

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah formulasi NLC resveratrol dengan menggunakan variasi konsentrasi asam oleat dan panjang rantai lipid padat (asam miristat & asam stearat).

Sampel pada penelitian ini adalah formulasi NLC resveratrol dengan menggunakan variasi konsentrasi asam oleat pada bobot 0,5 gram dan 3,5 gram dan panjang rantai lipid padat (asam miristat & asam stearat) pada bobot 5 gram.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat. Variabel utama pada penelitian ini adalah formulasi dari *Nano Lipid Carrier* resveratrol yang dibuat dengan konsentrasi lipid padat, konsentrasi yang berbeda lipid cair dan surfaktan serta dilakukan 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.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi asam oleat dan perbandingan asam miristat dengan asam stearat. Variabel terikat pada penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria. Variabel terikat adalah karakteristik fisik NLC resveratrol yaitu uji pelepasan obat, efisiensi penyerapan dan pengujian aktivitas antioksidan.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualitasnya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara

tepat. Variabel terkendali adalah proses pembuatan NLC dengan kombinasi metode emulsifikasi dan ultrasonik diantaranya suhu, lama pembuatan, rpm, kecepatan putaran *overhead stirrer*, *pulse*, waktu *on off ultrasonic*.

3. Definisi operasional variabel utama

Zat aktif resveratrol dengan formulasi perbandingan panjang rantai asam miristat dan asam stearat dengan konsentrasi 5% serta variasi konsentrasi asam oleat dengan perbandingan 0,5% : 3,5% pada setiap formula dengan surfaktan tween 80. Uji antioksidan pada NLC menggunakan DPPH adalah menentukan jumlah zat aktif dapat memberikan aktivitas antioksidan dan menunjukkan stabilitas antioksidan didalam sistem NLC.

Efisiensi penyerapan dilakukan untuk mengetahui jumlah resveratrol yang terjerap dalam NLC. Pelepasan obat adalah dilakukan untuk mengetahui seberapa obat yang terlepas dengan menggunakan membran dialisis, dan mengetahui ukuran partikel apabila berukuran 10-1000 nm. Proses pembuatan NLC-RSV dengan variasi konsentrasi asam oleat dan perbandingan panjang rantai asam miristat dan asam stearat dengan menggunakan metode emulsifikasi dan sonikasi.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Resveratrol (*SYP*, China), asam miristat, Asam Stearat, Asam Oleat, Tween 80, dan aquadestillata, DPPH, Metanol (Merck, Germany) dan Membran Selofan.

2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu alat *Hanson Horizontal Diffusion Cell System* (Chatsworth, CA), *Qsonic sinicators* (Newtown, USA), Timbangan Analitik Ohaus PA213, *Overhead Stirrer IKA RW 20 Digital*, *sentrifugasi*, Spektrofotometri UV-Vis Shimadzu 1800 (Tokyo, Jepang), *Magnetic Stirrer*, alat-alat gelas (*Pyrex*, Jepang) dan non gelas pendukung lain.

D. Jalannya Penelitian

1. Kurva kalibrasi dan validasi metode analisis

1.1 Pembuatan kurva kalibrasi resveratrol dapar fosfat dan methanol

1.1.1 Pembuatan dapar fosfat pH 7,4. Ditimbang sebanyak 0,9 gram Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dan natrium hidroksida (NaOH) sebanyak 1,5 gram dimasukkan kedalam labu takar 1000 mL, ditambahkan aquadestillata sampai tanda batas, kocok sampai homogen. Larutan tersebut diukur pH-nya menggunakan pH meter sehingga diperoleh nilai pH 7,4.

1.1.2 Pembuatan larutan induk resveratrol.

1.1.2.1 Resveratrol ditimbang sebanyak 50,0 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan dapar fosfat sampai tanda batas, homogenkan.

1.1.2.2 Resveratrol ditimbang sebanyak 50,0 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan metanol sampai tanda batas, homogenkan.

1.1.3 Penentuan panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang serapan maksimum resveratrol dibuat 10 ppm dalam dapar fosfat dan dibuat dalam methanol dari larutan induk resveratrol, kemudian dibaca pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 200-400 nm.

