

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Nanopartikel

Nanopartikel didefinisikan sebagai dispersi partikel atau partikel padat dengan ukuran antara 10-1000 nm. Nanopartikel adalah struktur koloid berukuran sub-nano terdiri dari polimer sintesis atau semi sintesis, keuntungan nanopartikel adalah dapat meningkatkan bioavailabilitas, pengiriman obat yang spesifik, pelepasan obat berkelanjutan dalam jangka waktu yang lama, dan meningkatkan kepatuhan pasien karena pengurangan dosis (Nagarajan *et al.* 2015), bersifat biodegradable, tidak beracun, dan mampu disimpan untuk waktu yang lebih lama karena mereka lebih stabil (Garud *et al.* 2012). Persyaratan nanopartikel yang ideal yaitu partikel tersebut harus dapat masuk ke dalam aliran darah dan mencapai ke dalam sel dan jaringan target (Abirami *et al.* 2014).

Menurut Yadav *et al.* (2011) polimer nanopartikel yang mampu menjerap obat dalam matriks atau mengkonjugasi pada permukaan merupakan suatu koloid berbentuk bola yang memiliki ukuran sangat kecil (10-100nm) sehingga terjadi pelepasan obat nanopartikel melalui difusi dan erosi dari matriks.

Polimer nanopartikel merupakan istilah yang diberikan khusus untuk *nanosphere* dan nanokapsul. *Nanosphere* merupakan suatu partikel matriks dimana massa padat dan molekul dapat diadsorpsi pada permukaan bola atau dienkapsulasi dalam partikel. Nanokapsul merupakan sistem vesikular dan bertindak seperti reservoir dimana zat yang terjerap terbatas dan terdapat rongga yang terdiri dari inti yang bersifat cairan (Rao dan Kurt 2011). Contoh polimer alami yaitu dekstran, gelatin dan kitosan sedangkan polimer ester, anhidrida dan amida, merupakan polimer sintesis (Yadav *et al.* 2011).

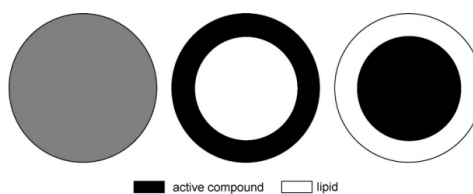
B. Solid Lipid Nanoparticle (SLNs)

Solid lipid nanoparticle (SLNs) ditemukan pada awal tahun 1991, ini merupakan sistem penghantar obat alternatif pembawa koloid seperti emulsi,

liposom dan mikropolimer. Sistem ini terdiri dari partikel lipid padat dengan rentang nanometer, yang terdispersi dalam air atau dalam larutan surfaktan. SLNs terbuat dari inti hidrofobik padat yang memiliki lapisan fosfolipid monolayer. Inti padat mengandung obat yang terlarut atau terdispersi dalam matriks lemak padat (Ramteke *et al.* 2012). Bahan utama dari SLNs terdiri dari lipid padat, *emulsifier* dan air. Lipid yang digunakan di sini mencakup golongan trigliserida (misalnya tristearin), gliserida parsial (misalnya Imwitor), asam lemak (misalnya asam stearat), steroid (misalnya kolesterol) dan golongan wax (misalnya cetyl palmitate). Kombinasi pengemulsi dapat mencegah aglomerasi partikel lebih efisien (Bagul *et al.* 2018).

Solid lipid nanoparticle (SLNs) memiliki banyak keuntungan dibandingkan dengan sistem pembawa lainnya antara lain biokompatibilitas yang baik, resiko toksisitas yang rendah, bioavailabilitas tinggi, target spesifik ke bagian organ tertentu, pelepasan obat berkelanjutan yang dikendalikan, enkapsulasi dan perlindungan senyawa dari degradasi kimia serta bisa digunakan untuk produksi skala besar (Talele 2018).

Terdapat tiga model SLNs berdasarkan letak distribusi obat pada partikel SLNs, yaitu *homogenous matrix model*, *drug-enriched shell model* dan *drug-enriched core model*. Struktur ini diperoleh berdasarkan pengaruh perbedaan komposisi formula antara lemak dan surfaktan dan kondisi produksi (Muller *et al.* 2009).



Keterangan : kiri : *homogenous matrix model*
 tengah : *Drug-enriched shell model*
 kanan : *Drug-enriched core model*

Gambar 1. Tipe SLNs berdasarkan letak senyawa aktif (Muller *et al.* 2009)

Homogenous matrix model diperoleh jika pada pembuatannya menggunakan metode *cold homogenization* atau ketika obat yang lipofil didispersikan dalam SLNs dengan metode *hot homogenization*. Struktur *drug-*

enriched shell model diperoleh selama masa pendinginan dari droplet minyak cair ke bentuk lemak padat ukuran nanopartikel. Bahan obat yang mengandung emulgator atau surfaktan mengalami penurunan kelarutan ketika pendinginan sehingga berpartisipasi ke fase minyak. *Drug-enriched core model* diperoleh ketika obat mengalami presipitasi lebih dahulu sebelum lemak mengalami rekristalisasi, sehingga kulit luar menjadi kurang akan bahan obat (Muller *et al.* 2009).

