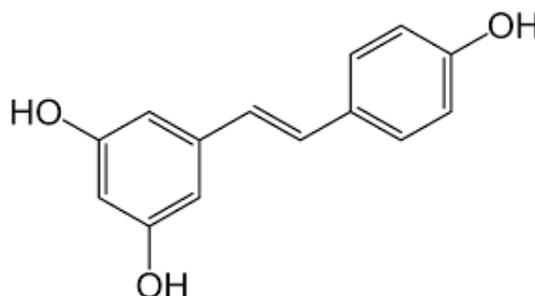


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Resveratrol

Resveratrol adalah bagian dari sekelompok senyawa yang disebut polifenol. Resveratrol terdapat pada kulit anggur merah, kacang dan buah beri. Resveratrol pertama kali ditemukan pada tahun 1940 di akar tanaman yang disebut *Veratrum grandiflorum*. Khasiat resveratrol belum sepenuhnya diberikan karena alasan tersebut resveratrol yang menyajikan kelarutan berair rendah dan pelarutannya lambat, sehingga akan mempengaruhi bioavailabilitasnya (Hao 2015). Resveratrol memiliki aktivitas antioksidan kuat, agen anti-inflamasi, antiestrogenik dan antikarsinogenik (Gambini *et al.* 2015).



Gambar 1. Struktur molekul resveratrol (Hao 2015)

Senyawa fenolik mempunyai berbagai efek biologis seperti aktivitas antioksidan melalui mekanisme sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkhelat logam, peredam terbentuknya singlet oksigen serta pendonor elektron. Beberapa tahun belakangan ini, telah dibuktikan bahwa flavonoid memiliki potensi yang besar melawan penyakit yang disebabkan oleh penangkap radikal. Kelarutan resveratrol dalam medium umum berkisar dari 0,05 mg/mL dalam air. 373,85 mg/mL dalam PEG-400. Resveratrol tidak larut dalam air. Polifenol ini senyawa mengandung kelarutan tertinggi dalam alkohol 87,98 mg/mL dan PEG-400 373,85 mg/mL. Resveratrol dapat diformulasikan dalam media dengan pH kurang dari 6. Resveratrol stabil dalam kondisi asam. Resveratrol memiliki 98% terikat pada protein plasma dan waktu paruh terhitung masing-masing 54 dan 25 jam (Robinson *et al.* 2014).

Sejumlah penelitian terbaru telah berfokus pada penggunaan nanoteknologi untuk meningkatkan bioavailabilitas resveratrol. Secara umum nanoteknologi menunjukkan peningkatan stabilitas dan bioavailabilitas dengan efek samping minimal dibandingkan dengan dosis oral. Nanoformulasi dapat meningkatkan kelarutan resveratrol dan transportasi melintasi membran plasma, dan dengan demikian meningkatkan efeknya dalam sel. Bukti bahwa nanoformulations resveratrol dapat melindungi resveratrol dari metabolisme selama proses pencernaan, akhirnya meningkatkan penyerapan jaringan. Resveratrol dimuat ke nanocapsules lipid-core meningkatkan konsentrasi jaringan di otak, hati, dan ginjal tikus sehat dibandingkan dengan resveratrol bebas (James 2014).

B. Nano Lipid Carrier

1. Pengertian NLC

Sistem pembawa NLC merupakan generasi baru dari *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN) yang dapat digunakan sebagai pembawa obat untuk penghantaran topikal. NLC merupakan sistem penghantaran obat yang terdiri dari campuran lipid padat dan lipid cair, membentuk matriks inti lipid yang distabilkan oleh surfaktan. Ukuran partikel NLC pada rentang 10-1000 nm. Ukuran partikel lipid yang kecil dapat meningkatkan penyerapan hingga ke stratum korneum dan dapat meningkatkan laju pelepasan obat yang dapat dikendalikan (Annisa *et al* 2015).

Keuntungan NLC yaitu ukuran partikel lipid yang kecil dapat meningkatkan penyerapan hingga ke startum korneum dan dapat meningkatkan laju pelepasan obat yang dapat dikendalikan, memberikan hasil penjebaran yang baik, meminimalkan kerusakan senyawa aktif selama penyimpanan. Sistem NLC memiliki viskositas yang rendah dan nyaman digunakan pada kulit dan mengurangi toksisitas serta iritasi lokal (Annisa *et al* 2015).

Berbagai teknik telah dipelajari untuk merumuskan sistem pembawa nanopartikel (Ribeiro *et al.* 2010). Polimer dan *solid lipid nanopartikel* (SLN) adalah dua jenis sistem pembawa nano. Nanopartikel polimer memiliki beberapa

kelemahan seperti toksisitas dan tidak tersedianya teknik yang baik untuk produksi nanopartikel dalam skala besar. Perbandingan dengan nanopartikel polimer, SLN memiliki beberapa keuntungan dalam hal risiko toksisitas yang lebih sedikit karena berasal dari lipid alami.

SLN menjadi pembawa yang baik, kapasitas muatan obat lebih sedikit dan perlakuan obat selama penyimpanan mungkin perlu menggunakan beberapa teknik tertentu untuk mengatasi masalah tersebut. NLC dapat didefinisikan sebagai generasi kedua SLN yang memiliki matriks lipid padat dan lipid cair (minyak) yang membentuk struktur kurang teratur atau tidak sempurna yang membantu dalam meningkatkan penyerapan obat dan mengurangi terlepasnya obat dari matriks selama periode penyimpanan (Radtke 2005).

