

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Percobaan Pendahuluan

Pembuatan *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN) dilakukan dengan menggunakan metode emulsifikasi, dan mendapatkan hasil sediaan SLN yang homogen dan mempunyai ukuran partikel yang kecil. Dilakukan percobaan pendahuluan pada awal penelitian yang bertujuan untuk menentukan lipid terbaik untuk digunakan dalam formula SLN mirisetin. Percobaan pendahuluan ini dilakukan dengan membuat basis SLN terlebih dahulu, kemudian diamati secara visual berupa stabilitas fisik ada tidaknya endapan.

Percobaan ini, dilakukan dengan menggunakan tiga lipid yaitu gliseril monostearat, presirol dan compritol. Lipid tersebut kemudian dibuat menjadi basis SLN dan selanjutnya didiamkan, dan dilihat ada yang memisah atau tidak dan dilihat kekentalannya. Basis lipid dengan masing-masing konsentrasi yaitu 2%, 4% dan 6% yang ditambahkan dengan surfaktan tween 80 untuk penstabilnya, didapatkan hasil lipid yang terpilih yaitu lipid gliseril monostearat 2% dan presirol konsentrasi 2%, 4%, 6% karena basis lipid tersebut lebih cair dan tidak mudah mengendap atau memisah.

**Tabel 3. Hasil skrining lipid**

<b>Formula</b>	<b>Endapan</b>
<b>Formula 1</b>	Tidak Ada
<b>Formula 2</b>	Ada
<b>Formula 3</b>	Ada
<b>Formula 4</b>	Ada
<b>Formula 5</b>	Ada
<b>Formula 6</b>	Ada
<b>Formula 7</b>	Tidak Ada
<b>Formula 8</b>	Tidak Ada
<b>Formula 9</b>	Tidak Ada

\*keterangan : formula 1 GMS 2%, formula 2 GMS 4%, formula 3 GMS 6%, formula 4 presirol 2%, formula 5 presirol 4%, formula 6 presirol 6%, formula 7 compritol 2%, formula 8 compritol 4%, formula 9 compritol 6%.

## B. Kurva Kalibrasi dan Verifikasi Metode Analisis

### 1. Pembuatan kurva kalibrasi

**1.1 Penentuan panjang gelombang maksimum.** Panjang gelombang maksimum dari serbuk mirisetin dilakukan dengan *scanning* larutan mirisetin dengan konsentrasi 10 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum diperoleh pada panjang gelombang 364 nm dengan serapan sebesar 0,5917. Data dapat dilihat pada lampiran 6 a.

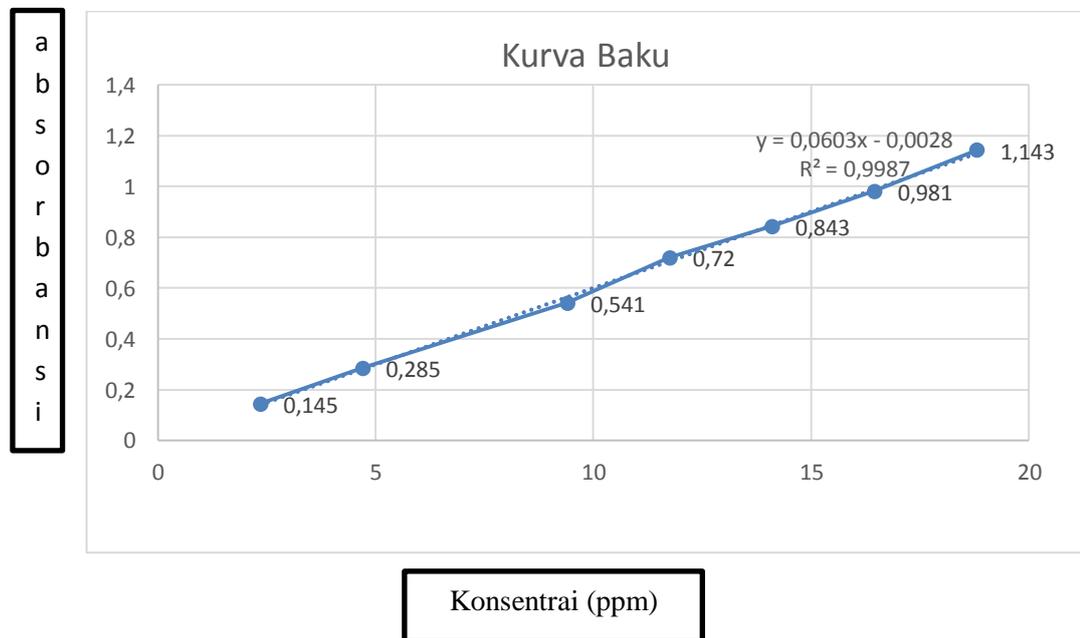
**1.2 Penentuan operating time.** Penentuan *operating time* bertujuan untuk melihat kestabilan reaksi suatu senyawa yang dianalisis. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk mirisetin pada panjang gelombang maksimum mirisetin, dibaca mulai dari menit 0 sampai menit didapatkan nilai serapan yang stabil. Pada lampiran, didapatkan serapan yang stabil pada menit ke-4 sampai menit ke-11.

