

**FORMULASI DAN KARAKTERISASI Fisetin NANOKRISTAL
DENGAN METODE *TOP-DOWN* (SONIKASI)**



Oleh :

**Hadi Surya
20144255A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIABUDI
SURAKARTA
2018**

**FORMULASI DAN KARAKTERISASI Fisetin NANOKRISTAL
DENGAN METODE *TOP-DOWN* (SONIKASI)**

SKRIPSI



*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh :

**Hadi Surya
20144255A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIABUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

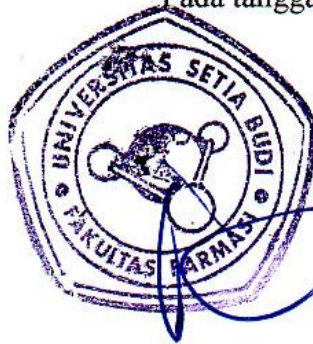
Berjudul:

**FORMULASI DAN KARAKTERISASI Fisetin NANOKRISTAL
DENGAN METODE *TOP-DOWN* (SONIKASI)**

Oleh:

Hadi Surya
20144244A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal :15 Januari 2018



Dekan,

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt

Surakarta, 15 Januari 2018

Pembimbing utama



Muhammad Dzakwan, M.Si., Apt

Pembimbing pendamping



Reslely Harjanti, M.Sc., Apt.

Penguji:

1. Ilham Kuncahyo, S.Si., M.Sc., Apt
2. Dr. Rina Herowati, M.Si., Apt
3. Dra. Suhartinah, M.Sc., Apt
4. Muhammad Dzakwan, M.Si., Apt



HALAMAN PERSEMBAHAN

"Man Jadda Wajada"

"Sesungguhnya Allah tidak mengubah keadaan suatu kaum sehingga mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri"
(ar-Ra'd:1)

"Allah akan mengangkat orang-orang yang beriman di antara kalian dan orang-orang yang berilmu beberapa derajat"
(QS. Al-Mujadilah: 21)

"Bagaimana aku akan takut dengan kemiskinan, bila aku hamba dari yang Maha Kaya"

Kupersembahkan karya ini untuk:

♥ Allah SWT dengan rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

♥ Ibu dan Bapakku tercinta yang senantiasa mendidik, menyayangi, dan mengusahakan segalanya untuk saya. Saya persembahkan ini sebagai wujud rasa hormat, bakti dan terimakasih yang mungkin tidak akan sebanding dengan apa yang telah Ibu dan Bapak berikan untuk saya.

♥ Kakak-kakakku dan saudaraku yang kusayangi serta seluruh keluarga yang selalu mendukung dan mendoakan saya.

♥ Untuk temanku dan sahabatku FSTOA 2017 bagiku kalian adalah orang yang sangat luar biasa.

♥ Untuk seseorang yang masih dalam misteri yang dijanjikan Ilahi yang siapapun itu.

♥ Agama, almamater, bangsa dan negara Indonesiaku

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, Januari 2018

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'H' followed by a series of vertical, wavy lines that resemble a signature.

Hadi Surya

KATA PENGANTAR



Assalamualaykum Warrahmatullahi Wabarakatuh.

Alhamdulillah segala puji bagi Allah SWT yang karena nikmatnya kebaikan-kebaikan menjadi indah dan karena karunianya niat-niat baik hamba-Nya dapat terlaksana, serta tak lupa semoga shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW kepada keluarganya, sahabatnya, para tabi'in, tabi'ut tabi'in, pengikutnya yang senantiasa berdiri diatas sunnahnya, serta kepada seluruh umatnya hingga akhir zaman yang menjadikan sebagai *uswatun hasanah*, suri tauladan yang baik sehingga memotivasi penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Formulasi dan Karakterisasi Nanokristal Fisetin dengan Metode *Top-Down* (Sonikasi)”

Skripsi ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm.) pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Dalam penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan, bimbingan, dan dorongan dari berbagai pihak.

Oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. RA Oetari, SU, MM, M.Sc., Apt. selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
2. Muhammad Dzakwan, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing utama
3. Reslely Harjanti, M.Sc., Apt selaku pembimbing pendamping
4. Dr. Gunawan Pamudji Widodo M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing akademik
5. Seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
6. Keluarga peneliti; Ombih Suhadiman, Nunung Fatimah, Totoh, Dede hermawati, Jajang sahidiman, Nanang Suryana dan Desi Susilawati.

7. Teman-teman Angkatan 2014 pada umumnya dan FST-OA 2014 pada khususnya.
8. Teman-teman upak-upuk family: Muksin Alkarim, Desi Ratna P, Ade Alfaruq, L. Sekar Nirwani, Hilda Khairunnisa S, Kiki Permata Sari, M. Rifky Giffary yang selalu memberikan motivasi dan dukungan untuk mengerjakan tugas kuliah maupun tugas akhir.
9. Team nanopharmaceutical angkatan 2014.
10. Keluarga Besar Himpunan Mahasiswa Jurusan S-1 Farmasi Universitas Setia Budi.
11. UPT-Lab dan Perpustakaan Universitas Setia Budi Surakarta.

Semoga Allah Subhanahu Wa Ta 'ala memberikan balasan yang lebih baik pada mereka semua.

Penulis menyadari bahwa hasil penelitian ini jauh dari sempurna, namun penulis berharap hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pihak lain yang berkepentingan.

Wassalamualaykum Warrahmatullahi Wabarakatuh.

Surakarta, Januari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Kegunaan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Nanopartikel.....	5
B. Nanokristal	6
C. Metode Pembuatan Nanokristal.....	7
1. Teknologi <i>bottom-up</i>	7
2. Teknologi <i>top-down</i>	8
2.1 <i>Pearl Milling (Ball Milling)</i>	8
2.2 <i>High Pressure Homogenizer</i> (homogenisasi tekanan tinggi)	8
2.3 Sonikasi	9
3. <i>Teknologi Smart Crystal</i>	10
D. Fisetin	11
E. Laju Disolusi	12
F. Bahan Penstabil.....	15
1. Penstabil Jenis Surfaktan	16

2.	Penstabil Jenis Polimer	17
G.	Studi Preformulasi	18
1.	Tween 80.....	18
2.	Na lauryl sulfat	19
3.	Poloxamer 188.....	20
4.	PVP (<i>Polyvinylpyrrolidone</i>)	20
5.	PVA.....	21
6.	HPMC	23
H.	Analisis dan Karakterisasi Nanokristal	24
1.	PSA (<i>Particle Size Analyzer</i>).....	24
2.	Zeta potensial.....	25
3.	Viskositas	27
4.	Liofilisasi/ <i>Freeze Drying</i>	27
5.	SEM (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)	28
6.	Kristanilitas dengan DSC.....	28
7.	Difraksi Sinar-X	29
8.	Uji Disolusi.....	31
I.	Landasan Teori.....	32
J.	Hipotesis.....	33
BAB III METODOLOGI PENELITIAN		34
A.	Populasi dan Sampel.....	34
B.	Variabel Penelitian.....	34
1.	Identifikasi variabel utama.....	34
2.	Klasifikasi variabel utama	34
3.	Definisi operasional variabel utama.....	35
C.	Bahan dan Alat.....	36
1.	Bahan.....	36
2.	Alat	36
D.	Jalannya Penelitian	37
1.	Percobaan pendahuluan.....	37
1.1	Skrining konsentrasi surfaktan dan polimer	37
1.2	Skrining waktu dan frekuensi pada <i>sonicator</i>	38
2.	Pembuatan fisetin nanosuspensi	38
3.	Karakterisasi fisetin nanosuspensi.....	38
3.1	Penetapan distribusi ukuran partikel dan potensial zeta.	38
3.2	Uji stabilitas fisik dalam penyimpanan.	39
4.	Pengeringandan karakterisasi fisetin nanokristal.	39
4.1.	Penentuan % rendemen dari fisetin nanokristal.	39
4.2.	Pengujian morfologi nanopartikel.	39
4.3.	Pengujian sifat kristalinitas.	39
4.4.	Uji kelarutan kinetik.....	39
5.	Pembuatan kurva kalibrasi.....	40
5.1.	Pembuatan dapar fosfat	40
5.2.	Pembuatan larutan induk.....	40

5.3.	Penetapan panjang gelombang maksimum	40
5.4.	Penetapan operating time	40
5.5.	Pembuatan larutan seri kurva kalibrasi	40
6.	Verifikasi metode spektrofotometer-UV	41
7.	Uji sisolusi fisetin nanokristal	41
E.	Analisis Hasil	41
F.	Skematis Jalannya Penelitian	42
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	43
A.	Percobaan Pendahuluan	43
1.	Skrining amplitude dan waktu pada sonikator	44
2.	Skrining stabilizer	45
B.	Pembuatan Fisetin Nanokristal	46
C.	Perhitungan % rendemen nanokrista fisetin	47
D.	Karakterisasi Fisetin Nanosuspensi	47
1.	Penetapan Distribusi dan Ukuran partikel	47
E.	Stabilitas Fisetin Nanokristal dalam Penyimpanan	48
1.	Pengamatan secara visual	48
F.	Pengukuran ukuran partikel sebelum dan setelah penyimpanan ...	49
G.	Pengujian Morfologi Nanopartikel	50
H.	Pengujian Sifat Kristalinitas	51
I.	Kurva kalibrasi dan verifikasi metode analisis	53
1.	Pembuatan kurva kalibrasi	53
1.1	Penentuan panjang gelombang maksimum	53
1.2	Penentuan operating time	53
1.3	Kurva kalibrasi	53
J.	Verifikasi Metode Analisis	55
1.	Linieritas	55
2.	Penentuan LOD dan LOQ	55
3.	Penyetaraan Dosis antara Fisetin Murni dan Nanokristal	56
K.	Uji Kelarutan Kinetik	56
L.	Uji Disolusi	57
M.	Analisis Hasil	58
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	60
A.	Kesimpulan	60
B.	Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	70

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema umum mekanisme teknologi <i>bottom-up</i>	7
Gambar 2. Skema umum mekanisme teknologi <i>top-down</i>	8
Gambar 3. Struktur fisetin(Bothirajaet al, 2014).....	11
Gambar 4. Skema proses dissolusi(Hanson 1991).	13
Gambar 5. Ilustrasi sederhana interkasi DLVO(Libo Wu dkk., 2011)	15
Gambar 6. Mekanisme kerja penstabil elektrostatik (Shi., 2002; Libo Wu dkk., 2011).	16
Gambar 7. Mekanisme kerja penstabil sterik (Shi., 2002).....	17
Gambar 8. Struktur tween 80(Salager 2002).....	18
Gambar 9. Struktur sodium dodesil sulfat(Salager 2002).....	19
Gambar 10. Struktur poloksamer (Memisoglu-Bilensoy et al, 2006).	20
Gambar 11. Struktur PVP (Salager 2002).....	20
Gambar 12. Rumus Struktur <i>Poly(vinyl alcohol)</i> (Rowe et al. 2009).	22
Gambar 13. Struktur HPMC (Rowe, Paul and Marian 2009).	23
Gambar 14. Skema ilustrasi partikel bermuatan negatif pada media air	26
Gambar 15. Skema difraksi sinar-X menurut Hukum Bragg.....	30
Gambar 16. Skema jalannya penelitian	42
Gambar 17. Morfologi fisetin nanokristal menggunakan SEM.....	50
Gambar 18. Morfologi fisetin murni menggunakan SEM	51
Gambar 19. Hasil XRD fisetin murni	51
Gambar 20. Hasil XRD sodium lauryl sulfat	52
Gambar 21. Hasil XRD sampel (fisetin murni dan SLS)	52
Gambar 22. Kurvakalibrasi medium dapar fosfat pH 7.4	54
Gambar 23. Kurvakalibrasi medium Aquadestillata	54

Gambar 24. Kelarutan fisetin murni dan nanokristal.....	57
Gambar 25. Disolusi fisetin murni dan nanokristal	58

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Sifat Fisik Sodium Dodesil Sulfat.....	19
Tabel 2. Jenis PVP Berdasarkan Nilai K.....	21
Tabel 3. Komposisi formula nanokristal fisetin.....	37
Tabel 4. Skrining waktu dan frekuensi.....	38
Tabel 5. HPMC 0,75% (polimer).....	44
Tabel 6. Sodium lauryl sulfat 0.75% (surfaktan).....	44
Tabel 7. Hasil skrining amplitude dan waktu pada sonikator	44
Tabel 8. Hasil skrining stabilizer	46
Tabel 9. Hasil penetapan distribusi & ukuran partikel	47
Tabel 10. Stabilitas fisetin nanosuspensi pada suhu kamar.	48
Tabel 11. Ukuran partikel sebelum dan setelah penyimpanan.....	49
Tabel 12. Parameter verifikasi metode analisis kurva kalibrasi fisetin	56

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Sertifikat analisis fisetin	71
Lampiran 2. Skrining waktu dan amplitude	72
Lampiran 3. Skrining stabilizer	74
Lampiran 4. Gambar formula dalam jumlah 600 ml	80
Lampiran 5. Ukuran, IP, dan zeta potensial sebelum freez drying	81
Lampiran 6. Gambar alat	83
Lampiran 7. Gambar bahan	85
Lampiran 8. Ukuran, IP, dan zeta potensial setelah penyimpanan	87
Lampiran 9. Hasil SEM	93
Lampiran 10. Hasil XRD	94
Lampiran 11. Disolusi dan kelarutan kinetic	96
Lampiran 12. kesetaraan dosis	103
Lampiran 13. Hasil uji kelarutan kinetic fisetin murni dan fisetin nanokristal..	104
Lampiran 14. Hasil uji disolusi	106
Lampiran 15. Contoh perhitungan	108

INTISARI

SURYA H., 2018.FORMULASI DAN KARAKTERISASI NANOKRISTAL Fisetin DENGAN METODE *TOP-DOWN* (SONIKASI). SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Fisetin (7,3,4'-tetrahidroksiflavanol) adalah senyawa flavonoid dengan beragam aktifitas yaitu sebagai antioksidan alami. Fisetin memiliki bioavailabilitas yang sangat rendah sekitar 10%, hal ini karena kelarutan dalam air yang kecil (0,002 mg/ml) dan absorpsi yang rendah sehingga pemberian fisetin dalam bentuk sediaan oral dan dermal menjadi terbatas. Salah satu pendekatan untuk meningkatkan kelarutan dan laju disolusi adalah teknologi nanokristal.

Ultrasonik merupakan vibrasi suara dengan frekuensi melebihi batas pendengaran manusia yaitu di atas 20 KHz. Karakterisasi fisetin nanokristal meliputi ukuran partikel, distribusi ukuran partikel, potensial zeta, morfologi partikel, sifat kristalinitas, kelarutan kinetik dan uji disolusi. Dalam penelitian ini dikembangkan fisetin nanokristal dengan metode sonikasi dengan menggunakan berbagai variasi bahan penstabil.

Stabilizer terpilih adalah Sodium Lauryl Sulfat 0.75%, Amplitudo terpilih 40% dengan lama sonikasi 30 menit. Ukuran partikel 483.4 nm, indeks polidispersitas 0.544 dan zeta potensial -63.5 mV, Rendemen dengan metode freeze drying 99.28%, Fisetin stabil pada penyimpanan 8 minggu dengan ukuran partikel 483.4, 549.3 dan 788.4 nm, indeks polidispersitas 0.544, 0.612 dan 0.694, zeta potensial -64.2, -63.6 dan -63.5 mV. Hasil XRD Fisetin nanokristal adalah masih bersifat kristalin, jumlah fisetin nanokristal yang terlarut dalam uji kelarutan kinetik adalah 9.86 mg dari 10 mg yang ditambahkan, dan nanokristal fisetin yang terlarut pada uji disolusi sebesar 69.30%.

Kata Kunci : Fisetin, Nanokristal, Zeta potensial

ABSTRACT

SURYA H., 2018., FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF NANOCRISTAL Fisetin WITH *TOP-DOWN* METHOD (SONICATION) UNDERGRADUATE THESIS, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Fisetin (7,3,4'-tetrahydroksiflavanol) is a flavonoid compound with various activities as a natural antioxidant. Fisetin has a very low bioavailability of about 10%, this is because of the small water solubility (0.002 mg / ml) and low absorption so that the fetal preparation in oral and dermal dosage forms is limited. One approach to increasing solubility and dissolution rate is nanocrystal technology.

Ultrasonic is a vibration of sound with a frequency exceeding the limits of human hearing that is above 20 KHz. Characterization of nanocrystal fisetin includes particle size, particle size distribution, zeta potential, particle morphology, crystallinity properties, kinetic solubility and dissolution test. In this research developed fisetin nanokristal by sonication method by using various variations of stabilizer.

The selected stabilizer was Sodium Lauryl Sulfate 0.75%, selected Amplitudo 40% with 30 minutes duration of sonication. Particle size 483.4 nm, pistolispersity index 0.544 and zeta potential -63.5 mV, Rendemen with freeze drying method 99.28%, Fisetin stable on 8 weeks storage with particle size 483.4, 549.3 and 788.4 nm, polydispersity index 0.544, 0.612 and 0.694, zeta potential -64.2, -63.6 and -63.5 mV. XRD results The nanocrystal fisetin is still crystalline, the amount of soluble nanocrystal fisetin in the kinetic solubility test is 9.86 mg of 10 mg added, and the dissolved fetal nanocrystal of the dissolution test is 69.30%.

Keywords : Fisetin, Nanocrystal, Zeta potential

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Diperkirakan lebih dari 40% zat aktif baru yang beredar dipasaran baik yang diperoleh dari hasil sintesis maupun bahan alam memiliki kelarutan yang sangat rendah (Lipinski *et al.* 2002., Park *et al.* 2013). Kelarutan obat yang rendah menjadi penyebab terbatasnya pengembangan zat aktif farmasi yang poten. Obat-obat yang sukar larut menyebabkan laju disolusi yang rendah dalam cairan pencernaan, absorpsi terbatas dan berpengaruh terhadap rendahnya ketersediaan hayati, terutama untuk golongan obat-obat *Biopharmaceuticals Classification System* (BCS) kelas II (Donget *al.* 2014., Junyapresart *et al.* 2015). Pada golongan obat tertentu rendahnya laju disolusi dapat menyebabkan iritasi pada saluran pencernaan (Gao *et al.* 2013).

