

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

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

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

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran dalam penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah myrisetin yang dibuat *Solid Lipid Nanoparticle*.

##### **2. Sampel**

Sampel adalah sebagian dari populasi yang diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaannya mampu mewakili atau menggambarkan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel dalam penelitian ini adalah sejumlah myrisetin SLN yang dibuat dengan berbagai proporsi lipid padat (imwitor 941, *dynasan* 118, apifil)

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

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

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol. Variabel utama dari penelitian ini yaitu Myrisetin SLN

##### **2. Klasifikasi variabel**

**2.1. Variabel bebas.** Variabel Bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dari penelitian ini adalah lipid padat dan surfaktan.

**2.2. Variabel tergantung.** Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah persoalan yang merupakan kriteria penilaian ini yaitu karakterisasi Myrisetin SLN yaitu ukuran partikel dan zeta potensial, PSA, uji antioksidan, dan uji efisiensi penyerapan dengan spektrofotometri UV-Vis.

**2.3. Variabel Terkontrol.** Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas. Variabel terkontrol dari penelitian ini adalah ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak

tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat yaitu proses pembuatan SLN dengan metode Ultrasonikasi.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Zat aktif Myrisetin dengan Lipid padat (Imwitor 941, *dynasan* 118, Apifil) surfaktan tween 80. Ukuran partikel pada SLN adalah 50-1000 nm. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari nanopartikel. Zeta potensial menunjukkan muatan dari partikel koloid yang berhubungan dengan tolak-menolak elektrostatis antar partikel sehingga mencegah terjadinya agregasi partikel koloid.

Efisiensi Penjerapan merupakan perbandingan jumlah obat yang terjerap dalam lipid dengan jumlah obat yang digunakan dalam satuan persen. Pengujian efisiensi penjerapan zat aktif dilakukan untuk menentukan jumlah zat aktif yang terjerap dalam SLN.

Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) berdasarkan kemampuan bahan uji dalam mereduksi atau menangkap radikal DPPH yang dapat dilihat dari perubahan warna ungu dari larutan DPPH setelah dicampur dengan sampel uji menjadi warna kuning. Nilai  $IC_{50}$  merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji ( $\mu\text{g/ml}$ ) yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50% (mampu meredam proses oksidasi DPPH sebesar 50%).

## **C. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan**

Myrisetin (Shaanxi Dideu Medichem Co. Ltd, Cina), Imwitor 941 (IOI Oleo, Jerman), Dynasan 118 (IOI Oleo, Jerman), Apifil (Gattefosse, Prancis). Tween 80 (PT. Bratachem), Aquadestilata (PT. Bratachem)

### **2. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat uji ukuran partikel dan zeta potensial (Beckman Coulter Delsa<sup>®</sup> Nano C, USA), *homogenizer*, *magnetic stirrer*, *hotplate stirrer* (Thermo Scientific, China), *sentrifuge* (SPLC Series, Gemmy 8 Hole, Taiwan), Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10s, Thermo

scientific), 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 jenis lipid yang digunakan, diuji kemampuan dalam melarutkan zat aktif dengan metode spektrofotometri yang sesuai untuk menghasilkan sediaan yang stabil dan homogen. Pembuatan SLN ini menggunakan metode ultrasonikasi. Percobaan pendahuluan yang dilakukan dengan memakai surfaktan tween 80 dan Lipid padat (Imwitor 941, Dynasan 118, Apifil) dengan konsentrasi yang bervariasi.

### 2. Screening Myrisetin SLN dengan metode Ultrasonikasi

Tabel 2. Screening Myrisetin SLN dengan lipid padat dan surfaktan

		Konsentrasi (mg)								
FORMULA		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lipid Padat	Imwitor 491	2%	4%	6%	-	-	-	-	-	-
	Dynasan 118	-	-	-	2%	4%	6%	-	-	-
	Apifil	-	-	-	-	-	-	2%	4%	6%
Surfaktan	Tween 80	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
Aquadest Ad		50	50	50	50	50	50	50	50	50
		ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml

Pembuatan basis SLN, diawali dengan melelehkan lipid padat dengan suhu 100 °C. Kemudian tween 80 dipanaskan dilarutkan dalam air panas. Tuangkan fase minyak dalam fase air dikit sedikit homogenkan dengan magnetic stirrer pengadukan 2000 rpm selama 1 jam pada temperatur ruangan. Pre-emulsi yang diperoleh, diultrasonikasi probe selama 5 menit.