NLC dikembangkan sebagai pengembangan dari SLN. SLN terdiri dari lipid padat, sedangkan fase lipid NLC mengandung lipid padat dan cair. NLC meningkatkan jumlah lipid cair sehingga nanopartikel membentuk dan menjadi pencampuran yang tidak beraturan, menghasilkan kisi yang tidak sempurna dan membentuk struktur amorf. Karena meningkatkan lipid cair dapat meningkatkan kelarutan zat aktif, serta zat aktif berperan membantu dengan enkapsulasi yang lebih baik dibandingkan dengan SLN, material lipid NLC menunjukkan potensi aplikasi yang lebih banyak. NLC meningkatkan stabilitas dan kapasitas pemuatan obat, dan mengurangi kehilangan kandungan obat selama penyimpanan (Annisa *et al* 2015).

2. Kelebihan NLC

Sebagai sistem penghantaran obat, NLC memiliki beberapa kelebihan diantaranya ukuran partikel lipid yang kecil dapat meningkatkan penyerapan hingga ke stratum korneum. Meningkatkan laju pelepasan obat yang dapat dikendalikan dan memberikan hasil penjejakan yang baik (Li and Ge 2012). Meminimalkan kerusakan senyawa aktif selama penyimpanan (Annisa *et al* 2015). Struktur NLC (tipe *Imperfection, amorf, dan multiple*) dapat mengakomodasi lebih banyak obat dan menurunkan resiko kebocoran selama penyimpanan dibandingkan dengan SLN (Zhuang *et al.* 2010). Memberikan perlindungan terhadap bahan-bahan yang labil secara kimia dengan degradasi

kimia. Menurunkan jumlah air dalam partikel emulsi. Membentuk lapisan tipis pada permukaan kulit sehingga memiliki efek *controlled uclusion* dan *skin hidration*. Meningkatkan bioavailabilitas bahan aktif di kulit dan dapat membentuk *skin targeting sistem* (Zhuang *et al.* 2010).

3. Komponen penyusun NLC

3.1 Lipid Padat dan Lipid Cair. Istilah lipid secara umum digunakan untuk struktur trigliserida, gliserida, asam lemak, steroid dan lilin (Mader 2006). Pada sistem NLC, digunakan kombinasi lipid padat (lemak) dan lipid cair (minyak) yang termasuk dalam kategori *Generally Recognized as Safe Status* (GRAS) seperti tristearin, campuran mono-, di-, dan triasilgliserol, asam lemak, dan beeswax (Souto 2007). Adanya minyak atau lipid cair pada sistem NLC ini memberikan kelebihan sistem NLC dalam hal pengebakan obat karena pada umumnya bahan obat lebih larut dalam minyak daripada lipid padat (Tamjidi *et al.* 2013) dan adanya minyak dapat menurunkan keteraturan kisi kristal matriks lipid disebabkan oleh perbedaan panjang rantai karbon lipid padat dan minyak (Souto 2007).

Tabel 1. Contoh-contoh lipid padat (asam lemak jenuh), anatar lain : (Hart 1983)

| Nama | Struktur | Sumber |
|---------------|----------------------------------------------------|-------------------------|
| Asam Butirat | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2$ | Lemak Susu |
| Asam Miristat | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$ | Lemak hewani dan nabati |
| Asam Palmitat | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$ | Lemak hewani dan nabati |
| Asam Stearat | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}_2\text{H}$ | Lemak hewani dan nabati |

Tabel 2. Contoh – contoh dari lipid cair (asam lemak tak jenuh), antara lain : (Hart 1983)

| Nama | Struktur | Sumber |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Asam Oleat | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ | Lemak hewani dan nabati |
| Asam Linoleat | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ | Minyak nabati |
| Asam Linolenat | $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ | Minyak biji rami |

Asam lemak jenuh merupakan asam lemak yang mengandung ikatan tunggal pada rantai hidrokarbonnya. Asam lemak jenuh mempunyai rantai zig-zag yang dapat cocok satu sama lain, sehingga gaya tarik *van der walls* tinggi, sehingga biasanya berwujud padat. Sedangkan asam lemak tak jenuh merupakan asam lemak yang mengandung satu ikatan rangkap pada rantai hidrokarbonnya. Asam lemak dengan lebih dari satu ikatan rangkap tidak lazim, terutama terdapat

pada minyak nabati, minyak ini disebut poliunsaturat. Trigliserida tak jenuh ganda (poliunsaturat) cenderung berbentuk minyak (Souto 2007).

3.2 Surfaktan. Beberapa jenis surfaktan yang telah banyak digunakan untuk membentuk sistem NLC adalah jenis poloxomer, polisorbit, lesitin, asam empedu dan Kolliphor. Diketahui bahwa kombinasi surfaktan dapat menurunkan aglomerasi partikel secara signifikan (Mader 2006). Jenis surfaktan dapat mempengaruhi kecepatan pelepasan obat dalam sistem NLC. Surfaktan atau zat aktif permukaan adalah molekul yang struktur kimianya terdiri dari dua bagian yang mempunyai perbedaan afinitas terhadap berbagai pelarut, yaitu bagian hidrofilik dan hidrofobik. Bagian hidrofobik terdiri dari rantai panjang hidrokarbon, mempunyai afinitas terhadap minyak atau pelarut non polar. Bagian hidrofilik dapat berupa gugus ion, gugus polar, atau gugus yang larut dalam air. Bagian ini merupakan bagian yang memiliki afinitas terhadap air atau pelarut polar (Mayer 2006).

Jumlah bahan yang dapat dilarutkan oleh sejumlah surfaktan tertentu merupakan fungsi karakteristik polar-nonpolar dari surfaktan tersebut biasanya dinyatakan dalam HLB (Keseimbangan Hidrofil-Lipofil) (Martin *et al.* 1993). Harga HLB memiliki skala 0-20. Surfaktan yang memiliki harga HLB reah lebih larut dalam minyak atau bersifat hidrofobik sedangkan surfaktan yang memiliki harga HLB tinggi lebih larut dalam air atau bersifat hidrofilik (Mayer 2006). Berdasarkan muatannya surfaktan dibagi menjadi empat golongan yaitu :

3.2.1 Surfaktan anionik. Surfaktan anionik merupakan surfaktan dengan bagian aktif pada permukaannya mengandung muatan negatif. Contohnya adalah garam alkana sulfonat, garam olefin sulfonat, garam sulfonat asam lemak rantai panjang.

