

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Percobaan Pendahuluan**

Percobaan pendahuluan dilakukan untuk mengetahui kondisi percobaan terbaik sehingga menghasilkan sediaan SLN yang stabil dan homogen. Kondisi percobaan yang perlu diperhatikan adalah kecepatan pada magnetik dan konsentrasi pada setiap lipid yang digunakan, dengan dilihat kestabilan secara visual selama 4 minggu. Zat aktif yang digunakan untuk membentuk SLN adalah myrisetin. Bahan tambahan lain yang digunakan adalah lipid yaitu lipid golongan wax dan trigliserid. Surfaktan yang dipakai adalah tween 80.

Golongan lipid wax menghasilkan distribusi ukuran partikel dan stabilitas fisik lebih baik bila dibandingkan dengan golongan gliserida yang lebih mudah terjadi pertumbuhan ukuran partikel dan agregasi (Jenning *et al.* 2000 dan Souta *et al.* 2013), dibuktikan pada skrining lipid bahwa Imwitor 2% (F1), imwitor 4% (F2), imwitor 6% (F3) dan *dynasan* 2% (F4), *dynasan* 4% (F5), tidak stabil pada minggu ke-2 berbeda dari Apifil 2% (F7) apifil 4% (F8) yang masih stabil sampai minggu ke-4. *Dynasan* 6% (F6) tetap stabil didalam minggu ke-4 tetapi diamati dari tingkat kekeruhan dan kekentalan akan menghasilkan ukuran partikel yang lebih besar. Imwitor dan *dynasan* mudah teraglomerisasi sehingga memadat pada suhu ruang, sangat tidak stabil, dan pertumbuhan partikel yang cukup besar terjadi dalam beberapa hari. Hal ini disebabkan meningkatkan jumlah parsial gliserida seperti monogliserida yang menyebabkan ketidakstabilan tersebut (Jeening 2000), dan menghasilkan ukuran partikel yang besar.

Pemilihan surfaktan yang digunakan adalah tween 80 dengan konsentrasi 20%, karena termasuk golongan nonionik yang memiliki sifat nontoksik, non iritan (Han *et al* 2009) dan dapat menghasilkan ukuran nano partikel yang tertarget yaitu kurang dari 200 nm. Tween 80 memiliki rantai hidrofobik yang tidak jenuh, semakin panjang rantai hidrofobik dari surfaktan semakin besar pengaruh kelarutan obat dalam air (Martin 1993). Tween 80 juga dapat menghasilkan stabilisasi sterik partikel akan menstabilkan pertikel tersebut

sehingga nanopartikel tidak saling beraglomerasi (Shi 2002 & Libo *et al* 2011). Interpenetrasi dari rantai polietilen panjang tween 80 membatasi kebebasan partikel dan mencegah mereka dari berhubungan satu sama lain sehingga tidak membentuk aglomerasi (Lim 2002).

### **B. Pembuatan Myrisetin SLN**

Pembuatan formula myrisetin SLN dari skrining lipid yang terpilih yaitu F7, dan F8 tetapi di tambah dengan variasi konsentrasi apifil 3% (F10) dan apifil 5% (F11). Pembuatan menggunakan metode ultrasonikasi probe selama 5 menit dengan frekuensi 35% dan pengadukan menggunakan *stirrer* 2000 rpm selama jam, karena pada penelitian Arifin (2015) menunjukkan bahwa ukuran partikel terdistribusi secara merata. Waktu dan frekuensi selama ultrasonikasi mempengaruhi ukuran partikel karena waktu yang lebih lama dan frekuensi yang lebih tinggi dapat meningkatkan suhu SLN. Sebuah penelitian Zhang *et al.*, (2008) menunjukkan bahwa suhu adalah salah satu parameter penting untuk ukuran partikel, masalah yang terjadi selama teknik ultrasonikator adalah distribusi ukuran partikel yang lebih luas mulai dari rentang mikrometer yang menyebabkan ketidakstabilan fisik.

Pembuatan SLN myrisetin dilakukan dengan melarutkan lipid dan myrisetin dengan pelarut yang sama kemudian dicampurkan, sementara pada penelitian Cho *et al.* (2008) myrisetin merupakan senyawa flavonoid yang memiliki berbagai aktifitas farmakologi salah satunya sebagai antioksidan. Senyawa antioksidan dapat terdegradasi kurang lebih pada suhu 70 °C, karena akan mengurangi kemampuan senyawa antioksidan atau bahkan menghilang. Sehingga titik leleh lipid perlu dipertimbangkan dalam pembuatan formula SLN myrisetin agar tidak merubah aktifitas farmakologi dengan mencampurkan zat aktif setelah menurunkan suhu secara bertahap.