C. Metode Pembuatan SLNs

Metode yang digunakan dalam pembuatan SLNs adalah *bottom up* (pembuatan partikel dari larutannya atau presipitasi), teknologi *top down* (penurunan ukuran partikel yang pada umumnya dengan gaya mekanik) (Keck dan Müller 2006), ultrasonikasi atau *High Shear Homogenization* (probe ultrasonikasi, *ultrasonication bath*), metode evaporasi pelarut, metode emulsifikasi-difusi pelarut, metode cairan superkritis, mikroemulsi, metode emulsi ganda, teknik presipitasi, *film-ultrasound dispersion*, teknik injeksi pelarut, atau menggunakan kontraktor membran. Menurut Souto *et al.* (2007); Pardeike *et al.* (2009); Muller *et al.* (2014); Mitri *et al.* (2011) pembuatan SLNs yang paling umum digunakan adalah HPH (panas dan dingin), *ultrasonication* dan *High Shear Homogenization* (probe ultrasonikasi, *ultrasonication bath*), mikroemulsi dan emulsifikasi.

1. Teknologi *Bottom Up*

Teknologi *Bottom Up* merupakan metode pembuatan nanopartikel dengan cara memperbesar ukuran dari senyawa yang berukuran kecil dimulai dari atom-atom atau molekul-molekul menjadi lebih besar membentuk partikel berukuran nanometer yang dikehendaki (Abdullah *et al.* 2008). Metode yang telah banyak digunakan adalah presipitasi atau metode hidrosol. Keuntungan dari metode presipitasi adalah menggunakan peralatan yang sederhana. Kekurangan metode presipitasi yaitu obat harus dapat larut setidaknya dalam satu pelarut dimana pelarut tersebut harus dapat bercampur dengan *non*-pelarut (Gupta dan Kompella

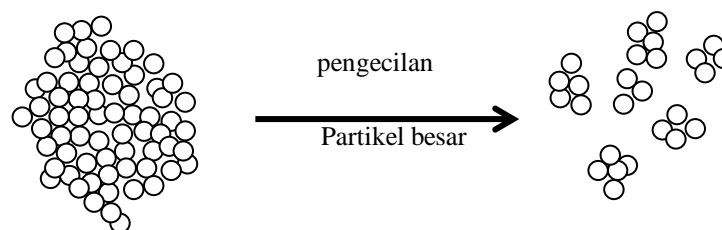
2006). Keterbatasan metode *bottom up* adalah kesulitan saat *scale up* adanya residu dari pelarut yang digunakan (Shegokar dan Müller 2010).



Gambar 2. Skema umum mekanisme teknologi *bottom-up*
(Gupta dan Kompella 2006)

2. Teknologi *top down*

Teknologi *top down* merupakan metode pembuatan nanopartikel dengan cara mengubah partikel berukuran besar menjadi ukuran nanometer menggunakan gaya mekanik (Lalena *et al.* 2008). Hal yang perlu diperhatikan bila menggunakan metode *top down* adalah kekuatan atau kelipatan bahan, kekerasan, sifat *abrasive*, bentuk dan ukuran partikel, serta sensitivitasnya terhadap suhu (Gupta dan Kompella 2006; Van Eerdenbrugh *et al.* 2008).



Gambar 3. Skema umum mekanisme teknologi *top down*
(Gupta dan Kompella 2006)

Metode pembuatan dengan teknologi ini terdiri dari berbagai cara, yaitu :

2.1 Pearl Milling (Ball Milling). Alat yang digunakan dalam *pearl milling* terdiri dari wadah dan bola yang bergerak. Metode ini obat didispersikan dalam larutan surfaktan kemudian dimasukkan ke dalam alat *pearl milling*. Keuntungan metode ini adalah teknologi sederhana dan biaya produksi relatif murah. Kekurangan metode ini adalah potensi kontaminasi dari bahan *milling*,

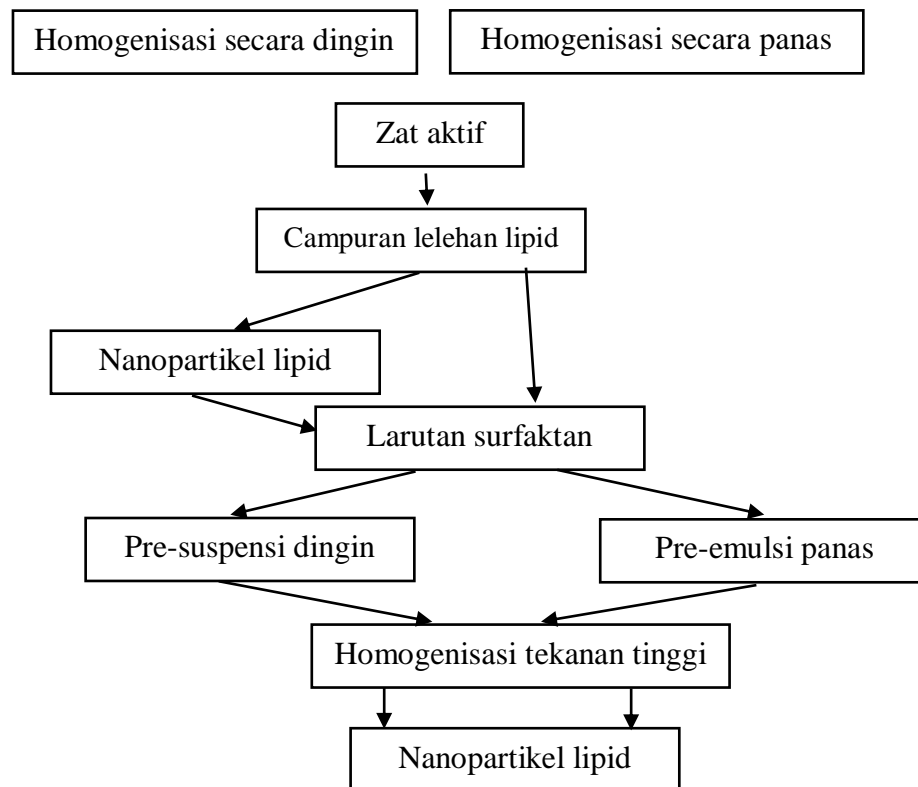
durasi proses lama, adanya potensi pertumbuhan kuman pada fase air karena proses pembuatan yang lama (Müller *et al* 2006; Shegokar dan Müller 2010).