Senyawa antioksidan telah banyak dikembangkan, baik antioksidan alami maupun sintetik. Antioksidan alami umumnya berupa senyawa-senyawa fenolik yang terdapat dalam berbagai tanaman (Khalil *et al.* 2007). Fisetin merupakan senyawa antioksidan golongan flavonol yang secara luas dapat ditemukan dalam buah-buahan. Senyawa ini lazim ditemukan dalam buah-buahan seperti stroberi (160,0 µg/g), apel(26,9 µg/g), kesemek (10,5 µg/g), anggur (3,9 µg/g), kiwi(2,0 µg/g), dan persik (0,6 µg/g).Selain itu, fisetin terdapat pada sayuran seperti akar teratai (5,8 µg/g), bawang (4,8µg/g), tomat (0,1 µg/g), dan mentimun (0,1 µg/g) (Araiet *al.* 2000). Flavonol merupakan salah satu kelompok dalam flavonoid yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Berbagai substituen, terutama hidroksil dan metoksil, dapat terikat pada cincin benzena dan heterosiklik flavonol, menghasilkan beragam jenis flavonol, salah satunya adalah fisetin (7,3,4'-tetrahidroksiflavonol). Fisetin pada dosis 10mg/kg BB tikus dapat menurunkan kadar gula darah pada tikus diabetes (Prasath dan Subramanian, 2010).

Bioavaibilitas sediaan oralsenyawa flavonoid sangat rendah disebabkan karena rendahnya kelarutan dalam air dan absorpsi yang terbatas (Odeh *et al.*

2011). Fisetin adalah senyawa flavonoid dengan beragam aktifitas yaitu sebagai antioksidan alami, antiinflamasi, antialergi, antikanker, kardioprotektif (Prozhazcova *et al.* 2011). Sebagai antiaterosklerosis, antiaging dan menurunkan kadar LDL (*Low Density Lipoprotein*) dalam plasma (Hu Jun *et al.* 2013). Fisetin memiliki bioavailabilitas yang sangat rendah sekitar 10%, hal ini karena kelarutan dalam air yang kecil (0,002 mg/ml) dan absorpsi yang rendah sehingga pemberian fisetin dalam bentuk sediaan oral dan dermal menjadi terbatas (Hong *et al.* 2014., Al Shal *et al.* 2011).

Beberapa cara telah dilakukan untuk meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas fisetin seperti kokristal (Sowa *et al.* 2014), liposom (Mignet *et al.* 2012), nanokelat (Bothiraja *et al.* 2014), nanoemulsi (Ragelle *et al.* 2012) dan kompleks inklusi β -siklodektrin (Guzzo *et al.* 2006). Namun hal tersebut belum mampu meningkatkan kelarutan fisetin secara signifikan karena terbatasnya pemahaman tentang sifat fisika kimia dan sifat biologis fisetin (Yao *et al.* 2013).

Salah satu pendekatan untuk meningkatkan kelarutan dan laju disolusi adalah teknologi nanokristal. Obat nanokristal adalah kristal nanoskopik dengan dimensi ukuran kurang dari 1 μm yang mengandung 100 % obat dan bahan penstabil (polimer/surfaktan) tanpa bahan pembawa (Junyapresart *et al.* 2015). Kelebihan nanokristal yaitu dapat menghantarkan obat dengan lebih baik ke unit yang kecil di dalam tubuh, mengatasi resistensi yang disebabkan oleh *barrier* fisiologi dalam tubuh yang disebabkan sistem penghantaran obat yang langsung dipengaruhi oleh ukuran partikel (Gupta & Kompella 2006).

Nanokristal juga dapat meningkatkan efisiensi penghantaran obat dengan meningkatkan kelarutan dalam obat yang sukar larut dalam air sehingga meningkatkan laju disolusi dan absorpsi serta bioavailabilitas (Junghans dan Müller 2008; Zaheer *et al.* 2011). Peningkatan kelarutan kinetik nanokristal sesuai dengan persamaan Kelvin-Gibbs dan Ostwald-Freundlich. Derajat ukuran partikel dan kelarutan sangat erat hubungannya yaitu semakin kecil derajat ukuran partikel maka semakin luas permukaan partikel yang kontak dengan pelarut sehingga dapat meningkatkan kelarutannya. Nanokristal dapat meningkatkan kelarutan

jenuh dan luas permukaan sehingga dapat meningkatkan kecepatan disolusi, hal ini sesuai dengan persamaan Noyes-Whitney (Keck dan Müller2006).

Ultrasonik 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 dan Lorimer 2002).

Adapun penelitian yang telah dilakukan menggunakan metode sonikasi adalah suchitonaonaonaol (ITZ), ascorbylpalmitate (ASC), fenofibrate (FNB), griseofulvin (GF), dan sulfamethoxazole (SFMZ). Berdasarkan hal tersebut saya akan membuat nanopartikel dari fisetin dengan ukuran micrometer dengan penambahan zat penstabil dengan metode sonikasi.

Karakterisasi fisetin nanokristal meliputi ukuran partikel, distribusi ukuran partikel, potensial zeta, morfologi partikel, sifat kristalinitas, viskositas, indeks redispersibilitas, kelarutan kinetik dan uji disolusi. Dalam penelitian ini dikembangkan fisetin nanokristal dengan metode sonikasi dengan menggunakan berbagai variasi bahan penstabil.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah fisetin dapat dibuat nanokristal dengan metode sonikasi?
2. Berapakah konsentrasi surfaktan atau polimer yang dapat menghasilkan nanokristal fisetin yang stabil?
3. Apakah nanosuspensi dari fisetin stabil selama proses penyimpanan?
4. Apakah fisetin setelah dibuat nanokristal dapat mempercepat kelarutan kinetik dan disolusi?

C. Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan nanokristal fisetin dengan metode sonikasi.
2. Mendapatkan konsentrasi surfaktan dan polimer yang dapat menghasilkan nanokristal fisetin yang stabil.

3. Mengetahui kesetabilan nanosuspensi fisetin selama penyimpanan.
4. Mendapatkan perbandingan kelarutan kinetik dan disolusi antara fisetin murni dengan nanokristal fisetin secara invitro.

D. Kegunaan Penelitian

Dengan penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengetahuan kepada berbagai pihak, khususnya dibidang teknologi farmasi dengan mengembangkan metode dari penelitian dan evaluasi stabilitas nanokristal fisetin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Nanopartikel

Nanopartikel adalah partikel koloid atau padatan dengan diameter berkisar dari 10-1000 nm. Nanopartikel dengan menggunakan polimer dapat dimanfaatkan untuk sistem penghantaran tertarget, meningkatkan bioavailabilitas, pelepasan obat terkendali, atau melarutkan obat untuk penghantaran sistemik. Juga dapat digunakan untuk melindungi agen terapeutik akibat adanya degradasi enzim (nuklease dan protease) (Rauhatun dan Iis 2013).

Secara sederhana nanopartikel yang terbuat dari suatu polimer dapat dibedakan menjadi dua tipe yaitu nanosphere dan nanokapsul. Nanosphere merupakan nanopartikel dengan sistem matriks dan obat terdispersi seluruhnya di dalam matriks tersebut, sedangkan nanokapsul merupakan nanopartikel dengan sistem reservoir yang terbuat dari membran polimer yang mengelilingi intinya. Pada awalnya, nanopartikel dibuat menggunakan polimer *non-biodegradable*, namun jenis polimer ini segera tergantikan oleh polimer yang *biodegradable*. Nanopartikel yang terbuat dari polimer *biodegradable* banyak dikembangkan sebagai sistem penghantaran obat (Tiyaboonchai 2003).

Nanopartikel terbukti mampu membawa obat (antibiotik, sitostatik, peptida, dan protein) ke target jaringan yang spesifik. Nanopartikel juga diyakini mampu melindungi obat agar tidak mengalami degradasi baik secara kimia maupun enzimatik. Nanopartikel juga mampu mengurangi efek samping yang mungkin ditimbulkan dari beberapa zat aktif. Nanopartikel yang digunakan sebagai sistem penghantaran obat memiliki banyak keuntungan. Salah satu keuntungannya yaitu, ukuran partikel dan sifat permukaannya dapat diatur dengan mudah. Nanopartikel dapat mengontrol pelepasan zat aktif selama perjalanannya menuju lokasi obat tersebut bekerja, sehingga dapat meningkatkan efek terapi obat dan mengurangi efek sampingnya. Sistem pelepasan obat dalam bentuk nanopartikel dapat diatur dengan jalan memilih matriks yang tepat sehingga nantinya dapat dihasilkan sistem pelepasan obat yang berbeda-beda. Nanopartikel

dapat digunakan untuk banyak rute pemberian obat, seperti oral, nasal, parental, intra-okular, dan lainnya (Rawat, Singh, dan Saraf 2006).

B. Nanokristal

Nanokristal adalah kristal nanoskopik dengan dimensi ukuran kurang dari 1 μm yang mengandung 100% obat tanpa bahan pembawa tetapi mengandung bahan penstabil surfaktan atau polimer. Dispersi obat nanokristal dalam medium cairan dan stabilisasi dengan zat aktif permukaan disebut nanosuspensi (Junyapresart *et al.* 2015).

Kelebihan nanokristal yaitu dapat menghantarkan obat dengan lebih baik ke unit yang kecil di dalam tubuh, mengatasi resistensi yang disebabkan oleh *barrier* fisiologi dalam tubuh yang disebabkan sistem penghantaran obat yang langsung dipengaruhi oleh ukuran partikel (Gupta dan Kompella 2006). Nanokristal juga dapat meningkatkan efisiensi penghantaran obat dengan meningkatkan kelarutan dalam obat yang sukar larut dalam air sehingga meningkatkan laju disolusi dan absorpsi serta bioavailabilitas (Junghans dan Müller 2008; Zaheer *et al.* 2011).

Nanokristal dapat meningkatkan kelarutan kinetik dan luas permukaan sehingga dapat meningkatkan kecepatan disolusi (Mauludin *et al.* 2009, Mauludin *et al.* 2012). Peningkatan kinetika kelarutan dijelaskan dengan persamaan Kelvin-Gibbs dan Ostwald-Freundlich.

$$\ln \frac{S_r}{S_\infty} = \frac{2 \gamma M}{\rho r RT} \quad (1)$$

S_r adalah kelarutan partikel dengan jari-jari r , S_∞ adalah kelarutan partikel *noncurved* ($r \rightarrow \infty$), V adalah volume molar zat terlarut, M adalah molaritas zat terlarut, ρ adalah bobot jenis, γ merupakan tegangan permukaan, r adalah jari-jari partikel, R adalah konstanta gas dan T adalah temperatur absolut. Pengaruh ukuran partikel terhadap laju disolusi dapat dijelaskan dengan menggunakan persamaan Noyes-Whitney (persamaan 2). Menurut Noyes-Whitney (1987), tahap dari pelepasan obat dimulai dari proses pelarutan obat pada permukaan partikel padat membentuk suatu lapisan jenuh. Obat terlarut dalam lapisan berdifusi menuju

bagian dengan kandungan obat rendah, sebagaimana dijelaskan pada persamaan dibawah ini.

$$\frac{dc}{dt} = \frac{DA}{h} (C_s - C_x) \quad (2)$$

Dimana, dC/dt adalah jumlah obat terlarut dalam waktu t , D adalah konstanta kecepatan difusi, A adalah luas permukaan partikel padat, C_s adalah kelarutan jenuh obat, C_x adalah konsentrasi obat pada pelarut dan h adalah ketebalan lapisan difusi. Partikel kecil memiliki ketebalan lapisan difusi yang lebih kecil dibandingkan partikel besar (Müller dan Akkar 2004).

C. Metode Pembuatan Nanokristal

Pembuatan nanopartikel dapat dibagi menjadi dua kategori yaitu teknologi *bottom-up* (pembuatan partikel dari larutannya atau presipitasi), dan teknologi *top-down* (penurunan ukuran partikel yang pada umumnya dengan gaya mekanik) (Keck dan Müller 2006).

1. Teknologi *bottom-up*

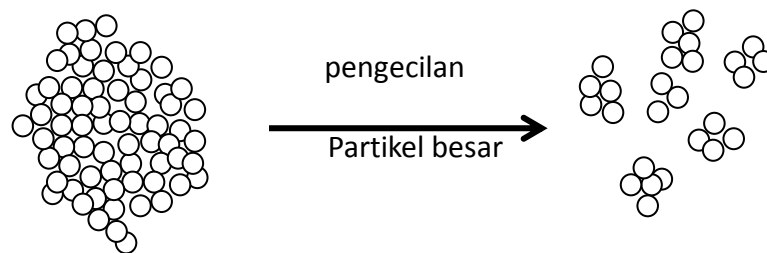
Metode yang telah banyak digunakan adalah presipitasi atau metode hidrosol. Parameter yang harus diperhatikan dalam metode ini adalah kecepatan pengadukan, suhu, perbandingan antara pelarut dengan non pelarut, konsentrasi obat, viskositas, jenis pelarut, dan bahan penstabil yang digunakan. Keuntungan dari metode presipitasi adalah menggunakan peralatan yang sederhana. Kekurangan metode presipitasi yaitu obat harus dapat larut setidaknya dalam satu pelarut dan pelarut tersebut harus dapat bercampur dengan non- pelarut (Gupta dan Kompella. 2006). Keterbatasan metode *bottom-up* adalah kesulitan saat *scale up* adanya residu dari pelarut yang digunakan (Shegokar dan Müller 2010).



Gambar 1. Skema umum mekanisme teknologi *bottom-up* (Gupta dan Kompella 2006)

2. Teknologi *top-down*

Teknologi *top-down* merupakan metode pembuatan nanopartikel dengan menggunakan gaya mekanik, sehingga mengubah partikel berukuran besar menjadi kecil. Hal yang perlu diperhatikan bila menggunakan metode *top-down* adalah kekuatan atau keliatan bahan, kekerasan, sifat abrasive, bentuk dan ukuran partikel, serta sensitivitasnya terhadap suhu (Gupta dan Kompella 2006; Van Eerdenbrugh *et al.* 2008).



Gambar 2. Skema umum mekanisme teknologi *top-down* (Gupta dan Kompella 2006)

Metode pembuatan dengan teknologi ini terdiri dari berbagai cara, yaitu :

2.1 Pearl Milling (Ball Milling). Alat yang digunakan dalam *pearl milling* terdiri dari wadah dan bola yang bergerak. Pada metode ini obat didispersikan dalam larutan surfaktan kemudian dimasukkan ke dalam alat *pearl milling*. Keuntungan metode ini adalah teknologi sederhana dan biaya produksi relative murah. Kekurangan metode ini adalah potensi kontaminasi dari bahan milling, durasi proses lama, adanya potensi pertumbuhan kuman pada fase air karena proses pembuatan yang lama (Müller *et al.* 2006; Shegokar dan Müller 2010).

2.2 High Pressure Homogenizer (homogenisasi tekanan tinggi). Metode homogenisasi tekanan tinggi dibagi menjadi 2 macam, yaitu *piston-gap homogenization* dan *jet stream arrangement*. Metode *piston-gap homogenization* menghancurkan suspensi kasar dengan mendorong partikel kasar masuk ke dalam suatu celah (gap). Proses pengecilan ukuran partikel dipengaruhi oleh daya dorong, kavitasi dan tumbukan antar partikel. Contoh alat homogenisasi tekanan tinggi adalah Micron Lab[®] 40. Keuntungan metode ini adalah efektif dalam proses pengurangan ukuran partikel, proses produksi dapat divalidasi, terhindar dari

kontaminasi, proses relatif sederhana dan biaya relatif rendah. Teknologi yang sudah dikembangkan menggunakan metode ini adalah Dissocubes[®]. Dissocubes[®] menggunakan media dispersi air dan melalui kavitasi dengan memberikan tekanan yang tinggi pada media dispersi. (Müller *et al.* 2006; Shegokar dan Müller 2010).

2.3 Sonikasi. Ultrasonik 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).

Penggunaan ultrasonik berdasarkan rentangnya yang luas ini dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama adalah suara beramplitudo rendah (frekuensi lebih tinggi). Gelombang beramplitudo rendah ini secara umum digunakan untuk analisis pengukuran kecepatan dan koefisien penyerapan gelombang pada rentang 2 hingga 10 MHz. Bagian kedua adalah gelombang berenergi tinggi dan terletak pada frekuensi 20 hingga 100 KHz. Gelombang ini dapat digunakan untuk pembersihan, pembentukan plastik, dan modifikasi bahan-bahan organik maupun anorganik (Mason & Lorimer 2002).

Ultrasonikasi dengan intensitas tinggi dapat menginduksi secara fisik dan kimia. Efek fisik dari ultrasonikasi intensitas tinggi salah satunya adalah emulsifikasi. Beberapa aplikasi ultrasonikasi ini adalah dispersi bahan pengisi dalam polimer dasar, emulsifikasi partikel anorganik pada polimer dasar, serta pembentukan dan pemotongan plastik (Suslick & Price 1999).

Efek kimia pada ultrasonikasi ini menyebabkan molekul-molekul berinteraksi sehingga terjadi perubahan kimia. Interaksi tersebut disebabkan panjang gelombang ultrasonik lebih tinggi dibandingkan panjang gelombang molekul-molekul. Interaksi gelombang ultrasonik dengan molekul-molekul terjadi melalui media cairan. Gelombang yang dihasilkan oleh tenaga listrik diteruskan oleh media cair ke medan yang dituju melalui fenomena kavitasi akustik yang menyebabkan kenaikan suhu dan tekanan lokal dalam cairan (Wardiyati *et al.* 2004). Ultrasonikasi pada cairan memiliki berbagai parameter

seperti frekuensi, tekanan, suhu, viskositas, dan konsentrasi suatu sampel. Aplikasi ultrasonikasi pada polimer berpengaruh terhadap degradasi polimer tersebut (Wardiyati *et al.* 2004).

Cara kerja metode ultrasonik dalam mengekstraksi adalah sebagai berikut : gelombang ultrasonik terbentuk dari pembangkitan ultrason secara lokal dari kavitasi mikro pada sekeliling bahan yang akan diekstraksi sehingga terjadi pemanasan pada bahan tersebut, sehingga melepaskan senyawa ekstrak. Terdapat efek ganda yang dihasilkan, yaitu pengacauan dinding sel sehingga membebaskan kandungan senyawa yang ada di dalamnya dan pemanasan lokal pada cairan dan meningkatkan difusi ekstrak. Energi kinetik dilewatkan ke seluruh bagian cairan, diikuti dengan munculnya gelembung kavitasi pada dinding atau permukaan sehingga meningkatkan transfer massa antara permukaan padat-cair. Efek mekanik yang ditimbulkan adalah meningkatkan penetrasi dari cairan menuju dinding membran sel, mendukung pelepasan komponen sel, dan meningkatkan transfer massa (Keil 2007). Liu *et al.* (2010), menyatakan bahwa kavitasi ultrasonik menghasilkan daya patah yang akan memecah dinding sel secara mekanis dan meningkatkan transfer material.

