

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi adalah keseluruhan unit dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi dalam penelitian ini adalah mirisetin yang diformulasi menjadi *Solid Lipid Nanokristal* (SLN).

##### **2. Sampel**

Sampel adalah sebagian dari populasi yang ingin diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan ciri-ciri dan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel dalam penelitian ini adalah sejumlah SLN mirisetin yang dibuat dengan berbagai konsentrasi dari lipid padat golongan gliseride yaitu GMS, compritol, dan presiol.

#### **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 SLN mirisetin yang dibuat dengan lipid padat dan surfaktan yang berbeda, konsentrasi lipid padat yang berbeda, dan karakterisasi SLN dengan berbagai macam pengujian.

##### **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, konsentrasi lipid padat yaitu GMS, compritol, dan presiol yang berbeda, serta karakterisasi SLN dengan berbagai macam pengujian.

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian ini yaitu karakterisasi SLN mirisetin yaitu ukuran

partikel, zeta potensial, stabilitas dalam penyimpanan dan efisiensi penjerapan serta uji DPPH.

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. Variabel terkontrol dari penelitian ini yaitu metode *emulsifikasi*, kecepatan *magnetic stirrer* dan suhu.

### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

Zat aktif mirisetin dengan proporsi surfaktan (tween 80) dan lipid padat golongan gliseride (GMS, presirol, dan compritol).

Ukuran partikel pada SLN adalah berkisar antara 50-1000 nm. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari SLN. 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.

Efisiensi penjerapan dilakukan untuk mengetahui berapa persen zat aktif yang terjebak dalam partikel lipid. Zat aktif yang lipofilik memiliki nilai EE antara 90-98%.

Formula SLN untuk mengetahui stabilitas selama penyimpanan diamati secara visual dan disimpan pada suhu kamar.

## **C. Bahan dan alat**

### **1. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mirisetin (Tocris a biotechne brand, China), tween 80, GMS (PT. Bratachem, Indonesia), presirol, compritol (PT. Gattefosse, Prancis), aqua demineral, etanol P.A, DPPH.

### **2. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat uji ukuran partikel dan zeta potensial (Beckman Coulter Delsa<sup>®</sup> Nano C, USA), *magnetic stirrer*, *hotplate stirrer* (Thermo Scientific, China), *sentrifuge* (SPLC Series, Gemmy 8 Hole, Taiwan), pH meter (Eutech Instruments, Ecoscan hand-held series, Singapura),

Spektrofotometer *UV-Vis* (Genesys 10s, Thermo scientific), timbangan analitik (Ohaus), alat-alat gelas alat (Pyrex, Jepang) dan non gelas yang terdapat di laboratorium.

#### D. Jalannya Penelitian

##### 1. Percobaan Pendahuluan

Percobaan pendahuluan digunakan 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*. Percobaan pendahuluan yang dilakukan adalah memakai lipid padat golongan gliseride (GMS, presirol, compritol) dengan konsentrasi yang bervariasi.

##### 2. *Screening lipid SLN mirisetin dengan Metode Emulsifikasi*

Tabel 2. *Screening lipid SLN mirisetin.*

		Konsentrasi (mg)								
Lipid Padat	GMS	2%	4%	6%	-	-	-	-	-	-
	Compritol	-	-	-	2%	4%	6%	-	-	-
	Presirol	-	-	-	-	-	-	2%	4%	6%
Surfaktan	Tween 80	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
Aquadest Ad		50	50	50	50	50	50	50	50	50
		ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml

Pembuatan SLN mirisetin diawali dengan melelehkan lipid padat (GMS, compritol, presirol) pada *hotplate* dalam beaker glass dengan suhu 125°C. Tambahkan tween 80 sebanyak 10 gr dan aquademineralisata yang telah dipanaskan pada suhu 100°C, kemudian diaduk dengan *hot plate magnetik stirrer* dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam. Selanjutnya dinginkan dengan cara menurunkan suhu pada *hot plate magnetik stirrer* sampai suhu 25°C. Hasil formula kemudian diamati kestabilan dan kekentalannya.

##### 3. Pembuatan Kurva Kalibrasi

**3.1 Pembuatan larutan induk.** Standar mirisetin ditimbang sebanyak 5 mg tetapi yang masuk labu takar sebanyak 4,7 mg masukan dalam labu takar 100 ml, dan ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas (konsentrasi 47 ppm) (El-Gawad *et al.* 2014).

