

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Percobaan Pendahuluan

Pada awal penelitian dilakukan percobaan pendahuluan yang bertujuan untuk mengetahui kondisi percobaan dan metode terbaik yang dapat menghasilkan nanofitosom yang stabil dan homogen. Percobaan pendahuluan ini meliputi percobaan terhadap waktu penggunaan sonikasi, penggunaan sonikasi *probe* memerlukan waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan sonikasi *bath*. Perbedaan antara sonikasi *probe* dan *bath* terletak pada posisi sampel, untuk sonikasi *probe* sampel langsung bereaksi dengan alat sedangkan untuk sonikasi *bath* sampel perlu ditempatkan pada wadah Sampel yang berbeda posisi akan berpengaruh pada lamanya sonikasi dan ukuran partikel yang dihasilkan. Nanofitosom dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi menggunakan *magnetic stirrer* untuk menghomogenkan sampel yang dibuat. Kemudian ukuran partikelnya diperkecil dengan menggunakan sonikasi *probe* selama 3 siklus atau 6 menit untuk mendapatkan ukuran nanofitosom yang masuk dalam *range* nano dan didapatkan nanofitosom yang stabil dan homogen.

B. Pembuatan Nanofitosom Askorbil Palmitat

Proses pembuatan nanofitosom askorbil palmitat menggunakan kombinasi metode hidrasi lapis tipis-sonikasi sehingga didapatkan sediaan nanofitosom yang homogen dan memiliki ukuran partikel yang kecil. Lapis tipis yang terbentuk harus homogen dengan ketebalan yang merata karena akan mempengaruhi efisiensi dari proses hidrasi nanofitosom. Metode hidrasi lapis tipis dipilih karena merupakan metode konvensional yang paling sering digunakan karena lebih mudah, cepat dan sederhana. Peralatan yang digunakan pada pembuatan nanofitosom dengan metode hidrasi lapis tipis sangat sederhana yang hanya meliputi rotavapor dan alat pemisah agregat dari vesikel yang terbentuk.

Pada saat pembuatan dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis ini, askorbil palmitat dan fosfatidilkolin masing-masing dilarutkan dalam pelarut

etanol 96% sebanyak 10 mL pada *beaker glass*, kemudian kolesterol dilarutkan dengan kloroform sebanyak 5 mL. Menurut penelitian Pooja *et al* (2015) penggunaan jumlah pelarut organik yang digunakan akan mempengaruhi ukuran partikel yang dihasilkan. Semakin minimum penggunaan pelarut organik maka akan semakin kecil ukuran partikel yang didapatkan, sehingga penggunaan pelarut seminimal mungkin untuk mengurangi resiko terbentuknya partikel yang terlalu besar. Campuran askorbil palmitat dan fosfatidilkolin dicampur dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit dengan kecepatan 2000 rpm pada suhu 30°C. Setelah tercampur merata selanjutnya campuran tersebut dirotari evaporasi sampai fase etanol dan kloroform menguap. Pada penelitian ini, digunakan suhu 50°C dan dengan kecepatan 60 rpm dimana kolesterol mengalami transisi pada suhu ini dari fase padat ke cair setelah pelarut menguap dan mulai membentuk lapis tipis pada dinding labu.

Penguapan sisa pelarut ditandai dengan mengeringnya lapisan tipis pada dinding labu. Pembentukan nanofitosom terjadi saat lapis tipis dihidrasi dengan PBS pH 7,4 yang ditandai dengan terbentuknya dispersi koloid dengan batas yang jelas. Hidrasi adalah proses masuknya air dan zat yang terlarut kedalam vesikel. Hidrasi dilakukan dengan menggunakan fase air yang dapat melarutkan zat aktif, hidrasi ini dilakukan untuk mengembangkan vesikel dan mengoptimalkan penyerapan zat aktif. Zat aktif yang terjerap dalam nanofitosom dapat berasal dari obat dengan berat molekul rendah maupun tinggi. Zat terjerap karena terjadi interaksi antara zat aktif dengan bagian hidrofilik atau campuran keduanya. Proses hidrasi dimulai dengan formasi fase serbuk dalam air dan setelah itu terbentuk fase lipid yang stabil. Vesikel yang mengembang terjadi karena masuknya air ke dalamnya, sehingga dengan adanya zat aktif terlarut pada fase air, diharapkan zat aktif yang masih berada diluar akan ikut masuk ke dalam vesikel.

Untuk memperkecil ukuran partikel, nanofitosom yang sudah jadi kemudian disonikasi dengan menggunakan sonikasi *probe* selama 3 siklus atau 6 menit dengan amplitudo sebesar 50% yang berfungsi untuk memisahkan penggumpalan partikel dan untuk memperkecil ukuran partikel agar masuk dalam

ukuran nano yaitu 10-1000 nm. Penggunaan sonikasi *probe* menjadi pilihan karena dayanya dapat dikontrol.

