

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Percobaan Pendahuluan**

Penelitian awal dilakukan untuk mengetahui kondisi percobaan dan metode pembuatan yang dapat menghasilkan nanofitosom yang stabil dan homogen. Metode percobaan yang digunakan adalah pembuatan nanofitosom dengan hidrasi lapis tipis serta kondisi percobaan pendahuluan waktu penggunaan sonikator *probe*. Myricetin fitosom berhasil diformulasikan dengan menggunakan kombinasi metode hidrasi lapis tipis dan sonikasi karena diperoleh sediaan fitosom yang mempunyai ukuran partikel yang kecil. Pemilihan metode hidrasi lapis tipis karena prosesnya cepat, mudah, sederhana dan dapat menarik semua pelarut organik hingga sempurna. Metode sonikasi sangat berperan dalam pembentukan nanofitosom, penggunaan gelombang ultrasonik dalam pembentukan partikel berukuran nano sangat efektif karena gelombang ultrasonik dapat menimbulkan efek kavitasi. Efek kavitasi dapat memisahkan *agglomeration* (penggumpalan partikel).

Komposisi nanofitosom yaitu fosfatidilkolin dan kolesterol. Kolesterol berguna untuk membentuk suatu kerangka yang kaku dan dapat mencegah terjadinya kebocoran pada molekul surfaktan yang telah menjerap zat aktif. Surfaktan yang digunakan dalam formula ini adalah fosfatidilkolin yang memiliki gugus hidrofilik di bagian kepalanya dan gugus hidrofobik di bagian ekornya yang secara spontan akan membentuk vesikel dengan struktur yang mirip dengan membran sel saat dihidrasi. Perpaduan kolesterol dengan surfaktan memberikan pengaruh pada stabilitas dan permeabilitas gelembung. Kolesterol akan mengepak barisan molekul lipid dari fosfatidilkolin pada struktur bilayer nanofitosom. Pengepakan ini bertujuan untuk menghindari kebocoran dari lapisan fitosom sehingga obat yang terjerap di dalam fitosom tidak mudah keluar. Penggunaan kolesterol yang terlalu banyak dapat membuat fitosom menjadi kaku sehingga menyebabkan proses absorpsi, distribusi dan pelepasan obat dari fitosom menjadi lebih sukar (Kumar 2011).

## **B. Pembuatan Nanofitosom Myricetin**

Nanofitosom dibuat dengan cara melarutkan myricetin dalam 10 ml etanol 96%, fosfatidilkolin dilarutkan dalam 10 ml etanol 96% dan kolesterol dilarutkan dalam kloroform. Larutan fitoaktif dan fosfolipid dicampur menggunakan *magnetic stirrer* suhu 35°C kecepatan 2000 rpm selama 15 menit, kompleks nanofitosom dibuat lapisan tipis pada *rotary evaporator* suhu 45°C kecepatan 50 rpm hingga fase etanol dan kloroform menguap. Lapisan tipis yang terbentuk pada dinding labu alas bulat dihidrasi dengan *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7,4 ditandai dengan terbentuknya dispersi koloid. Hidrasi dilakukan dengan menggunakan PBS karena hidrasi adalah proses masuknya air ke dalam vesikel, hidrasi bertujuan untuk mengembangkan vesikel dan mengoptimalkan penyerapan zat aktif. Zat aktif yang terperap dalam fitosom dapat berasal dari obat dengan berat molekul rendah maupun tinggi. Zat aktif terperap karena terjadi interaksi antara zat aktif dengan bagian hidrofilik atau campuran keduanya. Dispersi koloid yang terbentuk disonikasi menggunakan sonikasi *probe* selama 3 menit dengan amplitudo 50% untuk memperkecil ukuran partikel, membentuk nanofitosom yang stabil dan homogen.

## **C. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan *Operating Time***

Penentuan panjang gelombang maksimum dimaksudkan untuk mendapatkan nilai absorpsivitas yang memberikan sensitivitas pengukuran tertinggi (Kusumawardhani *et al.* 2015). Hasil penentuan panjang gelombang maksimum pada medium aquadest p.a adalah 358 nm dan dalam medium dapar fosfat pH 7,4 diperoleh panjang gelombang 365 nm dengan serapan terbesar. Hasil tersebut menunjukkan adanya perubahan panjang gelombang maksimum myricetin pada medium dapar fosfat pH 7,4. Panjang gelombang maksimum teoritis myricetin adalah 369 nm (Yashu *et al.* 2014). Perubahan panjang gelombang maksimum myricetin disebabkan karena adanya gugus ausokrom pada myricetin yang terikat pada gugus kromofor sehingga mengakibatkan pergeseran pita absorpsi menuju panjang gelombang yang lebih besar (Tulandi *et al.* 2015).

Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu stabil suatu senyawa yang akan dianalisis. Larutan yang stabil ditunjukkan dengan serapan yang

tidak berubah pada waktu tertentu. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk myricetin pada panjang gelombang maksimum myricetin mulai dari menit ke-0 sampai menit ke-30. Hasil serapan stabil pada medium aquadest p.a yaitu pada menit 11-14 dan pada medium dapar fosfat pH 7,4 serapan stabil pada menit ke 14-17.

#### **D. Kurva Kalibrasi**

##### **1. Penentuan panjang gelombang maksimum**

Panjang gelombang maksimum dari serbuk myricetin dilakukan scanning larutan myricetin dengan konsentrasi 100 ppm. Serbuk myricetin sebanyak 10 mg dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 5 ml, selanjutnya ditambah larutan dapar fosfat pH 7,4 pada labu takar 100 ml hingga tanda batas. Larutan baku dibaca serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm hingga didapatkan absorbansi yang stabil dan konstan. Hasil pengukuran menunjukkan puncak serapan pada panjang gelombang 365 nm dengan serapan terbesar 0,4477. Menurut Yashu (2013), panjang gelombang maksimum myricetin sebesar 369 nm. Perbedaan hasil panjang gelombang yang didapatkan dengan literatur dapat dipengaruhi oleh proses preparasi dan kondisi lingkungan. Hasil tersebut tidak berbeda secara signifikan sehingga panjang gelombang maksimum yang didapatkan selanjutnya dapat digunakan untuk menentukan kurva kalibrasi dan efisiensi penjerapan nanofitosom myricetin.

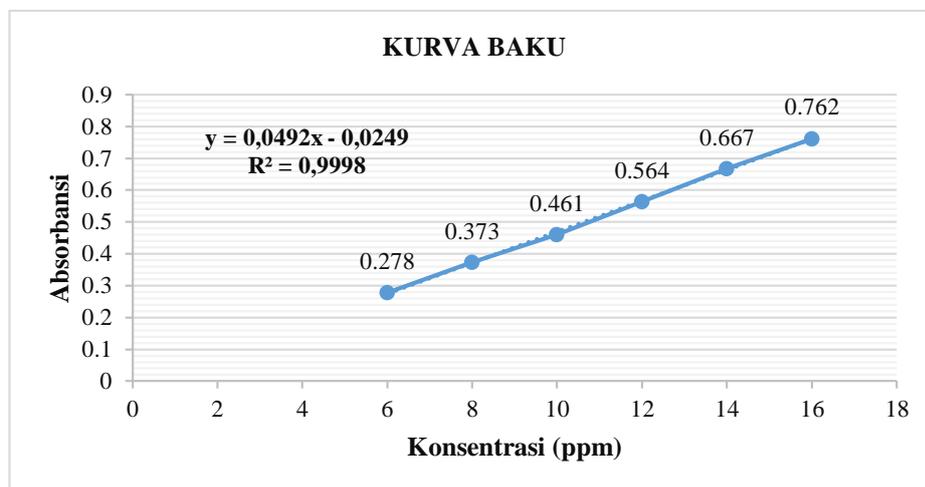
##### **2. Penentuan operating time**

Penentuan *operating time* bertujuan untuk melihat kestabilan reaksi suatu senyawa yang dianalisis. Larutan yang stabil ditunjukkan dengan serapan yang konstan pada waktu tertentu, pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk myricetin pada panjang gelombang maksimum myricetin. Serapan dibaca mulai dari menit ke-0 sampai menit ke-30, selanjutnya didapatkan nilai serapan yang konstan yaitu 0,412 secara berturut-turut pada menit ke-14 sampai menit ke-17.

