

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah totalitas atau keseluruhan subjek penelitian baik benda, orang, ataupun suatu hal lain yang di dalamnya bisa diambil informasi penting berupa data penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah formulasi NLC dengan bahan aktif fisetin yang dibuat dari campuran surfaktan, lipid padat dan lipid cair dengan konsentrasi yang berbeda dan dilihat uji karakteristik serta kestabilan fisik.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil yang diambil dari anggota populasi berdasarkan prosedur yang sudah ditentukan sehingga bisa digunakan untuk mewakili populasi. Sampel dalam penelitian ini adalah sejumlah formulasi NLC dengan bahan aktif fisetin yang diambil dari 9 formula dengan penggunaan surfaktan (tween 80), proporsi lipid padat (compritol, gliseril monostearat dan precinol) dan lipid cair (isopropil miristat).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel tergantung, variabel terkendali dan variabel bebas. Variabel dalam penelitian ini adalah formula dari NLC fisetin yang dibuat dengan konsentrasi lipid padat yang berbeda dengan penambahan surfaktan dan lipid cair, formula NLC fisetin dikarakterisasi dengan berbagai macam pengujian.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan dalam berbagai variabel, antara lain variabel kendali, variabel tergantung dan variabel bebas.

Variabel kendali 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 NLC fisetin dengan metode *emulsifikasi*, suhu, kecepatan *magnetic stirrer* serta waktu pencampuran lipid.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian ini yaitu *screening* formula NLC fisetin, karakterisasi meliputi ukuran partikel, stabilitas selama penyimpanan, efisiensi penjerapan (Ee) dan uji aktifitas antioksidan.

Variabel bebas yaitu variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung yaitu konsentrasi lipid padat yang berbeda (compritol, gliseril monostearat dan precirol).

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Zat aktif fisetin dengan penambahan surfaktan (tween 80) konsentrasi 20%, lipid padat (compritol, precirol dan gliseril monostearat) dengan konsentrasi masing-masing lipid yaitu 2%, 4% dan 6% serta lipid cair (isopropil miristat) sebanyak 0,1 gram.

Ukuran partikel pada NLC adalah 50 – 1000 nm. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari nanopartikel. Stabilitas selama penyimpanan diamati secara visual pada formula NLC fisetin yang menghasilkan ukuran partikel 50-1000 nm. Pengujian stabilitas dilakukan pada suhu kamar. *Presentase* bahan aktif yang terjerap dalam partikel lipid diamati dengan parameter efisiensi penjerapan menggunakan *Spektrofotometer uv-Vis*. Kandungan antioksidan yang terdapat dalam formula NLC fisetin dapat diperoleh dengan menggunakan uji aktivitas antioksidan yaitu metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).

Proses pembuatan NLC fisetin dengan metode *emulsifikasi*.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fisetin *Pharmaceutical Grade* (Tocris Co. Ltd, China), compritol dan precirol (Gattefosse, France), isopropil miristat (BASF, Indonesia), tween 80 (Cipta

Kimia, Solo), *DPPH* (2,2-Difenil-1 Pikrilhidrazil), aquademineralisata dan etanol pro analisis (PT. Bratachem, Indonesia).

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat uji ukuran partikel (PSA) (Malvern Panalytical, DKSH, England), *Zeta Nanosizer ZS* (Zetasizer) (DelsaMax Pro), *magnetic stirer* (Thermo Scientific, China), *spektrofotometer UV-Vis* (Genesys 10s, Thermo scientific), timbangan analitik (Ohaus), alat-alat gelas (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 dengan konsentrasi yang sesuai untuk menghasilkan sediaan NLC yang homogen dan memiliki kestabilan yang baik selama penyimpanan. Pembuatan NLC pada penelitian ini menggunakan metode *emulsifikasi*. Percobaan pendahuluan yang pertama yaitu *screening* lipid padat dengan konsentrasi yang berbeda terhadap fisetin, dengan surfaktan yang digunakan (tween 80), lipid padat yang digunakan yaitu (compritol, gliseril monostearat dan precinol) sedangkan lipid cair yang digunakan yaitu (isopropil miristat/IPM).