Beberapa keunggulan pada penggunaan teknologi ultrasonik dalam aplikasinya pada berbagai macam pati dan polisakarida adalah (Lida 2002): 1) proses ultrasonik tidak membutuhkan penambahan bahan kimia dan bahan tambahan lain, 2) Prosesnya cepat dan mudah, yang berarti prosesnya tidak memerlukan biaya tinggi, 3) Prosesnya tidak mengakibatkan perubahan yang signifikan pada struktur kimia, partikel, dan senyawa-senyawa bahan yang digunakan. Hal-hal yang mempengaruhi kemampuan ultrasonik untuk menimbulkan efek kavitasi yang diaplikasikan pada produk pangan antara lain karakteristik ultrasonik seperti frekuensi, intensitas, amplitudo, daya, karakteristik produk (seperti viskositas, tegangan permukaan) dan kondisi sekitar seperti suhu dan tekanan (Williams 1983).

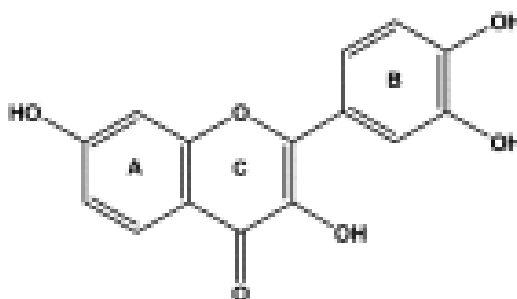
3. *Teknologi Smart Crystal*

Merupakan teknologi yang menggabungkan beberapa metode *bottom up* dengan *top down*. Diantaranya adalah metode H₉₆ yaitu metode liofilisasi dengan

homogenisasi dalam media dispersi air (Shegokar dan Müller 2010., Junyapresart *et al.* 2015). Metode H₉₆ dengan mikrosuspensi dalam air dengan surfaktan atau polimer. Air dihilangkan dari suspensi untuk memperoleh serbuk nanopartikel dengan *freeze drying* kemudian dilanjutkan dengan homogenisasi bertekana tinggi (Müller *et al.* 2006; Shegokar dan Müller 2010). Metode H₄₂ adalah metode kombinasi antara *spray drying* dengan homogenisasi tekan tinggi, metode H₆₉ merupakan metode kombinasi antara presipitasi dengan homogenisasi tekanan tinggi, metode CT adalah kombinasi antara bead milling dengan homogenisasi tekana tinggi (Shegokar dan Müller 2010., Douromius dan Fahr, 2013., Junyapresart *et al.* 2015).

D. Fisetin

Fisetin merupakan flavonoid turunan flavonol dengan 4 gugus hidroksil yang banyak terdapat pada buah, sayuran dan tanaman herbal. Dengan rumus molekul C₁₅H₁₀O₆, massa molar 286,2363 g/mol, dan titik lebur 330 °C (Hu-Jun *et al.* 2013).



Gambar 3. Struktur fisetin (Bothiraja *et al.*, 2014)

Fisetin-tetrahydroxyflavone (3,7,3',4'-OH), Fisetin praktis tidak larut dalam air, tetapi mudah larut dalam etanol, methanol, aseton dan DMF. Myricetin termasuk obat golongan BCS kelas II dengan kelarutan 0,002 mg/ml dengan absorpsi dan bioavailabilitas yang sangat rendah sekitar 10% (Dang *et al.* 2014, Yao *et al.* 2013). Fisetin memiliki aktifitas farmakologi sebagai antioksidan dan antiradikal bebas, anti karsinogenik, anti inflamasi, anti sklerosis dan anti thrombosis (Adhami 2012).

Fisetin dikenal sebagai *Natural Brown* adalah flavonoid tanaman bioaktif penting besar sebagai obat terapi berpotensi berguna, untuk berbagai radikal bebas yang dimediasi serta penyakit lainnya (Arbiser *et al.* 2011).

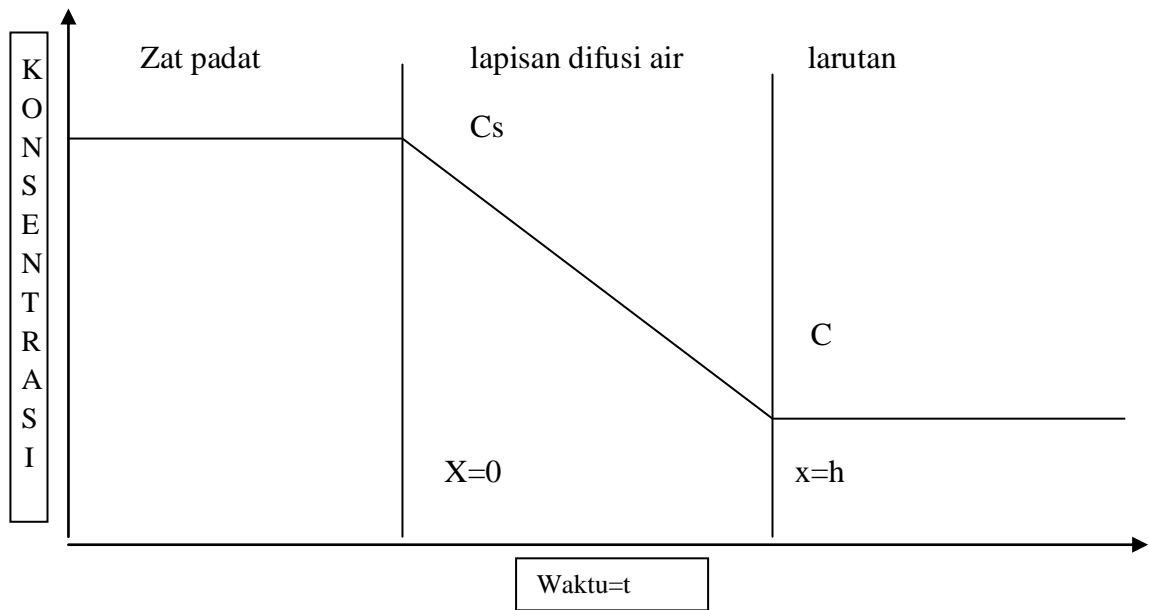
Fisetin umumnya ditemukan dalam buah-buahan, kacang-kacangan, anggur dan sayuran seperti bawang, mentimun, apel, kesemek dan stroberi pada konsentrasi 2-160 mg / g dengan perkiraan asupan harian rata-rata 0,4 mg. Fisetin juga ditambahkan ke suplemen gizi pada konsentrasi yang sangat tinggi dan memiliki berbagai efek farmakologis termasuk antioksidan dan anti-inflamasi aktivitas bertindak terutama sebagai pemulung radikal bebas. Fisetin juga bertindak sebagai inhibitor *kinase cyclin-dependent* (CDKs) dan menginduksi penangkapan siklus sel kanker. Kegiatan antioksidan yang dapat dikaitkan dengan fitur struktural serta kemampuannya untuk memodulasi jalur sinyal seluler tertentu, terutama protein kinase dan jalur lipid kinase (Chen WSet *al.* 2010).

Berdasarkan hal tersebut fisetin telah ditunjukkan untuk mengerahkan berbagai aktivitas biologis yang penting. Selain itu, peningkatan kadar trigliserida, bersama dengan konten trigliserida dan glukosa konsentrasi hati ditemukan secara signifikan dikurangi dengan suplementasi fisetin dalam kelompok diet tinggi lemak. Fisetin juga dilaporkan menurun risiko kardiovaskular oleh ameliorating hati steatosis dan dengan menurunkan sirkulasi konsentrasi glukosa (Chien CS *et al.* 2010).

Efek karsinogenik pelindung dan *anticardio* dari fisetin pada dosis diet yang dikaitkan dengan sifat antioksidan dan kemampuannya untuk mencegah proliferasi sel dan angiogenesis *vitro*. Karena efek seperti menguntungkan biologi, fisetin dan beberapa flavonoid tanaman lain yang sering digunakan sebagai suplemen nutrisi pada konsentrasi tinggi (Chen YC*et al.* 2002).

E. Laju Disolusi

Laju disolusi dapat didefinisikan jumlah bahan aktif dalam sediaan padat yang terlarut dalam larutan per satuan waktu pada keadaan standar dari antarmuka cairan-padatan, suhu, dan komposisi medium(Hanson 1991).



Gambar 4. Skema proses dissolusi(Hanson 1991).

Proses disolusi kristal terbagi menjadi 2 tahap, yaitu pembentukan larutan di sekeliling partikel dan difusi dalam cairan. Larutan yang terbentuk sangat cepat dan menghasilkan lapisan jenuh yang dianggap stagnan. Proses difusi berlangsung lebih lambat. Oleh karena itu disebut disolusi rate-limiting step. (Abdou 1989).

Disolusi merupakan *rate limiting step* pada proses absorpsi untuk obat yang kelarutannya buruk dalam air. Masalah potensial dalam bioavailabilitas obat yang sangat hidrofobik (kelarutan dalam cairan kurang dari 0,1 mg/ml pada suhu 37°C) karena absorpsi yang tidak lengkap pada saluran cerna(Raju *et al.* 2007).

Laju suatu padatan melarut di dalam suatu pelarut telah diajukan dalam batasan-batasan kuantitatif oleh Noyes Whitney pada tahun 1987 dan telah dikerjakan dengan teliti oleh peneliti-peneliti lain. Persamaan tersebut bisa dituliskan sebagai :

$$\frac{dM}{dxt} = \frac{DS}{h} (C_s - C)$$

Dimana $\frac{dM}{dxt}$: laju disolusi dari massa zat terlarut yang dilarutkan pada waktu t (massa/waktu), D : koefisien difusi dari zat terlarut dalam larutan, S : luas permukaan zat padat yang menyentuh larutan, h : ketebalan lapisan difusi,

Cs: konsentrasi jenuh dari senyawa tersebut dari suhu percobaan, C: konsentrasi zat terlarut pada waktu t (Martin, Swarbrick, dan Cammarata, 1983).

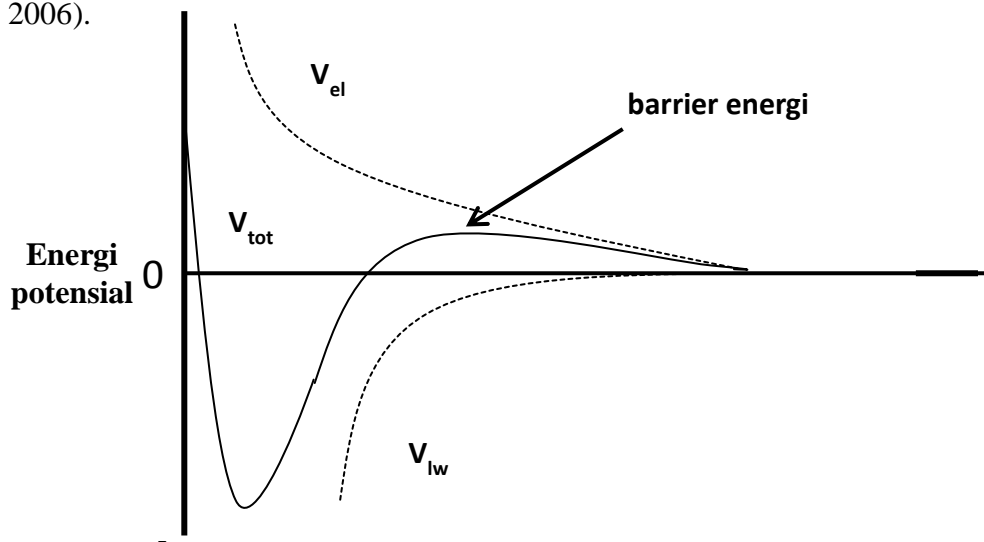
Beberapa jenis peralatan yang digunakan untuk uji disolusi yaitu :

- 1 Tipe basket (disebut juga apparatus I) Alat terdiri dari sebuah wadah tertutup yang terbuat dari kaca atau bahan transparan lain yang inert, suatu motor, suatu batang logam yang digerakkan oleh motor dan keranjang berbentuk silinder. Wadah tercelup sebagian di dalam suatu tangas air yang sesuai berukuran sedemikian sehingga dapat mempertahankan suhu dalam wadah pada $37^{\circ}\text{C} + 0,5^{\circ}\text{C}$ selama pengujian berlangsung dan menjaga agar gerakan air dalam tangas air halus dan tetap. Bagian dari alat, termasuk lingkungan tempat alat diletakkan tidak dapat memberikan gerakan, guncangan, atau getaran signifikan yang melebihi gerakan akibat perputaran alat pengaduk.
- 2 Tipe dayung (disebut juga apparatus II) Alat terdiri dari daun dan batang sebagai pengaduk. Batang berada pada posisi sedemikian sehingga sumbu tidak lebih dari 2 mm pada setiap titik dari sumbu vertikal wadah dan berputar dengan halus tanpa goyangan yang berarti. Daun melewati diameter batang sehingga dasar daun dan batang rata (DepKes RI 1995).

Faktor yang mempengaruhi laju disolusi suatu sediaan diklasifikasikan menjadi tiga kategori utama, yaitu : pertama adalah Faktor yang berhubungan dengan sifat fisikokimia obat Faktor-faktor yang berhubungan dengan sifat fisikokimia obat antara lain Kelarutan obat, Pembentukan garam, Ukuran partikel, Bentuk kristal obat dan Polimorfisme. Faktor yang kedua yaitu faktor yang berhubungan dengan sediaan obat Faktor-faktor yang berhubungan dengan sediaan obat antara lain Rancangan metode disolusi, Metode beaker dan Sediaan lepas termodifikasi. Faktor yang ketiga yaitu faktor berhubungan dengan metode dan uji parameter Faktor-faktor yang berhubungan dengan metode dan uji parameter antara lain Pengaruh pengadukan, Pengaruh kecepatan pengadukan terhadap laju disolusi sediaan padat, Pengaruh pH dan Pengaruh medium disolusi (jenis medium, tegangan permukaan, volume, suhu) (Abdou, 1989).

F. Bahan Penstabil

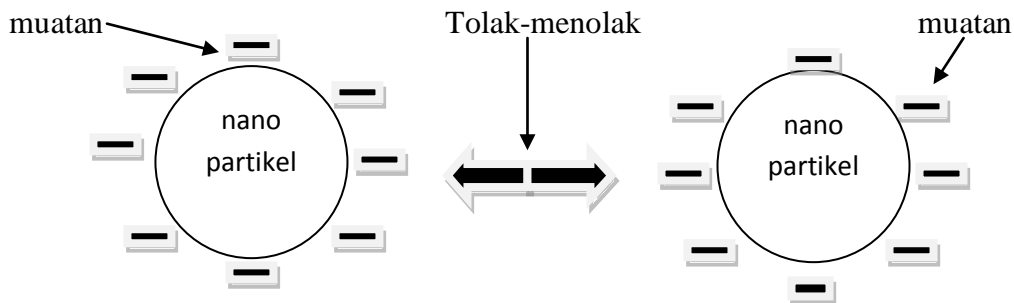
Penurunan ukuran partikel menyebabkan peningkatan luas permukaan partikel. Luas permukaan partikel yang besar menyebabkan energi bebas permukaan menjadi lebih tinggi. Hal ini menyebabkan terjadi interaksi antar partikel yang cukup besar, dapat mempengaruhi makroskopik partikel seperti dapat terjadi agregasi, pembentukan kristal (Peukert, 2005). Interaksi antar partikel dapat berupa gaya tarik menarik atau tolak menolak dan interaksi partikel dengan medianya (Peukert., 2005). Interaksi antar partikel dapat dijelaskan dengan teori DLVO (Derjaquin, Landau, Verwey, Overbeek). Teori ini menjelaskan terjadinya interaksi partikel bermuatan dengan medianya. Perbedaan potensial muatan partikel dengan elektronetral medianya disebut sebagai potensial zeta (Sinko., 2006).



Gambar 5. Ilustrasi sederhana interaksi DLVO(Libo Wu dkk., 2011)

Dimana, V_{tot} adalah energi potensial interaksi total antar dua partikel, V_{el} adalah energi elektrostatis, V_{lw} adalah energi Van der Waals. Nanopartikel sangat mudah untuk saling berinteraksi antar partikelnya, sehingga perlu dilakukan stabilisasi partikel untuk mencegah agregasi atau aglomerasi. Terdapat dua mekanisme stabilisasi partikel, yaitu halangan elektrostatis dan halangan sterik (Libo Wu dkk., 2011). Dalam beberapa kasus diperlukan kombinasi bahan penstabil (Ghosh., 2011).

1. Penstabil Jenis Surfaktan

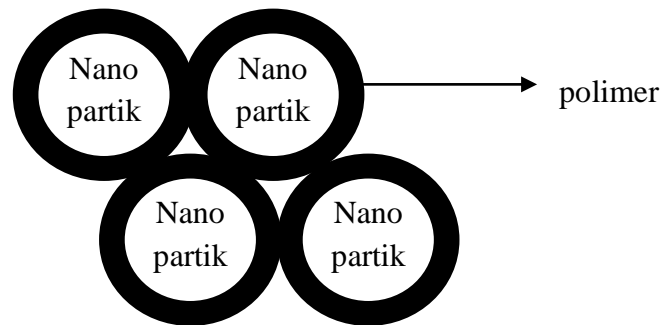


Gambar 6. Mekanisme kerja penstabil elektrostatik (Shi., 2002; Libo Wu dkk., 2011).

Penstabil jenis surfaktan bekerja dengan mekanisme halangan elektrostatik. Bahan penstabil yang mengandung gugus-gugus terion dalam pendispersi nanopartikel akan teradsorpsi pada permukaan partikel. Untuk menjaga elektronetralitas, sejumlah ion dengan muatan berlawanan (*counter ion*) akan mengelilingi partikel sebanding dengan muatan pada permukaan partikel tersebut dan membentuk lapisan rangkap listrik. Lapisan rangkap listrik akan menstabilkan partikel tersebut sehingga nanopartikel tidak saling beraglomerasi (Shi., 2002; Libo Wu dkk., 2011).