##### **3. Kurva kalibrasi**

Kurva kalibrasi myricetin dalam medium dapar fosfat pH 7,4 dengan seri konsentrasi 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm dan 16 ppm. Seri konsentrasi

dibaca serapannya sebanyak tiga kali replikasi pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum myricetin yaitu 365 nm. Regresi linier antara konsentrasi (ppm) dengan absorbansi myricetin ditunjukkan pada gambar 14.



Gambar 1. Kurva kalibrasi

Hasil persamaan regresi linier dengan pelarut dapar fosfat pH 7,4 yang diperoleh yaitu  $y = -0,0249 + 0,0492x$  dengan koefisien relasi sebesar 0,9998. Hasil persamaan regresi linier diperoleh koefisien korelasi mendekati +1 sehingga pasangan data variabel x dan y memiliki korelasi linier positif kuat (Utama 2016).

## E. Verifikasi Metode Analisis

### 1. Linieritas

Linieritas adalah kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Koefisien korelasi adalah parameter yang paling umum digunakan untuk mengetahui linieritas suatu metode. Nilai koefisien relasi merupakan indikator kualitas dari parameter linieritas yang menggambarkan respon analitik (luas area) terhadap konsentrasi yang diukur. Menurut Sarwono (2009) jika nilai koefisien korelasi  $0,75 < r \leq 0,99$  maka artinya korelasi sangat kuat. Hasil nilai koefisien korelasi pada medium dapar fosfat pH 7,4 sebesar 0,9998 menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proporsional antara respon analitik dengan konsentrasi yang diukur karena nilai koefisien korelasi  $\leq 0,99$ .

## 2. Penentuan 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. Statistik perhitungan LOD dan LOQ diperoleh melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. LOD dan LOQ menunjukkan kesensitifan dari suatu metode, semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin sensitif metode yang digunakan (Harvey 2000).

Penentuan LOD dihitung berdasarkan standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (slope) kurva baku pada level yang mendekati LOD sesuai dengan rumus, standar deviasi dapat ditentukan berdasarkan intersep y pada garis regresi linier (Gandjar & Rohman 2012). Hasil penentuan LOD dan LOQ ditunjukkan pada tabel 3.

**Tabel 1. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)**

Parameter	Hasil
R (Koefisien determinasi)	0,9998
Batas deteksi (LOD)	0,4363 ppm
Batas kuantifikasi (LOQ)	1,3221 ppm

Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa keberadaan myricetin dalam medium dapar fosfat pH 7,4 dapat dideteksi apabila kadar yang terkandung lebih dari atau sama dengan 0,4363 ppm dan apabila dimasukkan dalam persamaan regresi linier  $y = -0,0249 + 0,0492x$  diperoleh nilai serapan  $-0,0034$  yang berarti bahwa nilai respon di bawah batas deteksi tidak dapat diterima dalam analisis analit. Konsentrasi myricetin terendah dalam dapar fosfat pH 7,4 yang dapat diterima adalah 1,3221 ppm dan apabila dimasukkan dalam persamaan regresi linier  $y = -0,0249 + 0,0492x$  diperoleh nilai serapan  $0,0401$  yang menunjukkan nilai serapan terendah yang dapat diterima dalam analisis analit.

## 3. Akurasi

Akurasi bertujuan untuk mengetahui kedekatan antara nilai terukur dengan nilai sebenarnya yang ditunjukkan dengan persen perolehan kembali (% *recovery*). Akurasi dilakukan pada tiga konsentrasi yaitu 10 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm dengan replikasi tiga kali pada masing-masing konsentrasi. Kriteria penerimaan rata-rata

perolehan kembali dari ketiga konsentrasi adalah 95%-105%. Hasil akurasi ditunjukkan pada tabel 4.

**Tabel 2. Hasil akurasi**

Konsentrasi	Absorbansi	Konsentrasi terukur (ppm)	Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Konsentrasi (%)	% recovery	Rata-rata % recovery
80%	0,497	10,6112	10	106	106%	105%
	0,499	10,6518	10	107		
	0,492	10,5095	10	105		
100%	0,598	12,6646	12	106	106%	105%
	0,596	12,6240	12	105		
	0,601	12,7256	12	106		
120%	0,684	14,4132	14	103	103%	
	0,687	14,4742	14	103		
	0,689	14,5148	14	104		

Dari hasil penelitian didapatkan rata-rata persen perolehan kembali sebesar 105% sehingga memenuhi rentang akurasi yang dipersyaratkan yaitu 95%-105%.