2. *Screening* lipid dengan metode *emulsifikasi*

Tabel 2. Screening lipid

FORMULA		Konsentrasi (gram)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lipid Padat	GMS	2%	4%	6%	-	-	-	-	-	-
	Precinol	-	-	-	2%	4%	6%	-	-	-
	Compritol	-	-	-	-	-	-	2%	4%	6%
Lipid Cair	IPM	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Surfaktan	Tween 80	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
Aquademineralisata ad		50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah emulsifikasi (*emulsification*). Tahapan *screening* lipid diawali dengan cara melebur lipid padat (gliseril monostearat, compritol dan precinol) konsentrasi 2%, 4% dan 6% dengan lipid cair (isopropil miristat) sebanyak 0,1 gram. Dibuat 9 formula, 3 formula campuran gliseril monostearat dengan isopropil miristat, 3 formula campuran

compritol dengan isopropil miristat dan 3 formula campuran precirol dengan isopropil miristat.

Perlakuan untuk formula (lipid padat dan lipid cair) masing-masing dilebur secara bersamaan pada suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$, pada saat yang sama larutan surfaktan (tween 80) konsentrasi 20% (10 gram) dan aquademineralisata dipersiapkan dalam *beaker glass* yang berbeda, keduanya dilebur secara bersamaan pada suhu yang sama yaitu $\pm 100^{\circ}\text{C}$ lalu dicampur sedikit demi sedikit.

Campuran surfaktan dan aquademineralisata panas kemudian ditambahkan kedalam campuran lipid panas dalam *beaker glass* kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm selama 45 menit (Sriarumtias dkk 2017). Dilakukan uji stabilitas secara visual selama ± 2 minggu untuk melihat kelarutan lipid terbaik yang bisa digunakan dalam pembuatan NLC fisetin.

3. Pembuatan kurva kalibrasi

3.1 Pembuatan larutan induk. Serbuk fisetin murni ditimbang sebanyak 5 mg tetapi yang masuk labu takar hanya 4,6 mg dimasukkan dalam labu takar 100 ml dengan ditambahkan etanol pro analisis sampai tanda batas (46 ppm) (El-Gawad *et al.* 2014).

3.2 Penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan induk dibaca dengan *spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang antara 200-400 nm. Hasil *scan-wavelength* menunjukkan nilai absorbansi tertinggi terdapat pada panjang gelombang maksimum (El-Gawad *et al.* 2014).

3.3 Penetapan *operating time*. Larutan induk dibaca pada panjang gelombang maksimum dimulai dari menit 0 sampai menit tertentu hingga didapatkan nilai absorbansi yang stabil (El-Gawad *et al.* 2014).

3.4 Pembuatan larutan seri kurva kalibrasi. Larutan induk dipipet sebanyak 0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 ml masing-masing dimasukkan dalam labu takar 10 ml dengan ditambahkan etanol pro analisis sampai tanda batas (konsentrasi 3,68; 4,6; 5,52; 6,44; 7,36; 8,28 ppm). Selanjutnya diukur serapannya dengan *spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum, kemudian dibuat kurva regresi linear antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi fisetin sehingga diperoleh persamaan regresi linear yang selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar fisetin (El-Gawad *et al.* 2014).

4. Verifikasi Metode Analisis

4.1 Akurasi. Metode untuk sampel yang diketahui jumlah fisetin sesuai dengan 80, 100 dan 120% dimana konsentrasi yang dipilih adalah 4,6; 5,52; 6,44 ppm dengan pengukuran menggunakan panjang gelombang yang sudah dicari, pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali dan didapatkan hasil data *recovery*.

4.2 Presisi. Dalam studi variasi antar-hari, sepuluh larutan yang berbeda dengan konsentrasi yang sama dari 1 konsentrasi terpilih pada pengujian akurasi disusun dan dianalisis, absorbansi yang didapat dicatat untuk menentukan koefisien korelasi.

5. Pembuatan NLC fisetin

Formula lipid yang terpilih pada tahap *screening* digunakan untuk membuat formula NLC fisetin. Pembuatan NLC fisetin dibuat dengan cara melebur lipid padat (gliseril monostearat, precirol dan compritol) dan lipid cair (isopropil miristat) pada suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$.

