

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

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

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

Populasi adalah keseluruhan unit atau individu dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi yang digunakan adalah nanofitosom myricetin dengan komponen lipid fosfatidilkolin dan kolesterol.

##### **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 yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah myricetin yang dibuat nanofitosom dengan komponen lipid fosfatidilkolin dan kolesterol dengan berbagai variasi konsentrasi 1:1:0,2; 1:2:0,2; 1:3:0,2; 1:4:0,2; dan 1:5:0,2.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung. Variabel utama dalam penelitian ini adalah formula dari nanofitosom myricetin yang dibuat dengan fosfatidilkolin dan kolesterol dengan berbagai variasi konsentrasi.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah karakteristik, stabilitas dan mutu fisik dari fitosom myricetin (ukuran partikel).

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah metode pembuatan fitosom myricetin (alat dan lama sonikasi).

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan dalam berbagai variabel, antara lain variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas yaitu variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung yaitu konsentrasi fosfatidilkolin yang digunakan dalam pembuatan fitosom myricetin.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian ini yaitu karakterisasi fitosom myricetin meliputi ukuran partikel, zeta potensial, efisiensi penjerapan, stabilitas dan analisis morfologi.

Variabel terkendali 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 yaitu proses pembuatan fitosom myricetin dengan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Myricetin dengan proporsi fosfatidilkolin dan kolesterol. Fosfatidilkolin dan kolesterol merupakan fosfolipid yang dapat menentukan ukuran partikel pada nanofitosom myricetin yaitu kurang dari 1000 nm.

Ukuran partikel merupakan uji untuk mengetahui ukuran partikel dari nanofitosom myricetin yang dibuat. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari nanofitosom myricetin. Pengukuran ukuran partikel dilakukan dengan alat PSA (*Particle Size Analyzer*).

Zeta potensial merupakan prediktor yang baik dari fenomena gelasi karena potensial zeta mengatur derajat tolak-menolak antara partikel-partikel yang terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan. Potensial zeta merupakan uji untuk mengetahui dan mengkarakterisasi sifat muatan permukaan partikel yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Potensial zeta mencerminkan potensi muatan dari partikel dan dipengaruhi oleh komposisi dari partikel dan medium tempat nanopartikel terdispersi. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Zeta Analyzer*.

Efisiensi penjerapan merupakan analisis yang digunakan untuk mengetahui zat aktif yang terjerap dalam sistem pembawa fitosom dengan cara melakukan sentrifugasi fitosom kemudian pellet diukur dengan alat spektrofotometer UV-Vis dan dihitung sebagai obat yang tidak terjerap.

Stabilitas nanofitosom bertujuan untuk mengetahui stabilitas myricetin fitosom selama penyimpanan. Metode yang digunakan yaitu penyimpanan pada suhu kamar (27°C) selama 3 minggu.

Analisis morfologi merupakan analisis yang digunakan untuk membandingkan bentuk dan morfologi myricetin standar dengan nanofitosom yang mengandung myricetin. Analisis morfologi dilakukan dengan menggunakan TEM (*Transmission Electron Microscopy*).

### **C. Bahan dan Alat**

#### **1. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah myricetin (Tocris, China), *Phospholipon 90 G* (Lipoid, Jerman), kolesterol (*Merk*), etanol (*Merk*), kloroform (*Merk*), aquadest (*Merk*), *Phosphat Buffer Saline* (*Merk*).

#### **2. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10s, Thermo scientific), *rotary evaporator* (Heidolph), *probe sonicator* (QSonica, newtown, USA), alat uji ukuran partikel dan zeta potensial *particle size analyzer* (Malvern Panalytical, USA), *magnetic stirrer* (Thermo Scientific, China), pH meter (Eutech Instruments, Ecoscan hand-held series, Singapura), *sentrifuge* (SPLC Series, Gemmy 8 Hole, Taiwan), timbangan analitik (Ohaus), alat-alat gelas (Pyrex, Jepang) dan non gelas yang terdapat di laboratorium.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Verifikasi metode analisis**

**1.1 Linearitas.** Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan induk myricetin dalam pelarut etanol 96% dan dapar fosfat pH 7,4 yaitu 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm dan 16 ppm pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat persamaan garis regresi linear dan ditentukan koefisien korelasi (nilai *r*). Hasil ini selanjutnya digunakan untuk menentukan linearitas.