#### 4. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan diekspresikan sebagai simpangan baku relatif (Gandjar & Rohman 2014). Dalam validasi metode analisis presisi dilakukan pada konsentrasi 10 ppm dengan replikasi sepuluh kali. Hasil presisi ditunjukkan pada tabel 5.

**Tabel 3. Hasil presisi**

Replikasi	Absorbansi	Konsentrasi terukur (ppm)	Konsentrasi sebenarnya (ppm)
1	0,475	10,1639	10
2	0,480	10,2655	10
3	0,479	10,2452	10
4	0,489	10,4485	10
5	0,484	10,3468	10
6	0,488	10,4282	10
7	0,492	10,5095	10
8	0,480	10,2655	10
9	0,473	10,1232	10
10	0,484	10,3468	10

Kriteria penerimaan RSD yaitu  $<2\%$ , berdasarkan hasil penelitian didapatkan nilai RSD presisi adalah  $1\%$  sehingga memenuhi kriteria yang dipersyaratkan.

## F. Karakterisasi Nanofitosom Myricetin

### 1. Analisis Ukuran Partikel

Ukuran partikel merupakan karakteristik yang paling penting dalam suatu sistem nanopartikel karena menentukan kecepatan dan kemudahan obat untuk terabsorpsi secara optimal. Ukuran partikel nanofitosom myricetin diukur dengan menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*).

Penggunaan fosfolipid berpengaruh terhadap ukuran partikel dan kestabilan dispersi nanopartikel yang dihasilkan. Hasil analisis ukuran partikel nanofitosom myricetin menunjukkan bahwa formula 1 hingga formula 5 sudah memenuhi rentang ukuran nanopartikel yaitu 10-1000 nm (Jonassen 2014). Hasil analisis ukuran partikel ditunjukkan pada tabel 6.

**Tabel 4. Hasil analisis ukuran partikel**

Ukuran partikel	Formula				
	1	2	3	4	5
Replikasi 1	905,2	688,5	163,5	211,2	139,1
Replikasi 2	912,2	471,8	155,9	197,9	139,2
Replikasi 3	930,5	619,1	192,9	211,1	140,1
Rata-rata $\pm$ SD	915,967 13,064	539,133 110,659	170,767 19,541	206,733 7,650	139,467 0,551

Hasil penelitian menunjukkan bahwa formula 5 dengan perbandingan konsentrasi myricetin:fosfatidilkolin:kolesterol (1:5:0,2) memiliki ukuran partikel yang paling kecil yaitu 139,467 0,551. Konsentrasi fosfatidilkolin yang lebih besar daripada myricetin dapat mengikat myricetin dengan sempurna karena 1 molekul fitokonstituen akan diikat oleh 1 molekul fosfatidilkolin sehingga ikatannya lebih kuat. Penambahan kolesterol pada formula dapat meningkatkan stabilitas fisik nanofitosom selama lebih dari 21 hari. Kolesterol dalam nanofitosom berfungsi

untuk meningkatkan stabilitas, menurunkan porositas, mencegah agregasi dan fusi dari nanofitosom.

Kolesterol merupakan steroid yang menyebabkan perubahan fluiditas dan permeabilitas dari bilayer fitosom. Kolesterol merupakan molekul ampifilik, dimana gugus OH-nya akan mengarah pada fase air, dan rantai alifatiknya akan mengarah pada rantai hidrokarbon dari surfaktan. Kekuatan yang terjadi pada fitosom disebabkan karena adanya kerangka steroid yang kaku dan berinteraksi dengan molekul surfaktan sehingga membatasi pergerakan karbon dari rantai hidrokarbon surfaktan. Kolesterol juga dapat mencegah terjadinya kebocoran pada molekul surfaktan yang telah menyerap zat aktif (Du *et al.* 2015).

## 2. Indeks Polidispersitas (IP)

IP adalah nilai yang menyatakan luasnya distribusi ukuran partikel di dalam suatu sediaan. IP bernilai  $\leq 0,5$  untuk partikel monodispersi, sedangkan  $IP > 0,5$  menyatakan sistem nanopartikel dengan distribusi ukuran partikel yang sangat luas (polidispersi). Nilai indeks polidispersitas terbaik yaitu  $< 0,5$  karena semakin kecil nilai IP maka stabilitas nanofitosom semakin bagus. Hasil indeks polidispersitas ditunjukkan pada tabel 7.