**1.3 Kurva kalibrasi.** Kurva kalibrasi mirisetin dibuat dengan konsentrasi 2,35 ppm, 4,7 ppm, 9,4 ppm, 11,75 ppm, dan 14,1 ppm, 16,45 ppm, dan 18,8 ppm. Larutan seri konsentrasi tersebut 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*. Hasil persamaan regresi linear yang diperoleh yaitu  $y = -0,00280 + 0,06032x$ , dimana nilai koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,99935. Persamaan regresi linear yang diperoleh telah memenuhi standar parameter linearitas yaitu memiliki nilai koefisien korelasi mendekati 1 (Miller 1993). Hasil penentuan kurva baku dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil penentuan kurva baku mirisetin**

Kadar (ppm)	Absorbansi
2,35	0,145
4,7	0,285
9,4	0,541
11,75	0,72
14,1	0,843
16,45	0,981
18,8	1,143

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



**Gambar 8. Grafik hubungan antara konsentrasi mirisetin dengan absorbansi**

**1.4 Verifikasi metode analisis.** Verifikasi metode analisis yang dilakukan yaitu penentuan linieritas, presisi, akurasi, penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan batas kuantifikasi (LOQ).

**1.4.1 Linieritas.** Hasil dari linieritas didapatkan persamaan regresi linier antara konsentrasi (ppm) dan serapan diperoleh:

$$a = -0,00280$$

$$b = 0,06032$$

$$r = 0,99935$$

$$y = -0,00280 + 0,06032x$$

Nilai  $r$  yang didapatkan yaitu 0,99935 yang berdasarkan teori nilai  $r$  semakin mendekati 1 maka akan semakin baik. Sehingga nilai  $r$  yang diperoleh ini dapat disimpulkan baik.

**1.4.2 Akurasi.** Merupakan ketepatan metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konversi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Persen akurasi ditetapkan dengan menentukan beberapa persen analit yang ditambahkan yang dapat ditemukan (Harmita, 2004). Penetapan akurasi peneliti menggunakan tiga macam konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Berdasarkan hasil yang diperoleh, nilai *recovery* mirisetin dalam etanol sebesar 100,3%. Nilai *recovery* yang diperoleh pada rentang % *recovery* berdasarkan *Association of Official Analytical Chemists* (2002) yaitu antara 85-115% (kadar 10-100 ppm) dan berdasarkan Gandjar dan Rohman (2012) yaitu antara 98-102 %, sehingga metode yang digunakan memiliki akurasi yang baik.

**1.4.3 Presisi.** Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif (RSD) dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik (Gandjar & Rohman 2007). Hasil perhitungan nilai RSD untuk validasi metode analisis kurva kalibrasi mirisetin dalam etanol sebesar 0,52% , nilai tersebut menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan memiliki presisi yang baik karena nilai yang didapat  $\leq 2$  (Harvey, 2000).

**1.4.4 LOD dan LOQ.** Batas deteksi (LOD) didefinisikan sebagai konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi namun tidak perlu secara kuantitatif, sedangkan definisi LOQ dikatakan sebagai konsentrasi terkecil analit yang dapat diukur secara kuantitatif (Harvey, 2000).

Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dilakukan dengan metode perhitungan berdasarkan standar deviasi respon dan kemiringan (*slope*) kurva baku. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blangko pada standar deviasi residual garis *regresi linier* atau standar deviasi intersep- $y$  pada garis regresi. Batas deteksi didefinisikan sebagai

konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi (Gandjar & Rahman 2012). Hasil perhitungan penentuan batas deteksi (LOD) yaitu sebesar 0,782746  $\mu\text{g/ml}$  dan batas kuantifikasi (LOQ) yaitu sebesar 2,371959  $\mu\text{g/ml}$ .

