Gawad *et al.* 2014).

**4.2 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum.** Larutan induk askorbil palmitat dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan dengan nilai serapan yang paling tinggi (El-Gawad *et al.* 2014).

**4.3 Penentuan *Operating Time*.** Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui kestabilan suatu senyawa. Pengujian dilakukan dengan

membaca larutan induk askorbil palmitat pada panjang gelombang maksimum askorbil palmitat, kemudian dibaca mulai dari menit ke 0 sampai 30 menit hingga didapatkan nilai serapan yang stabil.

**4.4 Pembuatan Larutan Seri Kurva Kalibrasi.** Seri konsentrasi kurva baku pada 10 ppm, 14 ppm, 16 ppm, 18 ppm, 20 ppm dan 22 ppm yang dibuat dengan cara memipet larutan induk askorbil palmitat 100 ppm sebanyak 1 ml; 1,4 ml; 1,6; 1,8 ml; 2 ml dan 2,2 ml lalu dimasukkan dalam labu ukur 10 ml. kemudian masing-masing diencerkan sampai tanda batas dengan larutan dapar. Seri larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum askorbil palmitat, dibuat kurva regresi linear antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi askorbil palmitat sehingga diperoleh persamaan *regresi linear* yang selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar askorbil palmitat dalam uji efisiensi penjerapan (El-Gawad *et al.* 2014).

## **5. Verifikasi Metode Spektrofotometri UV-Vis.**

Verifikasi metode spektrofotometri UV-Vis berdasarkan beberapa parameter seperti linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ), penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dilakukan dengan menggunakan metode perhitungan berdasarkan standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blanko pada standar deviasi residual garis regresi linear atau dengan standar deviasi intersep-y pada garis regresi. Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi (Gandjar & Rahman 2012).

**5.1 Linearitas.** Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan induk askorbil palmitat yaitu 10 ppm, 14 ppm, 16 ppm, 18 ppm, 20 ppm dan 22 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 %. Nilai linearitas dikatakan baik dan dapat digunakan untuk menghitung akurasi serta presisi bila  $r$  hitung  $>$   $r$  tabel.

**5.2 Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Penentuan Batas Kuantifikasi (LOQ).** Batas deteksi dan batas kuantifikasi penetapan kadar askorbil palmitat ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan membuat enam 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 ( $Sy/x$ ). Batas deteksi dan kuantifikasi dapat ditentukan dengan persamaan:

$$LOQ = \frac{10 Sy/x}{b} \dots\dots\dots 4$$

$$LOD = \frac{3,3 Sy/x}{b} \dots\dots\dots 5$$

## 6. Uji Aktivitas Antioksidan

**6.1 Pembuatan Larutan Stok DPPH.** Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM, sebanyak 15,8 mg DPPH ditimbang dengan seksama dan dilarutkan dengan etanol p.a. sampai tanda batas labu takar 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM. Konsentrasi mM dihitung terhadap BM (Bobot Molekul) DPPH sebesar 394,32 g/mol. Labu takar dilapisi dengan aluminium foil atau di tutup dengan bahan gelap dan terhindar cahaya. Pembuatan larutan DPPH harus dibuat baru dan secukupnya karena DPPH tidak stabil saat sudah menjadi larutan.

**6.2 Pembuatan Larutan Stok Askorbil Palmitat.** Sebanyak 10 mg askorbil palmitat ditimbang dengan seksama dan dilarutkan dengan pelarut etanol p.a. sampai tanda batas labu takar 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi baku askorbil palmitat 100 ppm. Larutan askorbil palmitat konsentrasi 100 ppm dibuat 6 seri pengenceran yaitu 26 ppm; 34 ppm; 42 ppm; 50 ppm; 58 ppm dan 66 ppm.

**6.3 Pembuatan Larutan Stok Nanofitosom Askorbil Palmitat.** Memipet larutan nanofitosom askorbil palmitat (formula 4) sebanyak 5 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Larutan nanofitosom askorbil palmitat (formula 4)

konsentrasi 250 ppm dibuat seri pengenceran yaitu 7,81 ppm, 15,62 ppm, 31,25 ppm, 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm.

**6.4 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.** Larutan stok DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml lalu ditambahkan etanol pro analisa ad 10 ml. lalu dilakukan *scanning* panjang gelombang maksimum pada panjang gelombang 400-600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang saat sampel memiliki absorbansi (serapan) maksimum (Windono *et al* 2004).

**6.5 Penentuan Operatting Time (OT).** Dilakukan dengan cara pada labu takar 10 mL yang telah ditutup dengan aluminium foil dimasukkan 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM dan 1,0 mL larutan dari masing-masing larutan uji (askorbil palmitat murni, sampel nanofitosom askorbil palmitat) dan 3 ml etanol pro analisa. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah didapat dengan interval waktu 1 menit selama 1 jam hingga diperoleh absorbansi yang stabil dan tidak ada penurunan absorbansi (Windono *et al* 2004).