**1.2 Penentuan LOD dan LOQ.** Batas deteksi dan batas kuantifikasi penetapan kadar myricetin ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan membuat lima seri konsentrasi di bawah konsentrasi terkecil uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai  $b$  (*slope*) pada persamaan regresi linier  $y=a+bx$ , sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residual ( $Sy/x$ ). Batas deteksi dan kuantifikasi dapat ditentukan dengan persamaan:

$$LOQ = \frac{10 Sy/x}{b} \dots\dots\dots 5$$

$$LOD = \frac{3,3 Sy/x}{b} \dots\dots\dots 6$$

**1.3 Akurasi.** Akurasi merupakan kedekatan hasil uji antara hasil yang diperoleh dengan nilai sebenarnya atau dengan nilai referensinya, selain itu akurasi juga dapat menggambarkan kesalahan sistematik dari suatu hasil pengukuran (Chan *et al.* 2004). Nilai *recovery* yang diperoleh pada rentang % *recovery*, yaitu antara 80-120% untuk menyatakan bahwa metode analisis yang digunakan memiliki akurasi yang baik.

**1.4 Presisi.** 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. Uji presisi dilakukan dengan mengaspirasikan larutan standar dengan konsentrasi tertentu pada alat spektrofotometri serapan atom sebanyak lima kali aspirasi. Kemudian dihitung nilai *Standart Deviation* (SD) dan *Relatif Standary Deviation* (RSD). Standar Deviasi adalah akar jumlah kuadrat deviasi masing-masing penetapan terhadap mean dibagi dengan derajat kebebasan. Standar Deviasi dinyatakan dengan rumus:

$$SD = \frac{\sum (X-x)^2}{N-1} \dots\dots\dots 7$$

Keterangan:

X = nilai masing-masing pengukuran

x = rata-rata dari pengukuran

N = frekuensi penetapan

N-1 = derajat kebebasan

Nilai SD disebut sebagai varian ( $v$ ),  $\sqrt{v}$  nilai SD dari serangkaian pengukuran yang semakin kecil sebanding dengan semakin cepatnya metode yang digunakan (Gandjar & Rohman 2007). *Standart Deviasi Relative* (RSD) atau *Coefficient of Variation* (CV) umumnya dinyatakan dalam %. Nilai RSD dari serangkaian pengukuran yang semakin kecil sebanding dengan semakin tepatnya metode yang digunakan. *Standart Deviasi Relative* dinyatakan dengan rumus:

$$RSD = \frac{100 \times SD}{X} \dots\dots\dots 8$$

Keterangan:

RSD = standart deviasi relatif

SD = standart deviasi

X = rata-rata

Kriteria ketelitian diberikan apabila metode memberikan hasil simpangan baku relative atau koefisien variasi  $\leq 2\%$  (Harmita, 2004).

## 2. Percobaan pendahuluan

Percobaan pendahuluan dilakukan untuk menentukan kondisi percobaan terbaik dan komposisi bahan yang sesuai untuk menghasilkan sediaan fitosom myricetin yang stabil dan homogen dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.

**Tabel 1. Komposisi formula fitosom myricetin**

Komposisi	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
Myricetin (mg)	10	10	10	10	10
Fosfatidilkolin (mg)	24	48	71	95	118
Kolesterol (mg)	2	2	2	2	2
Etanol 96% (ml)	5	5	5	5	5
Kloroform (ml)	1	1	1	1	1
Etanol 96% ad (ml)	20	20	20	20	20

Ket: Formula 1 menggunakan perbandingan mol Myricetin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:1:0,2)

Formula 2 menggunakan perbandingan mol Myricetin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:2:0,2)

Formula 3 menggunakan perbandingan mol Myricetin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:3:0,2)

Formula 4 menggunakan perbandingan mol Myricetin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:4:0,2)

Formula 5 menggunakan perbandingan mol Myricetin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:5:0,2)