Larutan surfaktan (tween 80) konsentrasi 20% (10 gram) dilebur dengan aquademineralisata pada suhu yang sama yaitu $\pm 100^{\circ}\text{C}$. Bahan aktif fisetin dilarutkan terlebih dahulu dengan menggunakan etanol pro analisis sebanyak 1 ml sampai larut.

Campuran surfaktan dan aquademineralisata panas kemudian ditambahkan kedalam campuran lipid panas dalam *beaker glass* kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm selama 45 menit. Campuran fisetin yang telah dilarutkan dengan etanol pro analisis kemudian dimasukkan kedalam campuran diatas sedikit demi sedikit (Sriarumtias dkk 2017). Hasil akhir dimasukkan kedalam botol yang tertutup rapat dengan bagian luar dilapisi alumunium foil untuk menghindari adanya radikal bebas kemudian disimpan pada suhu kamar setelah itu dikarakterisasi.

6. Karakterisasi NLC fisetin

6.1 Penetapan distribusi & ukuran partikel. Penetapan distribusi dan ukuran nanopartikel menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan kedalam *beaker glass* ditambahkan 1 ml aquademineralisata, kemudian dimasukkan kedalam kuvet dengan tinggi $\pm 1\text{cm}$.

Kuvet yang digunakan harus bersih dari busa dan lemak. Kuvet yang telah diisi sampel dimasukkan ke dalam *sample holder*. Alat dinyalakan dan dipilih menu *particle size*. Alat akan mengukur sampel selama 10 menit. Data yang dihasilkan merupakan ukuran partikel yang dihitung dari fluktuasi rata-rata intensitas hamburan cahaya. PSA bekerja dengan prinsip gerak *Brownian*.

6.2 Efisiensi penjerapan (EE). Sebanyak 200 mg sampel NLC fisetin ditimbang dalam *beaker glass* tambah 10 ml etanol masukkan tabung reaksi, kemudian disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 6.000 rpm, hal ini dilakukan untuk memisahkan fase lipid dengan air. Supernatan yang didapat disaring dan dianalisis menggunakan *spektrofotometer UV-vis*. Pengaruh *entrapment efficiency* (EE) dapat dihitung dengan persamaan berikut :

$$Ee = \left(\frac{W_a - W_s}{W_a} \right) \times 100\%$$

Keterangan :

Wa : Jumlah obat yang ditambahkan ke dalam sistem

Ws : Jumlah bahan obat bebas dalam supernatan

7. Uji stabilitas NLC fisetin setelah penyimpanan secara visual.

Formula NLC fisetin yang sudah diketahui menghasilkan ukuran partikel terkecil (50-1000 nm) di uji stabilitasnya pada suhu kamar selama 2 minggu dan diamati secara visual setiap minggu.

8. Uji aktivitas antioksidan

8.1 Pembuatan larutan DPPH. Menimbang serbuk DPPH sebanyak 16 mg dimasukkan kedalam labu takar 10 ml tambahkan etanol sampai tanda batas (konsentrasi 160 ppm).

8.2 Pembuatan larutan induk zat aktif. Sebanyak 50 mg serbuk fisetin dimasukkan labu takar 100 ml tambahkan etanol sampai tanda batas (konsentrasi 500 ppm).

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

8.4 Pembuatan larutan seri konsentrasi zat aktif. Pembuatan seri konsentrasi diambil dari larutan induk dengan konsentrasi 15,56; 7,78; 3,89; 1,95; 0,97 ppm. Ambil 1 ml tiap konsentrasi, 1 ml DPPH dan 3 ml etanol sesuai OT, baca serapannya.

8.5 Pembuatan larutan seri konsentrasi formula sediaan. Pembuatan larutan induk dari formula 200 ppm, dibuat seri konsentrasi 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 ppm. Ambil 1 ml tiap konsentrasi, 1 ml DPH, 3 ml etanol sesuai OT, baca serapannya.