Myrisetin didispersikan didalam fase lemak apifil membentuk emulsi air dalam minyak (a/m), kemudian ditambahkan fase air dan tween 80 sebanyak 20% yang didispersikan dalam 50 ml aquademineralisata untuk membentuk emulsi a/m/a dengan globul yang lebih kecil selanjutnya disonikasi selama 5 menit untuk

memisahkan penggumpalan partikel (*agglomeration*). Emulsi SLN myrisetin yang terbentuk berupa larutan koloid bewarna putih seperti susu kekuningan, hal ini diakibatkan oleh tercampurnya fase lipid dan fase air yang dicampurkan pada titik gelasnya dengan ukuran yang kecil (nm) (Jafar 2015).

**Tabel 3. Formula yang terpilih**

Formula	myrisetin (%)	Apifil (%)	Tween 80 (%)	Aquademineralisata
<b>F7</b>	0,02	2	20	Add 50 ml
<b>F8</b>	0,02	3	20	Add 50 ml
<b>F10</b>	0,02	4	20	Add 50 ml
<b>F11</b>	0,02	5	20	Add 50 ml

### C. Pembuatan Kurva Kalibrasi

#### 1. Penentuan panjang gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum dari myrisetin dilakukan dengan scanning larutan induk myrisetin dengan konsentrasi 47 ppm pada panjang gelombang 200-500 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis didapatkan nilai serapan 2,9816. Diencerkan menjadi 9,4 ppm diperoleh panjang gelombang yang memiliki serapan terbesar yaitu 364 nm dengan nilai serapannya sebesar 0,5917 nm. Hasil panjang gelombang maksimum myrisetin ada di lampiran

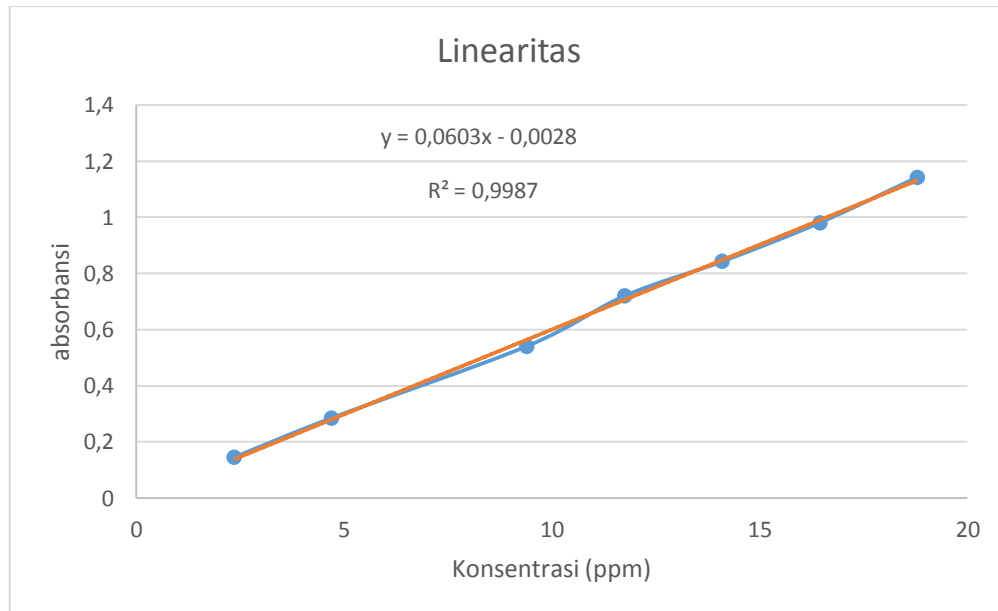
#### 2. Penentuan Operating Time

Operating time ditentukan dengan menggunakan seri konsentrasi myrisetin 9,4 ppm. Penentuan operating time bertujuan untuk memudahkan dalam melihat kestabilan reaksi larutan dari suatu senyawa yang dianalisis. Reaksi larutan yang stabil ditunjukkan dengan tidak berubahnya nilai serapan selama waktu tertentu. Hasil operating time selama 30 menit menunjukkan bahwa larutan myrisetin stabil pada menit ke-11 dapat dilihat pada Lampiran

#### 3. Kurva Kalibrasi

Pembuatan tujuh seri konsentrasi myrisetin yaitu 2,35; 4,7; 9,4; 11,75; 14,1; 16,45 dan 18,8 ppm dari larutan baku 47 ppm pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebanyak tiga kali replikasi. Penentuan persamaan regresi linear dengan nilai  $x$  yaitu konsentrasi,  $y$  adalah absorbansi. Hasil persamaan regresi linear yang diperoleh yaitu  $y = 0,0028 + 0,0603x$ , dimana nilai koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,99935. 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 1993).