Tabel 5. Hasil indeks polidispersitas

Indeks polidispersitas	Formula									
	1		2		3		4		5	
Replikasi 1	0,572		1,000		0,474		0,385		0,375	
Replikasi 2	0,484		1,000		0,417		0,405		0,387	
Replikasi 3	0,575		0,924		0,431		0,454		0,377	
Rata-rata $\pm$ SD	0,544	0,052	0,975	0,044	0,441	0,030	0,415	0,036	0,380	0,006

Nilai indeks polidispersitas yang paling kecil ditunjukkan pada formula 5 yaitu 0,380 0,006. Nilai indeks polidispersitas yang semakin kecil dikatakan sediaan memiliki ukuran yang homogen dengan partikel lainnya, hal ini menunjukkan bahwa nanofitosom myricetin sudah homogen.

## 3. Potensial Zeta

Potensial zeta adalah ukuran dari besarnya muatan elektrostatis partikel dalam dispersi. Potensial zeta diukur untuk mengetahui kestabilan koloid. Sistem

larutan koloid distabilkan oleh gaya tolak-menolak elektrostatik, di mana semakin besar gaya tolak-menolak antara partikel akan menyebabkan partikel akan sulit berdekatan untuk membentuk agregat. Nilai potensial zeta  $\pm 30$  mV memiliki stabilitas koloid yang baik. Uji potensial zeta hanya dilakukan pada formula 5 karena memiliki nilai ukuran partikel dan indeks polidispersitas yang paling kecil. Hasil potensial zeta ditunjukkan pada tabel 8.

**Tabel 6. Hasil potensial zeta**

Potensial zeta (mV)					
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata	SD
<b>Formula 5</b>	-4,570	-5,930	-5,680	-5,393	0,724

Hasil pengukuran potensial zeta pada nanofitosom myricetin formula 5 dari tiga kali replikasi memiliki nilai rata-rata -5,393, sehingga dinyatakan kurang stabil karena nilai potensial zeta masih rendah yaitu kurang dari  $\pm 30$  mV.

### **G. Penetapan Efisiensi Penjerapan**

Efisiensi penjerapan bertujuan untuk mengetahui jumlah myricetin yang terjerap dalam sistem pembawa nanofitosom. Sistem penghantaran obat harus memiliki kapasitas pemuatan obat yang tinggi dan bertahan lama. Kapasitas pemuatan obat (efisiensi penjerapan) pada umumnya dinyatakan dalam persen obat yang terjerap dalam fase lemak terhadap obat yang ditambahkan (Gregoriadis 2007).

Pengujian efisiensi penjerapan dilakukan dengan memisahkan obat yang tidak terjerap menggunakan teknik sentrifugasi. Uji efisiensi penjerapan dilakukan pada formula 3, 4 dan 5 karena memiliki nilai ukuran partikel yang lebih kecil dibandingkan formula 2 dan formula 3, serta memiliki nilai indeks polidispersitas  $\leq 0,5$  sehingga memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Nanofitosom myricetin formula 3, 4 dan 5 disentrifugasi selama 50 menit dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu kamar yang bertujuan untuk memisahkan zat aktif yang tidak terjerap. Supernatan hasil sentrifugasi dari formula 3, 4 dan 5 masing-masing diambil sebanyak 0,5 ml kemudian diencerkan dengan larutan PBS pH 7,4 hingga 10 ml, kemudian dibaca serapannya sebanyak tiga kali replikasi menggunakan

spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 365 nm. Penetapan kadar zat aktif yang tidak terjerap dihitung dengan menggunakan persamaan  $y = -0,0249 + 0,0492x$ . Hasil efisiensi penjerapan ditunjukkan pada tabel 9.