2.2 High Pressure Homogenizer (homogenisasi tekanan tinggi).

Teknik ini merupakan teknik yang pertama kali digunakan untuk membuat SLNs. Berasal dari kata "*homogenize*," yang berarti mendapatkan ukuran kecil dan seragam. Teknik ini memiliki keunggulan diantaranya, pengurangan ukuran partikel yang efektif, tidak menggunakan pelarut organik dan layak untuk produksi skala besar dengan biaya relatif rendah (Yadav *et al.* 2013). Proses pengecilan ukuran partikel dipengaruhi oleh daya dorong dengan tekanan tinggi sekitar 100-2000 bar melalui celah sempit, kavitasi dan tumbukan antar partikel. Teknologi yang sudah dikembangkan menggunakan metode ini adalah Dissocubes[®] (Müller *et al* 2006; Shegokar dan Müller 2010). Teknik ini memiliki 2 metode yakni teknik homogenisasi panas dan teknik homogenisasi dingin:

2.2a Metode Homogenisasi Panas. Homogenisasi panas bertekanan tinggi dilakukan pada suhu yang lebih tinggi daripada titik leleh dari lipid yang diberikan yang dapat membuat fase emulsi dalam sistem. Pre-emulsi lipid diperoleh dengan penggunaan homogenizer *Ultra-Turrax*. Homogenizer ini menggunakan teknologi Rotor-Stator. Kecepatan rotasi optimum Rotor-Stator jatuh dalam kisaran 10-24 m/s. Produk akhir harus berupa tetesan diameter beberapa mikrometer. Obat dilarutkan dalam campuran lipid padat dan cair yang dilelehkan pada suhu 5-10°C diatas titik leleh dari lipid. Larutan surfaktan dengan air panas dilelehkan dengan pengadukan, untuk memperoleh emulsi. Homogenisasi dengan HPH pada suhu yang sama untuk mendapat nanoemulsi panas, kemudian dinginkan sampai suhu kamar untuk mendapatkan SLNs.

2.2b Metode Homogenisasi Dingin. Perbedaan antara HPH dingin dengan panas selain suhu, adalah dalam komposisi campuran lipid yang digunakan. Komposisi lipid yang berbeda, menghasilkan perubahan dalam profil pelepasan zat aktif, yang lebih rendah dalam HPH dingin. Obat harus dilarutkan atau didispersikan dalam sebagian besar lipid dan dalam HPH dingin campuran kemudian didinginkan dengan cepat untuk memastikan distribusi obat yang homogen dalam matriks padat. Metode ini digunakan untuk obat-obat hidrofilik.



Gambar 4. Skema prosedur SLNs homogenisasi secara panas dan dingin
(Pardeike *et al.* 2009)

3. Metode *High shear homogenization and ultrasound* (pengadukan berkecepatan tinggi dan ultrasonikasi)

Metode pengadukan berkecepatan tinggi dan ultrasonikasi merupakan pendispersi yang digunakan untuk pembuatan SLNs. Metode ini mudah ditangani dan paling sering digunakan, pada metode ini leburan lipid didispersikan pada fase air dengan suhu yang sama dengan pengadukan mekanik atau sonikasi (Gowda *et al.* 2016). Keunggulan dari metode ini adalah alat yang digunakan banyak tersedia dalam skala laboratorium. Dua alat yang dapat digunakan pada metode ultrasonikasi, yang pertama yaitu dengan menggunakan alat *probe* sonikator dengan bagian ujungnya sebagai masuknya energi tinggi untuk dispersi lipid tetapi kadang-kadang menyebabkan degradasi lipid karena terlalu panas dari dispersi lipid, yang kedua dengan menggunakan alat sonikator *bath* dengan prinsip kerja cenderung melepaskan partikel logam ke dalam

dispersi, yang harus dihilangkan dengan sentrifugasi sebelum digunakan (Pardeshi *et al.* 2012).

Kekurangan jika menggunakan metode ultrasonikasi yaitu partikel yang terbentuk lebih luas akan membentuk ukuran mikrometer. Tahap yang dapat dilakukan untuk mendapatkan formulasi yang stabil adalah tahap emulsifikasi dengan kecepatan tinggi antara fase lemak dan fase air kemudian dilanjutkan dengan tahap pendinginan dimana emulsi yang terbentuk diaduk dengan kecepatan yang lebih rendah sampai suhu kamar atau didispersikan dalam air dingin (Mukherjee *et al.* 2009). Ukuran dan distribusi dari dispersi lipid dipengaruhi oleh komposisi dan konsentrasi lipid, waktu, kekuatan sonikasi dan suhu (Pardeshi *et al.* 2012).