### C. Pembuatan Emulsi SLN Mirisetin

Tabel 4. Formula lipid yang terpilih.

		Konsentrasi (mg)			
Formula		1	7	8	9
Zat aktif	Mirisetin	20 mg	20 mg	20 mg	20 mg
Lipid padat	GMS	2%	-	-	
	Presirol	-	2%	4%	6%
Surfaktan	Tween 80	20%	20%	20%	20%
Aquadest	Ad	50 ml	50 ml	50ml	50 ml

Basis SLN mirisetin telah berhasil dibuat dengan menggunakan metode emulsifikasi. Metode ini dilakukan pada keadaan panas, lemak padat dilelehkan pada suhu tertentu bersamaan dengan surfaktan dan aquadem dicampur pada keadaan panas. Selanjutnya dicampur menjadi satu dengan *magnetic stirrer* pada kecepatan 200 rpm kemudian ditambahkan mirisetin yang telah dilarutkan dengan etanol sedikit demi sedikit dan diaduk selama 1 jam agar terdistribusi secara merata. Surfaktan yang terdapat dalam campuran akan menstabilkan SLN yang terbentuk sehingga partikel tidak beraglomerasi menjadi partikel yang lebih besar.

Mirisetin didispersikan didalam fase lemak membentuk emulsi air dalam minyak (a/m), kemudian ditambahkan fase air dan tween 80 sebanyak 20% yang didispersikan dalam 50 ml aquadem mineralisata untuk membentuk emulsi a/m/a dengan globul yang lebih kecil. Emulsi SLN mirisetin yang terbentuk berupa larutan koloid berwarna 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).

## D. Karakterisasi *Solid Lipid Nanopartikel (SLN)* mirisetin.

### 1. Ukuran Partikel

Sistem nanopartikel memiliki karakteristik yang paling penting yaitu ukuran partikel. Alat yang digunakan untuk mengukur ukuran partikel *Solid Lipid Nanoparticles (SLN)* mirisetin yaitu PSA (*Particle Size Analyzer*). Ukuran partikel dan kestabilan emulsi SLN yang dihasilkan dapat dipengaruhi dari penggunaan surfaktan. Penggunaan surfaktan untuk menyelimuti sistem SLN dari agregasi dan penggabungan ukuran partikel.

Tabel 5. Ukuran partikel.

Formula	ukuran partikel (nm)	indeks polidispersitas (PI)
Formula 1	1278	0,173
Formula 7	634,2	0,163
Formula 8	1480	0,392
Formula 9	489,8	0,885

\*keterangan : formula 1 GMS 2%, formula 7 presirol 2%, formula 8 presirol 4%, formula 9 presirol 6%.

Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat bahwa formula 7 yang menghasilkan ukuran partikel yang memasuki range ukuran nanopartikel 50-1000 nm. Dilihat dari urutan ukuran partikel dari yang terkecil yaitu pada formula 9, 7, 1, dan 8. Formula 1 memiliki ukuran partikel yang melebihi range ukuran nanopartikel karena lipid tersebut memiliki kristal alfa yang mudah meleleh dan memadat sehingga mudah terjadi *aglomerasi*.

Sedangkan pada formula 8 dengan ukuran partikel 1480 nm tidak masuk range ukuran nanopartikel dibandingkan dengan formula 7 dan 8 yang sama-sama menggunakan lipid yang sama, hal ini dapat disebabkan karena pengaruh dari konsentrasi lipid, semakin banyak konsentrasi lipid maka ukuran partikel akan semakin besar (Freitas dan Muller, 1999).

Sedangkan formula 9 memiliki ukuran partikel lebih kecil dari pada formula 9 tetapi dilihat dari PI nya formula 9 lebih besar dari pada formula 8 sehingga dapat terjadi flokulasi dengan cepat. Formula 8 memiliki PI lebih kecil yang artinya lebih homogen sehingga tidak mudah terjadinya flokulasi atau lebih stabil (Fan *et al.* 2011)

Keseragaman ukuran partikel dapat diketahui dari nilai indeks polidispersitas, Indeks polidispersitas merupakan ukuran lebarnya distribusi

ukuran partikel. Distribusi ukuran partikel dinyatakan sebagai monodispersi jika PI berada pada rentang 0,01-0,7 (Fan *et al.* 2012). Terlihat pada sampel F1, F7, dan F8 nilai Indeks polidispersitas yang dihasilkan masuk dalam rentang secara teoritis, ini menunjukkan bahwa emulsi SLN mirisetin yang terbentuk pada sampel tersebut merupakan dispersi yang cukup homogen. Indeks polidispersitas lebih dari 0,7 menunjukkan distribusi yang sangat luas dari ukuran partikel dan sangat polidispersi serta memungkinkan terjadi sedimentasi (Fan *et al.* 2012).