**Tabel 7. Hasil efisiensi penjerapan**

Efisiensi penjerapan	Formula		
	3	4	5
Replikasi 1	0,534	0,410	0,396
Replikasi 2	0,537	0,413	0,391
Replikasi 3	0,541	0,412	0,386
Rata-rata Absorbansi	0,537	0,412	0,391
%EE	88,57%	91,12%	91,54%

Hasil efisiensi penjerapan pada formula 3 sebesar 88,57% yang berarti myricetin sebanyak 88,57% terjerap di dalam komponen fosfolipid, formula 4 sebanyak 91,12% myricetin terjerap di dalam komponen fosfolipid dan pada formula 5 sebanyak 91,54% myricetin terjerap di dalam komponen fosfolipid. Dari hasil tersebut, masing-masing formula memasuki rentang efisiensi penjerapan yang baik yaitu >80%. Perbedaan efisiensi penjerapan dari setiap formula disebabkan karena perbedaan jumlah fosfolipid yang digunakan. Semakin banyak fosfatidilkolin yang ditambahkan ke dalam formula maka semakin meningkatkan efisiensi penjerapan nanofitosom. Formula nanofitosom myricetin yang memiliki efisiensi penjerapan paling tinggi adalah F5 yang memiliki konsentrasi fosfatidilkolin sebanyak 118 mg memiliki ukuran partikel 139 nm dan dapat menjerap myricetin cukup besar yaitu 91,54%.

## H. Stabilitas Nanofitosom Myricetin Selama Penyimpanan

### 1. Pengamatan secara visual

Nanofitosom myricetin disimpan pada suhu kamar (27°C) selama lebih dari 3 minggu. Warna nanofitosom myricetin dari minggu ke-0 hingga minggu ke-3 memiliki warna yang sama yaitu kekuningan. Bau yang dimiliki yaitu bau khas myricetin. Hasil stabilitas nanofitosom myricetin ditunjukkan pada tabel 10.

**Tabel 8. Stabilitas nanofitosom myricetin pada suhu kamar**

Formula	Minggu ke-1	Minggu ke-2	Minggu ke-3
1	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
2	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
3	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
4	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
5	Tidak ada endapan	Tidak ada endapan	Tidak ada endapan

Formula 1, 2, 3 dan 4 mengalami pengendapan, endapan yang terjadi bersifat reversibel karena dapat terdispersi kembali dengan cepat setelah dilakukan penggojokan. Endapan yang terbentuk hanya sedikit karena konsentrasi fosfatidilkolin yang digunakan lebih banyak daripada kolesterol, sehingga lipoid berperan sebagai emulgator yang dapat menahan terjadinya pengendapan. Kenaikan suhu akan meningkatkan energi kinetis dari partikel-partikel, sehingga memudahkan penggabungan antar partikel (beraglomerasi), suhu penyimpanan yang tidak sesuai menyebabkan rusaknya gerak brown. Gerak Brown adalah gerakan tidak beraturan atau gerak zig-zag partikel koloid. Hal ini terjadi karena adanya benturan yang tidak teratur dari partikel koloid dengan medium pendispersi. Gerak brown ini akan membuat partikel koloid terhindar dari pengendapan karena terus menerus bergerak (Wanibesak 2011). Formula 5 tidak mengalami pengendapan dan tetap jernih hingga lebih dari 3 minggu.

## 2. Analisis ukuran dan distribusi partikel setelah penyimpanan

Uji stabilitas setelah penyimpanan dilakukan pada suhu ruang selama 3 minggu. Uji stabilitas meliputi ukuran partikel, indeks polidispersitas dan potensial zeta. Hasil uji stabilitas ukuran partikel dan indeks polidispersitas ditunjukkan pada tabel 11.

**Tabel 9. Ukuran partikel sebelum dan sesudah penyimpanan**

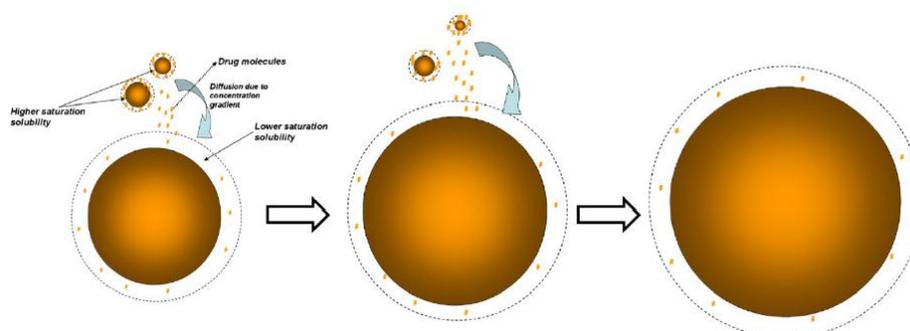
Formula	Ukuran Partikel (nm)		Indeks Polidispersitas	
	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah
F5	139,467 nm	164,960 nm	0,380	0,393