C. Karakterisasi Nanofitosom Askorbil Palmitat

1. Penetapan Ukuran Partikel dan Distribusi Ukuran Partikel

Ukuran partikel merupakan faktor paling penting dalam suatu sistem nanopartikel. Ukuran partikel nanometer memiliki kelebihan, dimulai dari kemampuan untuk menembus dinding sel yang lebih tinggi, kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal dan peningkatan aktifitas dari sistem karena peningkatan luas permukaan kontak pada jumlah yang sama. Pengujian ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*), dimana PSA merupakan alat yang digunakan untuk mengetahui ukuran partikel khususnya dalam skala nanometer.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Ukuran Partikel

Formula	Ukuran Partikel (nm) \pm SD	Indeks Polidispersitas \pm SD
F1	95,943 \pm 1,241	0,332 \pm 0,028
F2	115,833 \pm 1,498	0,386 \pm 0,001
F3	96,860 \pm 0,914	0,376 \pm 0,003
F4	92,710 \pm 0,503	0,284 \pm 0,004
F5	112,567 \pm 2,203	0,388 \pm 0,014

Keterangan : F1 = askorbil palmitat : fosfatidilkolin : kolesterol (10 mg : 18,34 mg : 1,83 mg)
 F2 = askorbil palmitat : fosfatidilkolin : kolesterol (10 mg : 36,68 mg : 1,83 mg)
 F3 = askorbil palmitat : fosfatidilkolin : kolesterol (10 mg : 55,02 mg : 1,83 mg)
 F4 = askorbil palmitat : fosfatidilkolin : kolesterol (10 mg : 73,37 mg : 1,83 mg)
 F5 = askorbil palmitat : fosfatidilkolin : kolesterol (10 mg : 91,71 mg : 1,83 mg).

Hasil pengukuran ukuran partikel rata-rata pada F1, F2, F3, F4, dan F5 berturut-turut sebesar 95,943; 115,833; 96,860; 92,710 dan 112,567 nm, dengan nilai indeks polidispersitas sekitar 0,284-0,388. Dapat dilihat pada tabel 3 diatas bahwa ukuran partikel yang terkecil dihasilkan dari formula 4 yaitu sebesar 92,710 \pm 0,503 nm dengan nilai indeks polidispersitas sebesar 0,284. Keseragaman ukuran partikel dapat diketahui dari nilai indeks polidispersitas, indeks polidispersitas merupakan ukuran lebarnya distribusi ukuran partikel. Tabel 3 terlihat nilai indeks polidispersitas yang dihasilkan, ini menunjukkan bahwa dispersi koloid nanofitosom askorbil palmitat yang terbentuk merupakan dispersi yang heterogen karena nilai indeks polidispersitas > 0,3 dan muncul beberapa

peak pada grafik. Nanofitosom askorbil palmitat yang dihasilkan kurang homogen kemungkinan dikarenakan oleh kurangnya waktu sonikasi yang dilakukan, sehingga proses pengecilan ukuran kurang optimal. Perbedaan ukuran partikel disebabkan karena partikel kurang homogen dalam pengadukan, sehingga pada saat pengukuran sampel akan didapatkan sampel acak dan ukuran yang tidak seragam hal ini dapat dibuktikan dengan nilai indeks polidispersitas.

Nilai indeks polidispersitas merupakan suatu tolak ukur yang memperlihatkan homogenitas dari ukuran partikel, dan nilai indeks polidispersitas memiliki rentang antara 0-1. Nilai indeks polidispersitas yang mendekati 0 menunjukkan ukuran partikel yang homogen, sedangkan nilai indeks polidispersitas $> 0,3$ menunjukkan ukuran partikel yang heterogen. Indeks polidispersitas dari semua sampel hampir seluruhnya bernilai kisaran 0,3 hal ini kemungkinan dikarenakan formula sudah sedikit mengalami aglomerasi (penggumpalan partikel). Aglomerasi dikarenakan adanya ketidak homogenitasan dalam partikel tersebut, dengan tidak homogen maka partikel yang berukuran kecil lama kelamaan akan berdifusi ke partikel yang lebih besar dan akan mengalami pembesaran ukuran partikel sehingga akan teraglomerasi.