**3.2 Penetapan panjang gelombang maksimum.** Larutan induk dibaca dengan **spektrofotometer UV-Vis** pada panjang gelombang 200-400 nm. Nilai serapan paling tinggi dari hasil *scan-wavelength* menunjukkan panjang gelombang maksimum.

**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.** Diambil dari larutan induk sebanyak 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; dan 4 ml masing-masing ditambahkan etanol *p.a* dalam labu takar 10 ml sehingga didapatkan seri konsentrasi 2,35; 4,7; 9,4; 11,75; 14,1; 16,4; dan 18,8 ppm. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum mirisetin, kemudian dibuat kurva regresi linear antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi mirisetin sehingga diperoleh persamaan regresi linear yang selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar mirisetin.

#### **4. Validasi Metode Analisis**

**4.1 Linearitas (*Linearity*).** Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan induk mirisetin dalam pelarut etanol *p.a* yaitu 2,35; 4,7; 9,4; 11,75; 14,1; 16,45; dan 18,8 ppm pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat persamaan garis regresi linier dan ditentukan koefisien korelasi (nilai *r*). Hasil 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* hitung > *r* tabel.

**4.2 Studi pemulihan akurasi.** Metode untuk sampel obat yang diketahui jumlah mirisetin sesuai dengan 80, 100, 120% di mana konsentrasi yang dipilih yaitu 4,7; 9,4; dan 11,75 ppm dengan pengukuran menggunakan panjang gelombang yang sudah dicari, pengulangan sebanyak 3 kali dan didapatkan hasil data recovery.

**4.3 Presisi.** 10 larutan yang berbeda dengan konsentrasi yang sama yaitu 9,4 ppm disusun, dianalisis dan hasil absorbansi dicatat untuk menentukan koefisiensi korelasi.

**4.4 Penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan batas kuantifikasi (LOQ).** Batas deteksi dan batas kuantifikasi penetapan mirisetin 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 ( $Sy/x$ ).

## 5. Pembuatan SLN Mirisetin

Formula lipid yang dipilih dari tahap *screening* selanjutnya digunakan untuk membuat SLN mirisetin. Lipid padat dan konsentrasi yang dipilih dilelehkan pada hotplate dalam beaker glass pada suhu 125°C, kemudian tambahkan tween 80 dan aquademineralisata yang telah dipanaskan pada suhu 100°C, kemudian diaduk dengan *hotplet magnetic stirrer* dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam. Suhu selanjutnya di turunkan pertahap. Timbang mirisetin kemudian dilarutkan dengan etanol *p.a* secukupnya masukkan kedalam campuran lipid saat suhu 35°C sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Hasil dimasukkan botol dan disimpan pada suhu kamar.

## 6. Karakterisasi SLN Mirisetin

**6.1 Karakterisasi Mirisetin Nanoemulsi.** Penetapan distribusi & ukuran nanopartikel menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA). Aquades dimasukkan dalam fluid tank tetes demi tetes hingga konsentrasi mencukupi, kemudian sampel dimasukkan selanjutnya didapatkan ukuran partikel melalui grafik.

**6.2 Efisiensi Penjerapan (EE).** Sampel SLN diambil 200 mg kemudian di larutkan dengan etanol *p.a* 10 ml, selanjutnya disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 4.000 rpm. Hal ini dilakukan untuk memisahkan fase lipid dengan air. Supernatan kemudian diambil dan dicek pada spektrofotometri *UV-Vis*. Selanjutnya dihitung persentasenya.

**6.3 Uji Stabilitas SLN Mirisetin Dalam Penyimpanan.** Pengamatan dilakukan secara visual dan dengan mengukur zeta potensial . Formula SLN mirisetin yang sudah diketahui menghasilkan ukuran partikel terkecil di uji stabilitasnya pada suhu kamar selama 2 minggu dan diamati setiap minggu.

## **6.4 Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH.**

**6.4.1 Pembuatan larutan DPPH.** Serbuk DPPH sebanyak 16 mg ditimbang dan dilarutkan ke dalam etanol *p.a* hingga 100 ml, diperoleh konsentrasi larutan DPPH 160 ppm. Larutan kemudian ditutup dengan aluminium foil dan selalu dibuat baru.