### 3. Pembuatan Kurva Kalibrasi

**3.1. Pembuatan larutan induk.** Myrisetin ditimbang 47 mg, dilarutkan dengan 100 ml etanol proanalisis, di masukan dalam labu takar 100 ml.

**3.2. Penetapan gelombang maksimum.** Larutan induk dibaca dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang antara 200-500nm. Hasil scan-

*wavelength* menunjukkan nilai absorbansi tertinggi terdapat pada panjang gelombang maksimum.

**3.3. Penetapan operating time.** Larutan induk dimulai dari menit 0 sampai menit 30 hingga didapatkan nilai absorbansi yang stabil.

**3.4. Pembuatan larutan seri kurva kalibrasi.** Seri konsentrasi 2,35; 4,7; 9,4; 11,75; 14; 16,45 dan 18,8 ppm, kemudian masing-masing larutkan dalam etanol proanalisis dalam labu takar 10 ml. Seri larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum myrisetin, dibuat kurva regresi linear antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi myrisetin sehingga diperoleh persamaan regresi linear yang selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar myrisetin (El-Gawad *et al* 2014).

#### **4. Validasi Metode Analisis**

**4.1. Linearitas (Linearity).** Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan induk Myrisetin dalam pelarut etanol yaitu 2,35; 4,7; 9,4; 11,75; 14,1 ppm; 16,45 dan 18,8 ppm pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat persamaan garis regresi linier 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.

**4.2. Penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan batas kuantifikasi (LOQ).** Batas deteksi dan batas kuantifikasi penetapan kadar obat Myrisetin ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan membuat lima seri konsentrasi dibawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai  $b$  (slope) pada persamaan regresi linear  $y = a + bx$ , sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residual ( $S_{y/x}$ ).

**4.3. Akurasi.** Metode untuk sampel yang diketahui jumlah myrisetin sesuai dengan 80, 100, 120% dimana konsentrasi yang dipilih adalah 4,7; 9,4; dan

11,75 ppm dengan pengukuran menggunakan panjang gelombang yang sudah dicari, pengulangan sebanyak tiga kali dan didapatkan hasil data recovery.

**4.4. Presisi.** sepuluh larutan yang berbeda dengan konsentrasi yang sama 9,4 ppm disusun, dianalisis dan absorbansi dicatat untuk menentukan koefisien korelasi.

## **5. Pembuatan SLN Myrisetin.**

Formulasi nanoemulsi yang terpilih dari *screening* selanjutnya digunakan untuk membuat SLN Myrisetin dengan konsentrasi yang berbeda. Pembuatan diawali dengan melelehkan lipid padat dengan suhu 100 °C tambahkan Myrisetin. Tween 80 dipanaskan ditambahkan aquademineralisata panas. Tuangkan fase air dalam fase minyak dikit sedikit homogenkan dengan *magnetic stirrer* 2000 rpm selama 1 jam. Pre-emulsi diultrasonikasi 5 menit.

## **6. Karakterisasi Myrisetin**

**6.1. Karakterisasi Myrisetin SLN.** Penetapan Distribusi & Ukuran Partikel. Pengukuran dan distribusi nanopartikel menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Ambil sampel myrisetin SLN 2ml masukkan dalam kuvet yang sesuai dengan sampel, jalankan alat PSA

### **6.2. Uji stabilitas Myrisetin SLN setelah penyimpanan.**

**6.2.1. Pengamatan secara visual.** Formula myrisetin SLN yang sudah diketahui menghasilkan ukuran partikel terkecil di uji stabilitasnya pada suhu kamar selama 2 minggu dan diamati setiap minggu.

**6.3. Efisiensi Penjerapan SLN** ditimbang 200 mg, ditambahkan etanol 10 ml, kemudian disentrifugasi selama 30 menit pada kecepatan 4000 rpm, perlakuan ini memisahkan fase minyak dan air. Supernatan diambil untuk mengecek di spektrometri.