### 3. Pembuatan myricetin fitosom

**1.1 Hidrasi lapis tipis.** Metode pembuatan fitosom dengan cara hidrasi lapis tipis, myricetin ditimbang sebanyak 10 mg untuk semua formula dan dilarutkan dalam etanol 96% 5 ml. Campuran bahan tambahan dari vesikel yaitu fosfatidilkolin (*Phospholipon 90 G*) dilarutkan dalam etanol 96% dan kolesterol dilarutkan dalam pelarut kloroform, kemudian dicampur di dalam labu alas bulat. Larutan yang terbentuk dalam labu alas bulat dievaporasi pada suhu 45°C kecepatan 50 rpm agar lipid terdeposit dari pelarut dalam bentuk lapis tipis pada permukaan dinding labu. Larutan dapar *Phosphat Buffer Saline* 20 ml pH 7,4 ditambahkan pada lapisan lipid sehingga lipid akan terhidrasi. Vesikel multilamellar yang dihasilkan diproses lebih lanjut melalui sonikasi untuk mengoptimalkan penyerapan obat (Babazadeh *et al.* 2018).

**1.2 Sonikasi.** Sonikasi merupakan vibrasi suara dengan frekuensi melebihi batas pendengaran manusia yaitu di atas 20 KHz (Tipler 1998). Ultrasonikasi merupakan salah satu teknik paling efektif dalam pencampuran, proses reaksi, dan pemecahan bahan dengan bantuan energi tinggi (Pirrung 2007). Batas atas rentang ultrasonik mencapai 5 MHz untuk gas dan 500 MHz untuk cairan dan padatan (Mason & Lorimer 2002). Larutan dapar *Phosphat Buffer Saline* 20 ml pH 7,4 ditambahkan pada lapisan fitoaktif-fosfolipid pada gelas vial. Campuran fitoaktif-fosfolipid disonikasi selama beberapa waktu tertentu sehingga dihasilkan vesikel kecil, uniform dan unilamellar (Blazek 2001; Verma 2010; Tarekegn 2010; Arora 2007). Larutan dispersi fosfolipid dihomogenkan dan disonikasi menggunakan *probe sonicator* selama 3 menit dengan amplitudo 50%.

### 4. Karakterisasi myricetin fitosom

**4.1 Penetapan distribusi ukuran partikel dan potensial zeta.** Untuk mengetahui ukuran sediaan nanopartikel dilakukan pengukuran ukuran dan distribusi nanopartikel menggunakan alat PSA. Untuk mengetahui nilai potensial zeta diukur menggunakan *zeta potensial analyzer*.

**4.2 Pengujian morfologi fitosom.** Penentuan bentuk partikel fitosom dilakukan menggunakan TEM. Sampel nanoliposom diencerkan 10 kali dengan aquadest deionisasi untuk mengurangi konsentrasi vesikel. Dengan volume yang

sama dari sampel yang telah diencerkan, ditambah larutan amonium molibdat (2%) dan dibiarkan selama 3 menit pada suhu kamar. Larutan diambil satu tetes kemudian ditempatkan pada grid tembaga berlapis Formvar-carbon (mesh 200, diameter HF36 3 mm) selama 5 menit. Setelah grid dikeringkan pada suhu kamar selama 5 menit, mikrograf dibuat dengan menggunakan Philips CM20 *Transmission Electron Microscope* beroperasi pada 200 kV. Mikrograf direkam menggunakan kamera Olympus TEM CCD (Colas *et al.* 2007).

## 5. Efisiensi penjerapan

Fitosom disentrifugasi dan supernatan dipisahkan. Pellet yang diperoleh dicuci kemudian disuspensikan kembali untuk mendapatkan fitosom yang bebas dari obat terjerap. Fitosom disentrifugasi selama 50 menit pada 50.000 rpm dengan tujuan untuk memisahkan obat yang tidak terjerap. Jumlah obat bebas (FD0) ditentukan pada supernatan. Supernatan hasil sentrifugasi ditetapkan kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Pham *et al.* 2012).

**1.1 Pembuatan larutan induk.** Pembuatan larutan induk myricetin dengan konsentrasi 100 ppm dibuat dengan cara melarutkan 10 mg myricetin dalam 10 ml etanol 96%, dimasukkan dalam labu takar 100 ml, dan ditambahkan *dapar phosphate* pH 7,4 sampai tanda batas (El-Gawad *et al.* 2014).