Berdasarkan nilai indeks polidispersitas tersebut maka dapat dikatakan bahwa hanya formula 4 saja yang memiliki distribusi ukuran partikel yang homogen karena memiliki nilai indeks polidispersitas $< 0,3$; sedangkan formula nanofitosom F1, F2, F3, dan F5 memiliki distribusi ukuran partikel yang heterogen karena memiliki nilai indeks polidispersitas $> 0,3$. Nanofitosom askorbil palmitat yang dihasilkan memiliki ukuran yang heterogen kemungkinan karena waktu sonikasi yang kurang optimal sehingga menghasilkan beberapa variasi ukuran partikel yang menyebabkan ukurannya tidak sejenis dan kurang homogen. Pada review jurnal Junaid Khan *et al.* 2013, fito-fosfolipid dapat membentuk kompleks dengan ukuran yang sangat bervariasi sekitar 50 nm-500 μm . Ukuran partikel yang dihasilkan dari kelima formula yaitu 95,943; 115,833; 96,860; 92,710 dan 112,567 nm, dimana ukuran partikel tersebut sudah dapat

dikatakan nanopartikel dengan rentang ukuran 10-1000 nm (Hosokawa *et al.* 2007).

2. Efisiensi Penjerapan Nanofitosom Askorbil Palmitat

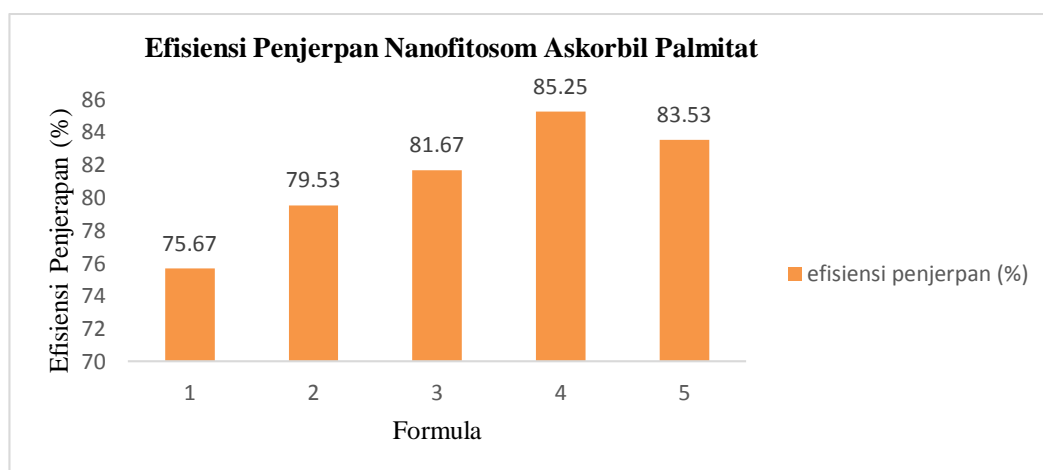
Pengujian efisiensi penjerapan nanofitosom askorbil palmitat dilakukan untuk mengetahui persentase askorbil palmitat yang mampu terjerap dalam vesikel nanofitosom yang dihasilkan, dan untuk mengetahui efisiensi dari metode yang digunakan. Suatu sistem penghantaran obat harus memiliki kapasitas pemuatan obat yang tinggi dan bertahan lama. Kapasitas pemuatan obat (efisiensi penjerapan) pada umumnya dinyatakan dalam persen obat yang terjerap dalam fase lemak terhadap obat yang ditambahkan (Gregoriadis 2007).

Pengujian efisiensi penjerapan askorbil palmitat dilakukan dengan cara memisahkan zat aktif bebas dari vesikel penjerapan zat aktif dengan menggunakan teknik sentrifugasi. Nanofitosom askorbil palmitat disentrifugasi selama 50 menit pada kecepatan 3.000 rpm pada suhu kamar agar zat aktif yang tidak terjerap dapat terpisah. Tujuan dari tahap ini adalah untuk mengendapkan fosfatidilkolin yang sudah berikatan dengan fitokonstituen, kemudian jumlah obat bebas (FD) ditentukan pada supernatan. Supernatan diambil sebanyak 1 ml kemudian diencerkan dengan etanol p.a sampai 10 ml dalam tabung reaksi dan dikocok hingga homogen. Analisis supernatan hasil sentrifugasi ditetapkan kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum askorbil palmitat yang sudah ditentukan sebelumnya.

Dispersi nanopartikel diketahui dapat menjerap obat dengan jumlah yang relatif besar. Hasil pengukuran efisiensi penjerapan pada nanofitosom yang mengandung askorbil palmitat untuk F1, F2, F3, F4 dan F5 yang dihasilkan yaitu 75,67%; 79,53%; 81,67%; 85,25% dan 83,53%. Jumlah obat yang terjerap sekitar 7,5-8,5 mg dengan total setiap formula 10 mg. Dari kelima formula terlihat bahwa formula 4 memiliki efisiensi penjerapan terbesar dibandingkan formula yang lain. Formula 4 dengan efisiensi penjerapan 85,25% setara dengan 8,525 mg dari total 10 mg. Dari kelima formula yang memiliki efisiensi penjerapan terkecil yaitu pada formula 1 sebesar 75,67% setara dengan 7,567 mg dari total 10 mg. Hal ini

dikarenakan efisiensi penyerapan nanofitosom askorbil palmitat dipengaruhi oleh konsentrasi kolesterol dan fosfatidilkolin yang digunakan.