Partikel memiliki muatan permukaan yang disebut potensial Nerst dalam media elektrolit, ion yang berasal dari media dispersi akan teradsorpsi ke dalam permukaan partikel. Lapisan pertama yang teradsorpsi merupakan muatan negatif disebut lapisan dalam Helmholtz dan lapisan kedua yang diadsorpsi merupakan muatan positif yang disebut lapisan luar Helmholtz. Gabungan dari kedua lapisan Helmholtz merupakan lapisan Stern. Muatan negatif yang tidak termasuk dalam lapisan stern merupakan ion yang bebas berdifusi sehingga disebut dengan lapisan difusi (Müller., 1996). Meningkatnya konsentrasi elektrolit, menyebabkan lapisan rangkap listrik pada permukaan akan berada pada jarak terendah sehingga lapisan difusi menjadi tipis. Dengan penurunan potensial zeta yang diakibatkan oleh peningkatan konsentrasi elektrolit maka menyebabkan stabilitas fisik suspensi akan menurun. Bahan penstabil yang digunakan dapat berupa surfaktan atau polimer bermuatan (Ghosh., 2011). Bahan penstabil yang dapat digunakan adalah polisorbitat (Tween[®] 80), natrium dokusat (DOSS) atau natrium lauril sulfat (SLS).

2. Penstabil Jenis Polimer



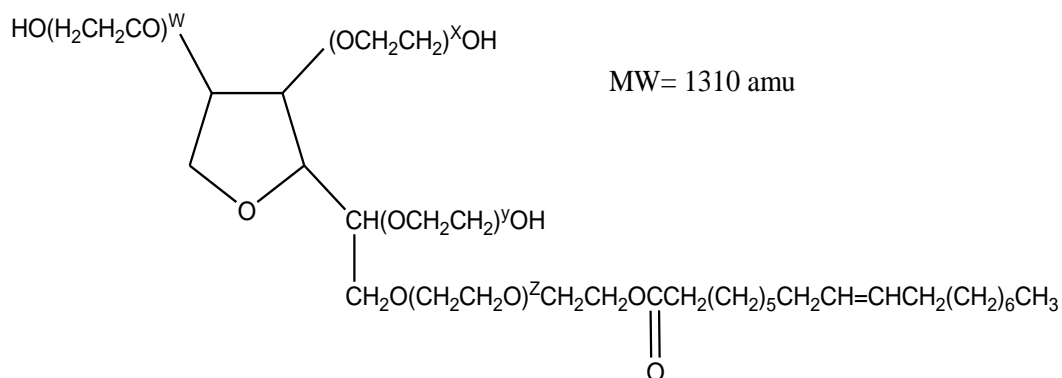
Gambar 7. Mekanisme kerja penstabil sterik (Shi., 2002)

Penstabil jenis polimer bekerja melalui mekanisme halangan sterik. Bahan penstabil halangan sterik adalah polimer yang mengandung gugus fungsi seperti karboksilat, hidroksil, amin dan ester. Mekanisme stabilisasi sterik yaitu dengan menyelimuti permukaan partikel sehingga interaksi antar partikel menjadi minimal. Polimer akan diadsorpsi menyelimuti permukaan partikel membentuk lapisan-lapisan (Shi., 2002). Keuntungan stabilisasi halangan sterik dibandingkan dengan stabilisasi halangan elektrostatis adalah relatif stabil terhadap keberadaan elektrolit, memiliki efektivitas yang sama dalam media air dan non air, memiliki efektivitas yang sama dalam konsentrasi padatan rendah dan tinggi dan terbentuk flokulasi yang reversibel (Shi., 2002).

Bahan penstabil yang dapat digunakan adalah hidroksipropil metil selulosa (HPMC), polivinil pirolidon (PVP), polivinil alkohol (PVA) dan poloksamer (pluronic F68). Semakin besar bobot molekul bahan penstabil yang digunakan, maka semakin lambat kecepatan adsorpsinya. Semakin besar konsentrasi polimer rantai panjang maka makin lambat laju disolusinya (Ghosh., 2011).

G. Studi Preformulasi

1. Tween 80



Gambar 8. Struktur tween 80(Salager 2002)

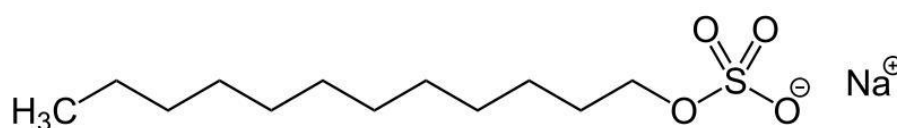
Tween 80 atau *Polysorbate 80* adalah ester oleat dari sorbitol dan anhidridanya berkopolimerisasi dengan lebih kurang 20 molekul etilen oksida untuk tiap molekul sorbitol dan anhidrida sorbitol. Tween 80 memiliki rumus kimia $C_{64}H_{124}O_{26}$. Tween 80 merupakan cairan seperti minyak, jernih, berwarna kuning muda hingga cokelat muda, bau khas lemah, rasa pahit, dan hangat. 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* (Akhtar *et al.* 2012).

Tween 80 adalah surfaktan hidrofilik nonionik yang mempunyai fungsi sebagai pengemulsi, pelarut; pembasah. Tween 80 digunakan secara luas sebagai pengemulsi dalam penyiapan emulsi farmasetik minyak dalam air. Mereka juga digunakan sebagai pelarut untuk bermacam-macam zat termasuk minyak esensial dan minyak pelarut vitamin. Dan sebagai pembasah dalam formulasi suspensi oral dan parenteral. Tween 80 mempunyai bau yang khas dan hangat, rasanya agak pahit, berwarna kuning. Tween 80 larut dalam etanol dan air, dan tidak larut dalam minyak mineral & minyak sayur. Tween 80 harus disimpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya di tempat sejuk dan kering (Akhtar *et al.* 2012)

2. Na lauryl sulfat

Sodium dodesil sulfat (SDS atau NaDS) atau *Sodium lauryl sulfate* ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) adalah surfaktan anionik yang digunakan dalam produk industri seperti produk pembersih lantai, sabun pencuci mobil, dan beberapa kebutuhan rumah tangga seperti sabun, pasta gigi, sampo, dan lain-lain. Molekul ini mempunyai bagian hidrofobik yang mengandung 12 atom karbon dan yang mengikat gugus sulfat yang menjadikannya sebagai senyawa amfifilik. Struktur senyawa ini adalah:



Gambar 9. Struktur sodium dodesil sulfat (Salager 2002)

Sodium lauryl sulfate adalah nama pasaran dari sodium dodesil sulfat yang merupakan surfaktan anionik. Seperti semua jenis surfaktan untuk deterjen (termasuk sabun), *sodium lauryl sulfate* dapat menghilangkan lemak dari kulit, tetapi dapat menyebabkan iritasi pada mata. Konsentrasi kritis misel (KKM) dalam air murni pada temperatur $25^{\circ}C$ adalah $0,0082 M$, dan jumlah agregatnya biasanya sekitar 50, derajat ionisasi miselnya (α) sekitar 0,3 (or 30%) (www.wikipedia.com). Sifat fisik dan kimia dari SDS ditunjukkan dalam tabel 2.1

Tabel 1. Sifat Fisik Sodium Dodesil Sulfat

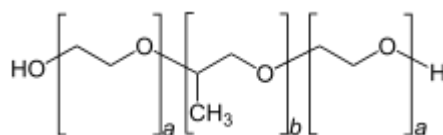
Rumus Molekul	$NaC_{12}H_{25}SO_4$
Sifat Fisik	Serbuk putih
Berat Molekul	$288,38 g mol^{-1}$
Massa Jenis	$1,01 g/cm^3$
Titik Leleh	$204-207^{\circ}C$
Kelarutan dalam air	150 (g/l)
Ph	9 - 10 (1% Aq.Sol)

Sumber : Salager, 2002

Sodium dodesil sulfat (SDS), yang diperoleh dari proses sulfasi *lauryl* alkohol dan reaksi netralisasi dengan natrium karbonat, adalah surfaktan yang bersifat amfifilik karena memiliki rantai C_{12} (lipofilik) dan gugus sulfat (hidrofilik). Dengan adanya dua gugus fungsi dalam satu molekul, SDS sangat bermanfaat sebagai pembersih dan deterjen. SDS juga digunakan sebagai suatu

agen pembasah di dalam produk tekstil, pembuatan sabun, pengemulsi kosmetika, dan pasta gigi (Akhtar *et al.* 2012)

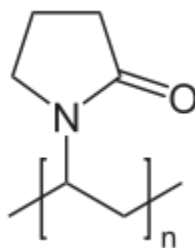
3. Poloxamer 188



Gambar 10. Struktur poloksamer (Memisoglu-Bilensoy *et al.*, 2006).

Poloksamer 188 merupakan kopolimer polioksietilen-polioksipropilen nonionic yang dengan rantai polioksietilen bersifat hidrofilik, sementara rantai polioksipropilen bersifat hidrofobik (Chen *et al.*, 2004). Poloxamer 188 (Gambar) yang biasa disebut dengan pluronic F 68 atau lutrol F 68 merupakan surfaktan nonionic yang banyak diaplikasikan dalam bidang farmasi sebagai *emulsifier*, *solubilizer* dan penstabil suspense dalam bentuk dosis *liquid oral*, *topical* dan *parenteral*. Penggunaan dalam bentuk padat berperan sebagai *wetting agent*, *plasticizer*, dan dapat meningkatkan kelarutan serta bioavailabilitas pada obat yang memiliki tingkat kelarutan yang rendah dalam air (Yen *et al.*, 2008). Peranan penting poloxamer 188 atau pluronic F 68 dalam system nanopartikel yaitu sebagai penstabil system, menurunkan diameter partikel dan indeks polidispersitas (Memisoglu-Bilensoy *et al.*, 2006).

4. PVP (*Polyvinylpyrrolidone*)



Gambar 11. Struktur PVP (Salager 2002)

PVP adalah polimer dengan rumus molekul C_6H_9NO , massa molar $111,14 \cdot mol^{-1}$, merupakan jenis polimer yang larut dalam pelarut air. Dengan ciri-ciri putih pucat kuning, higroskopis, amorf bubuk. PVP yang disebut juga dengan

povidon, polyvidone, polyvinylpyrrolidone adalah polimer sintesis yang mengandung kelompok rantai lurus 1-vinyl-2-pyrrolidinone (USP 25 2001).

PVP berupa serbuk berwarna putih sampai putih kekuningan PVP bersifat higroskopis, mudah larut dalam air, alkohol dan metanol, sedikit larut dalam aseton (BP 2002).

PVP memiliki perbedaan tingkat polimerisasi menghasilkan polimer yang memiliki berat molekul yang berbeda-beda. Perbedaan berat molekul ini mengakibatkan adanya perbedaan viskositas dalam air yang dinyatakan dengan nilai K. Nilai K bervariasi dari 12 sampai 120. Dalam formulasi PVP digunakan sebagai bahan pengikat dan penghancur tablet (USP 25 2001; Rowe 2004).

Tabel 2. Jenis PVP Berdasarkan Nilai K

Nilai K	Berat Molekul Rata-Rata
12	2.500
15	8.000
17	10.000
25	30.000
30	50.000
60	400.000
90	1.000.000
120	3.000.000

PVP digunakan pada berbagai macam formulasi. Pada tablet larutan PVP digunakan sebagai pengikat pada granulasi basah. PVP juga dapat ditambahkan pada campuran serbuk dalam bentuk kering dan penggranul insitu dengan penambahan air, alkohol atau larutan hidroalkoholik. PVP digunakan sebagai zat yang mempermudah pelarutan pada formulasi oral dan parenteral dan telah terbukti dapat meningkatkan kelarutan obat yang kelarutannya dalam bentuk padat rendah. Konsentrasi PVP sebagai disintegran adalah $\leq 5\%$ sedangkan sebagai bahan pengikat konsentrasi PVP yang digunakan adalah 0,5-5% (Rowe 2004).

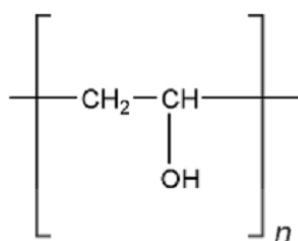
5. PVA

PVA adalah salah satu dari sedikit polimer yang bersifat dapat larut dalam air. Sifat kimia dan fisika dari polivinil alkohol membuat polimer ini memiliki andil penting dalam dunia perindustrian sehingga diproduksi secara luas di

dunia. Polivinil alkohol pertama kali ditemukan oleh Haehnel dan Herrman melalui reaksi adisi alkali pada larutan bening alkohol polivinil asetat yang kemudian menghasilkan larutan berwarna coklat muda yang kemudian diketahui merupakan polivinil alkohol. Polivinil alkohol kemudian diperkenalkan pertama kali secara komersial pada tahun 1927 (Kirk dan Othmer 1982).

Berbeda dari senyawa polimer pada umumnya yang diproduksi melalui reaksi polimerisasi, PVA diproduksi secara komersial melalui hidrolisis PVA dengan alkohol karena monomer dari vinil alkohol tidak dapat dipolimerisasi secara alami menjadi PVA (Kirk dan Othmer 1982).

Poly(vinyl alcohol) memiliki rumus kimia $(C_2H_4O)_n$ dengan berat molekul 20.000-200.000. polivinil alkohol merupakan polimer sintetik larut air. *Poly(vinyl alcohol)* tidak berbau, serbuk granul berwarna putih hingga cream. pH *Poly(vinyl alcohol)* 4.5-8.0, titik leleh 228 °C untuk nilai hidrolisis penuh. *Poly(vinyl alcohol)* larut dalam air, sedikit larut dalam etanol 95%; tidak larut dalam pelarut organik. Pelarutan membutuhkan dispersi (pembasahan) dari bentuk padat dalam air pada suhu ruang diikuti dengan pemanasan pada saat mencampur pada suhu 90 °C sekitar 5 menit. Pencampuran kemudian dilanjutkan ketika larutan panas menjadi dingin pada suhu ruang

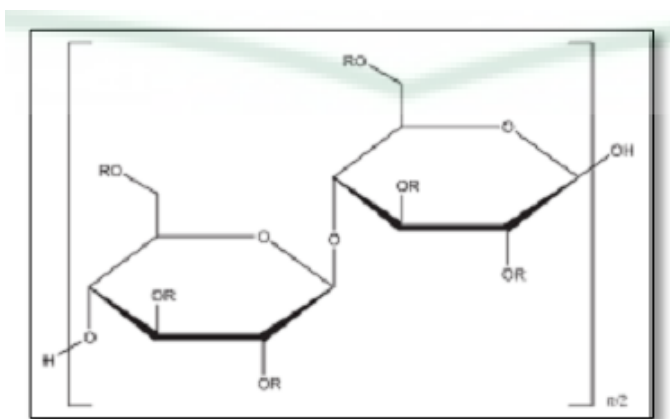


Gambar 12. Rumus Struktur *Poly(vinyl alcohol)* (Rowe *et al.* 2009).

Dalam aplikasinya *poly(vinyl alcohol)* digunakan dalam formulasi sediaan topikal (2.5% w/v) dan optalmik. *Poly(vinyl alcohol)* digunakan sebagai agen penstabil untuk emulsi (0.5% w/v). *poly(vinyl alcohol)* juga digunakan sebagai agen peningkat viskositas untuk formulasi kental seperti produk optalmik (0.25-3.0% w/v). *poly(vinyl alcohol)* juga digunakan sebagai airmata buatan dan sebagai pelumasan pada cairan kontak lens, dan digunakan dalam formulasi *sustained-release* untuk sediaan oral dan *patch transdermal* (Rowe *et al.* 2009)

6. HPMC

Hidroksi propil metil selulosa atau dengan nama lain *Benecel* MHPC; E464; Hidroksi propil metil selulosa; *hypermellose*; *hypromellosum*; *Methocel*; *methyl cellulose propylene glycol ether*; *methyl hydroxypropylcellulose*; MHPC; *Pharmacoat*; *Tylopur*; *Tylose MO*. Merupakan polimer dengan karakteristik bentuk berupa serbuk granul atau berserat dengan warna (Marian 2009).



Keterangan : R adalah H, CH₃ atau CH₃CH(OH)CH₂

Gambar 13. Struktur HPMC (Rowe, Paul and Marian 2009).

HPMC larut dalam air dingin dan membentuk larutan koloid kental, dapat larut dalam campuran etanol dan diklormetan, campuran metanol dan diklormetan serta larutan air dan alkohol. Beberapa grade dari HPMC larut dalam larutan aseton, campuran aseton dan propan-2-ol dan pelarut organik lainnya. Beberapa grade dapat mengembang dalam etanol. HPMC dengan konsentrasi 2% dalam larutan air memiliki pH sebesar 5,08,0 (Rowe *et al.* 2009).

HPMC tidak bercampur dengan beberapa zat pengoksidasi kuat. HPMC merupakan polimer nonionik, sehingga tidak membentuk kompleks dengan garam logam atau ion organik dan membentuk endapan yang tidak terlarut. Larutan HPMC stabil pada pH 3-11 (Rowe *et al.* 2009).

HPMC digunakan sebagai bahan bioadhesif, pembentuk film, zat penyalut, zat pengontrol pelepasan obat, agen pendispersi, peningkat disolusi, emulgator, stabilizer emulsi, zat peningkat viskositas, pengikat, *mukoadhesif* dan agen peningkat kelarutan (Rowe *et al.* 2009).

HPMC merupakan salah satu polimer yang paling banyak digunakan dalam penghantaran obat melalui rute bukal. HPMC dikategorikan sebagai polimer hidrofilik yang merupakan polimer yang dapat larut dalam air. Jenis polimer ini akan mengembang ketika ditempatkan dalam media berair yang disertai dengan disolusi matriks. Beberapa kelompok polimer polisakarida dan turunannya seperti HPMC memiliki permukaan aktif sebagai sifat tambahan dalam kemampuannya membentuk film (Roy *et al.* 2009).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Doshi *et al.* 2011, diketahui bahwa film diklofenak yang mengandung polimer HPMC memiliki waktu tinggal yang paling lama dibandingkan dengan film yang mengandung polimer PVA dan kombinasi PVA-PVP. Selain itu penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa film yang mengandung HPMC memiliki kekuatan bioadhesif yang paling tinggi. Selain itu dari penelitian yang dilakukan oleh Lalatendu tahun 2004 menunjukkan bahwa patch Salbutamol sulfat yang mengandung polimer HPMC sebanyak 1,5% memiliki waktu tinggal yang lebih lama, yaitu selama $2,9 \pm 0,55$ jam jika dibandingkan dengan patch yang mengandung PVA 10% dengan waktu tinggal $2,20 \pm 0,98$ jam (Lalatendu *et al.* 2004).