**1.2 Penetapan panjang gelombang maksimum.** Larutan induk myricetin dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan dengan nilai serapan yang paling tinggi (El-Gawad *et al.* 2014).

**1.3 Penetapan *operating time*.** Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui kestabilan suatu senyawa. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk myricetin pada panjang gelombang maksimum myricetin, dibaca mulai dari menit ke 0 sampai menit ke 30 untuk mendapatkan nilai serapan yang stabil.

**1.4 Pembuatan larutan seri kurva kalibrasi.** Seri konsentrasi 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm dan 16 ppm kemudian masing-masing diencerkan sampai tanda batas dengan larutan *dapar fosfat*. Seri larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum myricetin,

dibuat kurva regresi linear antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi myricetin sehingga diperoleh persamaan *regresi linear* yang selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar myricetin dalam uji efisiensi penyerapan (El-Gawad *et al.* 2014).

## 6. Stabilitas nanofitosom

Uji stabilitas nanofitosom yaitu dengan penyimpanan pada suhu kamar (27°C) selama 3 minggu. Selama penyimpanan dilakukan pengamatan terjadinya pemisahan fase, perubahan fisik dan kimia dari sediaan.

## 7. Uji aktivitas antioksidan

**7.1 Pembuatan larutan uji.** Myricetin ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan pelarut etanol p.a. dalam *beaker glass*, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan etanol p.a. hingga tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi baku myricetin 100 ppm. Larutan stok diambil 5 mL lalu dimasukkan dalam labu takar 50 mL dan ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas, sehingga menghasilkan konsentrasi 10 ppm.

**7.2 Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM.** DPPH ditimbang sebanyak 15,8 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a. dalam *beaker glass*, dimasukkan dalam labu takar 100 mL, ditambahkan etanol p.a.hingga tanda batas.

**7.3 Penentuan panjang gelombang maksimum.** Pada tiga labu ukur 10 mL dimasukkan masing-masing 0,5; 1,0; dan 1,5 mL larutan DPPH, kemudian ditambahkan etanol p.a. hingga tanda batas, diperoleh konsentrasi DPPH 7,9; 15,8; dan 23,7 mikrogram/mL. Larutan divorteks selama 30 detik, kemudian dilakukan *scanning* panjang gelombang maksimum pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

**7.4 Penentuan *Operating Time* (OT).** Pada labu takar 10 mL dimasukkan 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM dan 1,0 mL konsentrasi dari seri konsentrasi masing-masing larutan uji (myricetin murni, sampel nanofitosom myricetin dan fosfolipid). Etanol p.a. ditambahkan hingga tanda batas dan divorteks selama 30 detik. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah didapat dengan interval waktu 5 menit selama 1 jam.

**7.5 Pengukuran absorbansi larutan DPPH (kontrol).** Sebanyak 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM dimasukkan dalam labu takar 10 mL ditambahkan etanol

p.a. hingga tanda batas. Larutan dibaca absorbansinya berdasarkan OT dan panjang gelombang maksimum.

**7.6 Pengukuran absorbansi larutan uji, dan sampel nanofitosom myricetin.** Sebanyak 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM dicampur dengan 1,0 mL masing-masing seri konsentrasi larutan uji. Kemudian masing-masing campuran divorteks selama 30 detik dan dibiarkan selama OT. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh. Pengukuran absorbansi dilakukan pada myricetin murni, sampel nanofitosom myricetin dan fosfolipid.

**7.7 Pembuatan kurva regresi linier.** Nilai absorbansi larutan uji dan blanko yang telah didapat digunakan untuk mendapatkan nilai % Peredaman menggunakan persamaan (Rohman *et al.* 2005):