3.2.2 Surfaktan kationik. Surfaktan kationik merupakan surfaktan dengan bagian aktif pada permukaannya mengandung muatan positif. Surfaktan ini terionisasi dalam air serta bagian aktif pada permukaannya adalah bagian kationnya. Contohnya garam alkil trimetil ammonium, garam dialkil-dimethyl ammonium dan garam alkil dimethyl benzil ammonium.

3.2.3 Surfaktan nonionik. Surfaktan anionik adalah surfaktan yang tidak terionisasi di dalam air yaitu surfaktan yang bagian aktif permukaannya tidak mengandung muatan apapun. Contohnya ester gliserin asam lemak, ester sorbitan asam lemak, ester sukrosa asam lemak, polietilen alkil amina, glukamina, alkil poliglukosa, mono alkanol amina, dialkanol amina dan alkil amina oksida.

3.2.4 Surfaktan amfoterik. Surfaktan amfoterik yaitu surfaktan yang bagian alkilnya mempunyai muatan positif dan negatif. Contohnya surfaktan yang mengandung asam amino, betain dan fosofobetain (Mayers 2006).

C. Metode Pembuatan *nano lipid carrier*

1. Metode Emulsifikasi

Metode emulsifikasi merupakan metode dengan cara lipid padat dan cair dipanaskan dan dicampur. Kemudian obat-obatan ditambahkan untuk membentuk fase organik. Fase organik ditambahkan ke fase air yang mengandung surfaktan dan diaduk untuk membentuk emulsi kasar. Ini menguntungkan karena tidak ada residu pelarut organik, tidak ada pelepasan meledak pada waktu awal, dan dispersi dengan konsentrasi lipid yang tinggi (Li *et al* 2017)

Metode emulsifikasi merupakan metode penggabungan antara dua atau lebih fluida yang immiscible (tidak tercampur secara sempurna) (Hielscher 2005). Emulsi terdapat dua fasa atau lebih, misalnya fasa cair dan minyak. Fluida fasa pertama akan terdispersi dalam fluida fasa kedua dan membentuk koloid. Emulsi air dalam minyak terbentuk ketika partikel air disebarkan (didispersikan) dalam minyak. Emulsi minyak dalam air terbentuk ketika partikel minyak disebarkan (didispersikan) dalam air, hal ini tergantung dari perbandingan volume antar kedua fasa tersebut. Emulsifikasi berjalan efektif apabila terdapat pengemulsi atau surfaktan (surface active substance) dalam proses tersebut (Sudaryanto *et al.* 2007)

2. Metode Sonikasi

Sonikasi merupakan aplikasi penggunaan energi suara untuk proses pengadukan partikel pada suatu sampel. Sonikasi menggunakan energi suara untuk menggerakkan partikel yang bearada dalam suatu sampel. Sonikasi dapat

digunakan untuk mempercepat proses pelarutan suatu materi dengan prinsip pemecahan reaksi intermolekuler, sehingga terbentuk suatu partikel yang berukuran nano. Sonikasi berarti pemberian perlakuan ultrasonik suatu bahan pada kondisi tertentu, sehingga menyebabkan bahan tersebut mengalami reaksi kimia sebagai akibat perlakuan yang diberikan. Prosesnya dengan menggunakan gelombang ultrasonik pada rentang frekuensi 20 KHz -10 MHz atau yang dikenal dengan istilah ultrasonikasi.

Pada umumnya sonikasi digunakan dalam nano teknologi untuk nano partikel merata dalam cairan dan juga digunakan untuk memecah agregat partikel koloid berukuran mikro. Sonikasi juga dapat digunakan untuk memulai proses kristalisasi dan bahkan mengontrol kristalisasi polimorfik. Metode ini digunakan sebagai campur tangan dalam presipitat anti-pelarut (kristalisasi) untuk membantu pencampuran dan mengisolasi kristal kecil. Sonikasi adalah mekanisme yang digunakan dalam pembersihan ultrasonik untuk memilih partikel mana yang melekat pada permukaan. Metode sonikasi termasuk jenis metode top down dalam pembuatan material nano. Gelombang tersebut ditembakkan ke dalam medium cair sehingga menghasilkan gelembung kavitasasi yang dapat menyebabkan partikel memiliki diameter dalam skala nano.

Gelombang ultrasonik merupakan gelombang mekanik longitudinal yang tidak dapat didengar oleh telinga manusia karena memiliki frekuensi tinggi, dapat merambat dalam medium padat, cair, dan gas. Karakteristik gelombang ultrasonik yang melewati medium mengakibatkan getaran partikel medium amplitudo sejajar dengan arah rambat secara longitudinal, sehingga menyebabkan partikel medium membentuk rapatan (strain) dan regangan (stress). Proses yang kontinu menyebabkan terjadinya rapatan dan renggangan di dalam medium yang disebabkan oleh getaran partikel secara periodik pada saat gelombang ultrasonik melewatinya.

Kecepatan dan penyerapan ultrasonik akan berbeda dalam medium perambatan yang juga berbeda, disebabkan karena interaksi gelombang ultrasonik yang terjadi bergantung pada ciri-ciri fisik medium perambatan dan mekanisme interaksi gelombang ultrasonik dengan bahan. Kecepatan perambatan gelombang

longitudinal bergantung pada modulus elastik yang setara dengan modulus pukal dan densiti medium. dipengaruhi oleh parameter sonication, seperti daya input, waktu sonicasi, diameter probe, dan frekuensi sonikasion. Gelombang ultrasonik apabila berada dalam medium cair dapat menyebabkan kavitasi akustik. Selama proses kavitasi berlangsung terjadi bubble collapse (ketidakstabilan gelembung), yaitu pecahnya gelembung yang kecil akibat suara. Akibatnya terjadi peristiwa hotspot melibatkan energi yang sangat tinggi (Candani *et al.* 2018)

Penggunaan gelombang ultrasonik (sonikasi) dalam pembentukan materi berukuran nano sangatlah efektif. Gelombang ultrasonik banyak diterapkan pada berbagai bidang antara lain dalam instrumentasi, kesehatan dan sebagainya. Salah satu yang terpenting dari aplikasi gelombang ultrasonik adalah pemanfaatannya dalam menimbulkan efek kavitasi akustik. Efek ini akan digunakan dalam pembuatan bahan berukuran nano dengan metode emulsifikasi (Nakahira 2007).