Hasil efisiensi penyerapan formula dengan lipid lebih banyak menghasilkan efisiensi penyerapan yang lebih baik. Hal ini disebabkan karena zat aktif akan terjerap kedalam lipid sehingga semakin besar komposisi lipid yang digunakan, maka akan menghasilkan nilai efisiensi penyerapan semakin besar, namun pada formula 5 hasil efisiensi penyerapannya mengalami penurunan. Hal ini mungkin dikarenakan oleh lamanya proses *mixing* serta suhu pada saat pembuatan nanofitosom yang dapat mempengaruhi terhadap efisiensi penyerapan dan ukuran partikel nanofitosom. Hal ini dikarenakan dapat memfasilitasi proses ikatan antara fosfolipid dengan fitokonstituen, dan faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi kemampuan pengisian suatu obat dalam lemak antara lain kelarutan obat dalam lemak yang dilelehkan, ketercampuran (*misibilitas*) obat cair dalam lemak cair, dan struktur fisik dan kimia matriks lemak padat (Uner & Yener 2007). Diagram kelima formula nanofitosom askorbil palmitat dapat dilihat pada gambar 18.



Gambar 1. Efisiensi Penjerapan Nanofitosom Askorbil Palmitat

Setelah melihat hasil analisis ukuran partikel tiap formula dan hasil efisiensi penyerapannya, maka ditentukan F4 yang akan dilakukan uji stabilitas dan ukuran partikelnya setelah dilakukan uji stabilitas. Pemilihan F4 berdasarkan ukuran partikel yang paling kecil dan hasil efisiensi penyerapannya yang paling tinggi.

3. Uji Stabilitas Askorbil Palmitat Setelah Penyimpanan

3.1 Pengamatan Secara Visual. Pengujian stabilitas nanofitosom dilakukan dengan cara semua formula nanofitosom disimpan pada suhu ruang selama 3 minggu. Suhu ruang cocok dan baik untuk askorbil palmitat karena sifat dari askorbil palmitat yang tidak tahan terhadap panas. Penyimpanan pada suhu ruang dilakukan untuk menjamin kestabilan nanofitosom jika disimpan pada suhu ruang.

Tabel 2. Stabilitas Nanofitosom Askorbil Palmitat Pada Suhu Ruang

Formula	Minggu ke 1	Minggu ke 2	Minggu ke 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	Ada endapan	Ada endapan

Nanofitosom askorbil palmitat semua formula disimpan pada suhu ruang selama 3 minggu. Pada minggu ke-1 semua formula nanofitosom askorbil palmitat yang disimpan dalam suhu ruang tidak timbul endapan, sedangkan pada minggu ke-2 hanya F4 saja yang tidak mengalami pengendapan, sedangkan formula yang lain terbentuk endapan hingga minggu ke-3. Hal ini dipengaruhi oleh suhu ruang yang tidak stabil dan berubah-ubah sehingga akan meningkatkan energi kinetis dari tetesan-tetesan. Hal tersebut memudahkan penggabungan antar partikel (beraglomerasi) karena suhu penyimpanan yang tidak sesuai akan menyebabkan rusaknya gerak brown. Hal tersebut terjadi karena adanya benturan yang tidak teratur dari partikel koloid dengan medium pendispersi. Dengan adanya gerak brown ini maka partikel koloid terhindar dari pengendapan karena terus-menerus bergerak. Dan ketidakstabilan yang terjadi pada nanofitosom askorbil palmitat dapat disebabkan karena nilai potensial zetanya yang kecil. Sehingga menyebabkan terjadinya penggumpalan terhadap partikel dimana ukuran partikelnya akan menjadi lebih besar dan akan menyebabkan ketidakstabilan terhadap ukuran partikelnya sehingga akan terjadi pengendapan.

1.2 Penetapan Ukuran dan Distribusi Partikel Sebelum dan Setelah Penyimpanan. Uji stabilitas setelah penyimpanan dilakukan pada suhu ruang selama 3 minggu. Uji stabilitas meliputi ukuran partikel, indeks polidispersitas