**6.4.2 Pembuatan larutan mirisetin.** Sebanyak 50 mg serbuk mirisetin ditimbang tetapi yang masuk labu takar 49,7 mg kemudian dilarutkan ke dalam etanol *p.a* hingga 100 ml (konsentrasi 497 ppm). Larutan dibuat seri konsentrasi dengan dipipet sebanyak 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; dan 0,3 ml dan masing-masing ditambahkan etanol hingga 10 ml, sehingga didapat konsentrasi yaitu 0,97; 1,94; 3,88; 7,77; dan 15,53 ppm.

**6.4.3 Pembuatan larutan uji. Pembuatan larutan induk dari formula 400 ppm dengan** diambil 5 ml dan dilarutkan dalam etanol *p.a* hingga 10 ml. Larutan induk dibuat seri konsentrasi dengan dipipet sebanyak 0,16; 0,3; 0,6; 1,25; dan 2,5 ml masing-masing ditambahkan etanol *p.a* hingga 10 ml, sehingga didapatkan konsentrasi 3,13; 6,25; 12,5; 25; dan 50 ppm.

**6.4.4 Penentuan panjang gelombang dan *operating time*.** Penentuan panjang gelombang dengan mengambil 1 ml DPPH tambahkan 4 ml etanol dengan rentang panjang gelombang 400-600. *Operating time* ditentukan dengan lama 60 menit.

**6.4.5 Pengukuran absorbansi larutan mirisetin.** Larutan DPPH sebanyak 1 ml dimasukkan dalam vial dan ditambahkan 1 ml larutan mirisetin pada berbagai konsentrasi kemudian ditambahkan dengan etanol *p.a* sebanyak 3 ml. Larutan didiamkan selama OT, setelah OT larutan dibaca serapannya. Hitung nilai  $IC_{50}$ .

**6.4.6 Pengukuran absorbansi larutan uji.** Larutan DPPH sebanyak 1 ml dimasukkan dalam vial dan ditambahkan 1 ml larutan uji pada berbagai konsentrasi kemudian ditambahkan dengan etanol *p.a* sebanyak 3 ml. Larutan didiamkan selama OT, setelah OT larutan dibaca serapannya. Setelah didapat absorbansi dari larutan mirisetin dan uji selanjutnya dihitung nilai  $IC_{50}$ .

