

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

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

Pembuatan *Nanostructure Lipid Carriers* (NLC) dilakukan dengan menggunakan metode *emulsifikasi* untuk mendapatkan sediaan NLC yang homogen dengan ukuran partikel yang masih dalam ukuran nanometer yaitu 50-1000 nm. Percobaan pendahuluan dilakukan diawal penelitian untuk mengetahui kondisi percobaan dan juga untuk mengetahui konsentrasi lipid terbaik agar dapat digunakan dalam formula NLC fisetin. Formula dibuat dengan cara pengadukan lipid menggunakan *magnetic stirrer* sedangkan fisetin dilarutkan menggunakan etanol pro analisis kemudian ditambahkan kedalam campuran lipid dengan konsentrasi terpilih.

Senyawa antioksidan dapat terdegradasi kurang lebih pada suhu 70°C, mendekati suhu tersebut kemampuan senyawa antioksidan akan berkurang atau bahkan menghilang, sehingga pada saat memasukkan fisetin kedalam campuran lipid suhu yang digunakan pada alat *magnetic stirrer* diturunkan menjadi 45°C agar tidak merubah aktivitas farmakologi fisetin. Formula dimasukkan kedalam botol yang dilapisi alumunium foil agar terhindar dari radiasi sinar matahari yang dapat merusak bahan aktif fisetin didalamnya dan disimpan pada suhu ruang.

Penelitian ini menggunakan tiga lipid yaitu gliseril monostearat, precirrol dan compritol. Percobaan pendahuluan dilakukan dengan pemilihan konsentrasi lipid mulai dari konsentrasi 2%, 4% dan 6% untuk masing-masing lipid padat yang digunakan. Masing-masing lipid padat dengan konsentrasi 2% setelah proses pencampuran dapat membentuk emulsi yang stabil selama penyimpanan dan dengan konsentrasi lipid 4% dan 6% membentuk emulsi yang kental dan mengendap setelah penyimpanan, 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 yang

tidak beraturan atau gerak acak partikel koloid, hal ini terjadi karena adanya benturan tidak teratur dari partikel koloid dengan medium pendispersi. Endapan yang terjadi bersifat ireversibel karena dapat terdispersi kembali setelah dilakukan pengocokan. Hasil percobaan pendahuluan yang didapatkan yaitu konsentrasi masing-masing lipid (gliseril monostearat, compritol dan precirol) yang digunakan yaitu 2%.

## B. Pembuatan NLC fisetin

Tabel 3. Formula terpilih

FORMULA		Konsentrasi (g)			
		1	2	3	
Lipid Padat	Zat aktif	Fisetin	0,01	0,01	0,01
		GMS	2%	-	-
		Precirol	-	2%	-
		Compritol	-	-	2%
Lipid Cair		IPM	0,1	0,1	0,1
Surfaktan		Tween 80	20%	20%	20%
Aquademineralisata ad			50 ml	50 ml	50 ml

Dispersi NLC fisetin diformulasi dengan metode *emulsifikasi*. Metode *emulsifikasi* sangat berperan dalam pembentukan *Nanostructured Lipid Carriers* (NLC), pembentukan materi berukuran nano sangatlah efektif dengan penambahan surfaktan sebagai penstabil. Menstabilkan dan menghambat aglomerasi globul lemak terdispersi kedalam formula NLC fisetin dapat dilakukan dengan penambahan surfaktan, sehingga penambahan surfaktan tween 80 digunakan dalam formula NLC.

Fisetin didispersikan didalam fase lemak yaitu lipid padat (gliseril monostearat, compritol dan precirol) dan lipid cair (isopropil miristat) membentuk emulsi minyak dalam air (m/a), kemudian ditambahkan fase air berupa tween 80 yang didispersikan dalam 39 ml *aquademineralisata* untuk membentuk emulsi m/a/m dengan globul yang lebih kecil. Emulsi NLC fisetin 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).

### C. Kurva Kalibrasi dan Verifikasi Metode Analisis

#### 1. Pembuatan kurva kalibrasi

**1.1 Penentuan panjang gelombang maksimum.** Larutan induk konsentrasi 46 ppm dibaca pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan *spektrofotometer UV-Vis*. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu pada panjang gelombang 364 nm dengan serapan sebesar 0,3545. Data dapat dilihat pada lampiran 12a.