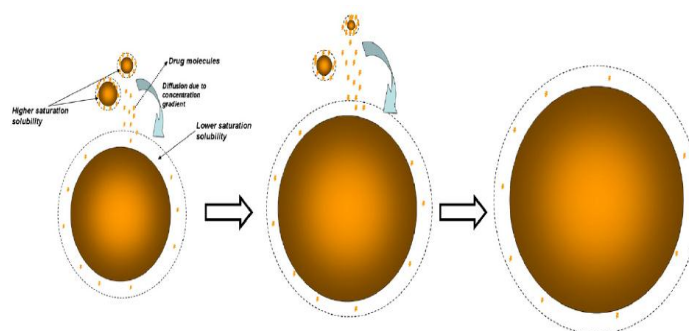
dan potensial zeta. Hasil uji stabilitas dapat dilihat pada tabel 4, berdasarkan tabel 3 dapat dilihat bahwa setelah proses penyimpanan terjadi kenaikan ukuran partikel pada formula 4 yaitu dari 92,710 nm menjadi 1105 nm, hasil ini menggambarkan bahwa formula 4 tidak stabil dalam penyimpanan selama 3 minggu. Kenaikan ukuran partikel nanofitosom askorbil palmitat ini dapat disebabkan oleh terjadinya ketidak stabilan fisika pada dispersi nanopartikel dan menyebabkan terjadinya peningkatan ukuran partikel selama penyimpanan. Ketidak seragaman ukuran partikel dapat dilihat berdasarkan pengukuran nilai indeks polidispersitas. Formula 4 terjadi kenaikan indeks polidispersitas setelah penyimpanan yang dapat menggambarkan bahwa ukuran partikel yang dihasilkan semakin tidak seragam sehingga tingkat kehomogenitasan partikel rendah.

Tabel 3. Ukuran Partikel Sebelum dan Setelah Penyimpanan

Formula	Ukuran Partikel (nm)		Indeks Polidispersitas	
	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah
F4	92,710	1105	0,284	0,643

Keterangan : F4 = askorbil palmitat : fosfatidilkolin : kolesterol (10 mg : 73,365 mg : 1,8282 mg)

Peningkatan ukuran partikel setelah penyimpanan dapat dijelaskan melalui mekanisme *Ostwald ripening*. Ukuran partikel kecil (nm) memiliki kelarutan yang lebih tinggi dari pada ukuran partikel yang besar (μm), sehingga zat aktif akan berdifusi ke ukuran yang lebih besar sehingga 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 13.



Gambar 2. Mekanisme *Ostwald Ripening* (Wu 2010).

Ostwald ripening tidak hanya mengakibatkan perbesaran ukuran partikel namun juga ketidakseragaman distribusi ukuran partikel sehingga ukuran partikel

menjadi bervariasi. Formula 4 terjadi kenaikan indeks polidispersitas setelah penyimpanan yang dapat menggambarkan bahwa ukuran partikel yang dihasilkan semakin tidak seragam.

4. Uji Zeta Potensial

Potensial zeta biasanya digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Partikel-partikel yang terdiri dari molekul heteroatomik biasanya memiliki muatan permukaan, yang mungkin menjadi positif atau negatif, tergantung pada orientasi dan ionisasi komponen partikel. Interaksi elektrostatik antara partikel akan menentukan kecenderungan agregasi dan fenomena tolak-menolak.

Besar kecilnya nilai zeta potensial dapat memprediksikan kestabilan koloid. Nilai zeta potensial yang tinggi menunjukkan sistem koloid yang stabil dan dapat mencegah agregasi. Adanya gaya tolak-menolak elektrostatis antar partikel ini menyebabkan partikel-partikel dalam sistem koloid nanopartikel akan saling tolak-menolak. Nilai zeta potensial yang rendah menyebabkan gaya tolak-menolak agar partikel berkurang dan menurunkan kemampuan dalam mencegah partikel beragregasi. Nilai zeta potensial lebih besar dari +30 mV atau kurang dari -30 mV diprediksi stabil selama penyimpanan dan dapat mencegah partikel beragregasi (Mohanraj & Chen 2005).

Tabel 4. Nilai Potensial Zeta Setelah Penyimpanan

Formula	Potensial Zeta (mV) ± SD
F4	-13,040 ± 0,658

Hasil pengujian potensial zeta dari nanofitosom askorbil palmitat setelah penyimpanan adalah -13,040 mV. Berdasarkan hasil yang diperoleh dari pengukuran nilai potensial zeta menunjukkan nilai potensial zeta yang tidak stabil sehingga dapat dikatakan gaya tolak-menolak antar partikel yang terdapat pada sediaan cenderung lebih rendah dibandingkan gaya tarik menarik partikel, sehingga menyebabkan terjadinya koagulasi dan flokulasi.

5. Pembuatan Kurva Kalibrasi

5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara 10 mg serbuk askorbil palmitat dilarutkan

dengan etanol p.a sebanyak 10 ml dalam labu takar 100 ml, selanjutnya ditambahkan dengan dapar fosfat pH 7,4 sampai tanda batas.