H. Analisis dan Karakterisasi Nanokristal

1. PSA (*Particle Size Analyzer*)

Metode yang paling umum digunakan untuk analisa gambar (mikrografi), meliputi metode mikroskopi dan metode holografi. Alat yang sering digunakan biasanya SEM, TEM dan AFM. Namun seiring dengan berkembangnya ilmu pengetahuan yang lebih mengarah ke era nanoteknologi, para peneliti mulai menggunakan *Laser Diffraction* (LAS). Metode ini dinilai lebih akurat untuk analisis bila dibandingkan dengan metode analisis gambar maupun metode ayakan (sieve analyses), terutama untuk sample-sampel dalam orde nanometer maupun submikron. Contoh alat yang menggunakan metode LAS adalah *Particle Size Analyzer* (PSA). Alat ini menggunakan prinsip *Dynamic Light Scattering* (DLS). Metode ini juga dikenal sebagai *Quasi-Elastic Light Scattering* (QELS). Alat ini

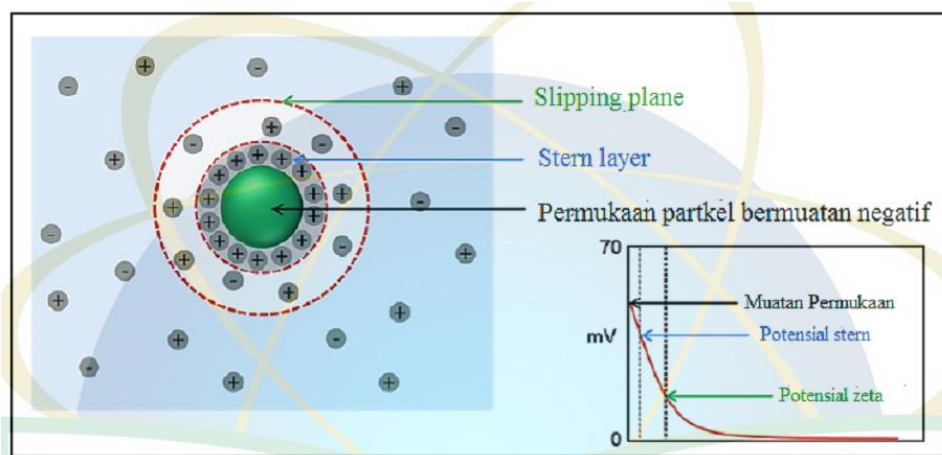
berbasis *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS). Metode LAS bisa dibagi dalam dua metode:

- a. Metode basah: metode ini menggunakan media pendispersi untuk mendispersikan material uji.
- b. Metode kering : metode ini memanfaatkan udara atau aliran udara untuk melarutkan partikel dan membawanya ke sensing zone. Metode ini baik digunakan untuk ukuran yang kasar, dimana hubungan antarpartikel lemah dan kemungkinan untuk beraglomerasi kecil.

Pengukuran partikel dengan menggunakan PSA biasanya menggunakan metode basah. Metode ini dinilai lebih akurat jika dibandingkan dengan metode kering ataupun pengukuran partikel dengan metode ayakan dan analisis gambar. Terutama untuk sampel-sampel dalam orde nanometer dan submicron yang biasanya memiliki kecenderungan aglomerasi yang tinggi. Hal ini dikarenakan partikel didispersikan ke dalam media sehingga partikel tidak saling beraglomerasi (menggumpal). Dengan demikian ukuran partikel yang terukur adalah ukuran dari single particle. Selain itu hasil pengukuran dalam bentuk distribusi, sehingga hasil pengukuran dapat diasumsikan sudah menggambarkan keseluruhan kondisi sampel (Lalatendu *et al.* 2004).

2. Zeta potensial

Potensial zeta adalah ukuran umum dari besarnya muatan elektrostatis partikel dalam dispersi, dan sangat sesuai dalam studi stabilitas suspensi nanopartikel. Umumnya, potensial zeta di atas nilai absolut dari 30 mV dianggap perlu untuk menjamin stabilitas koloid yang baik. Partikel bermuatan dalam dispersi cair dikelilingi oleh ion dalam lapisan ganda listrik. Lapisan ganda cair ini terdiri dari bagian dalam (stern layer) dengan ion berlawanan (dari permukaan partikel) yang terikat relatif kuat, dan wilayah luar dengan ion yang terikat kurang kuat. Potensial zeta adalah potensial listrik di bidang terluar (slipping plane), yaitu pada permukaan lapisan cair ganda stationer (Jonassen 2014).



Gambar 14. Skema ilustrasi partikel bermuatan negatif pada media air (Sumber: Jonassen 2014)

Selain berperan dalam stabilitas fisik, potensial zeta nanopartikel juga mempengaruhi efektivitasnya sebagai sistem penghantaran obat. Partikel bermuatan negatif dapat dengan cepat dibersihkan oleh makrofag. Selain itu sistem retikuloendotelial, terutama di hati dan limpa, menjadi kendala utama untuk pentargetan aktif karena kemampuannya untuk mengenali sistem ini, menghapusnya dari sirkulasi sistemik, dan akibatnya menghindari pengiriman efektif obat nano ke organ lain (Honary & Zahir 2013).

Perlekatan antara nanopartikel dengan membran sel jugaterpengaruh oleh muatan permukaan partikel. Nanopartikel dengan muatan permukaan tinggi sangat terikat pada membran sel dan menunjukkan serapan seluler tinggi, di mana interaksi elektrostatik antara membran anionik dan nanopartikel kationik memfasilitasi penyerapan tersebut. Setelah adsorpsi nanopartikel pada membran sel, penyerapan terjadi melalui beberapa mekanisme yang mungkin seperti pinositosis, endositosis dan fagositosis. Senyawa kationik juga dapat memiliki efek positif pada permeasi kulit, dimana komponen penyusun jaringan kulit seperti fosfatidil kolin dan karbohidrat yang ditemukan di sel mamalia mengandung gugus bermuatan negatif (Honary & Zahir 2013).

Nanopartikel dengan muatan positif lebih cenderung diserap oleh sel tumor dan waktu retensi yang lebih lama dibandingkan dengan partikel bermuatan negatif atau netral karena fosfatidil serin, residu bermuatan negatif, ditranslokasikan ke permukaan sel kanker dan nanopartikel dengan muatan positif

dapat ditranslokasikan oleh sel-sel tumor baik melalui endositosis, atau interaksi muatan dan penambatan ligan-reseptor (Honary & Zahir 2013).

3. Viskositas

Viskositas merupakan ukuran kekentalan fluida yang menyatakan besar kecilnya gesekan dalam fluida. Semakin besar viskositas fluida, maka semakin sulit suatu fluida untuk mengalir dan juga menunjukkan semakin sulit suatu benda bergerak didalam fluida tersebut. Didalam zat cair, viskositas dihasilkan oleh gaya kohesi antara molekul zat cair sehingga menyebabkan adanya tegangan geser antara molekul-molekul yang bergerak . Zat cair ideal tidak memiliki kekentalan. (Mutmainnah 2008).

Viskositas pada jaringan muncul karena adanya tumbukan antara partikel didalam jaringan. Besarnya viskositas pada suatu jaringan ditentukan oleh suatu konstanta perbandingan yang didefinisikan sebagai koefisien viskositas dan dinyatakan dengan rumus :

$$\eta = \frac{Fl}{vS}$$

Dengan η = koefisien viskositas $Ns.m^{-2}$, F = gaya tumbukan antar molekul (N) V = kecepatan partikel dalam jaringan ($M s^{-1}$) L = jarak tumbukan antar molekul (m) S = luas permukaan jaringan (m^2)

(Mutmainnah 2008)

Berdasarkan persamaan diatas dapat diketahui bahwa besarnya koefisien viskositas zat cair (η) sangat bergantung pada besarnya gaya tumbukan antar molekul (F), jarak tumbukan antar molekul (l) dan berbanding terbalik dengan besarnya kecepatan partikel dalam jaringan (v) serta luas permukaan jaringan (S). (Mutmainnah 2008).

4. Liofilisasi/ Freeze Drying

Liofilisasi atau *freeze drying* merupakan metode pengeringan yang banyak digunakan dalam farmasi untuk meningkatkan kestabilan dan memperpanjang waktu penyimpanan, salah satunya adalah untuk meningkatkan kestabilan nanokristal (Patel 2012). *Freeze drying* merupakan proses pengeringan dengan menggunakan temperatur yang rendah, metode ini menguntungkan bagi bahan

yang tidak tahan panas. Pada prinsipnya pengeringan beku terdiri dari dua proses, yaitu pembekuan yang dilanjutkan dengan pengeringan. Dalam hal ini, proses pengeringan berlangsung pada saat bahan dalam keadaan beku sehingga proses perubahan fase yang terjadi adalah sublimasi (Alanzi *et al.* 2007).

Proses pengeringan beku diperlukan suatu krioprotektan untuk melindungi sistem nanokristal dari agregasi dan penggabungan ukuran partikel. Krioprotektan yang biasa digunakan adalah manitol, sorbitol, *trehalose*, glukosa dan *polyvinylpyrrolidone* (PVP). Konsentrasi krioprotektan yang digunakan biasanya adalah 10-15% (Nireesha *et al.* 2013).

5. SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

SEM (*Scanning Electron Microscopy*) adalah analisis untuk penggambaran sampel dengan perbesaran hingga puluhan ribu kali. Dengan analisis SEM dapat melihat ukuran partikel yang tersebar pada sampel. SEM bekerja dengan memanfaatkan elektron sebagai sumber cahaya untuk menembak sampel. Sampel yang ditembak akan menghasilkan penggambaran dengan ukuran hingga ribuan kali lebih besar (Stevens 2001).

SEM (*Scanning Electron Microscopy*) berbeda dengan TEM (*Transmission Electron Microscopy*) dalam hal bahwa suatu berkas elektron yang sangat halus di-scan menyilangi permukaan sampel dalam sinkronisasi berkas tersebut dalam tabung sinar katoda. Elektron elektron yang terhambur digunakan untuk memproduksi sinyal yang memodulasi berkas dalam tabung sinar katoda, yang memproduksi suatu citra dengan kedalaman medan yang besar dan penampakan yang hampir tiga dimensi. Dalam penelitian morfologi permukaan dengan menggunakan SEM, terbatas pemakaiannya, tetapi memberikan informasi yang bermanfaat mengenai topologi permukaan dengan resolusi sekitar 100 Å (Stevens 2001).

6. Kristanilitas dengan DSC

Differential Scanning Calorimetry (DSC) adalah teknik analisis termal yang paling sering digunakan. Teknik ini dikembangkan oleh E. S. Watson dan M. J. O'Neill pada tahun 1962 dan diperkenalkan secara komersial pada 1963 dalam Konferensi Kimia Analitik dan Spektroskopi Terapan (Pittsburgh-Neill

& Watson 1966). Sejak saat itu, DSC banyak digunakan pada berbagai disiplin ilmu. Analisis DSC digunakan untuk mengukur perubahan entalpi atau perubahan kapasitas panas dalam sampel sebagai fungsi temperatur atau waktu. Selain itu, DSC dapat menentukan kapasitas panas (*heat capacity*), suhu perubahan dari keadaan kaku ke keadaan elastis (T_g), suhu pembentukan kristal (T_c), suhu perubahan dari padat menjadi cair (T_m), dan derajat pengkristalan (*crystallinity*) (Jumadi & Sari 2014).

Teknik *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) mengukur jumlah energi yang diabsorpsi atau dibebaskan oleh sampel saat dipanaskan, didinginkan atau dipertahankan pada suhu konstan. Energi ini dihubungkan dengan perbedaan aliran panas antara sampel dengan pembanding. Bahan sampel dan bahan pembanding ditempatkan dalam wadah terpisah dan temperatur setiap wadah dinaikkan atau diturunkan dengan kecepatan yang sudah ditetapkan. Ketika sampel mengalami peristiwa termal (eksotermik atau endotermik), kenaikan atau penurunan panas dialirkan pada sampel atau pembanding agar keduanya dapat dipertahankan pada suhu yang sama. Panas yang diberikan kepada sampel atau pembanding per satuan waktu diberikan kepada suatu pencatat (Riskafuri 2011).

Hasil percobaan DSC adalah kurva fluks panas terhadap suhu atau terhadap waktu. Selain dapat digunakan untuk mengidentifikasi parameter yang telah disebutkan sebelumnya, kurva ini juga dapat digunakan untuk menghitung entalpi transisi. Hal tersebut dapat dilakukan dengan mengintegrasikan puncak sesuai dengan transisi yang diberikan. Entalpi transisi dapat dinyatakan dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\Delta H = KA$$

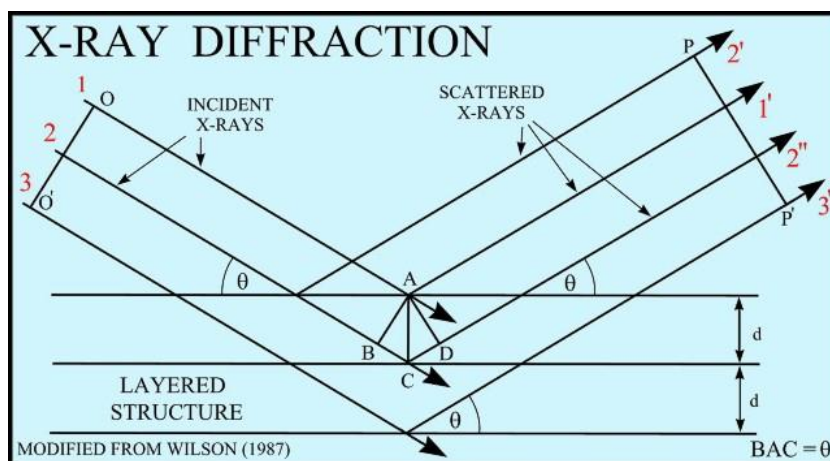
Di mana ΔH adalah entalpi transisi, K adalah konstanta kalorimetrik, dan A adalah luas di bawah kurva. Konstanta kalorimetrik akan bervariasi antar instrumen, dan dapat ditentukan dengan menganalisis sampel yang entalpi transisinya telah dikenal baik (Riskafuri 2011).

7. Difraksi Sinar-X

Difraksi sinar-X digunakan untuk mengetahui nilai parameter kisi, fasa kristal, ukuran kristal, dan derajat kekristalan. Metode XRD berdasarkan sifat

difraksi sinar-X, yakni hamburan cahaya dengan panjang gelombang λ saat melewati kisi kristal dengan sudut datang θ dan jarak antarbidang kristal sebesar d (Gambar 4) (Cullity & Stock (2001)).

Ketika sinar-X ditembakkan pada bahan terjadi interaksi dengan elektron dalam atom. Saat foton sinar-X bertumbukan dengan elektron, beberapa foton hasil tumbukan akan mengalami pembelokan dari arah awal datang. Jika panjang gelombang hamburan sinar-X tidak berubah, maka dinamakan hamburan elastik. Sinar-X ini yang membawa informasi distribusi atom dalam suatu bahan. Syarat terjadinya difraksi ialah harus memenuhi hukum Bragg, yaitu $2d \sin \theta = n \lambda$



Gambar 15. Skema difraksi sinar-X menurut Hukum Bragg (Cullity & Stock 2001).

Ukuran kristal dapat ditentukan dengan pola XRD berdasarkan metode Scherrer. Ukuran kristal ditentukan berdasarkan pelebaran puncak XRD yang muncul. Metode ini sebenarnya memprediksi ukuran kristal dalam material, bukan ukuran partikel. Berdasarkan metode ini, makin lebar puncak difraksi yang dihasilkan, makin kecil ukuran kristal. Kristal yang berukuran besar dengan satu orientasi menghasilkan puncak difraksi yang mendekati sebuah garis vertikal. Kristal yang sangat kecil menghasilkan puncak difraksi yang sangat lebar (Abdullah 2009).

Persamaan Scherrer sebagai berikut:

$$D = 0,9 \frac{\lambda}{B \cos \theta_B}$$

Dengan D adalah ukuran (diameter) kristal, λ adalah panjang gelombang sinar-X yang digunakan (nm), θ adalah sudut Bragg, B adalah *full width at half maximum* (FWHM) suatu puncak yang dipilih, dan $0,9$ adalah konstanta material (Abdullah 2009).

8. Uji Disolusi

Disolusi adalah proses suatu zat solid memasuki pelarut untuk menghasilkan suatu larutan. Pada saat obat mengalami disolusi, molekul obat pada permukaan awalnya akan membentuk suatu lapisan jenuh obat yang membungkus permukaan partikel padat. Larutan ini dikenal sebagai lapisan difusi. Dari lapisan difusi ini, molekul-molekul obat keluar dan melewati membran biologis untuk dapat diabsorpsi. Proses disolusi bergantung pada kemampuan partikel untuk dapat melalui membran. Akibatnya laju disolusi dapat mempengaruhi onset, intensitas dan lama respon serta kontrol bioavailabilitas obat tersebut keseluruhan dari bentuk sediaannya (Ansel 1989:118-120).

Disolusi merupakan salah satu kontrol kualitas yang dapat digunakan untuk memprediksi bioavailabilitas, dan dalam beberapa kasus dapat sebagai pengganti uji klinik untuk menilai bioekivalen. Disolusi mengacu pada proses ketika fase padat (misalnya tablet atau serbuk) masuk ke dalam fase larutan, seperti air. Ketika obat “melarut”, partikel-partikel padat memisah dan molekul demi molekul bercampur dengan cairan dan tampak menjadi bagian dari cairan tersebut. Oleh sebab itu, disolusi obat adalah proses ketika molekul obat dibebaskan dari fase padat dan masuk ke dalam fase larutan (Sinko 2012).

Setiap pengujian, volume dari media disolusi ditempatkan dalam bejana dan dibiarkan mencapai temperatur $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Kemudian satu tablet atau satu kapsul yang diuji dicelupkan ke dalam bejana atau ditempatkan dalam keranjang dan pengaduk diputar dengan kecepatan seperti yang ditetapkan dalam monografi. Pada waktu-waktu tertentu contoh dari media diambil untuk analisis kimia dari bagian obat yang terlarut. (Sinko 2012).

I. Landasan Teori

Fisetin adalah flavonoid tanaman bioaktif penting besar sebagai obat terapi berpotensi berguna, untuk berbagai radikal bebas yang dimediasi serta penyakit lainnya (Sengupta *et al.* 2005). Fisetin juga dilaporkan menurun risiko kardiovaskular oleh ameliorating hati steatosis dan dengan menurunkan sirkulasi konsentrasi glukosa. Namun, penggunaan fisetin sebagai senyawa aktif obat yang siap digunakan masih sangat sedikit karena masalah kelarutan dan laju disolusi senyawa ini di dalam air .(Odeh *et al.*, 2011) .

Rendahnya kelarutan dan laju disolusi menyebabkan fisetin memiliki ketersediaan hayati yang rendah di dalam tubuh. Beberapa tahun belakangan telah berkembang teknologi peningkatan kelarutan dan laju disolusi obat yang lebih efektif dalam mengatasi masalah laju disolusi dan ketersediaan hayati suatu senyawa. Salah satu metode tersebut teknologi formulasi nanokristal. Teknologi formulasi nanokristal memberikan kelebihan tersendiri seperti peningkatan saturation solubility, laju disolusi, dan adhesiveness tomembran cell (Junyaprasert & Morakul 2015).

