

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah ruang lingkup dari keseluruhan unit yang ingin diteliti. Populasi dalam penelitian ini adalah fisetin yang dibuat dengan SLN (*Solid Lipid Nanoparticles*).

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari populasi yang ingin diteliti, yang keberadaan dan ciri-cirinya diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan populasi yang sebenarnya. Sampel dalam penelitian ini adalah sejumlah fisetin SLN yang dibuat dengan berbagai proporsi lipid padat golongan alkohol (setil alkohol, setostearil alkohol, stearil alkohol dan surfaktan (tween 80)).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat. Variabel dalam penelitian ini adalah formula dari fisetin SLN yang dibuat dengan lipid padat golongan alkohol yang berbeda yaitu (Setil Alkohol, Setostearil Alkohol, Stearil Alkohol) dan menggunakan Surfaktan (Tween 80).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan dalam berbagai variabel, antara lain variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat.

Variabel bebas yaitu variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat yaitu jenis dan konsentrasi lipid padat, lipid padat berupa lipid golongan alkohol (setil alkohol, setostearil alkohol, stearil alkohol), serta karakterisasi SLN dengan berbagai macam pengujian. Variabel terikat pada penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian ini yaitu karakterisasi fisetin SLN yaitu ukuran partikel dan zeta

potensial, analisa morfologi dengan *Transmission Electron Microscopy* (TEM), PSA dan uji kelarutan dengan *spektrofotometer UV-Vis*.

Variabel terkontrol 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, seperti proses pembuatan SLN dengan metode *emulsifikasi-sonikasi*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Zat aktif fisetin dengan proposi surfaktan (tween 80) dan lipid padat golongan alkohol (setil alkohol, setostearil alkohol, stearil alkohol).

Ukuran partikel pada SLN adalah 10-1000 nm. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari nanopartikel. Zeta potensial merupakan prediktor yang baik dari fenomena glasi karena potensial zeta mengatur derajat tolak-menolak antara partikel-partikel yang terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan. Uji kelarutan untuk mengetahui ukuran suatu zat dapat melarut dalam suatu medium. Proses pembuatan fisetin SLN dengan kombinasi metode *emulsifikasi-sonikasi*. Uji kandungan antioksidan dilakukan dengan DPPH untuk mengetahui potensi antioksidan yang berkhasiat dari fisetin dan formula SLN.

Persentase bahan aktif yang terjebak didalam partikel lipid dapat diketahui dengan pengujian *drug loading capacity* dan efisiensi penjerapan (*entraptment efficiency*). Untuk bahan aktif yang bersifat lipofilik biasanya memiliki nilai EE antara 90-98%. Uji stabilitas setelah penyimpanan dilakukan untuk mengetahui kestabilan SLN. Proses pembuatan SLN fisetin dilakukan dengan metode *emulsifikasi-sonikasi*.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fisetin *Pharmaceutical Grade* (**Tocris A Biotechne Brand Co. Ltd, Cina**), tween80 (**PT. Bratachem, Indonesia**), setil alkohol, stearil alkohol,

aquademineralisatadan metanol (**PT. Bratachem, Indonesia**), setostearil alcohol (**PT. Rocchem, Indonesia**), DPPH (**PT. Bratachem, Indonesia**)

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat uji ukuran partikel dan zeta potensial (**Beckman Coulter Delsa[®] Nano C, USA**), *homogenizer*, *magnetic stirer*, *hotplate stirer* (**Thermo Scientific, China**), *sentrifuge* (**SPLC Series, Gemmy 8 Hole, Taiwan**), *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 yang sesuai untuk menghasilkan sediaan dispersi SLN yang stabil dan homogen. Pembuatan SLN ini menggunakan metode *emulsifikasi-sonikasi*. Percobaan pendahuluan yang dilakukan screening lipid padat golongan alkohol (setil alkohol, setostearil alkohol, stearil alkohol) masing-masing konsentrasi 2%; 4%; dan 6% dan surfaktan (tween 80) konsentrasi 20% tiap 50 ml campuran formula.

2. Screening fisetin SLN dengan Metode *Emulsifikasi-sonikasi*.

Tabel 3. Screening fisetin SLN dengan Lipid padat dan Surfaktan.