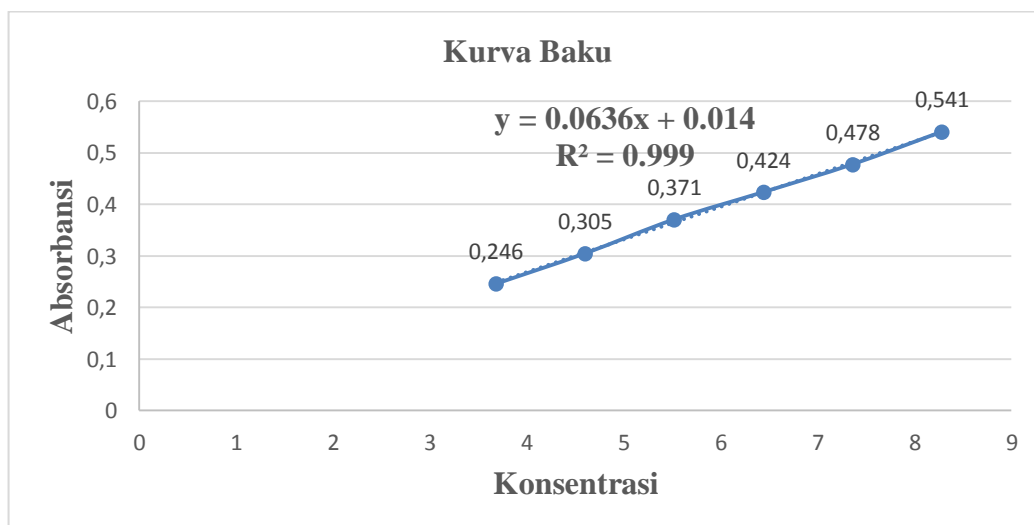
**1.2 Penentuan *operating time*.** Penentuan *operating time* bertujuan untuk melihat kestabilan reaksi suatu senyawa yang dianalisis. Larutan induk dibaca pada panjang gelombang 364 nm dimulai dari menit 0 sampai menit ke-30 hingga didapatkan nilai absorbansi yang stabil (El-Gawad *et al.* 2014). Pada lampiran 12b, didapatkan serapan yang stabil pada menit ke-10 dan seterusnya.

**1.3 Kurva kalibrasi.** Kurva kalibrasi fisetin dibuat dengan konsentrasi 3,68 ppm; 4,6 ppm; 5,52 ppm; 6,44 ppm; 7,36 ppm dan 8,28 ppm. Seri konsentrasi larutan tersebut diukur serapannya dengan *spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang 364 nm, kemudian dibuat kurva *regresi linear* antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi fisetin sehingga diperoleh persamaan *regresi linear*. Hasil persamaan  $y = a + bx$  yang diperoleh yaitu dengan koefisien korelasi sebesar 0,9995. Hasil penentuan kurva baku dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil penentuan kurva baku fisetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
3,68	0,246
4,6	0,305
5,52	0,371
6,44	0,424
7,36	0,478
8,28	0,541

Hubungan antara konsentrasi (ppm) dengan absorbansi fisetin dapat dilihat pada gambar :



Gambar 11. Grafik hubungan antara konsentrasi fisetin dengan absorbansi

**1.4 Verifikasi metode analisis.** Verifikasi metode analisis yang dilakukan yaitu penentuan akurasi dan presisi. Hasil verifikasi metode analisis ditunjukkan pada Tabel 5.

**Tabel 5. Parameter verifikasi metode analisis kurva kalibrasi fisetin**

Parameter	Hasil
R2 (koefisien determinasi)	0,999
Akurasi	100%
Presisi	1%

Hasil verifikasi metode analisis menunjukkan serapan dipengaruhi oleh fisetin sebesar 99,9%. Penentuan akurasi dinyatakan sebagai *prosentase* (%) perolehan kembali (*recovery*), dinilai dengan menggunakan 3 konsentrasi/3 replikasi yaitu pada konsentrasi 4,6 ppm, 5,52 ppm dan 6,44 ppm. Ketepatan metode analisa dihitung dari besarnya rata-rata (*mean, x*) kadar yang diperoleh dari serangkaian pengukuran dibandingkan dengan kadar sebenarnya. Nilai rata-rata *recovery* yang didapatkan yaitu 100%. Presisi ditentukan melalui populasi data hasil pengukuran berulang dan dinyatakan dalam bentuk RSD (*relative standart deviation*). Makin rendah nilai simpangan baku, maka data yang diperoleh akan saling berdekatan, dan ini berarti presisi hasil pengukuran yang dilakukan adalah lebih baik. Nilai CV yang didapatkan adalah 1%, hasil ini sesuai dengan persyaratan presisi yaitu  $\leq 2\%$ .