## 2. Uji stabilitas SLN mirisetin dalam penyimpanan

**2.1 Pengamatan secara visual.** SLN mirisetin disimpan pada suhu ruang selama 2 minggu. Setelah 2 minggu pengamatan dalam suhu kamar, SLN yang disimpan tidak timbul endapan sehingga SLN tersebut dikatakan stabil.

**Tabel 6. Stabilitas SLN mirisetin pada suhu ruang**

<b>Formula</b>	<b>Minggu</b>	<b>Endapan</b>
Formula 1	I	Tidak Ada
	II	Tidak Ada
Formula 7	I	Tidak Ada
	II	Tidak Ada
Formula 8	I	Tidak Ada
	II	Tidak Ada
Formula 9	I	Tidak Ada
	II	Tidak Ada

\*keterangan : formula 1 GMS 2%, formula 7 presirol 2%, formula 8 presirol 4%, formula 9 presirol 6%.

**2.2 Zeta potensial.** Potensial zeta digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. 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 elektrostatik antara partikel akan menentukan kecenderungan agregasi dan fenomena tolak-menolak.

Nanopartikel dengan nilai potensial zeta dengan nilai lebih besar dari +25 mV atau kurang dari -25 mV biasanya memiliki derajat stabilitas tinggi (Ronson 2012). Hasil pengukuran potensial zeta pada formula 7 setelah penyimpanan adalah -14,1 yang artinya formula tersebut kurang stabil. Dari 4 formula tersebut di pilih satu formula untuk di lakukan pengukuran zeta potensial dan dipilih

formula 7 karena dari ke-4 formula memiliki ukuran partikel dibawah 1000 nm dan memiliki PI yang bagus yaitu 0,163. Dari hasil pengukuran zeta potensial yang diperoleh menunjukkan sifat yang kurang stabil. Muatan partikel menunjukkan zeta potensial yang negatif, sebagian besar partikel yang terdispersi dalam air mendapatkan muatan negatif karena cenderung mengadsorpsi ion hidroksil (Sinko 2006).

### 3. Efisiensi penjerapan

Pengujian efisiensi penjerapan mirisetin dilakukan untuk menentukan jumlah mirisetin yang terjerap dalam SLN. Sistem penghantaran obat harus memiliki kapasitas pemuatan obat yang tinggi dan tahan lama. Kapasitas pemuatan obat (efisiensi penjerapan) biasanya dinyatakan dalam persen obat yang terjerap dalam fase lemak terhadap obat yang ditambahkan (Parhi & Suresh 2010).

Pengujian efisiensi penjerapan mirisetin dilakukan dengan melarutkan sejumlah SLN mirisetin kedalam etanol. Analisis dilakukan menggunakan spektrofotometri UV pada panjang gelombang maksimum mirisetin yang telah dideteksi yaitu pada lamda 364 nm.

**Tabel 7. Efisiensi penjerapan**

<b>Formula</b>	<b>Efisiensi Penjerapan (%)</b>
1	26,7
7	30,7
8	32,6
9	33,5

\*keterangan : formula 1 GMS 2%, formula 7 presirol 2%, formula 8 presirol 4%, formula 9 presirol 6%.

Hasil efisiensi penjerapan formula (7, 8, 9) dengan lipid 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 presirol akan memberikan lebih banyak tempat bagi zat aktif untuk terinkorporasi dalam SLN (Qingzhi Li 2009). Pada formula 1 dan 7 hasil penjerapan didapatkan berbeda meskipun jumlah lipid yang digunakan sama disebabkan karena lipid yang berbeda, sehingga kemampuan penjerapannya pun berbeda juga. Hal ini dipengaruhi oleh kelarutan

zat aktif dalam lipid. Zat aktif yang memiliki kelarutan kecil pada lipid akan menyebabkan efisiensi penyerapan yang kecil, dan sebaliknya jika zat aktif larut dalam lipid maka efisiensi penyerapan akan besar (Jafar *et al.* 2019).