3. *High Shear Homogenization and Ultrasound*

Metode ini merupakan teknik dispers yang mudah dan paling sering digunakan. Pada metode ini leburan lipid didispersikan pada fase air pada suhu yang sama dengan pengadukan mekanik atau sonikasi (Singhal *et al.* 2011). Terdapat pengaruh kecepatan pengadukan, waktu emulsifikasi dan kondisi pendinginan terhadap ukuran partikel dan nilai zeta potensial. Peningkatan kecepatan pengadukan lebih berpengaruh pada nilai *Polydispersity Index* (PI) dibanding pada penurunan ukuran partikel. Metode ini, kualitas dispersi masih kurang baik karena masih dijumpai mikropartikel dan untuk penggunaan metode *ultrasound*, terdapat kemungkinan kontaminasi logam (Mader 2006)

4. *High Pressure Homogenization*

Metode untuk persiapan dapat digunakan dalam produksi massal dan teknik pendispersi yang tidak melibatkan pelarut organik. Metode-metode ini dapat dibagi menjadi protokol homogenisasi suhu tinggi, tekanan tinggi dan suhu rendah. Metode homogenisasi suhu tinggi, tekanan tinggi adalah yang lebih umum diadopsi dan melibatkan peleburan pertama bahan lipid padat sebelum mencampurnya dengan lipid cair dan obat-obatan. Setelah pencampuran, cairan leleh tersebar di seluruh fase berair, yang mengandung surfaktan.

Campuran bentuk ke awal emulsi. Kemudian, dengan dampak kecepatan tinggi dan ekspansi Dekompresi di bawah gaya geser yang sangat tinggi, tetesan cairan secara bertahap dipecah menjadi partikel nano. Umumnya, suhu tinggi mengurangi viskositas cairan campuran, mengurangi ukuran partikel tetapi meningkatkan kemungkinan degradasi obat dan pembawa. Metode ini dapat berhasil digunakan untuk obat yang tidak larut dan yang lipofilik, tetapi tidak sepenuhnya cocok untuk obat hidrofilik. Keuntungan dari menghindari pelarut organik dan produksi skala besar (Li *et al.* 2017)

5. *Emulsification Solven Evaporation*

Metode ini, bahan-bahan lipofilik dan bahan aktif yang hidrofob dilarutkan dalam pelarut organik yang tidak campur dengan air. Kemudian larutan tersebut diemulsifikasikan ke dalam fase air menggunakan *High Speed Homogenizer* untuk meningkatkan efisiensi emulsifikasi, emulsi yang terbentuk dilewatkan pada *microfluidizer*. Tahap akhir adalah penguapan pelarut organik dengan pengadukan mekanik pada suhu kamar sehingga diperoleh presipitasi lipid nanopartikel (Singhal *et al* 2011).

D. Karakterisasi NLC

1. Pengukuran efisiensi penjerapan

Efisiensi penjerapan atau *entrapment efficiency (Ee)* adalah presentase bahan aktif yang terjebak didalam partikel lipid. Untuk bahan aktif yang bersifat lipofilik biasanya memiliki nilai *ep* antara 90-98% (Rahmawan *et al.* 2012). Efisiensi penjerapan memberikan data berapa persen zat aktif yang berhasil dijerap oleh nanopartikel. *Loading capacity* membantu dalam mengetahui jumlah obat dalam suatu nanopartikel (Sriarumtias *et al.* 2017)

Pengukuran persen efisiensi penjebakan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV. Efisiensi penjerapan merupakan langkah yang digunakan untuk mengetahui seberapa besar presentase zat aktif yang terjebak didalam sistem NLC. Hasil dari penentuan %EP dapat diketahui bahwa pada perbandingan lipid penyusun NLC semuanya memberikan hasil penjebakan yang cukup tinggi

(>80%) (Annisa *et al.* 2015). Keberhasilan jebakan NLC dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Entrapment Efficiency} = \frac{(W_a - W_s)}{W_a} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

$$\text{Drug Loading} = \frac{(W_a - W_s)}{W_a - W_s + W_l} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan :

EE = efisiensi penjerapan (%)

DL = Kandungan Obat

W_a = massa obat yang ditambahkan kedalam formula

W_s = analisa bobot obat dalam supernatan

W_l = penambahan bobot lipid (Sethuraman *et al.* 2018)

2. Pelepasan Obat

Uji pelepasan obat merupakan suatu metode fisika-kimia yang digunakan dalam pengembangan produk dan pengendalian mutu sediaan obat berdasarkan pengukuran parameter kecepatan pelepasan dan melarut zat berkhasiat dari sediaannya yang menentukan bioavailabilitas obat (Ansel 1989). Uji pelepasan bertujuan untuk memprediksi korelasi bioavailabilitas *in vivo* dari produk obat. Tujuan dari uji pelepasan obat yaitu petunjuk untuk pengembangan formulasi dan produk obat, kontrol kualitas selama proses produksi, memastikan kualitas bioekivalen *in vitro* antar *batch* dan regulasi pemasaran produk obat (Allen *et al.* 2005).