#### **D. Karakterisasi *Nanostructure Lipid Carriers* (NLC) fisetin.**

##### **1. Ukuran partikel**

Hasil ukuran partikel *Nanostructured Lipid Carriers* (NLC) fisetin secara umum terlihat berada pada range ukuran NLC yaitu (50-1000 nm). Ukuran partikel NLC fisetin pada formula 1 yaitu 898 nm, pada formula 2 yaitu 539,33 nm dan pada formula 3 memberikan hasil ukuran partikel yaitu 551,33 nm. Diamati bahwa gliserida dengan rantai alkil yang lebih panjang (gliseril monostearat) menghasilkan ukuran partikel yang lebih besar dibandingkan dengan rantai alkil yang lebih pendek (precirol dan compritol) (Huang *et al.* 2008).

Precirol pada formula 2 dengan ukuran partikel terkecil yaitu  $539,33 \pm 6,51$  nm memiliki sifat kosurfaktan, dengan adanya precirol didalam formula akan menurunkan tegangan permukaan antara matriks lipid dan fase air yang berakibat menurunnya ukuran partikel dari NLC (Rowe, 2009).

Ukuran partikel yang dihasilkan dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas nanopartikel (Singh *et al.* 2009). Pengukuran ukuran partikel dilakukan dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Ukuran partikel dan kestabilan emulsi NLC yang dihasilkan juga dipengaruhi oleh penggunaan surfaktan. Surfaktan yang digunakan yaitu tween 80 dengan konsentrasi 20% serta konsentrasi lipid padat 2% (gliseril monostearat, compritol dan precirol) pada formulasi NLC dapat membentuk ukuran partikel nano, hal tersebut terjadi karena jumlah pengemulsi yang lebih banyak dapat lebih mencegah terjadinya agregasi kembali. Surfaktan tween 80 memiliki ukuran *droplet* yang lebih kecil, memiliki ujung rantai hidrofob linier yang tidak jenuh, memiliki rantai hidrofob berjumlah 18 dan di rantai nomor 9 terdapat ikatan rangkap, hal ini menyebabkan kelarutan obat semakin meningkat (Komaiko 2016). Panjangnya rantai hidrofob dari tween 80 memiliki pengaruh besar terhadap kelarutan obat dalam air, hal ini dapat dijelaskan berdasarkan persamaan *gibbs* dimana jika penurunan tegangan permukaan besar maka penurunan energi bebas permukaan juga besar sehingga terjadi ukuran *droplet* yang dihasilkan semakin kecil (Martin 1993).

Keseragaman ukuran partikel dapat diketahui dari nilai indeks polidispersitas, indeks polidispersitas merupakan ukuran lebarnya distribusi ukuran partikel. Pada tabel 6 Nilai indeks polidispersitas yang dihasilkan berbeda-beda tiap formula, pada formula 1 menghasilkan nilai PDI yaitu 0,216, formula 2 menghasilkan nilai PDI yaitu 0,388 dan pada formula 3 menghasilkan nilai PDI yaitu 0,412. Terlihat pada formula F1, F2, dan F3 nilai indeks polidispersitas yang dihasilkan mendekati nilai 0, hal ini menunjukkan bahwa emulsi NLC fisetin yang terbentuk pada sampel tersebut merupakan dispersi yang cukup homogen karena nilai indeks polidispersitasnya mendekati nilai 0 dan nilai PDI yang paling homogen yaitu pada formula I.

**Tabel 6. Hasil pengukuran ukuran partikel**

<b>Sampel</b>	<b>Ukuran Partikel (nm)</b>	<b>PDI</b>
F1 (Gliseril monostearat)	898 ± 12,73	0,216
F2 (Precirol)	539,33 ± 6,51	0,388
F3 (Compritol)	551,33 ± 5,13	0,412

## 2. Zeta potensial.

Potensial zeta dapat menggambarkan prediksi mengenai stabilitas penyimpanan dari dispersi koloid. 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 elektrostatis antara partikel akan menentukan kecenderungan agregasi dan fenomena tolak-menolak.

Nanopartikel dengan nilai potensial zeta lebih besar dari +25 mV atau kurang dari -25 mV biasanya memiliki derajat stabilitas tinggi. Dispersi dengan nilai potensial zeta rendah akan menghasilkan agregat karena atraksi *Van Der Waals* antar-partikel (Ronson 2012).

Hasil pengukuran potensial zeta pada formula 2 yaitu -14,01 mV dan pada formula 3 yaitu -20,25 mV sedangkan pada formula 1 tidak dilakukan uji potensial zeta karena pada saat penyimpanan formula yang dihasilkan mengental, hal ini berpengaruh terhadap pengujian potensial zeta yang membutuhkan sampel pengujian berbentuk larutan. Nilai potensial zeta menurun karena berkurangnya stabilitas elektrostatis yang dihasilkan.