4. Teknik Mikroemulsi

Teknik yang sangat menarik untuk pembuatan lipid nanopartikel adalah mikroemulsi. Keuntungan dari metode ini untuk mendapatkan nanopartikel tidak diperlukan menggunakan energi. Hal ini dimungkinkan karena tetesan terdispersi dalam fase mikroemulsi (Priano *et al.* 2007). Obat dilarutkan dalam campuran lipid padat dan cair yang dilelehkan pada suhu 5-10°C diatas titik leleh dari lipid. Surfaktan cair ditambahkan pada lipid yang meleleh diaduk pada suhu yang sama. Ketika komponen dicampur dengan rasio yang benar maka terbentuk mikro-emulsi, tambahkan air dingin sedikit demi sedikit dengan pengadukan ringan secara terus menerus hingga terbentuk SLNs. Ukuran partikel yang kecil disebabkan oleh presipitasi dan pengadukan non mekanik.

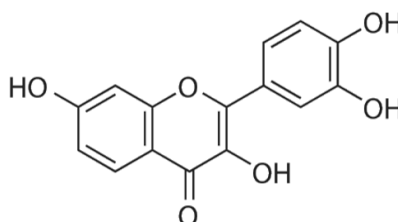
5. Teknik Emulsifikasi (Penguapan Pelarut)

Teknik emulsifikasi memiliki keuntungan dibandingkan metode pembuatan yang lainnya, metode ini pada pembuatannya lebih mudah dan dapat memberikan hasil penjejakan obat yang baik (Yuan *et al.* 2007). Metode ini dilakukan dengan cara melelehkan fase lipid dengan menggunakan perbandingan lipid yang berbeda, serta bahan aktif pada suhu 65°C. Larutan surfaktan disiapkan dan dipanaskan pada suhu 65°C, kemudian didispersikan ke dalam fase lipid panas menggunakan ultra-turax dengan kecepatan 3400 rpm selama 30 menit. Tahap selanjutnya adalah tahap pendinginan, kemudian diaduk

menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 100 rpm hingga mencapai suhu 25°C. SLNs yang telah jadi ditimbang untuk mengetahui berat akhir SLNs (Khurana *et al.* 2013; Yuan *et al.* 2007). Pada teknik emulsifikasi dengan kapasitas pemuatan obat yang lebih tinggi dan ukuran partikel yang lebih kecil, dapat meningkatkan bioavailabilitas potensial (Pardeshi *et al.* 2012).

D. Fisetin

Fisetin-tetrahydroxyflavone (3,7,3',4'1) adalah molekul bioaktif flavonol yang ditemukan dalam bunga, buah-buahan, sayuran dan teh, konsentrasi fisetin tertinggi ditemukan pada *green tea* (539µg/g) diikuti oleh *red tea* (320µg/g), *ceylon tea* (174µg/g) juga terdapat pada stroberi (160µg/g); kesemek (10,6µg/g); akar teratai (5,8µg/g); anggur (3,9µg/g); bawang (4,8µg/g); kiwi (2,0µg/g); dan mentimun (0,1µg/g) dengan asupan rata-rata per hari 0,4 mg (Khan *et al.* 2013; Sundarraj *et al.* 2018).



Gambar 5. Struktur kimia fisetin (Kashyap *et al.* 2017)

Guzzo *et al.* (2006) mengatakan bahwa Fisetin memiliki potensial sebagai obat terapeutik dengan siklodekstrin sebagai sistem pengantarannya. Pada beberapa penelitian fisetin diteliti memiliki kandungan antioksidan yang baik, bisa digunakan sebagai pencegahan dan pengobatan pada kanker dan juga sebagai neuroprotektif.

Ragelle *et al.* (2012) melakukan penelitian untuk menggabungkan fisetin ke dalam *nanoemulsion* untuk meningkatkan farmakokinetik dan terapeutik secara intravena pada tikus menunjukkan peningkatan bioavailabilitas fisetin 24 kali dalam paparan sistemik dibandingkan dengan kontrol fisetinnya.

Fisetin adalah obat golongan BCS kelas II yang praktis tidak larut dalam air, dengan kelarutan 0,002 mg/ml dan absorpsi serta bioavailabilitas yang sangat

rendah yaitu 10%. Fisetin mudah larut dalam etanol, methanol, aseton dan DMF (Dang *et al.* 2014; Yao *et al.* 2013).

E. Studi Preformulasi

1. Apifil

Apifil atau *yellow beeswax* atau yang lebih dikenal dengan nama cera flava dengan rumus molekul $C_{15}H_{31}COOC_{30}H_{61}$, diperoleh secara alami dari lilin lebah terdiri dari 70-75% campuran berbagai ester alkohol monohidrat rantai lurus dengan rantai karbon C_{24} - C_{36} . Apifil digunakan sebagai pengontrol pelepasan obat; *polishing agent*; agen stabilitas; *stiffening agent*. Penggunaannya pada konsentrasi 5-20%, sebagai *stiffening agent* pada salep dan krim. Lilin kuning juga digunakan dalam emulsi karena memungkinkan air untuk dimasukkan ke dalam emulsi air dalam minyak, untuk penggunaan oral lilin kuning digunakan sebagai *polishing agent* untuk tablet berlapis gula (Rowe *et al.* 2009).