### **6.4. Uji Antioksidan secara DPPH.**

**6.4.1. Pembuatan larutan DPPH.** Menimbang serbuk DPPH sebanyak 16 mg masukkan labu takar 100 ml tambahkan etanol sampai tanda batas (konsentrasi 160 ppm)

**6.4.2. Pembuatan larutan Induk zat aktif.** Sebanyak 50 mg tetapi yang masuk labu takar hanya 49,7 mg masukkan ke labu takar 100 ml tambahn etanol sampai tanda batas (konsentrasi 497 ppm)

**6.4.3. Penentuan panjang gelombang dan *operating time*.** Penentuan panjang gelombang dengan pengambilan 1 ml DPPH tambah 4 ml etanol dengan rentang panjang gelombang 400-600. *Operating time* ditentukan dengan lama 60 menit.

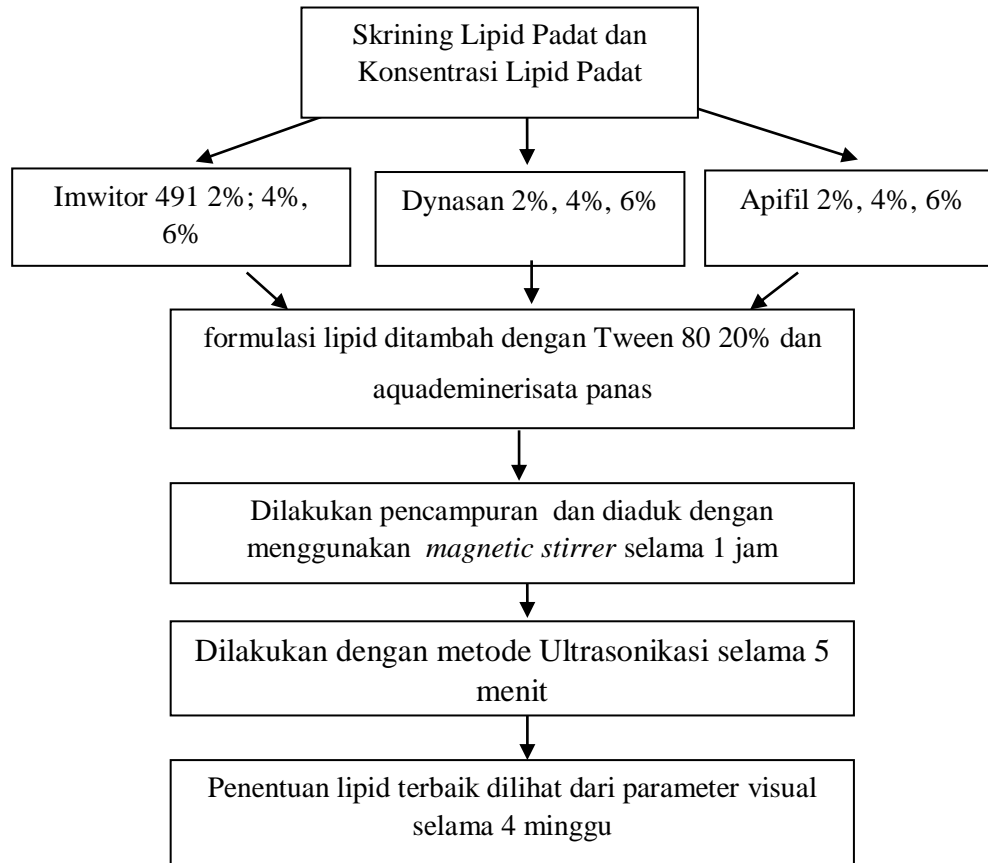
**6.4.4. Pembuatan seri konsentrasi zat aktif.** Pembuatan seri konsentrasi diambil dari larutan induk dengan konsentrasi 31; 15,5; 7,75; 3,88; dan 1,94 ppm dalam 10 ml etanol labu takar gelap. Ambil 1 ml tiap konsentrasi, 1 ml DPPH tambahkan 3 ml etanol sesuai OT, baca serapan.