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \dots\dots\dots 4$$

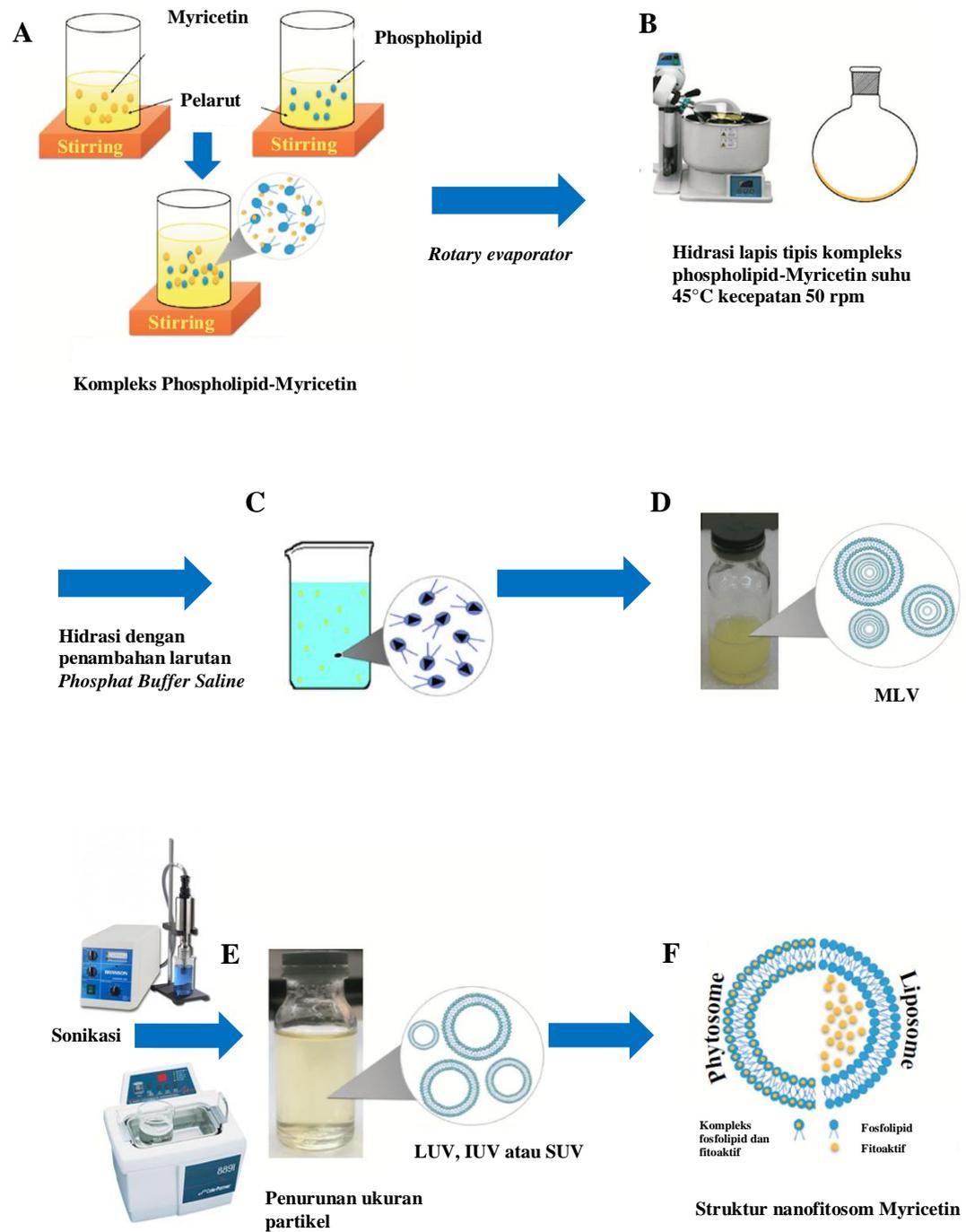
Kurva regresi dibuat antara konsentrasi larutan uji (sumbu x) dan % Peredaman (sumbu y) untuk masing-masing larutan uji. Konsentrasi larutan uji untuk myricetin murni, sampel nanofitosom myricetin dan fosfolipid yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Besarnya daya antioksidan ( $IC_{50}$ ) ditentukan dengan menggunakan regresi linier yang telah didapatkan.

## **E. Analisis Hasil**

Analisis hasil dilakukan 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 fitosom myricetin, misalnya pengacuan data hasil pengujian dengan referensi secara teori yang ada, dengan demikian hasil penelitian dengan referensi teori tersebut dibandingkan satu sama lainnya. Pengacuan terhadap referensi teori dilakukan untuk menghindari adanya kesalahan dalam penelitian.

