

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Percobaan Pendahuluan

Metode yang digunakan dalam pembuatan *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN) merupakan gabungan antara emulsifikasi pelarut dan sonikasi, supaya didapat ukuran partikel yang sesuai dan homogen untuk formula SLN. Penelitian ini diawali dengan percobaan pendahuluan dengan tujuan untuk menentukan konsentrasi lipid terbaik agar mendapatkan formula SLN yang stabil. Percobaan pendahuluan perlu dilakukan dengan memperhatikan konsentrasi pada setiap lipid dan surfaktan yang digunakan, kecepatan putaran pada magnetik, serta lama waktu sonikasi yang dibutuhkan. Sediaan fisetin yang dibentuk akan menghasilkan formula berupa nanoemulsi, dimana proses pembuatannya dengan melarutkan lipid pada *aquademineralsata* dan melarutkan fisetin pada etanol.

Percobaan pendahuluan dilakukan menggunakan beberapa lipid golongan alkohol yaitu setil alkohol, stearil alkohol, dan setostearil alkohol dengan konsentrasi yang berbeda yakni 2%; 4%; dan 6%. Pengujian dilakukan pada 9 formula untuk *screening* dengan melihat kondisi stabilitas fisik dari formula tersebut, kemudian didapat 1 formula yang memenuhi syarat secara stabilitas fisik berupa tidak adanya kekentalan, tidak adanya pengendapan. 1 formula tersebut adalah setil alkohol dengan konsentrasi 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, sedangkan lipid stearil alkohol tidak dipilih karena tampilan fisiknya menunjukkan kekeruhan. 3 formula yang dipilih kemudian dicek ukuran partikel.

SLN fisetin dibuat dengan melarutkan lipid dan fisetin dengan pelarut yang sama kemudian dicampur dan diaduk dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu dibawah 60°C, karenafisetin merupakan senyawa flavonoid yang memiliki berbagai aktifitas farmakologi salah satunya sebagai antioksidan. Antioksidan

alami umumnya berbentuk cairan pekat dan sensitif terhadap pemanasan. Antioksidan dapat rusak karena suhu tinggi dan mudah teroksidasi (Miryanti *et al.* 2011). Penelitian Erge dan Özşen 2013, menentukan pengaruh termal pada senyawa bioaktif berupa aktifitas antioksidan terdegradasi pada suhu 60-90°C. Pernyataan ini menyimpulkan bahwa diatas suhu tersebut kemampuan senyawa antioksidan akan menurun, sehingga titik leleh lipid perlu dipertimbangkan dalam pembuatan formula SLN fisetin agar tidak merubah aktifitas farmakologi fisetin

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan lipid golongan alkohol. Lipid yang digunakan dalam formula SLN fisetin adalah lipid yang dapat larut dalam pelarut dengan suhu kurang dari 60°C. Pada percobaan ini setil alkohol dilarutkan dalam aquademineralisata dengan suhu yang dinaikkan secara bertahap, setil alkohol larut pada suhu 50°C dan tidak cepat beraglomerasi kembali. Sementara stearil alkohol dan setostearil alkohol sangat mudah beraglomerasi menjadi partikel yang lebih besar , sehingga dalam formula SLN fisetin digunakan lipid setil alkohol.

B. Pembuatan SLN Fisetin

Tabel 4. Pembuatan fisetin SLN

		Konsentrasi (g)		
Formula		5	6	7
Fisetin		0,01	0,01	0,01
Formula	Setil Alkohol	0,25	0,125	0,075
Surfaktan	Tween 80	10	10	10
Aquademineralisata Ad		50 ml	50 ml	50 ml

SLN fisetin dibuat dengan gabungan metode emulsifikasi pelarut dan sonikasi, dimana fisetin dibuat dengan melarutkannya kedalam etanol kemudian lipidnya dimasukkan dalam surfaktan dan *aquademineralisata* yang telah dilarutkan terlebih dahulu. Lipid yang telah larut dalam campuran surfaktan dan *aquademineralisata*, kemudian ditambahkan fisetin yang terlarut pada etanol sedikit demi sedikit. Emulsifikasi pelarut dilakukan menggunakan *magnetic stirer* dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 jam pada setiap formula. Surfaktan yang

terdapat dalam campuran akan menstabilkan SLN yang terbentuk sehingga partikel tidak beraglomerasi menjadi partikel yang lebih besar.

Metode sonikasi sangat berperan dalam penggunaannya sebagai gelombang ultrasonik (sonikasi) yang menimbulkan efek kavitasi untuk membentuk *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN). Efek kavitasi dapat memisahkan penggumpalan partikel (*agglomeration*) dan terjadi dispersi sempurna dengan penambahan surfaktan. Penambahan surfaktan diperlukan untuk menghambat aglomerasi globul lemak terdispersi dan menstabilkan formula SLN fisetin.