Profil pelepasan bahan obat dari matriks lipid dapat diatur berdasarkan sifat dasar lipid, suhu produksi, dan konsentrasi surfaktan yang digunakan. Suhu yang tinggi dan konsentrasi surfaktan yang tinggi dapat menghasilkan profil pelepasan segera (*burst release*). Kelarutan bahan obat dalam fase air pada suhu kamar juga mempengaruhi profil pelepasan obat. Kelarutan obat pada fase air menurun selama proses pendinginan, obat akan mengalami re-partisi kedalam fase lipid yang juga mengalami penurunan suhu, inti partikel lipid yang mengalami kristalisasi selama pendinginan tidak dapat menampung obat, sehingga obat akan berada pada permukaan partikel lipid dan menghasilkan pelepasan segera (*burst release*) (Mader 2006).

Sistem NLC terdapat penambahan lipid cair pada sistem, memiliki kelebihan dalam hal penyerapan akibat penurunan modifikasi keteraturan kisi kristal dan karena bahan obat pada umumnya memiliki kelarutan yang lebih besar pada lipid cair atau minyak dibandingkan lipid padat. Sistem NLC obat ini memiliki dua pelepasan yaitu kelarutan pada fase air untuk bahan obat yang tidak terjerap matriks, dan mekanisme difusi untuk bahan obat yang terjerap matriks lipid. Jumlah kumulatif (Q) sampel yang terdifusi per luas area membran dihitung dengan rumus :

$$Q = \frac{C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \cdot S}{A} \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan :

- Q = jumlah kumulatif sampel yang terpenetrasi per luas area difusi ($\mu\text{g/mL}$)
- C_n = konsentrasi sampel ($\mu\text{g/mL}$) pada sampling menit ke-n
- V = volume sel difusi selofan (mL)
- C_i n-1 i=1 = jumlah konsentrasi sampel ($\mu\text{g/mL}$) pada sampling pertama (menit ke n-1) hingga sebelum menit ke-n
- S = volume sampling (mL)
- A = luas area membran (m^2)

Penentuan jumlah kumulatif resveratrol yang terlepas dari NLC per satuan luas membran tiap waktu ($\mu\text{g/cm}^2$), dihitung dari kadar yang diperoleh setiap waktu ($\mu\text{g/mL}$) ditambah faktor koreksi *Wurster* kemudian dikalikan dengan jumlah media (500 mL) dan selanjutnya dibagi luas permukaan membran, dibuat kurva hubungan antara jumlah kumulatif resveratrol yang lepas per satuan luas membran ($\mu\text{g/cm}^2$) terhadap akar waktu (menit^{1/2}) dari setiap formula atau sediaan uji.

Dari gambar profil pelepasan natrium diklofenak yang dihasilkan ditentukan keadaan *steady state* terlebih dahulu, selanjutnya dibuat persamaan regresi pada daerah *steady state* tersebut Berdasarkan hukum Difusi Higuchi, *slope* dari persamaan regresi tersebut merupakan laju pelepasan (fluks) resveratrol dari basis. Kondisi *steady state* adalah kondisi dimana membran berada dalam keadaan jenuh atau proses difusi sudah berjalan konstan (Purwanti *et al.* 2013).

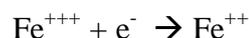
Pelepasan bahan aktif dari matriks menggunakan persamaan yang dikembangkan oleh Hiuguchi berdasarkan hukum Fick pertama dan kemudian diterapkan untuk difusi obat padat yang terdispersi dalam bentuk matriks yang homogen (Chen *et al* 2010).

E. Pengujian Antioksidan Aktivitas Resveratrol

1. Pengertian Radikal Bebas

Secara biokimia, oksidasi merupakan proses pelepasan elektron dari suatu senyawa. Sedangkan reduksi adalah proses penangkapan elektron. Senyawa yang dapat menarik atau menerima elektron disebut oksidan atau oksidator, sedangkan senyawa yang dapat melepaskan atau memberikan elektron disebut reduktan atau reduktor (Sayuti 2015).

Pengertian oksidan adalah senyawa penerima elektron (*electron acceptor*), yaitu senyawa yang dapat menarik elektron misalnya ion ferri (Fe^{+++})



Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Menurut Winarti (2010), radikal bebas adalah atom, molekul atau senyawa yang dapat berdiri sendiri yang mempunyai elektron tidak berpasangan, oleh karena itu bersifat sangat reaktif dan tidak stabil. Elektron yang tidak berpasangan selalu berusaha untuk mencari pasangan baru, sehingga mudah bereaksi dengan zat lain (protein, lemak maupun DNA) dalam tubuh.

2. Pengertian Antioksidan

Senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*elektron donor*). Pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat di hambat (Winarti, 2010). Antioksidan dibutuhkan tubuh untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Antioksidan adalah suatu senyawa atau komponen kimia yang dalam kadar atau jumlah tertentu mampu menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi.

Aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh banyak faktor seperti kandungan lipid, konsentrasi antioksidan, suhu, tekanan oksigen, dan komponen kimia dari makanan secara umum seperti protein dan air. Proses penghambatan antioksidan berbeda-beda tergantung dari struktur kimia dan variasi mekanisme. Mekanisme ini yang paling penting adalah reaksi dengan radikal bebas lipid, yang membentuk produk non-aktif. (Gordon *et al.* 2001). Mekanisme dari aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel sebagai berikut :

3. Mekanisme Aktivitas Antioksidan

Tabel 3. Mekanisme Aktivitas Antioksidan

| Jenis Antioksidan | Mekanisme aktivitas Antioksidan | Contoh Antioksidan |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Hidroperoxide Stabiliser | - Menonaktifkan radikal bebas lipid - Mencegah penguraian hidroperoksida menjadi radikal bebas | Senyawa Fenol |
| Sinergis | - Meningkatkan aktivitas antioksidan. | Asam Sitrat dan Asam Askorbat |
| Chelators Logam | - Mengikat berat logam menjadi senyawa non-aktif | Asam Fosfat dan Asam Sitrat |
| Unsur mengurangi hidroperoksida | - Mengurangi Hidroperoksida | Protein, Asam amino |

Sumber: Gordon, *et al.*, 2001

4. Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil*)

Pengujian kapasitas antioksidan suatu senyawa dilakukan secara bertahap yaitu uji in vitro menggunakan reaksi kimia, misalnya metillinoleat, DPPH. Uji in vitro menggunakan materi biologis, misalnya mengukur viabilitas sel (teknik kultur sel), pembentukan dien terkonjugasi dan kadar TBARS dari isolat LDL, dan lain-lain. Uji in vivo pada model hewan percobaan, misalnya aktifitas enzim antioksidan, kadar TBARS. Uji in vivo pada manusia.