Gambar 9.??

#### D. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis yang dilakukan yaitu linearitas, presisi, akurasi, penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan kuantifikasi (LOQ). Menurut *United State Pharmacopeia* (USP), validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduktibel, dan tahan pada kisaran analit yang dianalisis (Gandjar & Rohman 2012). Hasil verifikasi analisis dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Validasi metode analisis kurva kalibrasi Myristin

parameter	Hasil
Koefisien determinasi ( $R^2$ )	0,9987
Koefisien relasi (R)	0,99935
Perolehan kembali (recovery)	100 % $\pm$ 3,3
Simpangan Baku Relatif (RSD)	0,52 %
Batas Deteksi (LOD)	0,7827 $\mu$ g/ml
Batas kuantifikasi (LOQ)	2,3720 $\mu$ g/ml

### 1. Linearitas

Hasil validasi metode analisis menunjukkan bahwa serapan lebih dari 99% dipengaruhi oleh konsentrasi myrisetin, ditunjukkan dari nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) 0,9987. Nilai koefisien relasi yang dipersyaratkan oleh *Association of Official Analytical Chemis* (AOAC) adalah  $> 0,99$ . Berdasarkan hasil nilai koefisien korelasi kurva kalibrasi myrisetin pada metanol sebesar 0,99935 menunjukkan hasil yang baik karena  $> 0,99$ , menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proposional antara respon analitik dengan konsentrasi yang diukur.

### 2. Penentuan LOD dan 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).

Berdasarkan nilai LOD dan LOQ yang dihasilkan tertera pada (tabel 3) diketahui bahwa keberadaan myrisetin dalam etanol dapat dideteksi apabila kadar yang terkandung lebih dari sama dengan 0,7827  $\mu\text{g/ml}$  dan apabila dimasukkan dalam persamaan regresi linier  $y = 0,0603x - 0,0028$  diperoleh nilai serapan 0,044 yang dapat diartikan bahwa nilai serapan terendah yang dapat diterima dalam analisis analit, sedangkan myrisetin terendah dalam etanol yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode ini adalah 2,3720  $\mu\text{g/ml}$  dan apabila dimasukkan dalam persamaan regresi linier  $y = 0,0603x - 0,0028$  diperoleh nilai serapan 0,140 yang berarti bahwa nilai serapan terendah yang dapat diterima dalam analisis analit.

### 3. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif (RSD) dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik (Ganjdar & Rohman 2007). Hasil perhitungan

nilai RSD untuk validasi metode analisis kurva kalibrasi myrisetin dalam etanol sebesar 0,52%, nilai tersebut menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan memiliki presisi yang baik karena batas nilai RSD adalah  $\leq 2$  (Harvey, 2000).

#### 4. Akurasi

Akurasi merupakan ketepatan metode analisis atau kedekatan antara nilai hasil pengujian dengan nilai sebenarnya, atau nilai rujukan (Harmita 2004). Penetapan proses akurasi peneliti menggunakan tiga macam konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Berdasarkan hasil yang diperoleh, nilai *recovery* myrisetin sebesar 100%. Nilai *recovery* yang diperoleh pada rentang % *recovery* berdasarkan *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC* antara 98-102 %.

### E. Karakterisasi SLN Myrisetin

#### 1. Pengukuran distribusi dan ukuran Partikel

Tabel 5. Hasil penetapan distribusi partikel dan ukuran

Formula	Ukuran partikel	Indeks polidispersitas (PI)
F7	105,5 ± 0,70	0,232
F8	209,1 ± 10,88	0,744
F10	187 ± 0,87	0,430
F11	113,3 ± 0,76	0,749