1.1.4 Pembuatan kurva baku resveratrol.

- a. Pembuatan kurva baku resveratrol dilakukan dengan dapar fosfat. Pembuatan seri konsentrasi dari larutan induk resveratrol sebanyak 0,49; 0,98; 1,94; 2,91; 3,81; 4,76; 5,65; 6,52 dan 7,40 ppm, kemudian diukur absorban dan luas daerah dibawah kurva masing-masing larutan dengan panjang gelombang maksimum resveratrol. Dibuat kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara absorban dan konsentrasi. Persamaan garis regresi pada sumbu x dan y sebagai serapan sehingga diperoleh r (koefisien relasi) dari kurva kalibrasi.
- b. Pembuatan kurva baku resveratrol dilakukan dengan methanol. Pembuatan seri konsentrasi dari larutan induk resveratrol sebanyak 0,63; 0,99; 1,96; 2,92; 3,85; 5,67; dan 7,43 ppm, kemudian diukur absorban dan luas daerah dibawah

kurva masing-masing larutan dengan panjang gelombang maksimum resveratrol. Dibuat kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara absorbansi dan konsentrasi. Persamaan garis regresi pada sumbu x dan y sebagai serapan sehingga diperoleh r (koefisien relasi) dari kurva kalibrasi.

1.2 Validasi metode analisis.

1.2.1 Linearitas. Dari data pengukuran kurva kalibrasi, kemudian dianalisis dengan regresi linier sehingga diperoleh koefisien korelasi (r) yang menunjukkan linieritasnya. Nilai linearitas dikatakan baik apabila nilai $r \leq 0,995$ atau ≤ 1 . Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) dari persamaan regresi $y = a + b x$ (Riadi 2016)

$$r = \frac{\sum xt yt - \sum xt \sum yt / n}{\sqrt{\sum (xi - x)^2 \sum (yi - y)^2}} \dots \dots \dots (6)$$

1.2.2 Uji akurasi. Pengujian akurasi dilakukan dengan membuat sampel obat yang diketahui jumlah resveratrol kemudian masing-masing dimasukkan kedalam labu takar ditambahkan metanol sampai 100 mL. Diambil 1 mL dimasukkan dalam labu takar ditambahkan metanol sampai 10 mL. Kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum. Diulang sebanyak 3 kali untuk masing-masing konsentrasi. Hitung nilai % akurasi. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali.

$$\% \text{ Perolehan Kembali} = (C1 - C2) / C3 \times 100 \%$$

Ket:

C1 = konsentrasi sampel + baku

C2 = konsentrasi sampel sebenarnya

C3 = konsentrasi baku yang ditambahkan

Metode validasi memenuhi syarat jika persen perolehan kembalinya dengan nilai rentang 80 - 120 % (Riadi 2016).

1.2.3 Uji presisi. Pengujian dilakukan pada tingkat keterulangan dengan cara mengukur kadar larutan baku resveratrol dengan konsentrasi tertentu dibuat sebanyak 10 kali dan dibaca pada spektrofotometri UV-Vis. Nilai RSD antara 1 - 2 % biasanya dipersyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah yang

banyak, sedangkan untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, RSD berkisar antara 5 – 15 %

Presisi dinyatakan dengan persen simpangan baku relatif (% RSD) atau persen koefisien variasi (Riadi 2016).

$$\% \text{ RSD} = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\% \dots\dots\dots (7)$$

Keterangan : RSD = Simpangan baku relatif
S = Simpangan baku
 \bar{x} = nilai rata-rata pengukuran

1.2.4 Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ). Batas deteksi dan batas kuantifikasi penetapan kadar obat resveratrol dibuat larutan baku resveratrol yang mengacu pada kurva kalibrasi dari larutan baku resveratrol ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan membuat 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 dan kuantifikasi dapat ditentukan dengan rumus, sebagai berikut :

$$\text{LOD} = \frac{3 Sy/x}{b} \dots\dots\dots (8)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 Sy/x}{b} \dots\dots\dots (9)$$

Keterangan :
 Sy/x : Simpangan baku residual dari serapan
b : Slope persamaan regresi linear kurva kalibrasi.

2. Rancangan Formula NLC Resveratrol dengan *Factorial Design*

Tabel 4. Rancangan Formula NLC Resveratrol dengan *Factorial Design*

Formula	Kode		Aktual	
	Lipid padat	Lipid cair	Lipid padat	Asam oleat
1	-1	-1	Aam miristat	1
2	+1	-1	Asam stearat	1
3	-1	+1	Asam miristat	7
4	+1	+1	Asam stearat	7

3. Rancangan Formula NLC Resveratrol

Tabel 5. Rancangan Formula NLC Resveratrol

Bahan	Formula (g)			
	1	2	3	4
Resveratrol	0,025	0,025	0,025	0,025
Asam miristat	5	-	5	-
Asam stearat	-	5	-	5
Aasam oleat	0,5	0,5	3,5	3,5
Tween 80	3,3	3,3	5,1	5,1
Aquadestillata ad	100	100	100	100