Salah satu metode yang paling umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah dengan menggunakan radikal bebas *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil* (DPPH). Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH adalah metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain. Hasil pengukuran dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasarkan pada jenis radikal yang dihambat. Pada metode lain selain DPPH

membutuhkan reagen kimia yang cukup banyak, waktu analisis yang lama, biaya yang mahal dan tidak selalu dapat diaplikasikan pada semua sampel.

Larutan DPPH berperan sebagai radikal bebas yang akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga DPPH akan berubah menjadi 2,2- *diphenyl-1-picrylhydrazin* yang bersifat non-radikal. Peningkatan jumlah 2,2- *diphenyl-1-picrylhydrazin* akan ditandai dengan berubahnya warna ungu tua menjadi warna merah muda atau kuning pucat dan bisa diamati dan dilihat menggunakan spektrofotometer sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Molyneux 2004).

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* dengan metode DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunardi *et al.* 2007)

Pengukuran antioksidan dilakukan dengan mencampurkan DPPH dengan sampel sebanyak 1:1, diinkubasi selama 30 menit kemudian diukur dengan spektrofotometri sinar tampak pada panjang gelombang 516 nm. Selanjutnya hasil absorbansi dihitung untuk mendapatkan %Inhibisi, dengan perhitungan :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100 \dots \dots \dots (4)$$

Radikal DPPH adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada λ max 517 nm dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH tersebut akan tereduksi dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Perubahan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer, dan diplotkan terhadap konsentrasi Penurunan intensitas warna yang terjadi disebabkan oleh berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH. Hal ini dapat terjadi apabila adanya penangkapan satu elektron oleh zat antioksidan, menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron tersebut untuk beresonansi.

F. Factorial Design

Desain faktorial adalah suatu metode yang digunakan untuk mencari efek dari berbagai faktor atau kondisi terhadap hasil penelitian. Desain faktorial juga digunakan untuk menentukan secara serentak efek dari beberapa faktor sekaligus interaksinya. Desain faktorial merupakan aplikasi persamaan regresi yang memberikan model hubungan antara variable respon dengan satu atau lebih variable bebas. Desain faktorial dua level berarti ada dua faktor, misal A dan B yang masing-masing faktor diuji pada dua level yang berbeda yaitu level rendah dan level tinggi. Desain faktorial dapat didesain suatu percobaan untuk mengetahui faktor yang dominan berpengaruh secara signifikan terhadap suatu respon (Shahidulla *et al.* 2015).

Desain faktorial mengandung beberapa istilah, yaitu faktorial, level, efek dan respon. Faktor adalah setiap besaran yang mempengaruhi harga kebutuhan produk, yang pada prinsipnya dapat dibedakan menjadi faktor kuantitatif dan kualitatif. Level adalah nilai atau tetapan untuk faktor. Desain faktorial digunakan level tinggi dan level rendah. Efek adalah perubahan respon yang disebabkan variasi tingkat faktor. Efek respon atau interaksi merupakan rata-rata respon pada level tinggi dikurangi rata-rata respon pada level rendah. Respon merupakan sifat atau hasil percobaan yang diamati dan dapat dikuantitatif (Shahidulla *et al.* 2015).

Optimasi campuran dua bahan (berarti terdapat dua faktor) dengan desain faktorial (*two level factorial design*) dilakukan berdasarkan rumus:

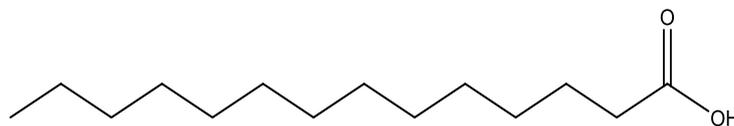
$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 \dots \dots \dots (5)$$

Keterangan: Y = Respon hasil atau sifat yang diamati
 X_1, X_2 = Level bagian A, level bagian B
 b_0 = Rata-rata hasil semua percobaan
 b_1, b_2, b_{12} = Koefisien dapat dihitung dari hasil percobaan

Desain faktorial memiliki beberapa keuntungan yaitu memiliki efisiensi yang maksimum untuk memperkirakan efek yang dominan dalam menentukan respon. Keuntungan utama desain faktorial adalah dapat mengidentifikasi efek masing-masing faktor, maupun efek interaksi antar faktor. Metode ini ekonomis, dapat mengurangi jumlah penelitian jika dibandingkan dengan meneliti dua efek faktor secara terpisah (Shahidulla *et al.* 2015).