Strategi nanosizing dibagi menjadi dua yaitu “*bottom-up*” dan “*top down*” (Chen *et al.* 2002; Rasenack and Muller 2004). Teknologi *top-down* merupakan metode pembuatan nanopartikel dengan menggunakan gaya mekanik, sehingga mengubah partikel berukuran besar menjadi kecil. Hal yang perlu diperhatikan bila menggunakan metode *top-down* adalah kekuatan atau ketahanan bahan, kekerasan, sifat abrasive, bentuk dan ukuran partikel, serta sensitivitasnya terhadap suhu (Gupta dan Kompella 2006; Van Eerdenbrughet *al.* 2008).

Dalam hal ini salah satu metode *top down* adalah ultrasonikasi, dimana Ultrasonik 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).

Efek kimia pada ultrasonikasi ini menyebabkan molekul-molekul berinteraksi sehingga terjadi perubahan kimia. Interaksi tersebut disebabkan panjang gelombang ultrasonik lebih tinggi dibandingkan panjang gelombang molekul-molekul. Interaksi gelombang ultrasonik dengan molekul-molekul terjadi melalui media cairan. Gelombang yang dihasilkan oleh tenaga listrik diteruskan oleh media cair ke medan yang dituju melalui fenomena kavitasi akustik yang menyebabkan kenaikan suhu dan tekanan lokal dalam cairan (Wardiyati *et al.* 2004). Ultrasonikasi pada cairan memiliki berbagai parameter seperti frekuensi, tekanan, suhu, viskositas, dan konsentrasi suatu sampel. Aplikasi ultrasonikasi pada polimer berpengaruh terhadap degradasi polimer tersebut (Wardiyati *et al.* 2004).

Surfaktan dan polimer dalam hal ini berperan sebagai penstabil dimana diharapkan untuk mencegah agregasi partikel menjadi lebih besar lagi pada saat berukuran nanometer dan juga untuk menurunkan tegangan permukaan atau pun meningkatkan kelarutan. Dalam penelitian ini digunakan surfaktan adalah tween 80, na lauryl sulfat dan poloxamer 188. sedangkan polimer yang digunakan adalah PVA, PVP, dan HPMC yang masing masing digunakan sebagai penstabil dan ditambahkan secara tunggal.

J. Hipotesis

1. Fisetin dapat dibuat nanokristal dengan metode sonikasi.
2. Jenis dan konsentrasi *stabilizer* memiliki pengaruh terhadap fisetin nanokristal.
3. Nanosuspensi fisetin stabil dalam penyimpanan.
4. Pembuatan nanokristal fisetin dapat mempercepat kelarutan kinetik dan disolusinya.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi sampel yang digunakan adalah mikrokristal fisetin (Sigma Aldrich, USA). Ukuran kisaran mikron yang telah terjamin kemurniaannya, yang dibuat dengan surfaktan (*tween 80*, *Na-lauryl sulfat*, *poloxamer 188*) dan polimer (*hidroksi propil metal sellulosa* (HPMC), *polyvinylpyrrolidone* (PVP), *polyvinylalcohol* (PVA)).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah mikrokristal fisetin murni yang dibuat nanokristal fisetin dengan surfaktan (*tween 80*, *na lauryl sulfat*, *poloxamer188*) dan polimer (HPMC, PVA dan PVP) dengan variasi tertentu.

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 nanokristal fisetin yang dibuat dengan stabilizer surfaktan dan polimer yang berbeda, konsentrasi surfaktan (*tween 80*, *Na lauryl sulfat*, *poloxamer 188*) dan polimer (PVP, PVA dan HPMC) yang berbeda.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah karakteristik, stabilitas dan mutu fisik dari nanokristal fisetin (ukuran partikel kristal).

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah metode pembuatan nanokristal fisetin (alat, lama sonikasi dan amplitude 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 stabilizer surfaktan dan polimer yang berbeda *tween 80*, *SLS*, *poloxamer 188*, *PVP*, *PVA*, dan konsentrasi HPMC yang berbeda.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian ini yaitu karakterisasi nanokristal fisetin yaitu ukuran partikel dan zeta potensial, analisis morfologi, viskositas, kristalinitas, uji kelarutan dan uji disolusi.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralkan atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat yaitu proses pembuatan nanokristal dengan metode *top down*.

3. Definisi operasional variabel utama

Zat aktif fisetin dengan proposi stabilizer surfaktan (tween 80, SLS, poloxamer 188) dan polimer (PVP, PVA, HPMC). Menentukan ukuran partikel pada nanokristal fisetin yaitu kurang dari 1000 nm. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari nanopartikel. Ukuran partikel merupakan uji untuk mengetahui ukuran partikel dari nanokristal fisetin yang dibuat. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari nanokristal. Pengukuran ukuran partikel dilakukan dengan alat *Particle Size Analyzer* (PSA).

Zeta potensial merupakan prediktor yang baik dari fenomena glasi 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 *Particle Size Analyzer* (PSA).

Viskositas adalah salah satu karakterisasi suatu suspensi, dalam hal ini uji untuk mengetahui viskositas dilakukan pada saat fisetin telah disonikasi sehingga fisetin dalam bentuk nanosuspensi. Viskositas merupakan ukuran kekentalan fluida yang menyatakan besar kecilnya gesekan dalam fluida. Semakin besar viskositas fluida, maka semakin sulit suatu fluida untuk mengalir dan juga menunjukkan semakin sulit suatu benda bergerak dalam fluida tersebut. Dalam zat cair,

viskositas dihasilkan oleh gaya kohesi antara molekul zat cair sehingga menyebabkan adanya tegangan geser antara molekul-molekul yang bergerak. Zat cair ideal tidak memiliki kekentalan. (Mutmainnah 2008 : 6).

Analisis morfologi merupakan analisis yang digunakan untuk membandingkan bentuk dan morfologi fisetin standar dengan nanopartikel lipid padat yang mengandung fisetin. Analisis morfologi dilakukan dengan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*).

Derajat kristalinitas adalah uji untuk mengukur perubahan energi panas yang terjadi pada sampel, yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan temperatur antara sampel dengan bahan yang bersifat inert secara termal, ketika keduanya dipanaskan secara bertahap dengan kecepatan tertentu. *X-ray diffraction (XRD)* untuk menentukan derajat kristalinitas nanokristal fisetin. Uji kelarutan untuk mengetahui ukuran suatu zat dapat melarut dalam suatu medium. Uji disolusi untuk mengetahui waktu pelepasan obat dari bentuk sediaan nanokristal menjadi bentuk terlarut.

Uji disolusi adalah uji untuk mengetahui kelarutan atau kadar zat yang terlarut pada waktu tertentu dari nanokristal fisetin dan alat yang digunakan untuk uji disolusi adalah alat uji disolusi, Alat disolusi yang sering digunakan ada 2 macam, yaitu tipe keranjang dan tipe dayung, yang akan digunakan adalah tipe dayung.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fisetin (Shaanxi Dideu Medichem Co. Ltd, Cina), tween80, natrium lauril sulfat (PT. Bratachem, Indonesia), poloxamer 188, PVP, PVA, HPMC (BASF, Jerman), aquadestilata (PT. Bratachem, Indonesia), serta bahan-bahan lain yang digunakan untuk uji disolusi.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat untuk memperkecil ukuran partikel *homogenizersonicator* (QSonica, newtown, U.S.A), *hotplate stirrer* (Thermo Scientific, China), alat uji ukuran partikel dan zeta

potensial *particle size analyzer* (Beckman Coulter Delsa® Nano C, USA), *magnetic stirer, hotplate stirer* (Thermo Scientific, China), *Scanning Electron Microscopy* (JEOL, JSM-6360 LA), *Powder X-Ray Diffraction* (Philips, PW 17170, Belanda), *dissolution tester* (Electrolab TDT-08L, India), Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10s, Thermo scientific), timbangan analitik (Ohaus), alat-alat gelas alat (Pyrex, Jepang) dan non gelas yang terdapat di laboratorium.

D. Jalannya Penelitian

1. Percobaan pendahuluan

Percobaan pendahuluan dilakukan untuk menentukan kondisi percobaan terbaik dan komposisi bahan yang sesuai untuk menghasilkan sediaan dispersi nanokristal yang stabil dan homogen. Pembuatan nanokristal ini menggunakan metode top down (sonikasi).

1.1 Skrining konsentrasi surfaktan dan polimer.

Tabel 3. Komposisi formula nanokristal fisetin

		Konsentrasi (mg)								
Fisetin		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
		10mg	10mg	10mg	10mg	10mg	10mg	10mg	10mg	10mg
Surfaktan	Tween 80	1%	2%	3%	-	-	-	-	-	-
	SLS	-	-	-	0,25%	0,5%	0,75%	-	-	-
	Poloxamer 188	-	-	-	-	-	-	1mg	2mg	3mg
	Aquadest	20ml	20ml	20ml	20 ml	20ml	20 ml	20 ml	20ml	20ml
		Konsentrasi (mg)								
Fisetin		F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18
		10mg	10mg	10mg	10mg	10mg	10mg	10mg	10mg	10mg
Polimer	PVA	0,15 mg	0,25 mg	0,5 Mg	-	-	-	-	-	-
	PVP	-	-	-	0,5%	0,7%	1 %	-	-	-
	HPMC	-	-	-	-	-	-	025%	0,5%	0,75%
	Aquadest	20ml	20ml	20ml	20ml	20ml	20 ml	20 ml	20ml	20ml

1.2 Skrining waktu dan frekuensi pada *sonicator*.

Tabel 4. Skrining waktu dan frekuensi
HPMC 0,75% (polimer)

	A=20%	A=30%	A=40%	A=50%	A=60%
T=10menit	F1	F2	F3	F4	F5
T=20menit	F6	F7	F8	F9	F10
T=30menit	F11	F12	F13	F14	F15

Sodium lauryl sulfat 0.75% (surfaktan)

	A=20%	A=30%	A=40%	A=50%	A=60%
T=10menit	F16	F17	F18	F19	F20
T=20menit	F21	F22	F23	F24	F25
T=30menit	F26	F27	F28	F29	F30

Keterangan:

A : amplitude

T : waktu

2. Pembuatan fisetin nanosuspensi

Pembuatan nanosuspensi fisetin diawali dengan mencampur fisetin dan aquabidestillata 500 mldengan surfaktan (tween 80, SLS, poloxamer 188) atau polimer (PVP, PVA, HPMC) secara tunggal atau masing-masing dilarutkan lalu ditambahkan aquabhidestillata dalam volum besar 600 ml. Kemudian campuran fisetin diaduk sampai surfaktan atau polimer merata dengan magnetic stirrer pada suhu kamar, lalu ditempatkan dalam alat sonikator dengan waktu dan frekuensi terpilih untuk memperkecil ukuran partikel menjadi partikel dalam ukuran nanometer, agar fisetin tidak rusak karna panas yang ditimbulkan dalam proses ini, sehingga memakai penangas es untuk menjaga suhu agar tetap dibawah atau sama dengan suhu kamar.

3. Karakterisasi fisetin nanosuspensi

3.1 Penetapan distribusi ukuran partikel dan potensial zeta. Untuk mengetahui ukuran sediaan nanopartikel dilakukan pengukuran ukuran dan distribusi nanopartikel menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA). Untuk mengetahui nilai potensial zeta diukur menggunakan *zeta potensial analyzer*.

3.2 Uji stabilitas fisik dalam penyimpanan. Meliputi ukuran partikel, indeks polidispersitas, potensial zeta dan pengamatan secara fisual selama penyimpanan selama delapan minggu.

4. Pengeringan dan karakterisasi fisetin nanokristal.

Nanosuspensi fisetin ditambah manitol 0.5% selanjutnya diliofilisasi kembali menggunakan *deep freezer* pada suhu -75°C selama 24 jam. Padatan yang telah membeku selanjutnya di keringkan atau *freez dry* dengan menggunakan *lyophilizer* pada kondisi vakum 200 pascal selama 36 jam sehingga menghasilkan serbuk kering fisetin.

4.1. Penentuan % rendemen dari fisetin nanokristal. Dilakukan dengan cara menimbang fisetin nanokristal dari 500 ml nanosuspensi yang diliofilisasi sebelumnya dan dibagi bobot fisetin, stabilizer dan manitol yang ditambahkan. Karna dalam tahap liofilisasi air akan hilang seluruhnya karna alat ini menggunakan pengeringan dengan perbedaan titik beku.

4.2. Pengujian morfologi nanopartikel. Penentuan bentuk partikel nanosuspensi dilakukan menggunakan mikroskop Nikon E50iPol, dipindai menggunakan Nikon DS-Fil dan ditampilkan dengan digital sight DS-U2. Dilakukan pencitraan morfologi SEM dengan cara sampel diberi lapisan tipis emas-paladium (Au (80%) dan Pd (20%)) menggunakan arus pada posisi 6-7,5 mA, tegangan 1,2 kV, kevakuman pada nilai 0,2 Torr selama 4 menit sehingga diperoleh lapisan 400 amstrong.

4.3. Pengujian sifat kristalinitas. Sifat kristalinitas fisetin mikrokristal dan nanokristal dianalisis dengan menggunakan analisis PXRD. PXRD dengan difraktometer menggunakan Cu sebagai anoda dan grafit monokromatik, instrumen dioperasikan pada voltase 40kV dan arus 30mA.

4.4. Uji kelarutan kinetik. Uji kelarutan dilakukan terhadap fisetin mikrokristal dan nanokristal. Ditimbang masing-masing 10 mgserbuk fisetin kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala 100 ml yang telah berisi 100 ml air suling, kemudian dilarutkan dengan menggunakan shaking thermostatic water bath pada suhu $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, kecepatan pengadukan 100 rpm selama 7 hari. Setiap 24 jam ditentukan kadar fisetin yang terlaru sampai membentuk larutan jenuh.

Larutan kemudian disaring dan filtrat yang dihasilkan diencerkan dan dianalisis secara spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum yang telah ditetapkan pada pengujian disolusi.

5. Pembuatan kurva kalibrasi

5.1. Pembuatan dapar fosfat. Sebanyak 0,5 gram kalium dihidroksi fosfat dimasukkan ke dalam *beaker glass* 1 liter kemudian ditambah 8,86 natrium monohidrat fosfat dan ditambah aquades hingga 1 liter. Derajat keasaman (pH) disesuaikan dengan asam fosfat 10% atau larutan NaOH 1N hingga diperoleh nilai pH 7.4 (USP 2015).

5.2. Pembuatan larutan induk. Ditimbang fisetin murni 10 mg, kemudian dilarutkan dalam etanol dalam labu ukur 100 mL. Didapat larutan dengan konsentrasi 1.00 ppm, larutan tersebut dipipet 1 mL dan diencerkan dengan aquadestillata dalam labu takar 10 mL sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 10 ppm.

5.3. Penetapan panjang gelombang maksimum. Larutan induk fisetin dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang antara 200-500 nm. Hasil *scan wavelength* menunjukkan nilai absorbansi tertinggi terdapat pada panjang gelombang maksimum.

5.4. Penetapan operating time. Larutan induk kurkumin dibaca pada panjang gelombang maksimum dimulai dari menit 0 sampai menit ke 30 didapatkan nilai absorbansi yang stabil.

5.5. Pembuatan larutan seri kurva kalibrasi. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh digunakan untuk pengukuran serapan kurkumin selanjutnya. Dari larutan 10 ppm, dipipet masing-masing 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL, 10 mL, dan 12 mL, kemudian diencerkan dalam metanol masing-masing dalam labu takar 10 mL sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm. Larutan tersebut kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum sebelumnya. Selanjutnya dibuat persamaan regresi liniernya.

6. Verifikasi metode spektrofotometer-UV

Validasi metode UV untuk metode validasi berdasarkan berbagai parameter seperti linearitas, batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ).

Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dilakukan dengan menggunakan metode perhitungan berdasarkan standar deviasi respon dan kemiringan (*slope*) kurva baku. Standar deviasi respon dapat ditentukan dengan berdasarkan standar deviasi blangko pada standar deviasi residual garis regresi linier atau dengan standar deviasi intersep-y pada garis regresi. Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi (Gandjar & Rahman 2012).

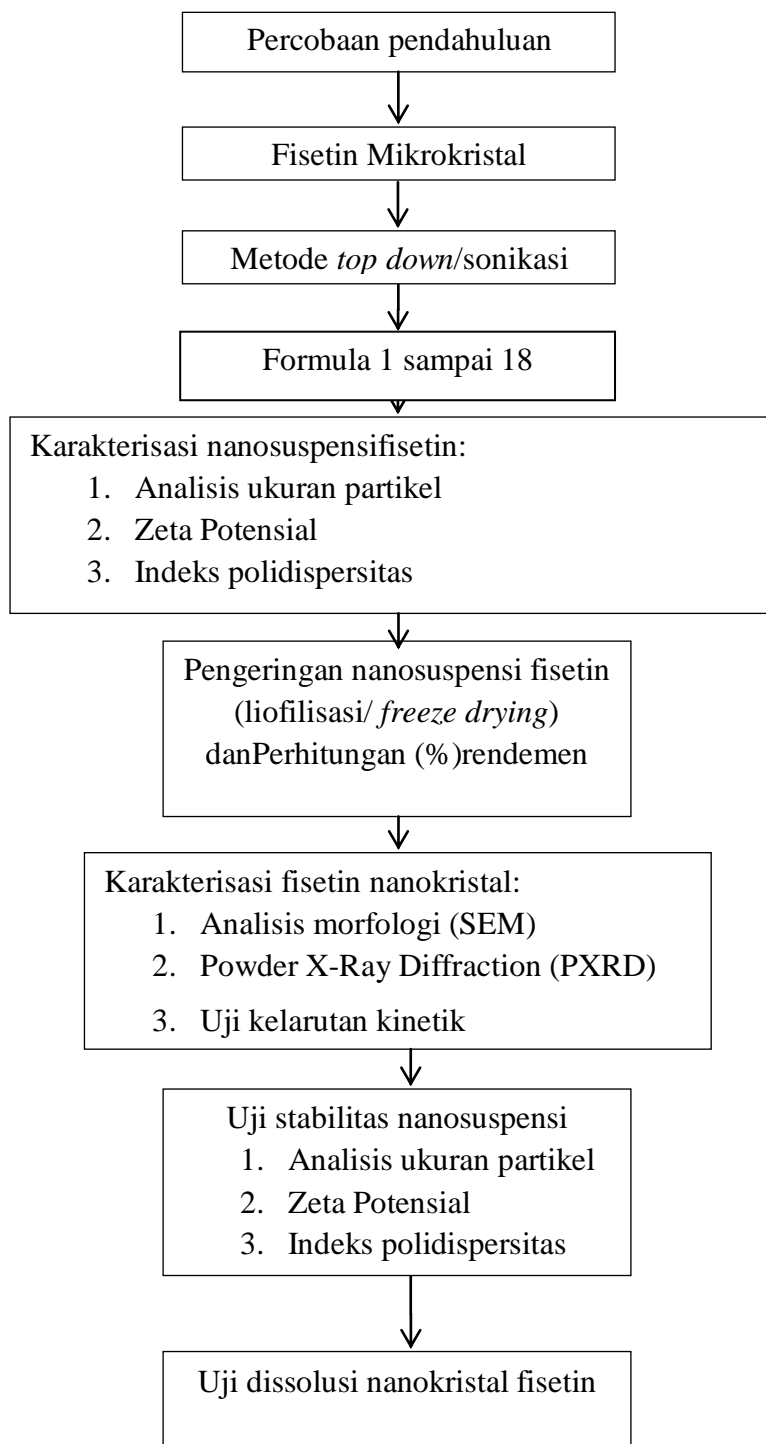
7. Uji disolusi fisetin nanokristal

Pelepasan obat di dalam tubuh dapat diketahui dengan uji disolusi atau kelarutan. Uji disolusi formula fisetin nanokristal dilakukan dengan cara dimasukan dengan ke 800 ml medium disolusi lalu ditambah lagi dengan 100 ml medium disolusi agar sampel tenggelam dan tidak mengambang dipermukaan lalu didisolusi dengan pengaduk dayung. Pengaduk berputar 100 rpm, suhu medium air suling dipertahankan $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Waktu yang digunakan dalam uji disolusi yaitu 5, 10, 15, 20, 30, 45, dan 60 menit. Setiap pengambilan 5 ml sampel diganti dengan 5 ml dapar fosfat pH 7.4. sampel diperiksa dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum dengan dapar phospat pH 7.4 yaitu 362 nm.