2. Polawax

Polawax atau *Cetomacrogol Emulsifying Wax* merupakan lilin pengemulsi nonionic yang digunakan sebagai *emulsifying wax* yang dibuat dari cetostearil alkohol dan mengandung turunan apolioksietilena dari ester asam lemak sorbitan. Fungsi lainnya dapat digunakan sebagai agen pengemulsi, zat pelarut, *stiffening agent*. Polawax adalah pengemulsi efektif yang cocok untuk pembuatan emulsi minyak kosmetik / air.

Konsentrasi 5% lilin digunakan untuk mengubah konsistensi suatu produk, 15% sebagai pengemulsi nonionic digunakan dalam krim, dan 25% dapat digunakan dalam krim contohnya seperti klorheksidin BP. *Nonionic emulsifying wax* merupakan serpihan padat lilin warna putih atau putih pudar yang meleleh saat dipanaskan memiliki bau samar dari setostearil alkohol. Tingkat penggunaan yang disarankan antara 2% - 10% (Rowe *et al.* 2009)

3. Carnauba wax

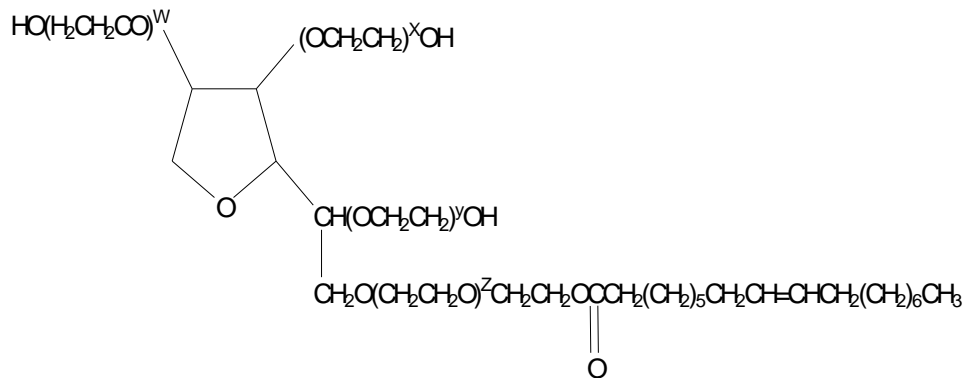
Carnauba wax atau nama lain lilin Brasil; lilin caranda; cera carnauba terdiri dari campuran kompleks ester asam dan asam hidroksi, terutama ester

alifatik, o-hidroksi ester, ester alifatik p-metoksisinamik, dan dioksida hidroksipininamik tersusun atas beberapa rantai panjang, di mana C₂₆ dan C₃₂ yang paling umum adalah alkohol. Berfungsi sebagai penyalut, carnauba digunakan secara luas dalam kosmetik umumnya digunakan dalam pelembab bibir, makanan tertentu, dan formulasi farmasi. Lilin Carnauba berbentuk serpihan atau gumpalan tidak terarur dari lilin keras dan rapuh berwarna coklat muda sampai kuning pucat memiliki bau khas dan tidak memiliki rasa, bebas tengik. Carnauba larut dalam kloroform dan toluen hangat; sedikit larut dalam etanol mendidih (95%) serta praktis tidak larut dalam air. Lilin Carnauba stabil dan harus disimpan dalam wadah tertutup dengan baik, di tempat yang sejuk dan kering (Rowe *et al.* 2009).

4. Tween 80 (*Polysorbate 80*)

Tween 80 atau *Polysorbate 80* adalah ester oleat dari sorbitol dan anhidridanya berkopolimerisasi dengan lebih kurang 20 molekul etilen oksida untuk tiap molekul sorbitol dan anhidrida sorbitol. Tween 80 memiliki rumus kimia C₆₄H₁₂₄O₂₆. Tween 80 memiliki harga HLB sejumlah 15 (Voigt 1995). Tween 80 merupakan cairan seperti minyak, jernih, bewarna kuning muda hingga coklat muda, bau khas lemah, rasa pahit, dan hangat (Anonim 2014). Tween 80 larut dalam air dan etanol, tidak larut dalam minyak mineral (Rowe *et al.* 2009). Tween 80 merupakan surfaktan nonionik hidrofilik yang digunakan sebagai eksipien untuk menstabilkan suspensi dan emulsi. Tween 80 juga digunakan sebagai agen pelarut dan *wetting agent* pada krim, salep, dan *lotion* (Rowe *et al.* 2009).

Tween 80 termasuk ke dalam golongan surfaktan nonionik. Surfaktan nonionik meningkatkan absorpsi dengan menginduksi fluidisasi lipid pada stratum korneum. Dua mekanisme yang menentukan laju penetrasi obat menggunakan surfaktan nonionik. Mula-mula surfaktan berpenetrasi ke dalam area intrasel stratum korneum, meningkatkan fluiditasnya, kemudian melarutkan komponen lipid. Penetrasi surfaktan pada matriks interseluler diikuti dengan interaksi dan ikatan pada filamen keratin sehingga menghasilkan gangguan pada korneosit (Suksaeree *et al.* 2014:4).