### 3. Efisiensi penyerapan

Jumlah fisetin yang terjerap dalam formula NLC dapat ditentukan dengan pengujian efisiensi penyerapan. Efisiensi penyerapan pada umumnya dinyatakan dalam persen obat yang terjerap dalam fase lemak terhadap obat yang ditambahkan. Sistem penghantaran obat harus memiliki kapasitas pemuatan obat yang tinggi dan bertahan lama (Parhi & Suresh 2010).

Tujuan dilakukannya evaluasi efisiensi penyerapan fisetin di dalam NLC adalah untuk mengetahui kemampuan lipid dalam menyerap 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).

Analisis dilakukan menggunakan *spektrofotometri UV-vis* karena pada fisetin terdapat gugus kromofor, yaitu gugus C=O dan benzen sehingga fisetin dapat terdeteksi pada panjang gelombang maksimum yaitu 364 nm.

**Tabel 7. Efisiensi penyerapan**

<b>Formula</b>	<b>Efisiensi Penyerapan (%)</b>
1 (GMS 2%)	22,99
2 (Precirol 2%)	59,20
3 (Compritol 2%)	37,24

Hasil efisiensi penyerapan pada masing-masing formula yaitu berbeda-beda, dari ketiga formula menunjukkan bahwa pada formula 2 menghasilkan efisiensi penyerapan yang lebih tinggi dibandingkan formula 1 dan 3, hal ini karena pada formula 1 dan 3 memiliki kelarutan dalam basis yang lebih rendah serta struktur fisik dan kimia matriks lemak padat yang berbeda dibandingkan formula 1. Campuran antara monogliserida, digliserida, trigliserida dan rantai asam jenuh pada precirol dapat menghasilkan rantai lipid yang berbeda dari bentuk aslinya. Rantai lipid yang berbeda tersebut dapat memberikan bentuk kristal yang kurang sempurna, sehingga menghasilkan ruang didalam kristal yang

lebih besar. Ruang kristal yang membesar tersebut dapat mengakomodasi obat lebih besar sehingga efisiensi penjabakan yang dihasilkan semakin besar (Souto & Muller, 2007). Hasil yang didapat menunjukkan bahwa formula 2 dapat menyerap fisetin cukup besar.

#### 4. Uji stabilitas NLC fisetin setelah penyimpanan secara visual

Ketiga formula NLC fisetin terpilih disimpan pada suhu ruang selama 2 minggu, dengan wadah botol berwarna putih yang digunakan dilapisi aluminium foil untuk menghindari adanya radiasi sinar matahari. Setelah 2 minggu pengamatan, NLC yang disimpan pada suhu kamar tidak terdapat adanya pemisahan dan terbentuknya endapan tetapi, warna larutan berubah menjadi warna putih seperti susu, hal ini karena kandungan etanol yang terdapat didalamnya menguap.

**Tabel 8. Stabilitas NLC fisetin pada suhu kamar**

Formula	Endapan	
	Minggu Ke-1	Minggu Ke-2
1	-	-
2	-	-
3	-	-

#### 5. Uji aktivitas antioksidan

Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah *Inhibition Concentration* ( $IC_{50}$ ) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan % penghambatan sebesar 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga  $IC_{50}$  yang rendah (Williams *et al.* 1994).

Berdasarkan perhitungan rata-rata replikasi nilai  $IC_{50}$  dari fisetin murni diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 6,07 ppm. Perhitungan  $IC_{50}$  pada masing-masing formula yaitu pada formula 1 sebesar 51,10 ppm, formula 2 sebesar 51,98 ppm dan pada formula 3 sebesar 55,36 ppm.

Tingkat kekuatan antioksidan adalah kategori kuat ( $IC_{50} < 50$  ppm), aktif ( $IC_{50}$  yaitu antara 50-100 ppm), sedang ( $IC_{50}$  yaitu antara 101-250 ppm), lemah



( $IC_{50}$  yaitu antara 250-500 ppm) dan tidak aktif ( $IC_{50}$  yaitu >500 ppm) (Jumaetri *et al.* 2016).

Berdasarkan pengujian aktivitas antioksidan dari fisetin, terlihat bahwa fisetin memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong kuat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 6,07 ppm, sedangkan pada formula NCL fisetin memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong aktif pada masing-masing formula. Terjadi penurunan aktivitas antioksidan setelah diformulasi menjadi NLC karena mengalami proses pemanasan dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 45°C selama  $\pm 15$  menit pada saat pencampuran lipid dengan fisetin. Proses pemanasan yang terlalu berlebih tersebut dapat merusak kandungan fisetin yang ada pada formula sehingga, bioaktivitasnya sebagai antioksidan menurun.