SLN fisetin akan membentuk emulsi air dalam minyak (a/m), karena lipid akan membungkus zat aktif. Fisetin didispersikan didalam fase lemak setil alkohol, kemudian ditambahkan fase air berupa tween 80 yang didispersikan dalam 40 ml *aquademineralisata* untuk membentuk emulsi a/m/a dengan globul yang lebih kecil. Emulsi yang terbentuk kemudian disonikasi selama 5 menit dengan amplitudo 35% untuk memisahkan penggumpalan partikel (*agglomeration*). Emulsi SLN fisetin yang terbentuk berupa larutan koloid bewarna bening kekuningan, hal ini diakibatkan oleh tercampurnya fase lipid dan fase air yang dicampurkan pada titik gelasinya dengan ukuran yang kecil (nm) (Jafar 2015). Nanoemulsi yang terbentuk kemudian dilakukan uji PSA dan zeta Potensial menggunakan alat *zetasizer*.

Penggunaan Tween 80 sebagai surfaktan atau penstabil untuk menyelimuti sistem SLN dari agregasi dan penggabungan ukuran partikel. Hasil dari PSA dan zeta potensial didapat ukuran partikel yang kecil dan stabilitas berdasarkan zeta dikatakan baik.

C. Kurva kalibrasi dan Validasi Metode Analisis.

1. Pembuatan kurva kalibrasi

1.1 Penentuan panjang gelombang maksimum. Pembuatan kurva baku fisetin dengan konsentrasi 46 ppm pada panjang gelombang 400-200 nm dalam etanol dan penetapan λ maks menggunakan *spektrofotometer UV-Vis*. Hasilnya dapat dilihat pada lampiran 9a didapatkan serapan tertinggi yaitu 0,3545 dengan panjang gelombang 364 nm.

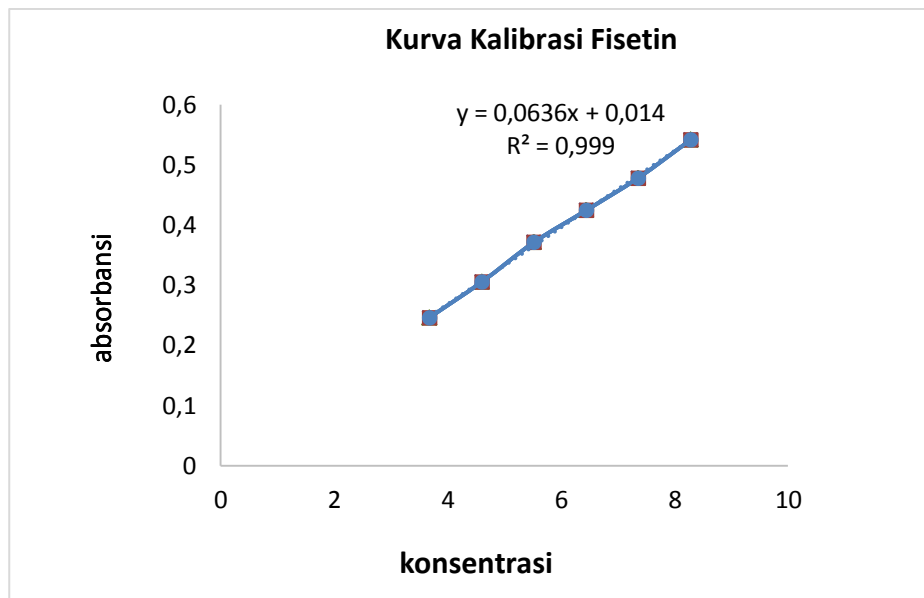
1.2 Penentuan *operating time*. *Operating time* digunakan untuk melihat kestabilan reaksi suatu senyawa yang dianalisis. Larutan induk dibaca pada panjang gelombang maksimum hingga didapatkan nilai absorbansi yang stabil dimulai dari menit 0 sampai menit tertentu (El-Gawad *et al.* 2014). Hasilnya dapat dilihat pada lampiran 9b, didapatkan serapan yang stabil pada menit ke-10 dan menit ke-13.

1.3 Kurva kalibrasi. Dibuat konsentrasi 3,68 ppm; 4,6 ppm; 5,52 ppm; 6,44 ppm; 7,36 ppm; dan 8,28 ppm untuk pembuatan kurva baku fisetin. Diukur serapan dari seri konsentrasi larutan tersebut dengan *spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang 364 nm, kemudian dibuat kurva *regresi linier* antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi fisetin sehingga diperoleh persamaan *regresi linier*. Hasil persamaan diperoleh koefisien korelasi sebesar 0,9995. Hasil dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Konsentrasi dan absorbansi fisetin dalam etanol

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 10. Kurva kalibrasi fisetin dalam etanol

Hasil persamaan regresi linier dengan pelarut etanol yang diperoleh yaitu $y = 0,014x - 0,063$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,99951.