Gambar 6. Struktur tween 80 (Salager 2002)

F. Verifikasi Metode Analisis

Verifikasi merupakan konfirmasi melalui penyediaan bukti objektif bahwa persyaratan yang ditentukan telah dipenuhi (ISO/IEC 2005). Verifikasi metode analisis bertujuan untuk memastikan bahwa percobaan laboratorium mampu menerapkan metode analisis dengan baik dan menjamin mutu hasil pengujian. Metode analisis menurut USP diklasifikasikan dalam 3 kategori, yaitu kategori I (penetapan kadar komponen utama), kategori II (penetapan cemaran dalam bahan baku), kategori III (penetapan kinerja dan kualitas sediaan). Parameter uji untuk verifikasi metode hampir sama dengan parameter uji validasi, beberapa parameter verifikasi metode analisis mencakup pengujian linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi dan limit kuantisasi (Harmita 2004). Parameter verifikasi metode analisis minimal yang akan diuji adalah selektivitas seperti uji akurasi dan presisi.

1. Akurasi (Kecermatan)

Akurasi menggambarkan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Berbagai macam kesalahan yang mungkin terjadi meliputi kelembaban, bahan referensi serta metode analisis. Akurasi dapat dinyatakan sebagai persen kembali analit yang ditambahkan sedangkan nilai akurasi dapat dinyatakan dengan persen perolehan kembali (% *recovery*).

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{\text{Kadar hasil analisis}}{\text{Kadar sesungguhnya}} \times 100$$

%.....(1)

2. Presisi (Keseksamaan)

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji dengan cara memperoleh pengukuran dari penyebaran hasil uji jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran homogen. Diukur sebagai simpangan baku atau simpangan relatif (koefisien variasi). Presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Dikatakan seksama jika metode memberikan simpangan baku relatif yaitu ≤ 2 (Han *et al.* 2004).

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{x} \times 100 \% \dots\dots\dots(2)$$

3. Batas deteksi (LOD)

Batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibanding dengan blanko (Harmita 2004).

Batas deteksi penetapan kadar obat ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan membuat lima seri konsentrasi dibawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai *b* (*slope*) pada persamaan regresi linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x). Batas deteksi ditentukan dengan persamaan :

$$\text{LOD} = \frac{3,3 Sy/x}{b} \dots\dots\dots(3)$$

4. Batas kuantitasi (LOQ)

Batas kuantitasi merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama serta dapat dikuantifikasi dengan penentuan kuantitatif senyawa yang terdapat dalam konsentrasi rendah dalam matriks (Harmita 2004). Batas kuantifikasi penetapan kadar obat ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan membuat lima seri konsentrasi dibawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai *b* (*slope*) pada persamaan regresi linear $y = a + bx$, sedangkan

simpangan blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x). Batas deteksi dapat ditentukan dengan persamaan :

$$LOQ = \frac{10 Sy/x}{b} \dots\dots\dots(4)$$

5. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon secara langsung atau dengan matematik, untuk mendapatkan hasil dari variabel data (absorbansi dan kurva kalibrasi) dengan adanya konsentrasi, serta untuk mengetahui kemampuan standar dalam mendeteksi analit (Chan *et al.* 2004).

Penentuan uji linearitas menggunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya dengan rentang 50–100 % dari rentang komponen uji. Parameter yang digunakan untuk mengetahui adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier, yang diharapkan mendekati angka 1 untuk suatu metode analisis yang baik (Harmita 2004). Hasil ini selanjutnya digunakan untuk menentukan linearitas yaitu dengan membandingkan nilai r hitung dengan nilai r tabel pada taraf kepercayaan 95%. Nilai linearitas dikatakan baik dan dapat digunakan untuk menghitung akurasi serta presisi bila r yang diperoleh mendekati 1.

G. Karakterisasi SLNs

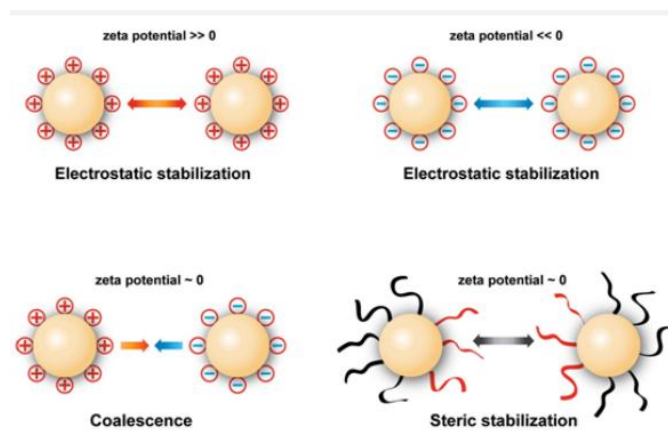
1. Ukuran Partikel

Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas nanopartikel (Singh *et al.* 2009). *Particle Size Analyzer* (PSA) merupakan alat yang digunakan untuk pengukuran partikel. Persyaratan sediaan *solid lipid nanoparticle* adalah partikel mempunyai ukuran 50-1000 nm dan stabil pada periode waktu tertentu (Muller *et al.* 2000).