Tujuan dilakukannya evaluasi efisiensi penyerapan zat aktif di dalam SLN adalah untuk mengetahui kemampuan lipid dalam menyerap zat aktif dan mengetahui efisiensi dari metode yang digunakan. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa presiol dapat menyerap mirisetin cukup besar dibandingkan dengan GMS karena kelarutan mirisetin dalam presiol cukup besar. Tetapi menurut Souto & Muller (2007) efisiensi penyerapan dikatakan bagus dengan persentase diatas 80%, sedangkan hasil penelitian dari ke-4 formulasi nilai efisiensi penyerapan dibawah 80%, maka menunjukkan bahwa efisiensi penyerapannya kurang. 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).

#### **4. Uji DPPH**

**4.1 Panjang gelombang maksimum DPPH.** Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk menentukan panjang gelombang pada saat senyawa yang ingin diukur memberikan absorbansi yang paling optimum. Senyawa yang memberikan absorbansi paling optimum, maka pengukuran akan memiliki sensitifitas yang tinggi dan linier sehingga adanya sedikit perubahan konsentrasi senyawa akan memberikan perubahan yang besar pada absorbansi yang dihasilkan, dan perubahan konsentrasi sebanding dengan perubahan absorbansi senyawa yang dihasilkan.

Panjang gelombang maksimum DPPH yang didapat yaitu 516 nm berbeda dari teorinya yaitu 517 nm. Hal ini diperbolehkan sesuai dengan ketentuan yang tercantum dalam Farmakope Indonesi edisi IV (1995), yaitu bebas pergeseran yang diperkenankan yaitu maksimum sebesar 2 nm. Oleh karena itu, panjang gelombang yang digunakan yaitu 516 nm pada data lampiran 9 a.

**4.2 Penentuan OT.** Penentuan OT bertujuan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan perbandingan dan radikal DPPH untuk tetap bereaksi. Hasil

didapatkan nilai OT dari menit ke 12-32 memiliki absorbansi yang stabil, maka menunjukkan bahwa menit ke 12-32 larutan pembanding dan uji bereaksi dengan larutan DPPH secara optimum sehingga didapatkan OT yaitu 18 menit.

**4.3 Nilai  $IC_{50}$  mirisetin dan larutan uji.** *Inhibition Concentration ( $IC_{50}$ )* yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan % penghambatan sebesar 50%. Berdasarkan hasil pembacaan absorbansi dan perhitungan pada lampiran c dan d halaman 67 dan 71 rata-rata replikasi nilai  $IC_{50}$  dari mirisetin murni diperoleh sebesar 6,93 ppm dan 23,5 ppm untuk formula 7. Formula 7 digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan karena memiliki ukuran partikel yang masuk range nanopartikel dan nilai PI yang bagus. Ukuran partikel berpengaruh pada aktivitas antioksidan karena semakin kecil ukuran partikel maka akan mempengaruhi aktivitas antioksidan. Hal ini menunjukkan bahwa ukuran partikel yang kecil akan mudah larut dan terjadi proses reduksi yang sempurna dengan DPPH (Saputra *et al.* 2011).

Berdasarkan pengujian aktivitas antioksidan dari mirisetin, menunjukkan bahwa mirisetin memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong sangat kuat dengan nilai  $IC_{50}$  6,93 ppm, sedangkan pada formula 7 juga memiliki aktivitas antioksidan yang kuat tetapi nilai  $IC_{50}$  turun menjadi 23,5 ppm. Hal ini sesuai pernyataan Subiyandono (2010) bahwa antioksidan yang terdapat dalam sampel menurun dikarenakan mudah teroksidasinya antioksidan oleh lingkungan luar, seperti terlalu panas pada saat proses pencampuran zat aktif sehingga menurunkan aktivitasnya di dalam meredam radikal bebas DPPH.

Dapat disimpulkan bahwa nilai  $IC_{50}$  berbanding terbalik dengan potensi peredaman radikal bebas. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh maka potensi aktivitas antioksidannya semakin besar, artinya konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghasilkan aktivitas peredaman radikal bebas sebesar 50% semakin kecil.

**Tabel 8. Hasil uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH.**

<b>Bahan</b>	<b><math>IC_{50}</math></b>
Mirisetin	6, 93 ppm
SLN mirisetin	23,5 ppm