G. Studi Preformulasi

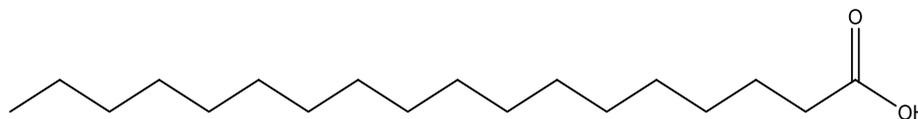
1. Asam Miristat



Gambar 2. Struktur Asam Miristat (Rowe *et al* 2009)

Asam miristat memiliki struktur kimia $C_{14}H_{28}O_2$. Titik leleh asam miristat 54,58 °C, titik didih 326,28 °C, nyala 1108 °C, Berat Molekul 228,37, Kelarutan dapat larut dalam aseton, benzena, kloroform, etanol (95%), eter, dan pelarut aromatik dan diklorinasi. Praktis tidak larut dalam air. Asam miristat terjadi sebagai padatan kristal putih berminyak. Gravitasi spesifik 0,860–0,870. Kegunaan asam miristat *Emulsifying agent*, penetran kulit, tablet dan pelumas kapsul. Penyimpanan bahan curah harus disimpan dalam wadah tertutup dengan baik, tempat yang kering. Inkompatibilitas Asam miristat tidak sesuai dengan oksidator kuat dan Basa (Rowe *et al* 2009)

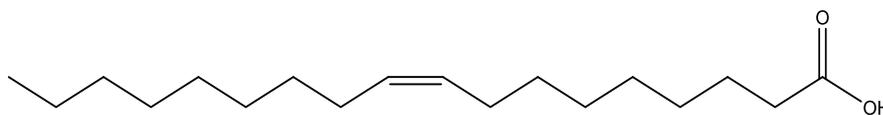
2. Asam Stearat



Gambar 3. Struktur Asam Stearat (Rowe *et al* 2009)

Asam stearat adalah campuran asam organik padat yang diperoleh dari lemak sebagian besar terdiri dari asam oktadekanoat. Asam stearat memiliki struktur kimia $C_{18}H_{38}O_2$. Suhu nyala otomatis 4508 °C, titik didih 210,58 °C. Kepadatan 0,884-0,906 g / cm³ (10), Titik nyala 1918 °C, Titik beku 55–578 °C, Titik lebur 59,4-59,88 °C untuk material murni. Kelarutan dapat larut dalam kloroform, etanol (95%), eter, heksana, Propilena glikol, benzena, aseton, dan minyak nabati. Praktis Tidak larut dalam air. Tekanan uap 133,3 Pa pada 150,38 °C. Viskositas (9,82 mPa pada 648 °C. Asam miristat terjadi sebagai padatan kristal putih berminyak. Penyimpanan Stearil alkohol stabil terhadap asam dan alkali dan biasanya tidak Menjadi tengik, harus disimpan dalam wadah tertutup baik, sejuk dan kering (Rowe *et al* 2009)

3. Asam oleat

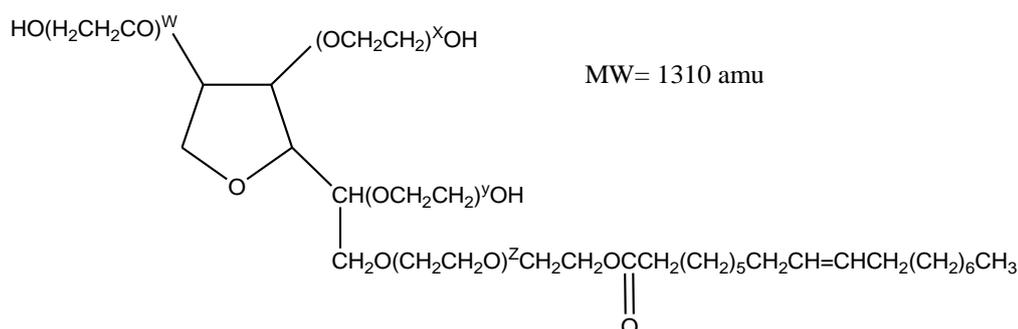


Gambar 4. Struktur Asam Oleat (Rowe *et al* 2009)

Rumus Empiris $C_{18}H_{34}O_2$. Fungsional *Emulsifying agent*, penetrasi kulit. Asam oleat digunakan sebagai agen pengemulsi dalam makanan dan topikal Formulasi farmasi, juga digunakan sebagai penetrasi. Asam oleat memiliki titik lebur $13-148^{\circ}C$; asam oleat murni mengeras pada $48C$, Indeks bias $n_D 26 = 1,4585$. Kelarutan Dapat bercampur dengan benzena, kloroform, etanol (95%), Eter, heksana, dan minyak tetap dan mudah menguap, praktis tidak larut dalam Air.

Tekanan uap $133 Pa (1 mmHg)$ pada $176,58^{\circ}C$ Viskositas (dinamis) $26 mPa s (26 cP)$ pada $258^{\circ}C$. Kondisi Stabilitas dan Penyimpanan Saat terpapar udara, asam oleat secara bertahap menyerap oksigen, menggelapkan Warna, dan mengembangkan bau yang lebih nyata Tekanan, ia terurai ketika dipanaskan pada $80-108^{\circ}C$. Asam oleat harus disimpan dalam wadah yang terisi penuh dan tertutup dengan baik, Terlindungi dari cahaya, di tempat yang sejuk dan kering (Rowe *et al* 2009)

4. Tween 80

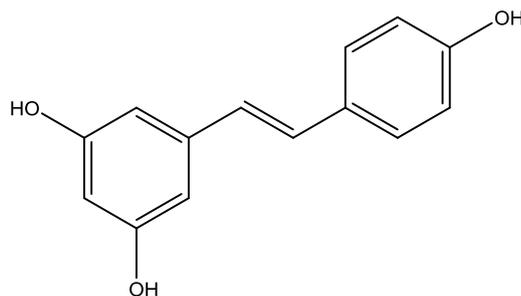


Gambar 5. Struktur tween 80

Tween 80 atau *Polysorbate 80* memiliki rumus kimia $C_{64}H_{124}O_{26}$. Tween 80 merupakan cairan seperti minyak, jernih, bewarna kuning muda hingga cokelat 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 memiliki harga HLB sejumlah 15 (Voigt 1995). 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).