2. Zeta potensial

Zeta potensial adalah ukuran muatan elektrostatik pada permukaan nanopartikel. Pengukuran potensial zeta dilakukan menggunakan *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments, UK) dalam air konduktivitas ($50 \mu S / cm$, pH 5.5) atau medium semula (fase air suspensi SLNs). Mobilitas elektroforetik diubah menjadi potensial zeta oleh persamaan Helmholtz-Smoluchowski. Pengukuran potensial

zeta dapat dilakukan menggunakan *zeta potensial analyzer* atau zetameter. Potensial zeta memberikan informasi tentang besarnya tolakan elektrostatis atau daya tarik antar partikel dalam suspensi SLNs yang berair. Potensial Zeta merupakan parameter penting dalam prediksi untuk stabilitas jangka panjang dari formulasi. Nilai tinggi potensial zeta (misalnya, lebih dari + 30mV atau kurang dari -30mV) dapat menstabilkan suspensi koloid dengan tolakan listrik, tolakan listrik umumnya menghasilkan lebih sedikit kontak antara partikel dan agregasi yang lebih sedikit. Sebagai contoh sistem koloid yang mengandung stabilisator sterik dapat mengekspresikan stabilitas jangka panjang yang baik bahkan dalam kasus ketika potensi zeta serendah sekitar 0mV (Bagul *et al.* 2018).



Gambar 7. Pengaruh Potensial Zeta pada tolakan/koalesensi partikel (Bagul *et al.* 2018)

3. Entrapment efficiency (EE) atau efisiensi penjerapan

Efisiensi penjerapan (*entrapment efficiency/EE*), kadang disebut efisiensi enkapsulasi berhubungan dengan total jumlah bahan aktif yang ada dalam partikel. Kombinasi teknik analitik dan pemisahan yang tepat (ultrafiltrasi, sentrifugasi dan dialisis) untuk menentukan kuantifikasi bahan aktif yang diperlukan. Efisiensi penjerapan bahan aktif dalam partikel nano lipid biasanya di atas 70, secara umum kelarutan dalam lipid dari obat berkurang ketika lipid cair didinginkan, oleh karena itu perlu untuk menetapkan jumlah obat yang terkait dengan partikel lipid dan jumlah obat terlarut dalam struktur lain dalam dispersi (Aldemar *et al.* 2018).

Entrapment efficiency (EE) dapat dihitung dengan persamaan berikut (Tan 2017):

$$EE = \left(\frac{W_f}{W_t} \right) \times 100\% \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan:

Wt : jumlah obat yang ditambahkan dalam sistem

Wf : jumlah bahan obat yang bebas dalam supernatan

Pengukuran EE dilakukan dengan menggunakan alat kromatografi yaitu spektrofotometri *UV-Visible*. Spektrofotometri *UV-Visible* adalah salah satu teknik yang paling sering digunakan dalam analisis farmasi. Ini melibatkan pengukuran jumlah radiasi ultraviolet atau terlihat diserap oleh zat dalam larutan. Instrumen yang mengukur rasio, atau fungsi rasio, dari intensitas dua berkas cahaya di wilayah *UV-Visible* disebut spektrofotometer *UV-Visible*.

Teknik spektrofotometri merupakan teknik yang sederhana, cepat, cukup spesifik dan digunakan untuk sejumlah kecil senyawa. Hukum dasar yang mengatur analisis spektrofotometri adalah hukum Lambert-Beer. Hukum Beer menyatakan bahwa intensitas sinar radiasi monokromatik paralel menurun secara eksponensial dengan jumlah molekul yang menyerap. Dengan kata lain, absorbansi sebanding dengan konsentrasi. Hukum Lambert menyatakan bahwa intensitas sinar radiasi monokromatik paralel menurun secara eksponensial saat melewati medium ketebalan homogen. Kombinasi dari dua hukum ini menghasilkan hukum Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \dots\dots\dots(6)$$

Keterangan : A = Absorbansi (unit absorbansi / a.u.)

ϵ = Absorptivitas molar ($M^{-1}cm^{-1}$)

b = tebal larutan (cm)

C = konsentrasi larutan (M)

$$\alpha = -\frac{1}{b} \ln \frac{I}{I_0} \dots\dots\dots(7)$$

Dimana α = koefisien absorpsi

b = tebal sampel (cm)

I_0 = intensitas cahaya yang menuju sampel (W/m^2)

I = intensitas cahaya yang keluar dari sampel (W/m^2)

Kuantifikasi zat obat menggunakan spektrofotometer dapat dilakukan dengan menyiapkan larutan dalam pelarut transparan dan mengukur absorbansi pada panjang gelombang yang sesuai. Panjang gelombang yang biasanya dipilih adalah panjang gelombang penyerapan maksimum (λ_{max}), di mana kesalahan kecil dalam pengaturan skala panjang gelombang memiliki sedikit pengaruh pada absorbansi terukur. Idealnya, konsentrasi harus disesuaikan untuk memberikan absorbansi antara 0,2-0,8, di mana akurasi dan ketepatan pengukurannya optimal.

H. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Antioksidan merupakan molekul atau senyawa yang dapat meredam aktivitas radikal bebas dengan mencegah oksidasi sel (Syahrizal 2008). Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat laju oksidasi molekul lain atau menetralkan radikal bebas (Fajriah dkk 2007). Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dibedakan menjadi 3 kelompok yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier. Berdasarkan sumber-sumber antioksidan dibagi menjadi dua kelompok yaitu sintetik dan alami. Metode uji antioksidan menggunakan metode DPPH. DPPH merupakan senyawa radikal bebas stabil kelompok nitrit oksida, senyawa ini memiliki ciri-ciri padatan berwarna ungu kehitaman, larut dalam pelarut etanol atau methanol (Prakash 2001). Metode ini merupakan metode uji aktivitas antioksidan yang sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya menggunakan sedikit sampel.