**6.6 Uji Aktivitas Antioksidan.** Larutan stok (askorbil palmitat murni dan sampel nanofitosom askorbil palmitat) dibuat 6 seri pengenceran, masing-masing seri pengenceran diambil 1 ml, kemudian ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,4 mM ke dalam labu takar 10 mL dan di tambahkan 3 mL etanol pro analisis. 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 tiga kali pengulangan, data hasil pengukuran absorbansi dianalisa presentase aktivitas antioksidannya menggunakan persamaan berikut :

$$\%Inhibisi = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100 \dots\dots\dots 6$$

Hasil persen (%) inhibisi tersebut disubstitusikan dalam persamaan linear untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub>. IC<sub>50</sub> didefinisikan sebagai jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan konsentrasi awal DPPH sebesar 50%. Pengujian

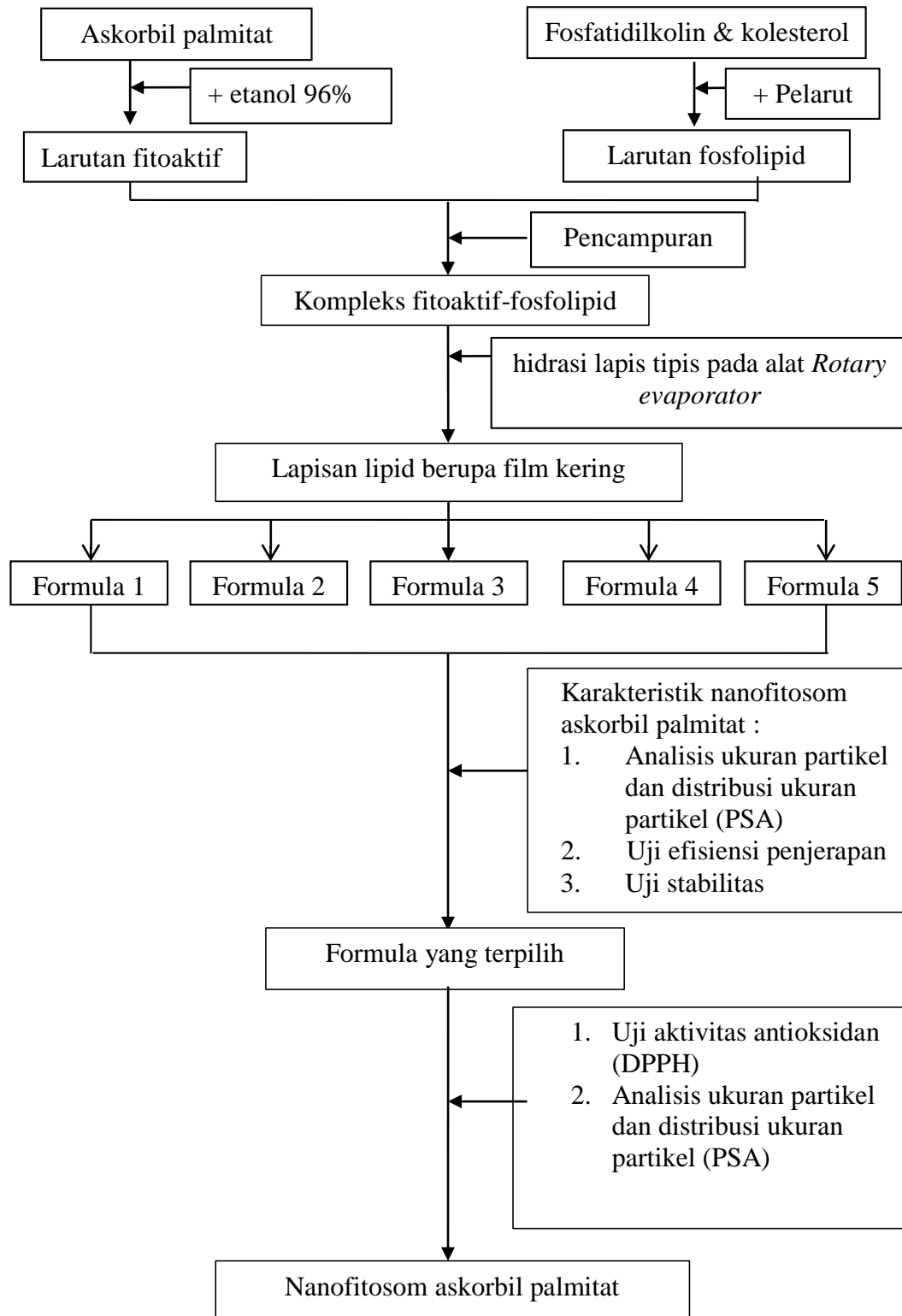


aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui aktivitas senyawa murni askorbil palmitat dan aktivitas askorbil palmitat setelah menjadi sediaan nanofitosom.

#### **E. Analisis Hasil**

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 kesesuaian dengan persyaratan baku yang telah menjadi ketentuan dari sediaan nanofitosom askorbil palmitat, 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.

### F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 2. Skema Jalannya Penelitian