E. Analisis Hasil

Analisis hasil yang diperoleh dianalisis dengan uji kolmogorov-seminov untuk mengetahui data yang diteliti terdistribusi normal, jika data terdistribusi normal maka langkah selanjutnya dilanjutkan dengan uji Analisa Variansi (ANOVA). Profil dissolusi antara serbuk fisetin murni dan fisetin nanokristal dibandingkan dengan menggunakan *Paired sampel T test* untuk mengetahui fisetin murni dan fisetin nanokristal memiliki perbedaan % disolusi yang signifikan atau tidak yang di tandai dengan nilai sig(2-tailed).

F. Skematis Jalannya Penelitian



Gambar 16. Skema jalannya penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Percobaan Pendahuluan

Pembuatan nanokristal fisetin dilakukan menggunakan metode *top-down* (sonikasi) sehingga didapat sediaan nanokristal yang homogen dan mempunyai ukuran partikel yang dalam range nanometer yaitu 200-1000 nm. Pada awal penelitian, terlebih dahulu dilakukan percobaan pendahuluan yang bertujuan untuk mengetahui kondisi percobaan terbaik untuk menghasilkan sediaan nanokristal yang stabil dan homogen. Dalam percobaan ini, kondisi percobaan yang perlu diperhatikan adalah konsentrasi pada setiap *stabilizer* yang digunakan, amplitude dan waktu sonikasi. Sediaan fisetin yang dibentuk akan menghasilkan sediaan berupa nanosuspensi. Dalam proses yang pembuatannya, serbuk fisetin murni dan bahan *stabilizer* ditambahkan pada aquabidest lalu disonikasi dengan amplitude dalam waktu tertentu.

Pada percobaan yang dilakukan menggunakan beberapa *stabilizer* yaitu golongan elektrostatik dan sterik. Penstabil jenis elektrostatik bekerja dengan mekanisme halangan elektrostatik. Bahan penstabil ini mengandung gugus-gugus terion dalam pendispersi nanopartikel akan akan teradsorpsi pada permukaan partikel. Untuk menjaga elektronetralitas, sejumlah ion dengan muatan berlawanan (counter ion) akan mengelilingi partikel sebanding dengan muatan pada permukaan partikel tersebut dan membentuk lapisan rangkap listrik. Lapisan rangkap listrik akan menstabilkan partikel tersebut sehingga nanopartikel tidak saling beraglomerasi (Shi 2002 & Libo *et al* 2011). Penstabil jenis sterik bekerja melalui mekanisme halangan sterik. Mekanisme stabilisasi sterik yaitu dengan menyelimuti permukaan partikel sehingga interaksi antar partikel menjadi minimal. Polimer akan diadsorpsi menyelimuti permukaan partikel membentuk lapisan-lapisan (Shi 2002).

1. Skrining amplitude dan waktu pada sonikator

Data skrining amplitude dan waktu pada sonikator

Tabel 5. HPMC 0,75% (polimer)

	A=20%	A=30%	A=40%	A=50%	A=60%
T=10menit	F1	F2	F3	F4	F5
T=20menit	F6	F7	F8	F9	F10
T=30menit	F11	F12	F13	F14	F15

Tabel 6. Sodium lauryl sulfat 0.75% (surfaktan)

	A=20%	A=30%	A=40%	A=50%	A=60%
T=10menit	F16	F17	F18	F19	F20
T=20menit	F21	F22	F23	F24	F25
T=30menit	F26	F27	F28	F29	F30

Keterangan:

A : amplitude

T : waktu

Skrining amplitude dan waktu pada sonikator bertujuan mendapatkan amplitude dan waktu optimum untuk memperkecil ukuran partikel dalam skala nanometer. Berdasarkan data pada tabel 5, terdapat 30 formula yang dibuat dimana formula 1 sampai 15 adalah formula dengan stabilizer polimer dan formula 16 sampai 30 adalah stabilizer surfaktan. dimana yang dipilih salah satu secara acak dengan konsentrasi terbesar dari tiga polimer dan surfaktan yang nantinya akan dipakai untuk skrining stabilizer, dari polimer yang dipilih secara acak yaitu HPMC0,75% dan surfaktan adalah SLS 0,75%, karena stabilizer dan konsentrasinya tidak menentukan dalam aspek memperkecil ukuran partikel dimana fungsinya adalah mempertahankan ukuran partikel tersebut dalam skala nanometer setelah di sonikator.

Tabel 7. Hasil skrining amplitude dan waktu pada sonikator

No	Formula	Ukuran partikel (nm)	Indeks Polidispersitas
1	F1H	1224.2	0.407
2	F2H	928.8	0.332
3	F3H	1591.1	0.546
4	F4H	935.7	0.472
5	F5H	1244.9	0.412
6	F6H	1251.2	0.341
7	F7H	963	0.37
8	F8H	711.1	0.474
9	F9H	1019.8	0.323
10	F10H	944.4	0.404

No	Formula	Ukuran partikel (nm)	Indeks Polidispersitas
11	F11H	8462.3	2.157
12	F 12H	-	-
13	F13H	1237.8	0.403
14	F14H	1145.6	0.383
15	F 15H	-	-
16	F 16H	-	-
17	F 17H	-	-
18	F 18H	-	-
19	F 19H	-	-
20	F 20H	-	-
21	F 21H	-	-
22	F22H	430	0.311
23	F 23H	-	-
24	F 24H	-	-
25	F25H	415.4	0.351
26	F 26H	-	-
27	F27H	477.1	0.256
28	F28H	361.7	0.414
29	F 29H	-	-
30	F 30H	-	-

Keterangan: warna hijau adalah sudah termasuk range ukuran nanometer (200-1000 nm)

Dari table 7 dapat dilihat bahwa yang memasuki range nanometer terdapat 9 formula yaitu formula 2, 4, 7, 8, 10, 22, 25, 27 dan 28. Dari semua formula yang termasuk range nanometer dipilih formula dengan ukuran yang paling kecil yaitu formula 28 dengan ukuran 361,7 nm yaitu pada amplitude 40 % selama 30 menit. Pada table juga terdapat nilai index polidispersitas yang menggambarkan keseragaman ukuran partikel, semakin kecil nilainya maka ukuran partikel tersebut semakin seragam, tetapi tidak ikut mempengaruhi dalam menentukan amplitude dan waktu karna nilai index polidispersitanya seragam dan termasuk dalam range yang baik secara keseluruhan, dengan demikian ukuran partikel dari semua formula yang termasuk range nanometer seragam dalam hal Ukurannya.

2. Skrining stabilizer

Setelah dilakukan skrining waktu dan amplitude dan mendapatkan waktu dan amplitude terpilih maka dilanjutkan dengan skrining stabilizer yaitu untuk menentukan stabilizer manakan yang paling sesuai untuk menstabilkan atau menjaga ukuran nanometer fisetin dalam keadaan konstan dalam penyimpanan.

Tabel 8. Hasil skrining stabilizer

No	Formula	ukuran partikel (nm)	Indeks polidispersitas
1	F 1(10 mg fisetin + tween 80 1%)	2173.2	0.634
2	F 2(10 mg fisetin + tween 80 2%)	4513.8	0.831
3	F 3 (10 mg fisetin + tween80 3%)		
4	F 4(10 mg fisetin + SLS 0,25%)	465.1	0.253
5	F 5(10 mg fisetin + SLS 0,5%)	445.6	0.416
6	F 6(10 mg fisetin + SLS 0,75%)	264.2	0.474
7	F 7(10 mg fisetin + Poloxamer 188 1%)	343.9	0.433
8	F 8(10 mg fisetin + Poloxamer 188 2%)	419.6	0.084
9	F 9(10 mg fisetin + Poloxamer 188 3%)	377.1	0.273
10	F10(10 mg fisetin + PVA 0,15%)	361.9	0.197
11	F 11(10 mg fisetin + PVA 0,25%)	339	0.25
12	F 12(10 mg fisetin + PVA 0,5%)	410.3	0.036
13	F13(10 mg fisetin + PVP 0,5%)	457.9	0.225
14	F 14(10 mg fisetin + PVP 0,75%)	400	0.186
15	F 15(10 mg fisetin + PVP 1%)	348.3	0.263
16	F16(10 mg fisetin + HPMC 0,25%)	329.9	0.291
17	F17(10 mg fisetin + HPMC 0,5%)	642.1	0.184
18	F18(10 mg fisetin + HPMC 0,75%)	607.6	0.265

Keterangan: warna hijau dipilih untuk freeze drying

Dari table hasil skrining stabilizer tersebut dipilih satu stabilizer dengan ukuran yang paling kecil yaitu formula 6 dengan ukuran partikel 264,2 nm dan indeks polidispersitas 0.474 yang termasuk stabilizer jenis surfaktan yaitu *sodium lauryl sulfat* dengan konsentrasi 0.75%.

B. Pembuatan Fisetin Nanokristal

Fisetin nanokristal telah dapat dibuat dengan metode *top-down* yang sebelumnya telah dilakukan percobaan pendahuluan. Pada metode ini fisetin dan *stabilizer* terpilih yaitu *sodium lauryl sulfat* ditambahkan dalam aquabidest, lalu disonikasi dengan amplitude dan waktu terplih yaitu amplitude 40% dan waktu 30 menit. Dalam pengerjaannya menggunakan metode sonikasi dapat menghasilkan panas yang dapat merusak fisetin karna sifat fisetin yang sebagai antioksidan sehingga diberikan penangas es agar dapat menurunkan suhu dan mengurangi kerusakan fisetin. Pembuatan. Pembuatan nanokristal fisetin ini dalam volum yang lebih besar yaitu 600 ml sehingga dalam pembuatannya tidak langsung 600 ml, tetapi 20 ml sebanyak 30 kali sonikasi, hal ini dikarnakan amplitude dan waktu terpilih yang telah ditentukan pada percobaan pendahuluan yaitu hanya

untuk volum 20 ml, karna berbeda volum percobaan maka waktu dan amplitudanya juga berbeda hal ini karna dengan volum yang lebih besar diperlukan energi yang lebih besar dan waktu yang berbeda. Pada metode *freeze* Nanosuspensi yang terbentuk kemudian dilakukan liofilisasi menggunakan metode *freeze drying* dengan krioprotektan manitol. Prinsip *freeze drying* terdiri dari dua proses, yaitu pembekuan yang dilanjutkan dengan pengeringan. Proses pengeringan berlangsung pada saat bahan dalam keadaan beku *drying* tidak digunakan panas untuk menguapkan pelarut sehingga tidak akan merusak fisetin yang tidak tahan panas. Penggunaan manitol sebagai krioprotektan untuk melindungi sistem nanokristal dari agregasi dan penggabungan ukuran partikel

C. Perhitungan % rendemen nanokrista fisetin

Nanokristal fisetin adalah gabungan antara fisetin murni, stabilizer dan manitol sehingga dalam perhitungan rendemennya adalah:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot fisetin nanokristal}}{(\text{bobot fisetin murni} + \text{bobot SLS} + \text{bobot manitol})} \times 100\%$$

$$\% \text{ rendemen} = \frac{1123 \text{ mg}}{(500 \text{ mg} + 375 \text{ mg} + 250 \text{ mg})} \times 100\% = 99.82\%$$

Dengan hasil tersebut dapat diartikan bahwa rendemen dari nanokristal fisetin adalah maksimal karna mendekati 100%. Hal tersebut dapat terjadi karena metode *freeze drying* menggunakan system perbedaan titik beku, dimana titik beku pelarutnya yaitu aquaahidestillata dengan fisetin ataupun stabilizer berbeda.

D. Karakterisasi Fisetin Nanosuspensi

1. Penetapan Distribusi dan Ukuran partikel

Tabel 9. Hasil penetapan distribusi & ukuran partikel

Formula	Ukuran partikel (nm)	Indeks polidispersitas	Zeta potensial (mV)
(10 mg fisetin + SLS 0,75%)	483.4	0.544	-64.2

Ukuran partikel sangat penting dalam sistem nanopartikel. Ukuran partikel fisetin nanosuspensi diukur menggunakan alat PSA (*Particle size Analyzer*). Penggunaan stabilizer surfaktan berpengaruh terhadap ukuran partikel

dan kestabilan nanosuspensi yang dihasilkan. Stabilizer surfaktan berfungsi dalam menstabilkan suspensi dengan cara memberikan muatan pada permukaan nanopartikel sehingga terjadi tolak-menolak antar partikel sehingga tidak terjadi aglomerasi menjadi partikel yang lebih besar.

Hasil pengukuran partikel fisetin nanosuspensi terlihat pada range ukuran nanopartikel yaitu 50-1000 nm. Keseragaman ukuran partikel dapat diketahui dengan indeks polidispersitas. Pada tabel 2 terlihat nilai indeks polidispersitas yang dihasilkan mendekati 0, semakin kecil nilai indeks polidispersitas maka partikel memiliki ukuran yang homogen dengan partikel lainnya, hal ini menunjukkan bahwa fisetin nanosuspensi merupakan dispersi yang cukup homogen. Selanjutnya ialah nilai zeta potensial yang menunjukkan muatan antar partikel, terlihat pada tabel bahwa partikel nanosuspensi fisetin memiliki muatan negative(-) 63.4 mv sehingga terjadi tolak-menolak antar partikel sehingga tidak terjadi aglomerasi menjadi partikel yang lebih besar. Muatan negative pada nanopartikel ini didapat melalui adsorpsi muatan dari sodium lauryl sulfat sebagai stabilizer jenis surfaktan dengan mekanisme halangan elektrostatik yang memiliki muatan negative.

E. Stabilitas Fisetin Nanokristal dalam Penyimpanan

1. Pengamatan secara visual

Pengamatan dilakukan terhadap semua formula pada skrining polimer dan surfaktan sebagai data perbandingan sebagai berikut:

Tabel 10. Stabilitas fisetin nanosuspensi pada suhu kamar.

Pembentukan endapan					
N0	Formula	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4
1	F 1(10 mg fisetin + tween 80 1%)	Tidak ada	Tidak ada	Ada+	Ada++
2	F 2(10 mg fisetin + tween 80 2%)	Tidak ada	Tidak ada	Ada+	Ada++
3	F 3 (10 mg fisetin + tween80 3%)	Tidak ada	Tidak ada	Ada+	Ada++
4	F 4(10 mg fisetin + SLS 0,25%)	Tidak ada	ada+	Ada++	Ada++
5	F 5(10 mg fisetin + SLS 0,5%)	Tidak ada	Tidak ada	Ada+	Ada++
6	F 6(10 mg fisetin + SLS 0,75%)	Tidak ada	Tidak ada	Ada+	Ada+
7	F 7(10 mg fisetin + Poloxamer 188 1%)	Ada+	Ada+	Ada++	Ada++
8	F 8(10 mg fisetin + Poloxamer 188 2%)	Ada+	Ada+	Ada++	Ada++
9	F 9(10 mg fisetin + Poloxamer 188 3%)	Tidak Ada	Ada+	Ada+	Ada++
10	F10(10 mg fisetin + PVA 0,15%)	Ada+	Ada+	Ada++	Ada++
11	F 11(10 mg fisetin + PVA 0,25%)	Ada+	Ada+	Ada++	Ada++

Pembentukan endapan					
N0	Formula	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4
12	F 12(10 mg fisetin + PVA 0,5%)	Ada+	Ada+	Ada++	Ada++
13	F13(10 mg fisetin + PVP 0,5%)	Ada+	Ada+	Ada++	Ada++
14	F 14(10 mg fisetin + PVP 0,75%)	Ada+	Ada+	Ad++	Ada++
15	F 15(10 mg fisetin + PVP 1%)	Ada+	Ada+	Ada++	Ada++
16	F16(10 mg fisetin + HPMC 0,25%)	Tidak ada	Ada+	Ada+	Ada++
17	F17(10 mg fisetin + HPMC 0,5%)	Tidak ada	ada+	Ada+	Ada++
18	F18(10 mg fisetin + HPMC 0,75%)	Tidak ada	Ada+	Ada+	Ada++

Keterangan: + endapan tipis, ++ endapan tebal.