Selanjutnya kurva baku kemudian dibaca pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis sampai didapatkan absorbansi yang stabil dan konstan. Hasil pengukuran menunjukkan puncak serapan pada panjang gelombang 258 nm dengan serapan sebesar 0,2952. Panjang gelombang tersebut selanjutnya dapat digunakan untuk menentukan kurva kalibrasi dan efisiensi penyerapan askorbil palmitat dalam fitosom.

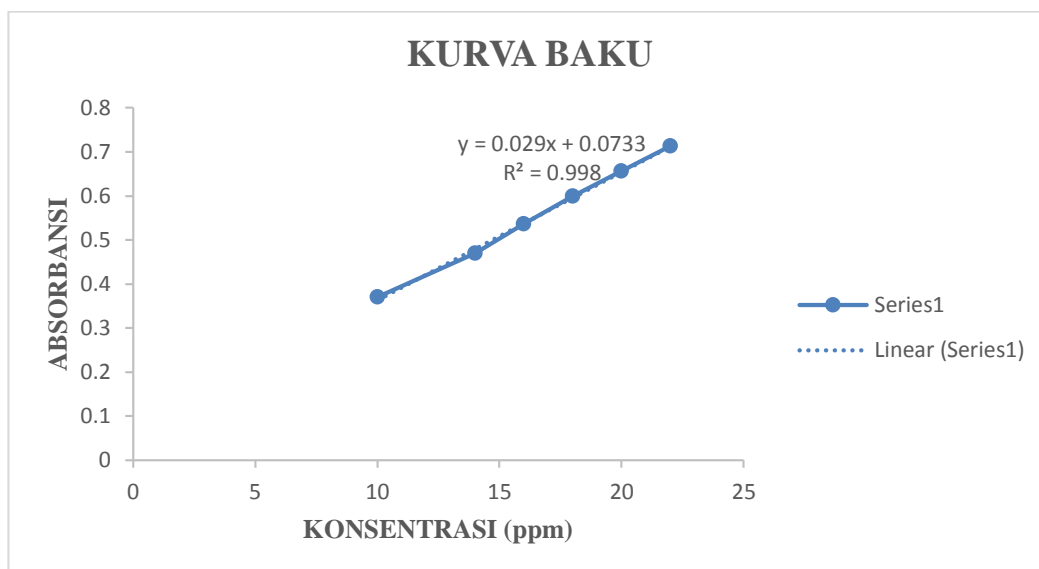
5.2 Penentuan *Operating Time*. Penentuan *operating time* bertujuan untuk melihat kestabilan reaksi suatu senyawa yang dianalisis. Larutan yang stabil ditunjukkan dengan serapan yang tidak berubah pada waktu tertentu, pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk askorbil palmitat pada panjang gelombang maksimum askorbil palmitat, dibaca mulai dari menit 0 sampai menit didapatkan nilai serapan yang stabil yaitu pada 21-30 menit pada medium dapar fosfat pH 7,4 dengan besar serapan yaitu 0,287.

5.3 Kurva Kalibrasi. Kurva kalibrasi askorbil palmitat dibuat dengan konsentrasi 10 ppm, 14 ppm, 16 ppm, 18 ppm, 20 ppm dan 22 ppm. Seri konsentrasi larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum askorbil palmitat kemudian dibuat kurva regresi linier antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi askorbil palmitat sehingga diperoleh persamaan *regresi linier*. Hasil persamaan regresi linier yang diperoleh yaitu $y = 0,0733 + 0,0290 x$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,999 maka data dinyatakan bagus karena nilai r mendekati 1 sehingga data dapat dipakai untuk analisis. Hasil penentuan kurva baku dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil Penentuan Kurva Baku Askorbil Palmitat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
10	0,370
14	0,470
16	0,536
18	0,599
20	0,656
22	0,713

Hubungan antara konsentrasi (ppm) dengan absorbansi askorbil palmitat dapat dilihat pada gambar 14.



Gambar 3. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Dengan Absorbansi

D. Verifikasi Metode Analisis

1. Linieritas

Linieritas adalah kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Koefisien korelasi adalah parameter yang paling umum digunakan untuk mengetahui linieritas suatu metode. Nilai koefisien relasi merupakan indikator kualitas dari parameter linieritas yang menggambarkan respon analitik (luas area) terhadap konsentrasi yang diukur. Hasil validasi metode analisis menunjukkan bahwa serapan lebih dari 99% dipengaruhi oleh konsentrasi askorbil palmitat, ditunjukkan dari nilai koefisien determinasi (r^2) 0,998. Nilai koefisien relasi yang dipersyaratkan oleh Association of Official Analytical Chemis (AOAC) adalah $> 0,99$ menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proporsional antara respon analitik dengan konsentrasi yang diukur.