		Konsentrasi (g)								
Formula		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lipid Padat	Setil Alkohol	1	2	3	-	-	-	-	-	-
	Setostearil Alkohol	-	-	-	1	2	3	-	-	-
	Stearil Alkohol	-	-	-	-	-	-	1	2	3
Surfaktan	Tween 80	10	10	10	10	10	10	10	10	10
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-sonikasi*. Pembuatan skrining SLN diawali dengan melelehkan lipid padat (setil alkohol, setostearil alkohol, stearil alkohol) masing-masing dibuat 3 variasi konsentrasi

yakni 2%; 4%; dan 6% pada suhu 70°C menggunakan cawan diatas *water bath*, kemudian di *beaker glass* yang berbeda tween 80 yang sudah dipanaskan dalam penangas air ditambahkan aquademineralisata lalu dituangkan kedalam lipid padat yang sudah dilelehkan hingga volume 50 ml. Campuran bahan tersebut kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 jam. Tahap selanjutnya adalah pendinginan yang dilakukan dengan cara mendinginkan emulsi tersebut dalam *beaker glass*, hingga mencapai suhu 25°C. Kemudian hasil emulsi fisetin disonikasi dengan kecepatan 20000-24000 rpm selama 30 menit pada temperatur ruangan. Kemudian didiamkan selama beberapa hari untuk melihat kestabilan dari SLN, SLN yang stabil akan dipilih untuk pembuatan SLN fisetin.

Tabel 4. Screening fisetin SLN dengan Lipid padat dan Surfaktan.

		Konsentrasi (g)						
Formula		1	2	3	4	5	6	7
Lipid padat	Setil alkohol	1	0,75	0,5	0,375	0,25	0,125	0,075
Surfaktan	Tween 80	10	10	10	10	10	10	10
Aquademineralisata Ad		50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml

Dari 9 formula tersebut, didapatkan 1 formula yang memenuhi syarat kestabilan yaitu setil alkohol 2%. Berdasarkan 1 formula terpilih itu, kemudian dibuat lagi formula dengan konsentrasi dibawahnya 1,5%; 1%; 0,75%; 0,5%; 0,25%; dan 0,15% didapatkan 7 formula. Dari 7 formula tersebut dilihat lagi kondisi stabilitas fisiknya dan hanya 3 formula yang terpilih yakni setil alkohol dengan konsentrasi 0,5%; 0,25%; dan 0,15% dari lipid setil alkohol dipilih. Formula-formula tersebut dibuat dengan cara kerja yang sama seperti formula skrining sebelumnya. Formula terpilih adalah setil alkohol dengan konsentrasi 0,5%; 0,25%; dan 0,15%.

3. Pembuatan Kurva Kalibrasi

3.1 Pembuatan Larutan Induk. Larutan induk dibuat konsentrasi 46 ppm dengan menimbang serbuk fisetin murni 4,6 mg dilarutkan dengan etanol *p.a* dalam labu takar 100 ml (El-Gawad *et al.* 2014).

3.2 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum. Larutan induk dibaca dengan *spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang

gelombang maksimum ditunjukkan dengan nilai serapan yang paling tinggi pada hasil *scan-wavelength* (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.

3.4 Pembuatan Larutan Seri Kurva Kalibrasi. Larutan induk dipipet sebanyak 0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 ml di ad kan 10 ml etanol sehingga didapat seri konsentrasi 1,84; 2,76; 3,68; 4,6; 5,52; 6,44; 7,36 dan 8,28 ppm. Seri larutan tersebut diukur serapannya dengan *spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum fisetin, 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. Validasi Metode Analisis

4.1 Linearitas (*Linearity*). Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan induk fisetin dalam pelarut etanol yaitu 1,84 ppm; 2,76 ppm; 3,68 ppm; 4,6 ppm; 5,52 ppm; 6,44 ppm; 7,36 ppm dan 8,28 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 95%. Nilai linearitas dikatakan baik dan dapat digunakan untuk menghitung akurasi serta presisi bila *r* hitung > *r* tabel.

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

4.3 Presisi. Dibuat 10 larutan yang berbeda dengan konsentrasi yang sama 4,6 ppm disusun, dianalisis dan absorbansi dicatat untuk menentukan koefisien korelasi.

5. Pembuatan SLN fisetin

Formulasi skrining lipid yang terpilih selanjutnya dipakai untuk membuat SLN fisetin dengan konsentrasi berbeda. Pembuatan diawali dengan melelehkan lipid padat suhu 110°C. Panaskan tween 80 dan aquademineralisata kemudian campurkan. Tuang fase air kedalam fase minyak sedikit demi sedikit homogenkan dengan magnetic stirrer kecepatan 6000 rpm suhu 110°C selama 1 jam sambil suhu diturunkan perlahan ketika mencapai suhu dibawah 45°C, tambahkan fisetin yang sudah dilarutkan dengan etanol secukupnya agar fisetin tidak rusak.