5. Resveratrol



Gambar 6. Struktur molekul resveratrol (Hao 2015)

Resveratrol adalah salah satu senyawa polifenol yang terdapat pada tumbuhan akar *veratrum grandiflorum*. Resveratrol memiliki nama lain trans-3,5,4'-trihydroxystilbene. Rumus molekul nya $C_{14}H_{12}O_3$, massa molar 228,25 $g \cdot mol^{-1}$, kelarutannya dalam air 0,03 g/L, dalam DMSO (dimethyl sulfoxide) 16 g/L dan etanol 50 g/L (Brown *et al.* 2009) dan titik leleh resveratrol yaitu 161-164 °C (Sahidin *et al.* 2008). Khasiat resveratrol belum sepenuhnya diberikan karena alasan tersebut resveratrol yang menyajikan kelarutan berair rendah dan pelarutannya lambat, sehingga akan mempengaruhi bioavailabilitasnya (Hao 2015). Resveratrol memiliki aktivitas antioksidan kuat, agen anti-inflamasi, antiestrogenik dan antikarsinogenik (Gambini *et al.* 2015).

H. Landasan Teori

Formula NLC pada penelitian ini menggunakan dua lipid padat yang berbeda pada panjang rantai yaitu asam miristat dan asam stearat, sebagai lipid cair yaitu asam oleat dengan berbagai variasi konsentrasi. Lipid yang tidak mempunyai ikatan rangkap akan lebih stabil, tidak mudah teroksidasi dan tidak berubah menjadi asam. Perbedaan panjang rantai pada asam miristat dan asam stearat dapat mempengaruhi stabilitas, konsistensi dan titik lebur dari lipid tersebut, semakin panjang rantai pada lipid padat maka semakin stabil, konsistensi

nya semakin padat dan titik leburnya semakin besar (Sunardi *et al.* 2009) sehingga penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perbedaan panjang rantai karbon lipid padat (asam miristat dan asam stearat) dan variasi konsentrasi asam oleat pada sistem NLC resveratrol terhadap karakterisasi fisik dan aktivitas antioksidan.

Lipid cair menyebabkan proses kristalisasi. Lipid padat dapat terjadi kristalisasi lebih awal kemudian lipid cair akan berada pada luar matriks bersama bahan aktif sehingga dapat memicu kecepatan pelepasan obat. Penggunaan asam oleat sebagai minyak dalam sistem penghantaran NLC berperan penting dalam menurunkan proses kristalisasi dan meningkatkan penurunan modifikasi keteraturan kristal asam stearat, serta faktor utama yang mempengaruhi kecepatan pelepasan bahan aktif dalam sistem NLC (Hu *et al.* 2005). Asam oleat merupakan asam lemak yang mudah teroksidasi, karena memiliki ikatan rangkap pada strukturnya. Sehingga dengan adanya asam miristat dan asam stearat maka akan menutupi kekurangan dari asam oleat. Variasi asam oleat dapat berpengaruh pada efisiensi penyerapan obat dan nilai HLB (Desnelli 2009)

Formula NLC juga memiliki komponen penting selain lipid padat dan lipid cair yaitu surfaktan sebagai zat penstabil, pemilihan surfaktan perlu diperhatikan surfaktan yang non ionik seperti Tween 80 dapat menurunkan tegangan antarmuka antara obat dan medium sekaligus membentuk misel sehingga molekul obat akan terbawa oleh misel larut ke dalam medium (Martin *et al.*, 1993). Penggunaan surfaktan pada kadar yang lebih tinggi akan berkumpul membentuk agregat yang disebut misel. Selain itu pada pemakaiannya dengan kadar tinggi sampai *Critical Micelle Concentration* (CMC) surfaktan diasumsikan mampu berinteraksi kompleks dengan obat tertentu selanjutnya dapat pula mempengaruhi permeabilitas membran tempat absorpsi obat karena surfaktan dan membran mengandung komponen penyusun yang sama (Attwood & Florence, 1985; Sudjaswadi, 1991). salah satu zat aktif yang dapat dibuat sebagai sistem NLC yaitu Resveratrol.

Resveratrol merupakan senyawa polifenol yang memiliki efek antioksidan yang cukup tinggi, karena mempunyai tiga kelompok hidroksil pada posisi 3,4

dan 5 pada strukturnya. Aktivitas resveratrol dalam menangkap radikal bebas diketahui lebih baik dibanding aktivitas vitamin E dan C serta setara dengan aktivitas epikatekin dan kuersetin (Mappamasing 2015). Resveratrol dibuat sistem NLC karena mempunyai kelarutan pada air rendah sehingga pasti akan mempengaruhi bioavailabilitasnya. Sistem NLC mampu meningkatkan kelarutan pada resveratrol sebagai sistem pembawa yang sesuai. Sistem NLC secara umum menunjukkan peningkatan stabilitas dan bioavailabilitas dengan efek samping minimal dibandingkan dengan dosis oral (Hao 2015). Aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh banyak faktor seperti kandungan lipid, konsentrasi antioksidan, suhu, tekanan oksigen, dan komponen kimia dari makanan secara umum seperti protein dan air (Gordon *et al.* 2001).

Sistem NLC resveratrol dibuat dengan metode emulsifikasi-sonikasi. Metode emulsifikasi dapat memberikan kelebihan dibandingkan dengan metode lainnya yaitu lebih mudah dilakukan, memberikan hasil penjebakan yang baik dan sering digunakan untuk pembuatan NLC dengan berbagai obat (Annisa *et al.* 2016). Penentuan sifat karakterisasi fisik yang dilakukan yaitu efisiensi penyerapan, pelepasan obat dan pengujian aktivitas antioksidan.

I. Hipotesis

Pertama, variasi konsentrasi asam oleat dan panjang rantai lipid padat (asam miristat & asam stearat) berpengaruh terhadap efisiensi penyerapan, uji pelepasan obat dan aktivitas antioksidan NLC resveratrol.

Kedua, pada formula NLC resveratrol tertentu mempunyai efisiensi penyerapan, uji pelepasan obat dan aktivitas antioksidan yang paling baik.