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

Batas deteksi (LOD) didefinisikan sebagai konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi namun tidak perlu secara kuantitatif, sedangkan definisi LOQ dikatakan

sebagai konsentrasi terkecil analit yang dapat diukur secara kuantitatif. Statistik perhitungan LOD dan LOQ diperoleh melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantitation* (LOQ) menunjukkan kesensitifan dari suatu metode, semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin sensitif metode yang digunakan (Harvey 2000). Penentuan LOD dihitung berdasarkan standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (*slope*, S) kurva baku pada level yang mendeteksi LOD sesuai dengan rumus, standar deviasi dapat ditentukan berdasarkan intersep-y pada garis regresi (Ganjar & Rohman 2012). Hasil verifikasi metode analisis ditunjukkan pada tabel 8.

Tabel 8. Parameter Verifikasi Metode Analisis Kurva Kalibrasi Askorbil Palmitat

Parameter	Hasil
R2 (koefisien determinasi)	0,998
Batas deteksi (LOD)	0,6968 ppm
Batas kuantifikasi (LOQ)	2,1114 ppm

Hasil verifikasi metode analisis menunjukkan serapan dipengaruhi oleh askorbil palmitat sebesar 99,8%. LOD dan LOQ dilakukan dengan metode perhitungan yaitu berdasarkan standar deviasi respon dan kemiringan (*slope*) kurva baku. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blanko pada standar deviasi residual garis regresi linier atau 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). Pada penentuan batas deteksi menunjukkan jumlah analit terkecil yang masih dapat dideteksi yaitu dengan konsentrasi 0,6968 ppm dan apabila dimasukkan dalam persamaan regresi linier $y = 0,0733 + 0,0290 x$ diperoleh nilai serapan 0,0935. Sedangkan pada penentuan batas deteksi menunjukkan jumlah analit terkecil yang masih dapat diukur secara kuantitatif yaitu dengan konsentrasi 2,1114 ppm dan apabila dimasukkan dalam persamaan regresi linier $y = 0,0733 + 0,0290 x$ diperoleh nilai serapan 0,1345.

E. Aktivitas Antioksidan Askorbil Palmitat

DPPH merupakan suatu senyawa radikal bebas yang digunakan sebagai reagen penentuan antioksidan karena sifatnya yang akan diredam oleh sampel

yang bersifat antioksidan. Hasil reaksi antara DPPH dengan senyawa antioksidan dapat diketahui melalui perubahan warna DPPH dari ungu pekat menjadi kuning akibat terjadinya resonansi struktur DPPH. Perubahan warna ini yang dijadikan patokan pengukuran pada spektrofotometer cahaya tampak (Molyneux 2004). DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat, peka serta hanya memerlukan sedikit sampel.

1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dimaksudkan untuk memperoleh daerah serapan maksimum dari DPPH. Hal ini dilakukan agar sedikit perubahan konsentrasi saat pengambilan tidak akan menyebabkan perubahan absorbansi yang besar sehingga akan didapatkan kepekaan analisis yang maksimum.

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan terhadap larutan DPPH. Pengukuran dilakukan dengan melakukan *scanning* panjang gelombang pada 400-600 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang menunjukkan bahwa sampel uji memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 516 nm. Hal ini sesuai dengan teori, menurut Ndhlala *et al.*(2010) bahwa DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 515-517 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk penentuan waktu reaksi dan pengukuran peredaman radikal bebas.

2. Penentuan *Operating Time* (OT)

Penentuan *operating time* bertujuan untuk menentukan rentang waktu saat larutan uji mereduksi radikal DPPH dengan sempurna sehingga diperoleh absorbansi yang stabil. Penentuan *operating time* perlu dilakukan agar dapat diketahui waktu pengukuran yang tepat dari suatu senyawa, dimana reaksi terjadi secara optimal. Pengukuran dilakukan pada saat *operating time* dimaksudkan untuk meminimalkan kesalahan dalam hal pengukuran.

Penentuan *operating time* dilakukan dengan mereaksikan DPPH dengan masing-masing larutan uji, dan diamati absorbansinya selama 1 jam. Penentuan *operating time* didasarkan pada waktu saat absorbansi larutan uji dan reagen DPPH mulai stabil atau menghasilkan selisih absorbansi yang kecil. Pengukuran

dilakukan pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan, yaitu 516 nm. *Operating time* askorbil palmitat yang diperoleh adalah antara 34-36 menit, karena pada menit tersebut dua hingga tiga replikasi menghasilkan nilai absorbansi yang stabil. *Operating time* untuk nanofitosom askorbil palmitat (formula 4) adalah 47-49 menit.