Berdasarkan Tabel 11 dapat dilihat bahwa setelah penyimpanan terjadi kenaikan ukuran partikel yaitu dari 139,467 nm menjadi 164,960 nm. Ukuran partikel selama penyimpanan masih dalam range ukuran nanofitosom yaitu 10 nm-1000 nm. Kenaikan ukuran nanofitosom bisa disebabkan karena terjadi ketidakstabilan fisika pada dispersi nanopartikel. Ketidakteraturan ukuran partikel dapat dilihat berdasarkan pengukuran nilai indeks polidispersitas. Formula 5 terjadi kenaikan indeks polidispersitas setelah penyimpanan yaitu dari 0,380 menjadi 0,393, kemungkinan partikel yang berukuran kecil saling menempel dan beraglomerasi menjadi partikel yang lebih besar.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan SPSS pada tes Kolmogorov Smirnov uji ukuran partikel memiliki signifikansi  $0,473 > 0,05$  dan indeks polidispersitas memiliki signifikansi  $0,999 > 0,05$ , maka data terdistribusi normal sehingga dilakukan uji selanjutnya yaitu dengan *Independent sample t-test* untuk mengetahui data sebelum dan sesudah penyimpanan memiliki perbedaan yang signifikan atau tidak signifikan. Uji ukuran partikel pada analisis *t-test* menunjukkan nilai *Equal variance not assumed* -13,884 dengan signifikansi  $< 0,05$  sehingga ukuran partikel sebelum dan sesudah penyimpanan memiliki perbedaan yang signifikan. Uji indeks polidispersitas pada analisis *t-test* menunjukkan nilai *Equal variance not assumed* -1,463 dengan signifikansi  $0,200 > 0,05$  sehingga indeks polidispersitas sebelum dan sesudah penyimpanan tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil data statistik ditunjukkan pada lampiran 16.

Peningkatan ukuran partikel setelah penyimpanan dapat dijelaskan melalui mekanisme *ostwald ripening*. Ukuran partikel kecil (nm) memiliki kelarutan yang lebih tinggi daripada ukuran partikel yang besar ( $\mu\text{m}$ ), sehingga zat aktif akan berdifusi menuju ukuran partikel yang lebih besar sehingga ukuran partikel yang lebih besar akan semakin besar dan ukuran partikel yang kecil akan semakin kecil.

*Ostwald ripening* tidak hanya mengakibatkan perbesaran ukuran partikel tetapi juga ketidakseragaman distribusi ukuran partikel sehingga ukuran partikel menjadi bervariasi.



**Gambar 2. Mekanisme *ostwald ripening* (Wu 2010)**

Hasil pengukuran potensial zeta selama penyimpanan dapat ditunjukkan pada tabel 12.

**Tabel 10. Nilai potensial zeta setelah penyimpanan**

Formula	Potensial Zeta (mV) $\pm$ SD	
	Sebelum	Sesudah
F5	-5,393 $\pm$ 0,724	-6,350 $\pm$ 0,4242

Potensial zeta mengindikasikan muatan dari partikel dalam medium spesifik. Potensial zeta mengatur derajat tolak-menolak antar partikel terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan (Sinko 2012). Nilai potensial zeta yang tinggi (negatif atau positif) mencegah terjadinya agregasi dari partikel karena adanya gaya tolak-menolak dan adanya stabilitas elektrik dari dispersi nanopartikel. Nilai potensial zeta dari suatu partikel yang terlalu kecil, akan terjadi gaya tarik-menarik yang lebih besar dibandingkan gaya tolak-menolak sehingga menyebabkan terjadinya koagulasi dan flokulasi. Nanopartikel dengan nilai potensial zeta  $\pm 30$  mV memiliki derajat stabilitas yang tinggi. Dispersi dengan nilai potensial zeta rendah akan menghasilkan agregat karena ikatan *Van Der Waals* antar partikel (Ronson 2012). Hasil pengujian potensial zeta dari nanofitosom myricetin sebelum penyimpanan adalah -5,393 mV dan setelah penyimpanan adalah -6,350 mV. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan nilai potensial zeta yang kurang stabil karena nilai potensial zeta kurang dari  $\pm 30$  mV dan gaya tarik-menarik antar