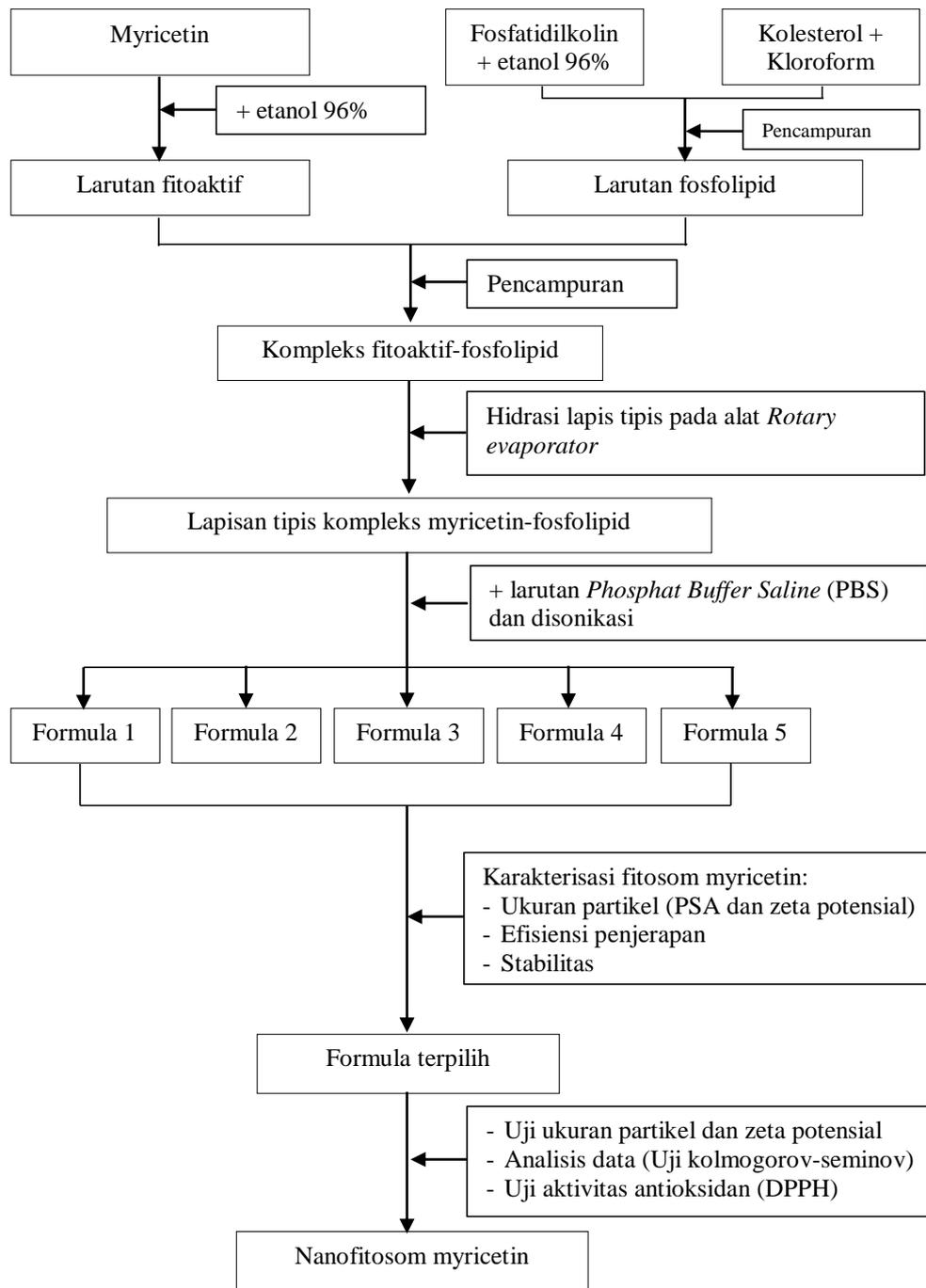
## F. Skematis Jalannya Penelitian

### 1. Preparasi kompleks nanofitosom



Gambar 1. Skema preparasi nanofitosom

## 2. Skematis jalannya penelitian



Gambar 2. Skema jalannya penelitian