4. Pembuatan sistem NLC resveratrol dengan metode emulsifikasi-sonikasi

Pembuatan NLC resveratrol diawali dengan meleburkan lipid padat dan lipid cair (asam miristat, asam stearat dan asam oleat) dibuat 4 formula, 2 formula campuran asam miristat dan asam oleat dan 2 formula campuran asam stearat dan asam oleat, kemudian di leburkan secara bersamaan pada suhu 70-80 °C, dan dipanaskan larutan surfaktan Tween 80) dengan pelarut aquadestillata yang dipanaskan pada suhu 70-80 °C. Campuran surfaktan panas kemudian ditambahkan ke dalam campuran lipid panas dengan menggunakan *mixer* pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Tahap selanjutnya yaitu campuran dimasukkan ke dalam sonikator pada amplitudo 35% selama 5 menit dengan *pulse on* 1 menit *off* 1 menit (Sriarumtias dkk 2017).

5. Karakterisasi fisik NLC resveratrol

5.1 Pengamatan ukuran partikel secara mikroskopik. Pengukuran ukuran partikel NLC resveratrol dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan mikroskopik *Leica*. Preparasi sampel NLC untuk pengamatan ukuran partikel secara kualitatif yaitu setelah dilakukan proses emulsifikasi sediaan diambil 1 tetes diletakkan diatas objek glass, kemudian ditetesi dengan aquadest secukupnya ditutupi dengan de glass, setelah proses sonikasi kemudian diambil 1 tetes diletakkan diatas objek glass, kemudian ditetesi dengan aquadest secukupnya. Masing-masing preparasi dibaca pada mikoskop pada perbesaran 40x.

5.2 Efisiensi Penjerapan. Cara pembuatan setiap sampel diambil 2 mL, kemudian disentrifugasi pada 6000 rpm selama 30 menit untuk memisahkan fase

lipid dan air. Bagian supernatan dilarutkan dengan metanol kemudian dibaca spektrofotometer UV-VIS pada 306 nm. Keberhasilan jebakan NLC dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Entrapment Efficiency} = \frac{(W_a - W_s)}{W_a} \times 100 \dots\dots\dots(10)$$

$$\text{Drug Loading} = \frac{(W_a - W_s)}{W_a - W_s + W_l} \times 100 \dots\dots\dots(11)$$

Keterangan :

EE = Efisiensi penjerapan

DL = Kandungan obat

W_a = Massa obat yang ditambahkan ke dalam formula

W_s = Analisis bobot obat dalam supernatan

W_l = Penambahan bobot lipid (Nagalakshmi *et al.* 2017).

5.3 Uji pelepasan obat. Pelepasan obat *in vitro* disiapkan NLC-RSV dilakukan dengan menggunakan metode kantung dialisis (Membran Himedia-Dialisis 135, Mol. Memotong 12.000-14.000 Da, Mumbai, India). NLC-RSV diambil 10 gram kemudian dimasukkan ke dalam kantung dan kedua ujung kantung diklem. Kantung dimasukkan ke dalam chamber dengan bantuan pemberat kemudian diisi dapar fosfat 500 mL pH 7,4. Suhu pada media dipertahankan pada 37 ± 1 °C dengan kecepatan 50 rpm. Kemudian disampling 5 mL pada interval waktu 5, 10, 15, 30, 45, 60 dan 120 dengan spuit dan diganti dengan buffer yang baru pada setiap waktu pengambilan sampling. Formulasi diambil untuk koreksi dengan spektrofotometri UV-Vis pada lamda max 317. Setiap sampling dibaca sebanyak 3 kali.

6. Uji Aktivitas Antioksidan

6.1 Persiapan larutan.

6.1.1 larutan DPPH. Analisis terhadap aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH yaitu dengan larutan pereaksi adalah larutan DPPH dalam pelarut metanol yang dibuat dengan menimbang 15,7 mg serbuk DPPH dimasukkan kedalam labu takar 100 mL kemudian ditambahkan metanol sampai tanda batas.

6.1.2 larutan stock resveratrol. Larutan ini dibuat dengan cara ditimbang 500 mg resveratrol dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambah methanol p.a sampai tanda batas. Pengujian serapan peredaman radikal bebas DPPH dilakukan terhadap sampel sebanyak 1 mL ditambahkan 1 mL DPPH dan 3 mL methanol kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan *operating time* yang akan ditentukan. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali dengan menggunakan methanol sebagai blanko.