Aktivitas antioksidan pada metode DPPH dinyatakan dengan IC_{50} (*Inhibition Concentration*) dimana IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel (ppm) yang mampu menghambat aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidan. Jika nilai IC_{50} suatu senyawa <50 ppm dikategorikan sangat kuat, IC_{50} nilai 50-100 ppm dikategorikan kuat, IC_{50} dengan nilai 100-150 ppm dikatakan sedang, dan dikatakan lemah jika nilai IC_{50} adalah 151-200 ppm (Blois 1958).

Penentuan nilai persen inhibisi (% inhibisi) dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut : (Ghosal & Mandal 2012)

$$\% \text{ inhibisi radikal DPPH} = \frac{\text{absorban kontrol} - \text{absorban bahan uji}}{\text{absorban kontrol}} \times 100\%$$

.....(8)

I. Landasan Teori

Fisetin termasuk dalam golongan obat BCS kelas II, dimana permeabilitasnya tinggi dan kelarutan yang rendah (Sinko 2006). Kelarutan yang rendah dapat mempengaruhi bioavailabilitas obat tersebut. *Solid lipid carrier* merupakan teknologi formulasi terbaru yang berperan sebagai sistem penghantar obat-obat yang memiliki bioavailabilitas rendah. Keuntungan sistem penghantaran ini dapat menyimpan lebih banyak obat dan menurunkan resiko kebocoran dibandingkan dengan sistem penghantaran obat pendahulunya, meningkatkan oklusi dan hidrasi pada kulit serta memiliki stabilitas fisik yang lebih baik. Lipid golongan wax (apifil, polawax, carnauba wax) merupakan lipid sederhana yaitu senyawa ester yang dibentuk oleh alkohol berantai panjang dan asam lemak berantai panjang. Penelitian mengenai lipid golongan wax yang dibuat dalam sistem SLNs terhadap zat aktif antioksidan menghasilkan pemuatan obat yang tinggi dan stabilitas yang baik (Yuan 2018) serta efisiensi penyerapan yang tinggi yaitu 96,5% untuk lipid *beeswax* dan *carnauba wax* (Kheradmandnia 2010).

Metode preparasi yang dipilih menggunakan metode ultrasonikasi, dilakukan dengan menggunakan pengadukan berkecepatan tinggi atau ultrasonikasi. Metode ini mudah ditangani dan paling sering digunakan, pada metode ini leburan lipid didispersikan pada fase air dengan suhu yang sama dengan pengadukan mekanik atau sonikasi (Singhal *et al.* 2011). Fisetin yang dibentuk SLNs diharapkan dapat memiliki bentuk ukuran yang kecil dengan luas area permukaan besar, memberikan efek oklusif, *loading* obat yang tinggi, interaksi fase di antarmuka serta potensinya untuk meningkatkan kinerja farmasetik dari sifat padatnya. Evaluasi karakterisasi sistem SLNs fisetin meliputi ukuran partikel, morfologi partikel, potensial zeta, stabilitas dalam penyimpanan, *loading capacity* dan *entraptment efficiency*.

Particle Size Analyzer (PSA) digunakan sebagai pengukuran partikel. Menurut Muller *et al.* (2000) syarat parameter ini adalah partikel mempunyai ukuran 50-1000 nm dan stabil pada periode waktu tertentu (Muller *et al.* 2000). Potensial zeta diukur dengan menggunakan alat *zetalyzer*. Potensial zeta mempunyai aplikasi praktis dalam stabilitas sistem yang mengandung partikel-partikel terdispersi, karena potensial ini mengatur derajat tolak-menolak antara partikel-partikel terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan (Sinko 2012). Besarnya potensial zeta dapat menstabilkan suspensi koloid dengan tolakan listrik, tolakan listrik umumnya menghasilkan lebih sedikit kontak antara partikel dan agregasi yang lebih sedikit. Derajat stabilitas tinggi pada nanopartikel jika nilai potensial zeta lebih besar dari +30 mV atau kurang dari -30 mV. Dispersi dengan nilai potensial zeta rendah akan menghasilkan agregat karena atraksi *Van Der Waals* antar-partikel (Bagul *et al.* 2012). Ukuran partikel yang kurang dari 100 nanometer akan meningkatkan kelarutan obat sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas obat dalam tubuh. Ukuran partikel dapat mempengaruhi efisiensi distribusi obat dalam tubuh karena dengan berkurangnya ukuran partikel maka akan meningkatkan luas permukaan partikel. Berkurangnya ukuran partikel juga meningkatkan disolusi dan kejenuhan larutan yang berhubungan dengan peningkatan kinerja obat secara *in vivo* (Rachmawati 2007).

J. Hipotesis

1. *Solid lipid nanoparticle* fisetin dapat diformulasi menggunakan lipid golongan wax dengan metode ultrasonikasi.
2. *Solid lipid nanoparticle* fisetin memiliki ukuran partikel nanometer, efisiensi penyerapan yang tinggi, zeta potensial yang besar serta stabil selama proses penyimpanan.
3. *Solid lipid nanoparticle* fisetin memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.