1.4 Validasi metode analisis. Validasi metode analisis yang dilakukan yaitu penentuan linieritas, akurasi, dan presisi. Hasil validasi metode analisis ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Parameter validasi metode analisis kurva kalibrasi fisetin.

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

Validasi metode analisis menunjukkan koefisien determinasi 0,999 yang berarti serapan dipengaruhi oleh fisetin sebesar 99,9%. Penentuan akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*), dinilai dengan menggunakan 3 konsentrasi yaitu 4,6 ppm; 5,52 ppm; 6,44 ppm. Ketepatan metode analisis 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 dilakukan melalui populasi data

hasil pengukuran berulang dan dinyatakan dalam bentuk RSD (*relative standard deviation*). Makin rendah nilai simpangan baku, maka data yang diperoleh akan semakin 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 kurang dari 2%.

D. Karakterisasi SLN Fisetin

1. Penetapan Ukuran Partikel & Polidispersi Indeks.

Tabel 6. Hasil penetapan ukuran partikel & polidispersi indeks.

Formula	Ukuran partikel (nm)	Polidispersi Indeks (PI)
Formula 7	15±0,57	0,263
Formula 6	29±3,06	0,139
Formula 5	217±30,06	0,291

Keterangan: *= formula 7 Setil Alkohol 0,15%, formula 6 Setil Alkohol 0,25%, formula 5 Setil Alkohol 0,50%.

Ukuran partikel sangat penting dalam sistem nanopartikel. Ukuran partikel SLN fisetin diukur menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*). Penggunaan surfaktan berpengaruh terhadap ukuran partikel dan kestabilan SLN yang dihasilkan. Penggunaan tween 80 sebagai surfaktan atau penstabil untuk menyelimuti sistem SLN dari agregasi dan penggabungan ukuran partikel.

Hasil pengukuran ukuran partikel SLN fisetin terlihat pada range ukuran nanopartikel yaitu 10-1000 nm. Penggunaan setil alkohol pada konsentrasi 0,15% menghasilkan ukuran partikel yang paling kecil dibanding konsentrasi 0,5%; dan 0,25% hal ini disebabkan karena lipid golongan alkohol memiliki rantai panjang yang sangat mudah beraglomerasi membentuk partikel yang lebih besar maka dengan konsentrasi yang sedikit lebih besar akan banyak berpengaruh pada hasil ukuran partikel, sehingga dengan konsentrasi yang diperkecil maka akan semakin sedikit lipid yang digunakan dan mengakibatkan kecil kemungkinan SLN untuk beraglomerasi kembali menjadi partikel besar. Keseragaman ukuran suatu partikel dan ada tidaknya agregasi dapat dilihat dari nilai polidispersi indeks. Distribusi ukuran partikel dinyatakan sebagai monodispersi jika PI berada pada rentang 0,01-0,7 (Fan *et al.* 2012). Pada penelitian ini diperoleh PI yang masuk pada

rentang secara teoritis, hal ini menunjukkan formula yang dihasilkan memiliki tingkat keseragaman distribusi ukuran yang cukup baik.

2. Efisiensi Penjerapan

Pengujian efisiensi penjerapan fisetin bertujuan untuk mengevaluasi efisiensi penjerapan zat aktif di dalam SLN, yakni mengetahui kemampuan lipid dalam menyerap zat aktif dan menentukan jumlah fisetin yang terjerap dalam SLN. Suatu sistem penghantaran obat harus memiliki kapasitas pemuatan obat yang tinggi dan bertahan lama. Kapasitas pemuatan obat (efisiensi penjerapan) pada umumnya dinyatakan dalam persen obat yang terjerap dalam fase lemak terhadap obat yang ditambahkan (Parhi & Suresh 2010).

Penelitian ini dilakukan pada 3 formula sampel terpilih dengan konsentrasi yang berbeda, yakni setil alkohol 0,15%; 0,25%; dan 0,5%. Hasil dapat dilihat pada tabel 7 Berdasarkan penelitian yang telah didapatkan hasilnya menunjukkan bahwa semakin banyak lipid yang digunakan akan semakin besar nilai % efisiensi penjerapannya.

Tabel 7. Efisiensi penjerapan

Formula	Efisiensi penjerapan
7	36,71
6	46,23
5	75,15

Keterangan: *= formula 7 Setil Alkohol 0,15%, formula 6 Setil Alkohol 0,25%, formula 5 Setil Alkohol 0,50%.

Hasil efisiensi penjerapan formula dengan lipid yang kadarnya 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 setil alkohol akan memberikan lebih banyak tempat bagi zat aktif untuk terinkorporasi dalam SLN (Qingzhi Li 2009).