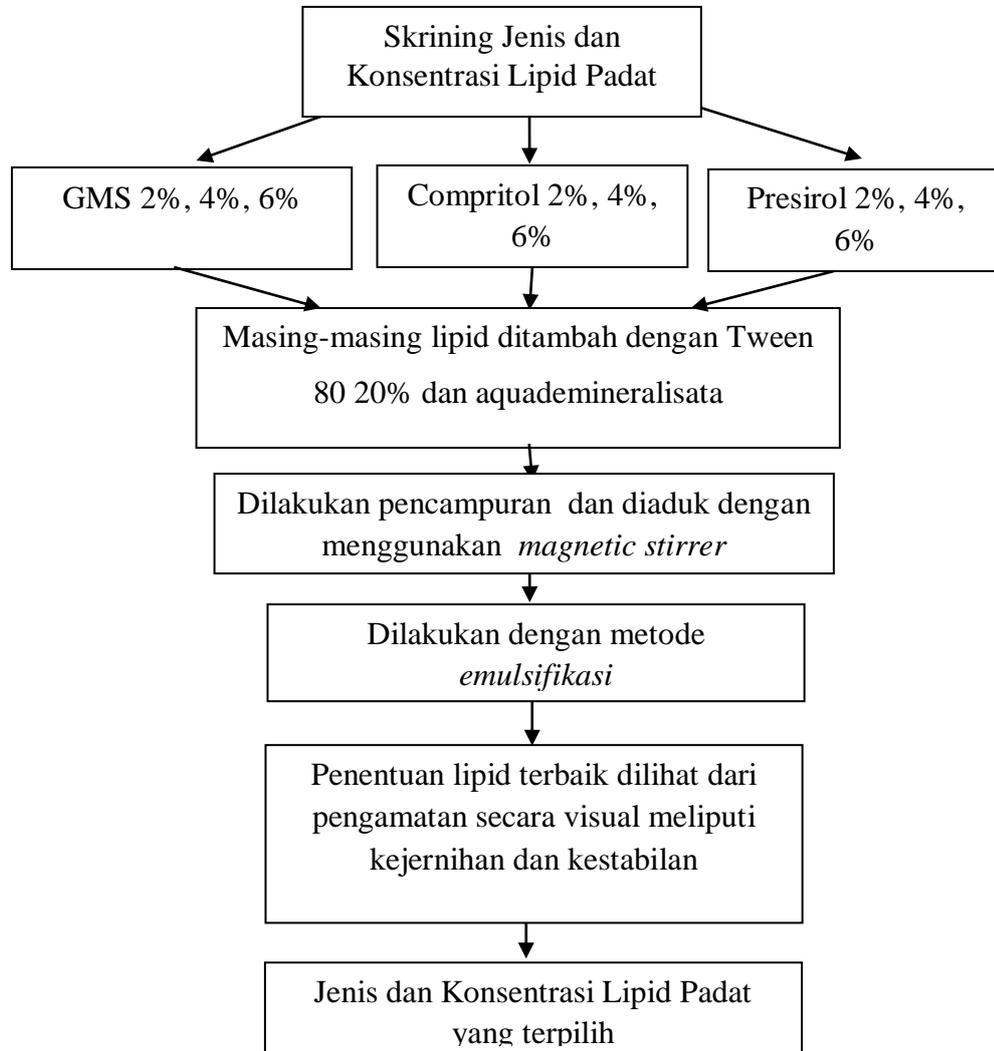
### **E. Analisis Hasil**

Analisis hasil digunakan 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 SLN mirisetin, misalnya mengacukan data hasil pengujian dengan referensi secara teori yang ada, dengan itu hasil penelitian dengan referensi teori tersebut dibandingkan satu sama lainnya. Pengacuan terhadap referensi teori digunakan untuk menghindari adanya kesalahan dalam penelitian.

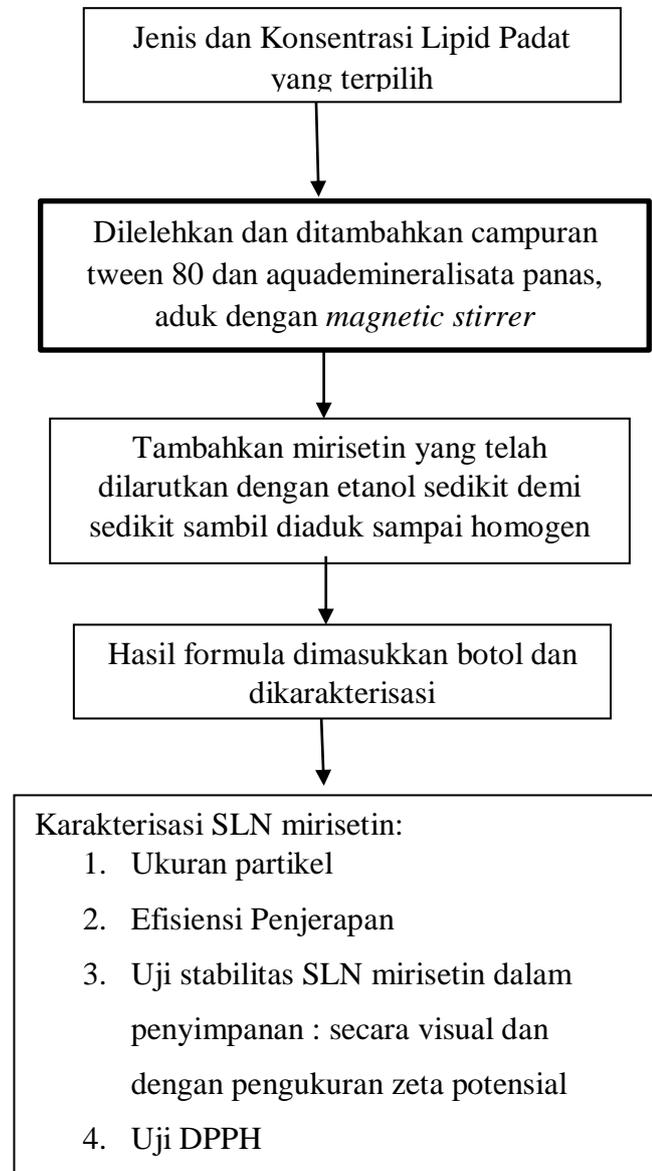
## F. Skema Jalannya Penelitian

### 1. Skema skrining lipid padat



Gambar 6. Skema 1 skrining lipid

## 2. Skema pembuatan SLN dan karakterisasi mirisetin



Gambar 7. Skema 2 pembuatan dan karakterisasi SLN mirisetin