**6.4.5. Pembuatan seri konsentrasi formula sediaan.** Pembuatan larutan induk dari formula 400 ppm, dibuat seri konsentrasi 80; 60; 40; 25; 12,5; 6,25; dan 3,125 ppm dalam 10 ml etanol labu takar gelap. Ambil 1 ml tiap konsentrasi, 1 ml DPPH tambahkan 3 ml etanol sesuai OT, baca serapan

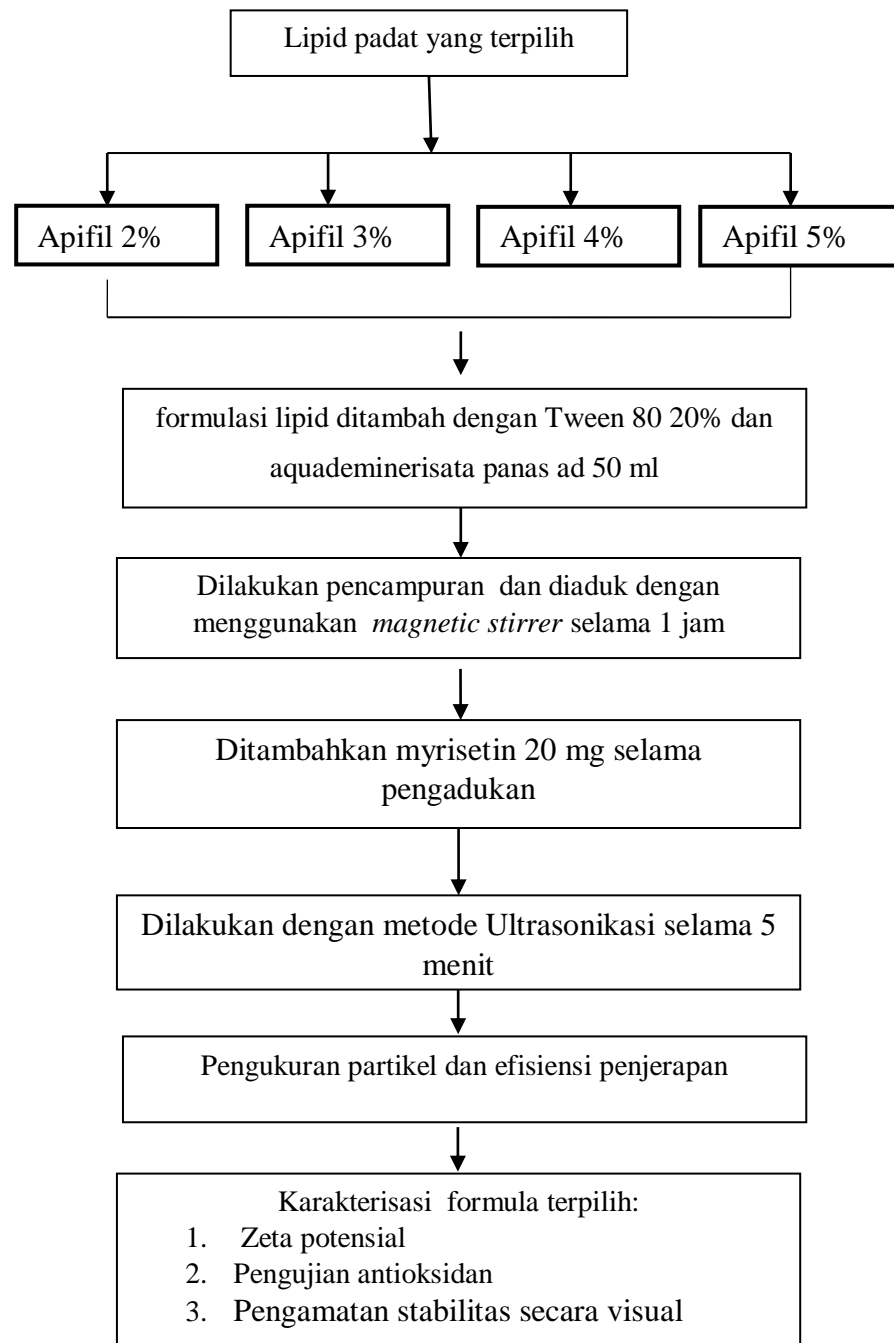
## **E. Hasil Analisis**

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 bentuk SLN dari myrisetin, 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 7. Cara kerja skrining lipid



Gambar 8. Skema cara kerja SLN