6.1.3 Larutan uji berupa NLC-RSV. Masing-masing ditimbang 2 gram, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambah methanol p.a sampai tanda batas. Kemudian di ambil 1 bagian larutan uji + 1 bagian DPPH + 3 bagian methanol p.a kemudian dibuat sesuai *operating time*, baca di spektrofotometri UV-Vis dan dihitung % inhibisi.

6.2 Penentuan panjang gelombang maksimum resveratrol. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH untuk uji aktivitas antioksidan sampel dilakukan dengan pengambilan 1 mL larutan DPPH ditambahkan 4 mL metanol kocok sampai homogen dan amati serapannya pada rentang 520-500 nm. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang yang mempunyai nilai serapan paling tinggi.

6.3 Penentuan operating time. Penetapan *operating time* yaitu dengan mencampurkan 1 mL larutan DPPH dengan 1 mL larutan induk resveratrol yang telah diencer ditambahkan 3 mL metanol kocok sampai homogen dan amati serapannya pada panjang gelombang yang telah ditentukan. Serapan dibaca mulai dari menit 0 sampai 60 menit sehingga didapatkan nilai absorbansinya yang stabil pada menit tertentu. Untuk penentuan *operating time* dapat ditentukan dari grafik antara waktu pembacaan dengan serapan.

6.4 Pembuatan kurva baku. Kurva baku dibuat seri konsentrasi 7; 14; 27; 54; 106; 211; 422; dan 667 ppm dari larutan induk. Masing-masing dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH dan 3 mL metanol. Masing-masing larutan konsentrasi yang dibuat kemudian dibaca pada waktu *operating time* dan panjang gelombang yang didapatkan. Hasil yang diperoleh dibuat regresi

linear antara konsentrasi (sumbu x) dan serapan (sumbu y). Dari hasil tersebut didapatkan persamaan regresi linier yang digunakan untuk menghitung aktivitas antioksidan.

Selanjutnya hasil absorbansi dihitung untuk mendapatkan %Inhibisi, dengan perhitungan :

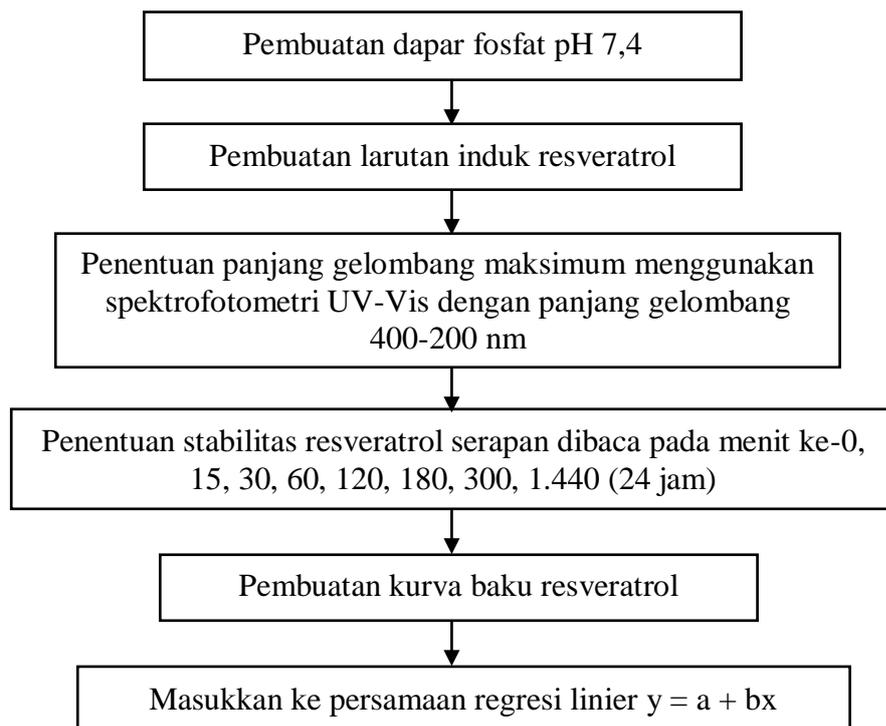
$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100 \dots \dots \dots (12)$$

Keterangan :

% inhibisi : besarnya hambatan serapan
 Abs DPPH : absorbansi kontrol
 Abs sampel : absorbansi sampel (Lung and Destiani 2015).