3. 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 ditambahkan 3 mL etanol pro analisis. Campuran diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh sebelumnya yaitu 34-36 menit untuk askorbil palmitat dan *operating time* untuk nanofitosom askorbil palmitat (formula 4) adalah 47-49 menit. Kemudian membaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yaitu 516 nm. Absorbansi serapan larutan DPPH dapat diperoleh dengan mengukur absorbansi dengan campuran 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan 4 mL etanol pro analisa pada panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 516 nm. Setiap pengujian dilakukan tiga kali pengulangan, data hasil pengukuran absorbansi dianalisa presentase aktivitas antioksidannya menggunakan persamaan berikut :

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

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

Metode DPPH dipilih untuk mengetahui aktivitas antioksidan karena metode ini mudah, cepat, serta sensitif. DPPH digunakan untuk aktivitas peredaman aktivitas radikal bebas. Pengamatan pada uji ini dengan melihat perubahan intensitas warna DPPH. DPPH akan tereduksi oleh proses donasi

hidrogen atau elektron, warnanya akan berubah dari violet menjadi kuning. Aktivitas antioksidan dengan metode ini diukur menggunakan parameter IC_{50} yaitu konsentrasi senyawa uji yang dibutuhkan untuk mengurangi radikal DPPH sebesar 50%. Semakin tinggi nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidannya semakin rendah. Nilai IC_{50} diperoleh dari regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan uji dengan persen penangkapan radikal.

Pengujian antioksidan hanya dilakukan pada formula 4 saja karena formula 4 memiliki ukuran partikel dan efisiensi penjerapan yang paling baik diantara formula lainnya. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas askorbil palmitat, nanofitosom askorbil palmitat dan pembawa dari nanofitosom. Tujuan penentuan aktivitas antioksidan ini adalah untuk mengetahui kemampuan antioksidan dari senyawa askorbil palmitat dan mengetahui apakah kemampuan antioksidan yang dimiliki askorbil palmitat masih tetap ada ketika dibuat dalam sistem penghantaran obat nanofitosom. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan askorbil palmitat dan nanofitosom askorbil palmitat (formula 4) dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Hasil Aktivitas Antioksidan

Sampel	IC_{50} (ppm)	Kekuatan
Askorbil palmitat	52,67 ppm	Kuat
Nanofitosom F4	99,82 ppm	Kuat

Hasil aktivitas antioksidan tersebut menunjukkan bahwa askorbil palmitat murni memiliki IC_{50} sebesar 52,67 ppm, dimana hasil tersebut lebih baik dibandingkan dengan sampel nanofitosom, sebab setelah dibuat menjadi nanofitosom aktivitas antioksidannya menjadi 99,82 ppm sehingga dapat dikatakan bahwa aktivitas antioksidannya menurun atau lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas antioksidan dari askorbil palmitat murni, namun keduanya masih masuk dalam kategori antioksidan yang kuat. Hal ini membuktikan bahwa askorbil palmitat masih memiliki potensi antioksidan setelah menjadi nanofitosom.

Pengukuran aktivitas antioksidan pada zat pembawa nanofitosom bertujuan untuk mengetahui dan memastikan apakah zat pembawa tersebut mempengaruhi aktivitas antioksidan dari askorbil palmitat. Adapun hasil yang

didapat yaitu absorbansinya berurut-turut 1,051 dimana absorbansi tersebut lebih besar dibandingkan dengan absorbansi kontrol yaitu sebesar 0,862. Sehingga zat pembawa tidak dapat diketahui nilai IC_{50} , hal ini karena semua konsentrasi tidak menghasilkan persen penghambatan mencapai 50%. Hal ini juga menunjukkan bahwa pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel nanofitosom tidak ada penambahan oleh aktivitas antioksidan dari zat pembawanya, sehingga murni aktivitas antioksidan dari askorbil palmitat.

Perbedaan aktivitas antioksidan antara askorbil palmitat dengan nanofitosom askorbil palmitat memberikan nilai IC_{50} yang berbeda karena dipengaruhi oleh obat yang terperap dalam vesikel nanofitosom. Dimana dalam nanofitosom askorbil palmitat zat aktif yang terperap hanya sebesar 85,25% yang setara dengan 8,525 mg dari total 10 mg zat aktif yang digunakan dalam pembuatan formula nanofitosom. Hal ini dikarenakan efisiensi penyerapan nanofitosom askorbil palmitat dipengaruhi oleh konsentrasi kolesterol dan fosfatidilkolin yang digunakan. Hasil efisiensi penyerapan formula dengan lipid lebih banyak akan menghasilkan efisiensi penyerapan yang lebih baik. Sehingga ketika dilakukan pengujian aktivitas antioksidan antara askorbil palmitat dengan setelah dibuat menjadi nanofitosom askorbil palmitat aktivitas antioksidannya menurun dibandingkan dengan askorbil palmitat murni . Sebab jumlah zat aktifnya berkurang karena yang terperap pada nanofitosm hanya 8,525 mg sedangkan pada askorbil palmitat murni zat aktifnya lebih banyak yaitu sebesar 10 mg.