Ket. F7= 1:10 , F8= 1: 6,67, F10= 1:5, F11= 1: 4

Ukuran partikel merupakan karakteristik yang paling penting di dalam suatu sistem nanopartikel. Penggunaan surfaktan berpengaruh terhadap ukuran partikel, PI dan kestabilan emulsi SLN yang dihasilkan. Surfaktan berfungsi dalam menstabilkan emulsi dengan cara menempati antar permukaan antara tetesan dan fase eksternal, dan dengan membuat batas fisik di sekeliling partikel yang akan berkoalesensi, sehingga kedua cairan yang tidak saling bercampur, mengurangi gaya tolak antara cairan-cairan tersebut dan mengurangi gaya tarik-menarik antarmolekul dari masing-masing cairan (Ansel 2008). Peningkatan konsentrasi surfaktan biasanya menyebabkan penurunan ukuran partikel, yaitu jika rasio surfaktan yang lebih tinggi dari pilid lipid dipilih, akan menghasilkan ukuran partikel yang lebih kecil (Bunjies 2003). Sesuai dengan percobaan, F7

menggunakan konsentrasi tween 80 lebih besar dari lipidnya, sedangkan F8, F9, F10 tidak sesuai karena kemungkinan dipengaruhi pada cara teknik pengerjaan.

Temperatur pada pemrosesan juga merupakan salah satu parameter terpenting yang mempengaruhi ukuran partikel. Temperatur homogenisasi, yang lebih rendah dari titik leleh lipid padat atau sama dengan itu, menghasilkan distribusi ukuran partikel yang heterogen dengan kandungan partikel mikro yang tinggi dalam kasus proses homogenisasi panas (Uner 2016). Sehingga, waktu pembuatan SLN menggunakan suhu 100 °C dan diturunkan secara bertahap untuk menjaga kestabilan.

Dalam asistem pengiriman obat menggunakan pembawa berbasis lipid, seperti liposom dan formulasi nanoliposom, PDI 0,3 dan di bawah dianggap dapat diterima dan menunjukkan populasi homogen (Badran 2014, Putri 2017) Pada Tabel 4 terlihat nilai indeks polidispersitas yang dihasilkan 0,234, ini menunjukkan bahwa SLN myrisetin merupakan dispersi yang cukup homogen pada F7. Indeks polidispersitas lebih besar dari 0,5 menunjukkan heterogenitas yang tinggi (Avadi et al. 2010), dari hasil yang menunjukkan adalah F8 dan F11.

## **2. Potensial Zeta**

Zeta potensial adalah muatan pada permukaan partikel yang dapat mempengaruhi kestabilan partikel di dalam larutan dengan gaya elektrostatis diantara partikel atau dapat dikatakan merupakan ukuran kekuatan tolak menolak antar partikel (Qiet *al.* 2004). Sebagian besar sistem koloid dalam air distabilkan oleh gaya tolak elektrostatis, semakin besar gaya tolak menolak maka semakin kecil kemungkinan partikel untuk bergabung dan membentuk agregat.

Pengukuran zeta potensial hanya pada F7 karena dari beberapa karakterisasi yang sesuai hanya F7 yang diperoleh hasil potensial zeta -20,52 mV dengan tiga kali replikasi sehingga kurang stabil, karena dalam penelitian Rosli (2015) suatu sistem dispersi koloid dengan nilai zeta potensial  $\pm 30$  mV dianggap merupakan suatu formulasi yang stabil dan nilai negatif atau positif yang tinggi dari zeta potensial akan menyebabkan nanopartikel saling tolak dan mencegah kecenderungan agregasi. Stabilitas nanopartikel dinyatakan dengan menggunakan zeta potensial.

### 3. Efisiensi Penjerapan

Tujuan dilakukannya efisiensi penjerapan untuk adalah untuk mengetahui kemampuan lipid dalam menjerap zat aktif dan mengetahui efisiensi dari metode yang digunakan. Faktor-faktor yang 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). Apabila zat aktif tidak larut sempurna dalam lemak cair, maka sebagian zat aktif akan terlepas dari matriks lemak dan terlarut dalam media.

Tabel 6. Hasil efisiensi penjerapan

Formula	Efisiensi penjerapan	Komposisi zat aktif
<b>F7</b>	73,56 %	19,2 mg
<b>F8</b>	28,89 %	20,8 mg
<b>F10</b>	40,19 %	19,8 mg
<b>F11</b>	42,46 %	20 mg

Hasil efisiensi penjerapan formula dengan lipid lebih banyak menghasilkan efisiensi penjerapan yang lebih baik. Hal ini disebabkan semakin besar komposisi lipid yang digunakan, akan menghasilkan nilai efisiensi penjerapan semakin besar, karena peningkatan Apifil akan memberikan lebih banyak tempat bagi zat aktif untuk terinkorporasi dalam SLN (Qingzhi Li 2009). Ditunjukkan oleh F8, F10 dan F11 semakin banyak konsentrasi lipidnya semakin besar efisiensi penjerapannya. Tetapi F7 menghasilkan efisiensi penjerapan yang paling besar kemungkinan karena konsentrasi apifil 2% dapat menjerap zat aktif secara optimum, dapat tercampur secara sempurna, dan memiliki daya serapan paling besar. Bisa karena kesalahan dalam pengerjaan sehingga menghasilkan serapan yang besar.