partikel yang terdapat di dalam nanofitosom cenderung lebih besar dibandingkan gaya tolak-menolak antar partikel.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan SPSS pada tes Kolmogorov Smirnov uji zeta potensial memiliki signifikan  $0,891 > 0,05$  maka data terdistribusi normal sehingga dilakukan uji selanjutnya yaitu dengan *Independent sample t-test* untuk mengetahui data sebelum dan sesudah penyimpanan memiliki perbedaan yang signifikan atau tidak signifikan. Uji zeta potensial pada analisis *t-test* menunjukkan nilai *Equal variance not assumed* 2,084 dengan signifikan  $0,133 > 0,05$  sehingga zeta potensial sebelum dan sesudah penyimpanan tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil data statistik ditunjukkan pada lampiran 16.

## I. Uji Aktivitas Antioksidan

### 1. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penetapan panjang gelombang maksimum digunakan untuk mengetahui serapan maksimum zat aktif yang dapat dibaca oleh spektrofotometri UV-Vis secara optimum. Hasil penetapan panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 516 nm dengan absorbansi  $0,8619 \text{ \AA}$ . Panjang gelombang maksimum DPPH pada serapan 515-520 nm (Molyneux 2004). Panjang gelombang yang diperoleh memasuki kriteria maksimum serapan DPPH.

### 2. Penentuan operating time

Penentuan *operating time* bertujuan untuk menentukan waktu pengukuran yang stabil ketika suatu zat aktif direaksikan dengan DPPH. Hasil *operating time* DPPH larutan uji pada panjang gelombang 516 nm selama 60 menit didapatkan hasil *operating time* memberikan serapan yang stabil pada menit ke 38-39 menit dengan nilai absorbansi  $0,454 \text{ \AA}$ .

### 3. Uji aktivitas antioksidan

Metode penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil ( $\alpha, \alpha$ -difenil- $\beta$ -pikrilhidrazil). DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dan tidak membentuk dimer akibat delokalisasi dari elektron bebas pada

seluruh molekul. Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode ini dapat diamati berdasarkan dari hilangnya warna ungu akibat tereduksinya DPPH oleh zat aktif yang mengandung aktivitas antioksidan. Intensitas warna dari larutan uji diukur melalui spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm. Hasil persen (%) inhibisi tersebut disubstitusikan dalam persamaan linier.  $IC_{50}$  didefinisikan sebagai jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan konsentrasi awal DPPH sebesar 50%.

Senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50 ppm ( $IC_{50} < 50$  ppm), kuat ( $50$  ppm  $< IC_{50} < 100$  ppm), sedang ( $100$  ppm  $< IC_{50} < 150$  ppm), lemah ( $150$  ppm  $< IC_{50} < 200$  ppm), dan sangat lemah ( $IC_{50} > 200$  ppm). Suatu zat mempunyai sifat antioksidan bila nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh berkisar antara 200-1000  $\mu$ g/mL (Molyneux 2004).

Mekanisme kerja senyawa antioksidan dalam meredam senyawa radikal salah satunya dengan mendonorkan elektron pada senyawa yang tidak stabil tersebut, sehingga dapat merubah radikal bebas yang tidak stabil menjadi senyawa yang lebih stabil. Nanofitosom myricetin diuji aktivitas antioksidan untuk mengetahui apakah terjadi perubahan aktivitas antioksidan myricetin sebelum dan sesudah dibuat nanofitosom. Basis nanofitosom juga diuji aktivitas antioksidan untuk mengetahui apakah mempunyai aktivitas antioksidan atau tidak.

Hasil uji menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang sangat kuat pada myricetin karena memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 11,7865 ppm. Uji aktivitas antioksidan pada sampel nanofitosom myricetin dilakukan pada formula 5 karena memiliki nilai efisiensi penyerapan yang paling tinggi. Nilai  $IC_{50}$  myricetin nanofitosom formula 5 sebesar 119,7920 ppm sehingga memiliki aktivitas antioksidan yang sedang. Kandungan dalam myricetin yang memberikan efek antioksidan terbesar adalah flavonoid. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Redha 2010). Hasil uji aktivitas antioksidan ditunjukkan pada lampiran 17.