6. Karakterisasi SLN Fisetin.

6.1 Penetapan Distribusi & Ukuran Partikel. Pengukuran dan distribusi nanopartikel menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA). Prinsip PSA menggunakan metode *laser diffraction*, dimana partikel melewati berkas sinar laser. Cahaya dihamburkan oleh partikel-partikel tersebut dikumpulkan lebih dari rentang sudut yang berhadapan langsung, distribusi intensitas yang dihamburkan akan dianalisis oleh komposisi sebagai hasil distribusi ukuran partikel. Cara menggunakan PSA dengan memasukkan akuadest kedalam *fluid tank* tetes demi tetes hingga konsentrasi yang mencukupi, masukkan sampel. Distribusi ukuran dalam sampel akan terukur melalui grafik yang dihasilkan.

6.2 Uji stabilitas fisetin SLN dalam penyimpanan selama 2 minggu.

6.2.1 Pengamatan secara visual. Formula fisetin SLN yang sudah diketahui menghasilkan ukuran partikel terkecil di uji stabilitasnya pada suhu kamar selama 2 minggu dan diamati ada atau tidaknya kekeruhan dan pengendapan setiap minggu.

6.2.2 Uji *Entrapment Efficiency*.SLN fisetin diambil sebanyak 200 mg, kemudian disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 4000 rpm untuk memisahkan lipid dan fase air. Supernatan kemudian diambil dan dianalisis dengan spektrofotometri UV-Vis. Jumlah bahan aktif yang terjebak dalam SLN dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Entrapment Efficiency (EE)} = \frac{(W_o - W_s)}{W_s} \times 100\%$$

Keterangan : EE : Efisiensi penjebakan (*Entrapment Efficiency*)
 W_o : Massa obat dalam formulasi
 W_s : Massa obat dalam supernatan

7. Uji Aktifitas Antioksidan (DPPH).

7.1 Pembuatan larutan DPPH. Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 16 mg masukkan labu takar 100 ml tambahkan etanol sampai tanda batas (konsentrasi 160 ppm).

7.2 Pembuatan larutan induk zat aktif. Sebanyak 50 mg serbuk fisetin ditimbang kemudian masukkan dalam labu takar 100 ml tambahkan etanol sampai tanda batas tambahkan etanol sampai tanda batas (konsentrasi 500 ppm).

7.3 Penentuan panjang gelombang dan *operating time*. Diambil 1 ml DPPH ditambahkan 4 ml etanol dengan rentang panjang gelombang 400-600 nm. Lama waktu yang digunakan untuk *operating time* adalah 60 menit.

7.4 Pembuatan seri konsentrasi zat aktif. Larutan induk dipipet 0,3; 0,15; 0,078; 0,039; 0,019 ml kemudian masing-masing ditambahkan etanol sampai 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi berturut-turut adalah 15,56; 7,78; 3,89; 1,95; 0,97 ppm. Dipipet 1 ml pada tiap konsentrasi zat aktif dan DPPH 1 ml, tambahkan 3 ml etanol sesuai OT, kemudian baca serapan pada spektro.

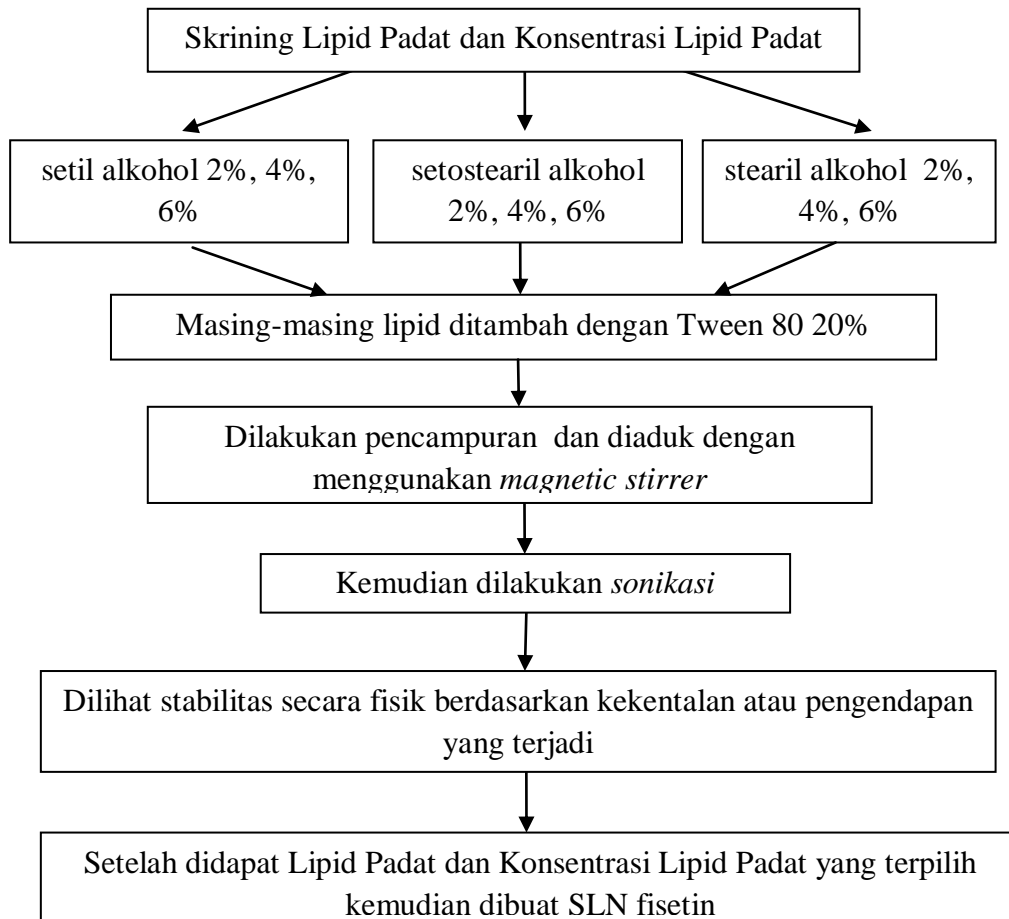
7.5 Pembuatan seri konsentrasi formula sediaan. Dibuat larutan induk formula 100 ppm. Dipipet 2,5; 1,225; 0,625; 0,156; 0,078 ml kemudian masing-masing ditambahkan etanol sampai 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi berturut-turut adalah 25; 12,25; 6,25; 1,56; 0,78 ppm. Dipipet 1 ml pada tiap konsentrasi zat aktif dan DPPH 1 ml, tambahkan 3 ml etanol sesuai OT, kemudian baca serapan pada spektro.