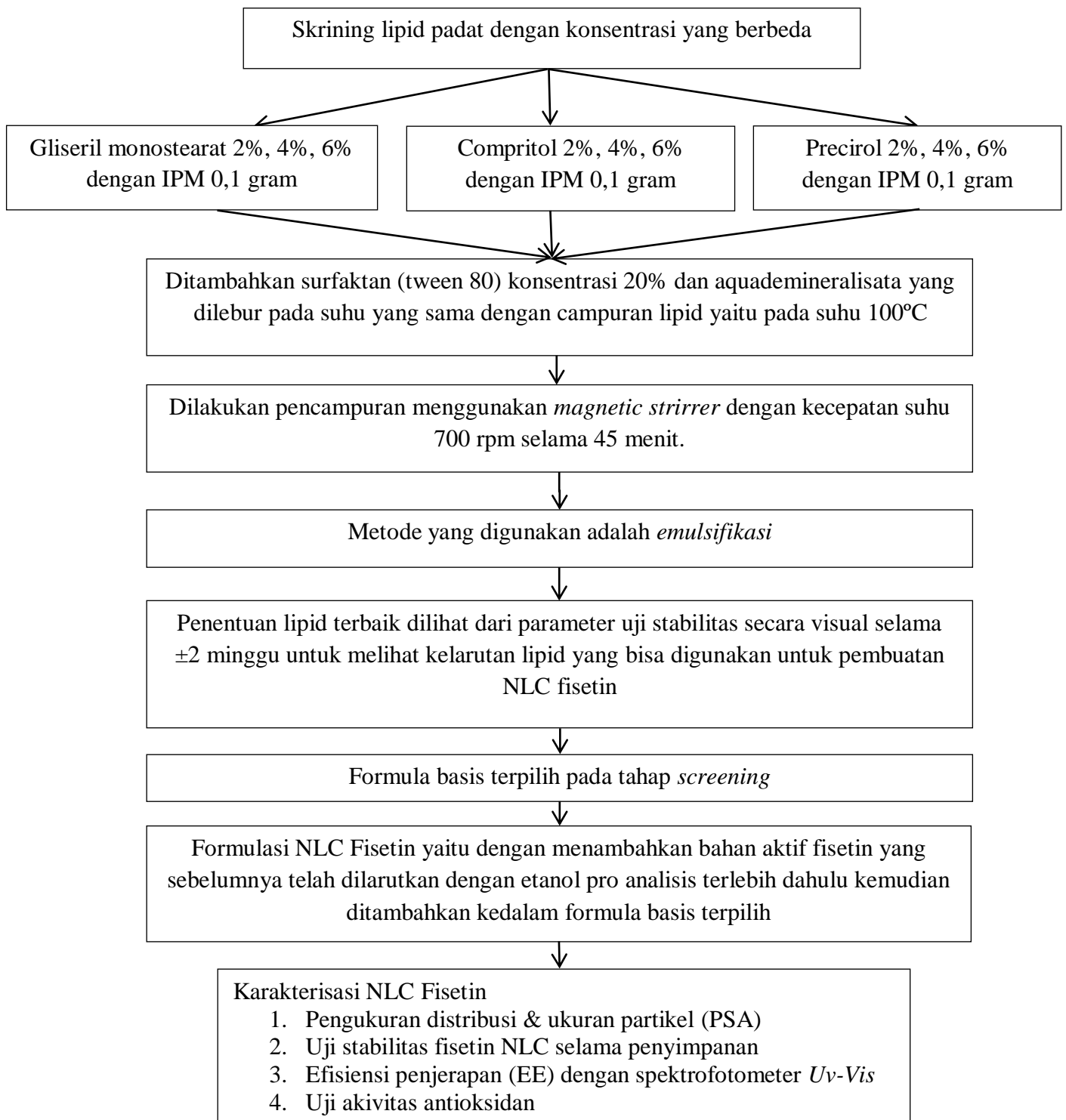
8.6 Perhitungan IC₅₀. Hasil perhitungan IC₅₀ didapatkan dari persamaan regresi linier antara absorbansi dan % inhibisi dengan rumus :

$$50 = a + bx$$

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 *Nanostructured Lipid Carriers* fisetin, 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 10. Skema jalannya penelitian