### 4. Uji stabilitas myrisetin selama penyimpanan

Percobaan dilakukan dengan pengamatan secara visual, dilihat kestabilan dan terbentuknya endapan selama 2 minggu pada suhu ruang. SLN yang disimpan dalam suhu kamar timbul endapan. Hal ini karena kenaikan suhu akan meningkatkan energi kinetis dari tetesan-tetesan, sehingga memudahkan



penggabungan antar partikel (beraglomerasi) suhu penyimpanan yang tidak sesuai menyebabkan rusaknya gerak brown. Gerak brown adalah gerak tidak beraturan atau gerak acak atau zig-zag partikel koloid. Hal ini terjadi karena adanya benturan tidak teratur dari partikel koloid dengan medium pendispersi. Dengan adanya gerak brown ini maka partikel koloid terhindar dari pengendapan karena terus-menerus bergerak (Wanibesak 2011). Endapan yang terjadi bersifat ireversibel karena dapat terdispersi kembali setelah dilakukan pengocokan.

**Tabel 7. Stabilitas penyimpanan**

<b>Minggu</b>	<b>Endapan</b>
<b>I</b>	-
<b>II</b>	Ada

## **5. Uji Antioksidan**

Uji antioksidan dilakukan pada zat aktif myrisetin untuk membuktikan adanya zat antioksidan karena pada penelitian Qu (2006) myrisetin dapat menangkap radikal bebas hidroksil yang dihasilkan melalui fotolisis UV H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hasil analisis aktivitas antioksidan myrisetin menunjukkan penurunan absorbansi yang semakin besar dan menunjukkan aktivitas antioksidan yang semakin besar pula. Penurunan nilai absorbansi di atas menunjukkan bahwa terjadi penangkapan/peredaman radikal bebas DPPH oleh myrisetin sehingga menunjukkan perbedaan adanya aktivitas antioksidan. Penurunan absorbansi diakibatkan oleh senyawa fenolik yang terkandung di dalamnya, senyawa-senyawa metabolit sekunder inilah yang diperkirakan mempunyai aktivitas sebagai antiradikal bebas karena gugus-gugus fungsi yang ada dalam senyawa tersebut seperti gugus OH yang dalam pemecahan heterolitiknya akan menghasilkan radikal O dan radikal H. Radikal-radikal inilah yang nantinya akan bereaksi secara radikal dengan DPPH sehingga dapat meredam panjang gelombang dari DPPH tersebut (Mega dan Swastini, 2010). Mekanisme reaksi DPPH ini berlangsung melalui transfer elektron. Larutan DPPH akan mengoksidasi senyawa dalam myrisetin. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen kepada DPPH, akan menetralkan radikal bebas DPPH. Semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi

berpasangan, akan ditandai dengan warna larutan yang berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang maksimumnya akan hilang (Molyneux 2004).

DPPH myrisetin dinyatakan dengan parameter  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi senyawa uji yang menyebabkan peredaman radikal bebas sebesar 50%. Hasil yang diperoleh 14,44 ppm dengan 3 kali replikasi yang dikategorikan sangat kuat. Uji antioksidan juga dilakukan pada formula yang terpilih yaitu F7 karena memenuhi beberapa karakteristik nanopartikel. F7 menghasilkan  $IC_{50}$  sebesar 38,77 ppm yang dikategorikan kuat. Hal ini sesuai pernyataan Subiyandono (2010) bahwa antioksidan yang terdapat dalam sampel menurun dikarenakan mudah teroksidasinya antioksidan oleh lingkungan luar, seperti terlalu panas pada saat proses pencampuran zat aktif sehingga menurunkan aktivitasnya di dalam meredam radikal bebas DPPH.

Dapat disimpulkan bahwa nilai  $IC_{50}$  berbanding terbalik dengan dengan potensi peredaman radikal bebas. Semakin besar nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh maka potensi aktivitas antioksidannya semakin kecil, artinya konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghasilkan aktivitas peredaman radikal bebas sebesar 50% semakin besar.