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 fisetin SLN, 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.

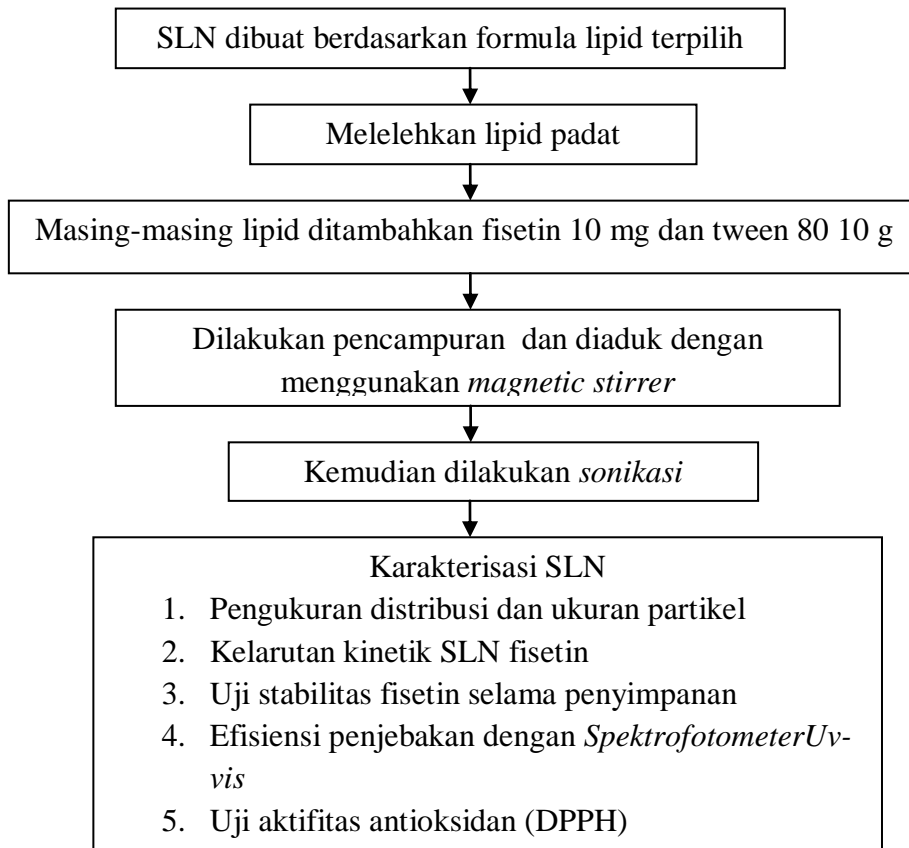
F. Skema Jalannya Penelitian

1. Skema Skrining Lipid Padat dan Konsentrasi Lipid Padat



Gambar 8. Skema Skrining Lipid Padat dan Konsentrasi Lipid Padat

2. Skema Pembuatan SLN dan karakterisasinya



Gambar 9. Skema Pembuatan SLN dan karakterisasinya