3. Zeta Potensial

Beberapa hal yang mempengaruhi kemampuan lipid dalam menyerap zat aktif adalah struktur fisik dan kimia matriks lemak padat, serta kelarutan obat dalam lemak yang dilelehkan (Uner & Yener 2007). Hasil yang didapat

menunjukkan bahwa setil alkohol dapat menjerap fisetin cukup besar karena kelarutan fisetin dalam setil alkohol cukup besar..

Tabel 8. Zeta Potensial formula

Formula	Zeta Potensial (ZP)
7	-18,08 mV
6	-18,40 Mv
5	-20,25 mV

Keterangan: *= formula 7 Setil Alkohol 0,15%, formula 6 Setil Alkohol 0,25%, formula 5 Setil Alkohol 0,50%.

Zeta potensial merupakan muatan partikel yang terdapat pada permukaan suatu sistem koloid. Zeta potensial yang semakin tinggi dapat mencegah terjadinya interaksi antara partikel satu dengan lainnya dan *flokulasi* atau penggabungan partikel menjadi lebih besar (Luo *et al.*, 2013). Nanopartikel dengan nilai potensial zeta dengan nilai lebih besar dari atau sama dengan +25 mV atau -25 mV biasanya memiliki derajat stabilitas tinggi (Ronson 2012). Kestabilan formula SLN dapat diketahui dengan zeta potensial. Pada Tabel 6 terlihat nilai zeta potensial yang dihasilkan ketiga formula setil alkohol karena dibawah nilai -25mV, ini menunjukkan bahwa SLN fisetin merupakan dispersi kurang stabil. Hal ini dikarenakan adanya peningkatan suhu selama penyimpanan sehingga terjadi kekeruhan.

4. Stabilitas SLN Fisetin dalam penyimpanan secara visual

Pengamatan secara visual. SLN fisetin (7,6,5) disimpan pada suhu ruang selama 2 minggu. Pada minggu ke-1 SLN yang disimpan dalam suhu kamar tidak timbul endapan, dan tidak keruh sedangkan pada minggu ke-2 tetap tidak terjadi endapan namun agak sedikit keruh dan konstan. Hal ini disebabkan beberapa faktor salah satunya, karena tween 80 merupakan surfaktan nonionik mempunyai gugus polioksietilen yang sensitif terhadap temperatur sehingga akan berpengaruh pada kestabilan sistem secara termodinamika. Semakin meningkat temperaturnya, surfaktan nonionik akan semakin bersifat lipofilik, hal ini disebabkan karena gugus polioksietilen yang berfungsi sebagai gugus polar atau kepala akan mengalami dehidrasi dengan meningkatnya suhu (Mahdi,

2006), mengakibatkan meningkatnya tegangan antarmuka antara minyak dan air sehingga tampilan dari nanoemulsi menjadi keruh dan tidak stabil lagi.

Tabel 9. Stabilitas SLN fisetin pada suhu kamar

	Pembentukan kekeruhan	
	minggu 1	minggu 2
F7	Tidak Ada	ada
F6	Tidak Ada	ada
F5	Tidak Ada	ada

Keterangan: *= formula 7 Setil Alkohol 0,15%, formula 6 Setil Alkohol 0,25%, formula 5 Setil Alkohol 0,50%.

E. DPPH (Uji Aktifitas Antioksidan)

Pengukuran aktivitas antioksidan sampel dilakukan pada panjang gelombang 516 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH, dengan konsentrasi DPPH 160 ppm. Adanya aktivitas antioksidan dari sampel mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna violet pekat menjadi kuning pucat (Prasad 2014).

Aktivitas antioksidan dari formula dan zat aktif fisetin dinyatakan dalam persentase inhibisinya terhadap radikal DPPH. Persentase inhibisi ini didapatkan dari perbedaan serapan antara absorban DPPH dengan absorban sampel yang diukur dengan *spektrofotometer UV-Vis*. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi efektif formula yang dibutuhkan untuk meredam 50% dari total DPPH, sehingga 50 disubstitusikan sebagai nilai y dan akan didapatkan x sebagai nilai IC_{50} . Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (100-150), dan lemah (151-200). Semakin kecil nilai IC_{50} semakin tinggi aktivitas antioksidan (Badarinath 2010).

Dilakukan uji DPPH pada zat aktif fisetin yang diyakini memiliki aktifitas antioksidan. Penelitian ini menunjukkan fisetin memiliki aktifitas antioksidan yang sangat kuat karena memiliki rata-rata IC_{50} sebesar 6,08 ppm, demikian juga dengan formula yang dibuat menunjukkan aktifitas antioksidan sangat kuat dengan rata-rata IC_{50} sebesar 12,14 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan

antioksidan sangat kuat dalam formula setil alkohol dengan zat aktif fisetin. Hasil dapat dilihat pada lampiran 13c & 13d.