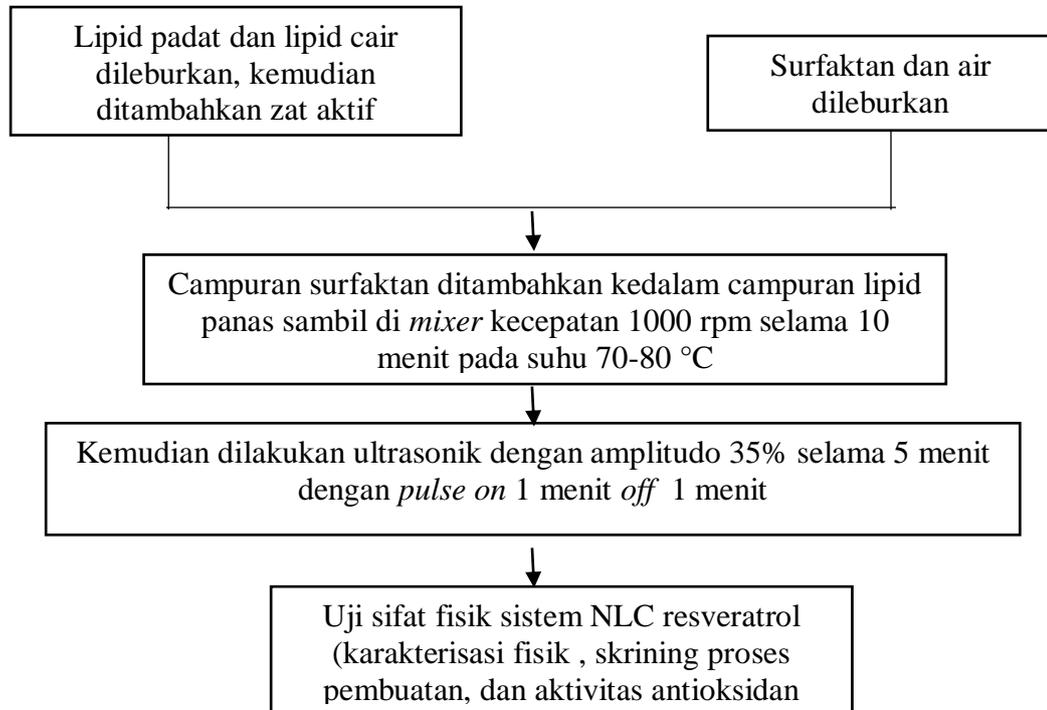
E. Skema Penelitian

1. Pembuatan kurva kalibrasi



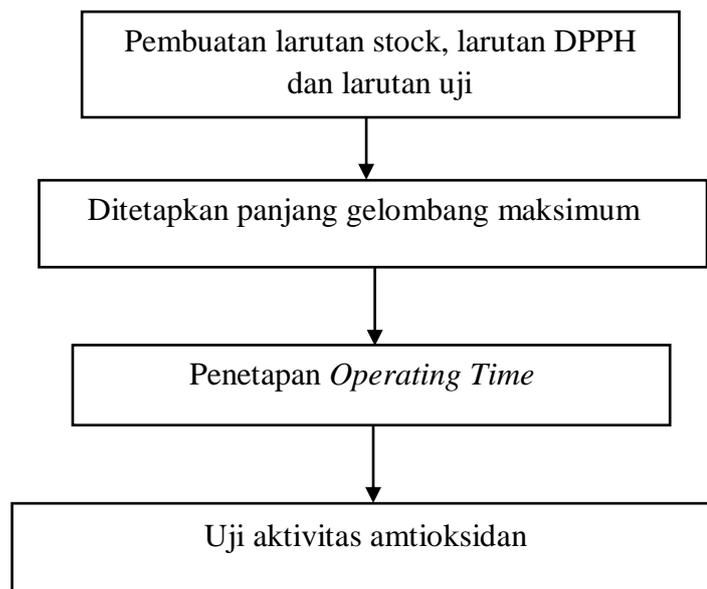
Gambar 7. Pembuatan kurva kalibrasi

2. Pembuatan Sistem NLC



Gambar 8. Skema pembuatan NLC

3. Uji aktivitas antioksidan



Gambar 9. Uji aktivitas antioksidan

F. Analisis Data

Data hasil percobaan yang meliputi efisiensi penjerapan, profil difusi dan uji aktivitas antioksidan dimasukkan ke dalam persamaan matematik untuk model *factorial design*. Berdasarkan persamaan masing-masing parameter akan diperoleh pengaruh variasi konsentrasi asam oleat dan panjang rantai lipid padat (asam miristat & asam stearat) terhadap efisiensi penjerapan, profil difusi dan uji aktivitas antioksidan.