Fisetin nanosuspensi (Formula 1 sampai 18) disimpan pada suhu ruang selama 4 minggu. Pada minggu ke-1 nanosuspensi yang disimpan dalam suhu kamar ada yang timbul endapan ada yang tidak dimana endapan dalam jumlah sedikit sedangkan pada minggu ke-2 sampai 4 endapan terbentuk dalam jumlah yang lebih banyak dan konstan. Hal ini karena kenaikan suhu akan meningkatkan energi kinetis dari tetesan-tetesan, sehingga memudahkan penggambungan antar partikel (beraglomerasi) suhu penyimpanan tidak sesuai menyebabkan rusaknya gerak brown. Gerak brown adalah gerak tidak beraturan atau gerak acak atau gerak zig-zag partikel koloid. Hal ini terjadi karena adanya benturan tidak teratur dari partikel koloid dengan medium pendispersi. Adanya gerak brown ini maka partikel koloid terhindar dari pengendapan karena terus-menerus bergerak (Wanibesak 2011). Endapan yang terjadi bersifat reversible karena dapat terdispersi kembali setelah dilakukan pengocokan. Pada formula terpilih terlihat bahwa hari pertama dan kedua tidak ada pengendapan dan minggu ke tiga dan 4 muncul sedikit endapan yang menandakan bahwa formula terpilih cukup stabil dibandingkan formula lainnya.

F. Pengukuran ukuran partikel sebelum dan setelah penyimpanan

Tabel 11. Ukuran partikel sebelum dan setelah penyimpanan

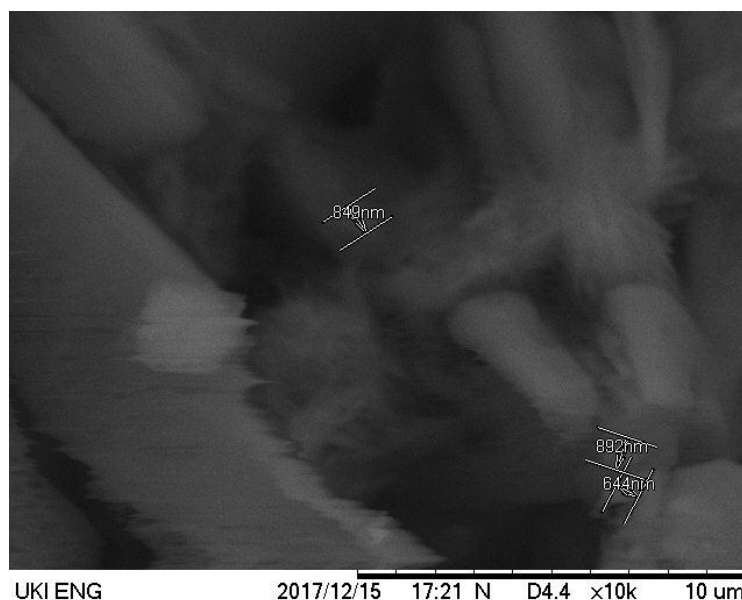
Formula 6			
Minggu ke-	Ukuran partikel (nm)	Indeks polidispersitas	Zeta potensial (mV)
0	483.4	0.544	-64.2
4	549.3	0.612	-63.6
8	788.4	0.694	-63.5

Uji stabilitas setelah penyimpanan dilakukan pada suhu ruang setiap 4 minggu selama 8 minggu hanya pada formula terpilih. Uji stabilitas meliputi

ukuran partikel, indeks polidispersitas dan potensial zeta. Hasil uji stabilitas dapat dilihat pada Tabel 4. Berdasarkan tabel 4 dapat dilihat bahwa setelah proses penyimpanan terjadi kenaikan ukuran partikel, nilai indeks polidispersitas dan penurunan muatan pada zeta potensial. Kenaikan ukuran partikel selama proses penyimpanan 8 minggu tersebut terjadi kenaikan ukuran tetapi masih dalam range nanopartikel dan juga nilai indeks polidispersitas mengalami kenaikan tetapi tidak signifikan karena kenaikannya yang sangat kecil. Tetapi pada nilai zeta potensial terjadi penurunan nilai muatan yang artinya adalah gaya tolak menolak antar partikel menurun tetapi hanya sedikit sehingga masih dapat menjaga kesetabilan ukuran partikel.

G. Pengujian Morfologi Nanopartikel

Penentuan bentuk partikel nanosuspensi dilakukan menggunakan mikroskop optik. Pengujian morfologi SEM dengan cara sampel diberi lapisan tipis emas-paladium (Au (80%) dan Pd (20%)) menggunakan arus pada posisi 6-7,5 mA, tegangan 1,2 kV, kevakuman pada nilai 0,2 Torr selama 4 menit sehingga diperoleh lapisan 400 amstrong.

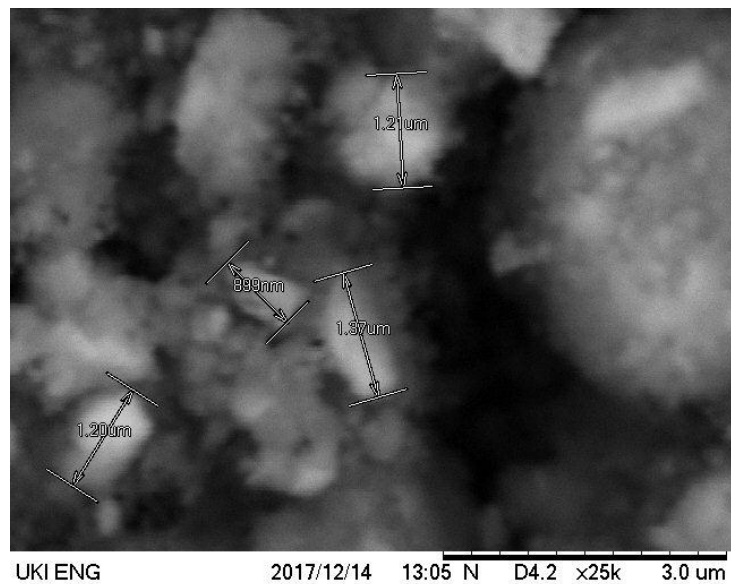


Gambar 17. Morfologi fisetin nanokristal menggunakan SEM

Mikroskop optik menunjukkan filamen panjang atau struktur tubular tidak beraturan, bagian dalam kristal tidak ada ruang berair. Ketidakteraturan ukuran kristal dibuktikan adanya beberapa struktur bergulung merupakan bagian dari

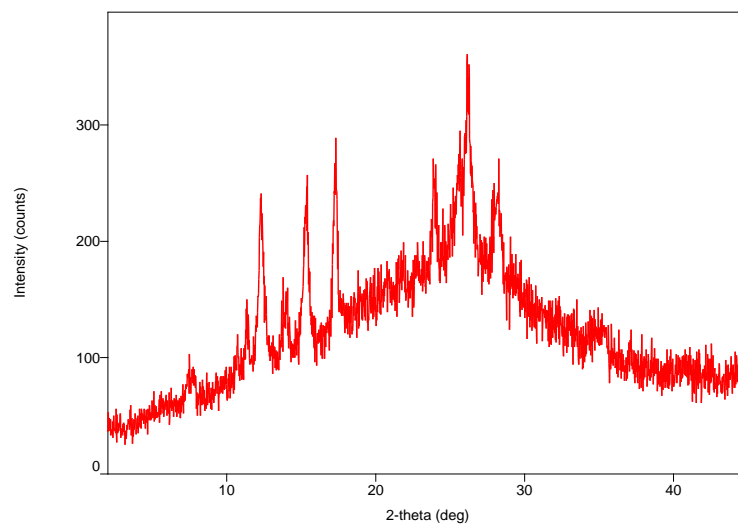
struktur tubular yang memanjang dengan ukuran 644 nm, 849 nm, 892 nm, yang memenuhi range persyaratan ukuran nanokristal.

Sedangkan morfologi sampel standart seperti terlihat pada gambar memiliki morfologi lebih speris dibandingkan dengan sampel nanokristal yang dibuat dengan metode sonikasi dan juga memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan sampel nanokristal fisetin yaitu 1.20, 1.21 dan 1.37 mikrometer yang berarti tidak termasuk range nanometer.

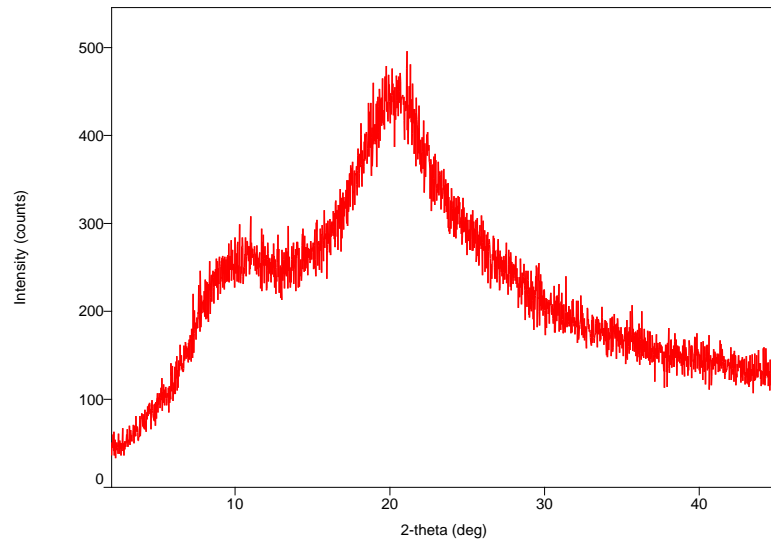


Gambar 18. Morfologi fisetin murni menggunakan SEM

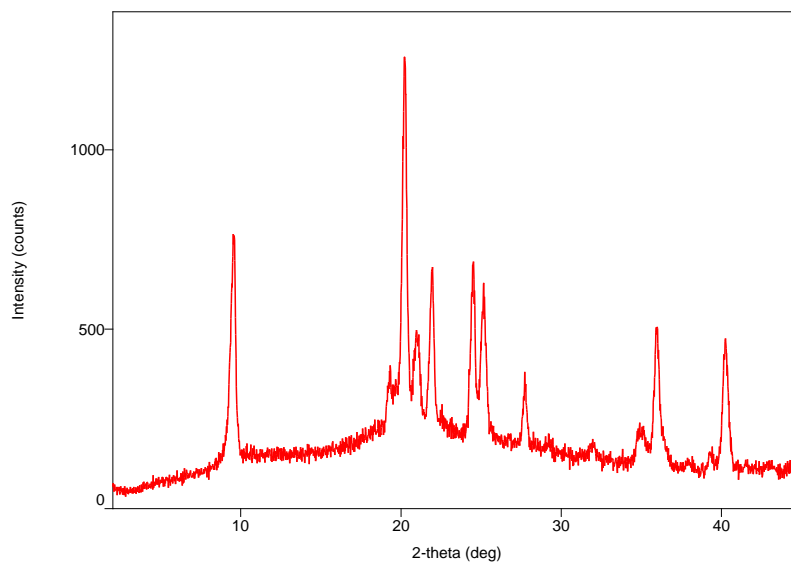
H. Pengujian Sifat Kristalinitas



Gambar 19. Hasil XRD fisetin murni



Gambar 20. Hasil XRD sodium lauryl sulfat



Gambar 21. Hasil XRD sampel (fisetin murni dan SLS)

Fisetin adalah senyawa yang berbentuk kristal. Karakterisasi XRD ini ditunjukkan untuk melihat adanya perbedaan sifat kristalinitas pada fisetin yang telah dibuat menjadi ukuran nanometer menggunakan metode *top-down*. Senyawa berbentuk kristal dapat dibuktikan dengan adanya *peak* pada difraktogram yang lancip keatas dengan meningkatnya intensitas secara cepat, sedangkan senyawa yang tidak terdapat kenaikan intensitas secara cepat memiliki bentuk amorf. Penstabil berupa SLS dapat menurunkan kristalinitas dari fisetin murni dapat

dilihat dari pergeseran nilai 2 theta menjadi lebih kecil serta sebagian menghilangkan peak yang dihasilkan sebelum dilakukan proses nanosiasi, tetapi fisetin masih dalam bentuk kristal.

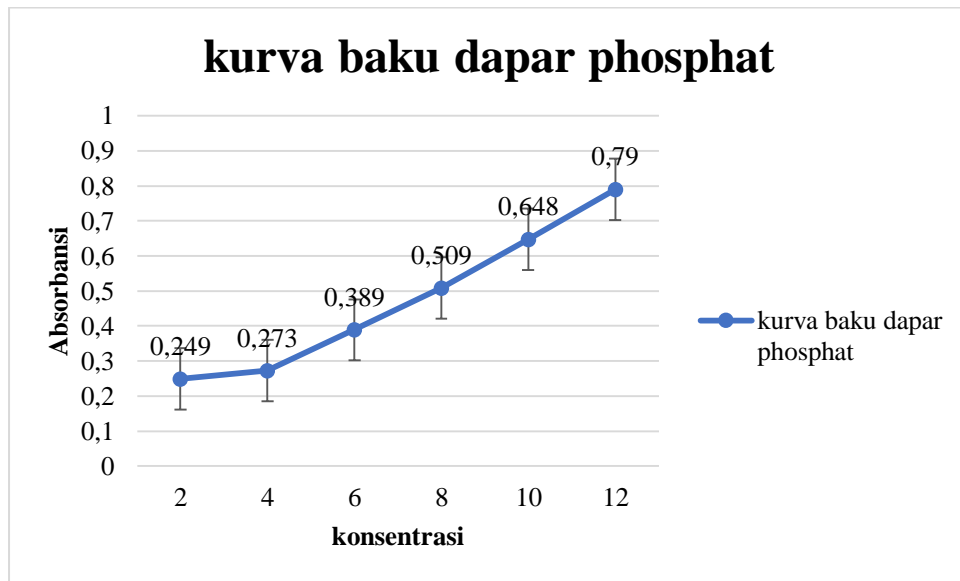
I. Kurva kalibrasi dan verifikasi metode analisis

1. Pembuatan kurva kalibrasi

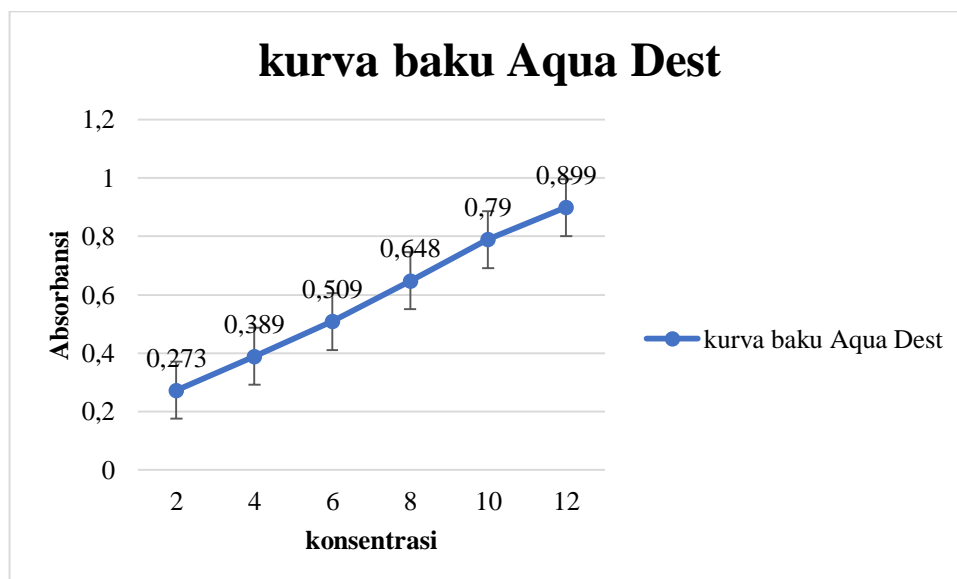
1.1 Penentuan panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum dari 10 mg serbuk fisetin dengan 100 ml dapar fosfat (pH 7,4) dan aquadestillata dengan penambahan *co-solvent* di encerkan 10 kali menjadi 10 ppm, dilakukan dengan *scanning* larutan fisetin dengan konsentrasi 10 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum diperoleh pada panjang gelombang 362 nm pada medium dapar fosfat dan 361 nm pada medium aquadestillata dengan serapan terbesar.

1.2 Penentuan operating time. Penentuan operating time bertujuan untuk melihat kestabilan reaksi suatu senyawa yang dianalisis. Larutan yang stabil ditunjukkan dengan serapan yang tidak berubah pada waktu tertentu. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk fisetin pada panjang gelombang maksimum fisetin, dibaca mulai dari menit 0 sampai menit 30 dapatkan nilai serapan yang stabil yaitu 15-25 menit pada medium dapar fosfat dan 13-22 menit pada medium aquadestillata.

1.3 Kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi fisetin dengan medium aquadest, dapar Fosfat pH 7,4 dan etanol dilakukan dibuat dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan 12 ppm dengan 3 pembacaan triplo. Seri konsentrasinya larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum fisetin pada masing-masing pelarut, kemudian dibuat kurva regresi linear antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi fisetin sehingga diperoleh persamaan regresi linear.



Gambar 22. Kurvakalibrasi medium dapar fosfat pH 7.4



Gambar 23. Kurvakalibrasi medium Aquadestillata

Hasil persamaan regresi linear dengan pelarut aquadest yang diperoleh yaitu $y = 0,0137 + 0,0638x$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,9993. Hasil persamaan regresi linear dengan pelarut dapar phospat pH 7,4 yang diperoleh yaitu $y = 0,0147 + 0,0636x$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,9983.

J. Verifikasi Metode Analisis

1. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji secara langsung proposional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Koefisien korelasi adalah parameter yang paling umum digunakan untuk mengetahui linearitas suatu metode. Nilai koefisien relasi merupakan indikator kualitas dari parameter linearitas yang menggambarkan respon analitik (luas area) terhadap konsentrasi yang diukur (Anonim, 1994). Hasil validasi metode analisis menunjukkan bahwa serapan lebih dari 99% dipengaruhi oleh konsentrasi analog kurkumin, ditunjukkan dari nilai koefisien determinasi (R^2) 0,9983 dan 0,9993. Nilai koefisien relasi yang dipersyaratkan oleh *Association of Official Analytical Chemis* (AOAC) adalah $> 0,99$. Berdasarkan hasil nilai koefisien korelasi kurva kalibrasi analog kurkumin pada metanol sebesar 0,9983 dan 0,9993 menunjukkan hasil yang baik karena $> 0,99$, menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proposional antara respon analitik dengan konsentrasi yang diukur.

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. *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantitation* (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*, S) kurva baku pada level yang mendekati LOD sesuai dengan rumus, standar deviasi dapat ditentukan berdasarkan intersep y pada garis regresi (Gandjar & Rohman 2012).

penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan batas kuantifikasi (LOQ). Hasil verifikasi metode analisis ditunjukkan pada Tabel 12.

Tabel 12. Parameter verifikasi metode analisis kurva kalibrasi fisetin

Parameter	Hasil
R2 (koefisien detriminasi) aquadestillata	0,9993
R2 (koefisien detriminasi) dapar fhosfat PH 7,4	0,9983
Batas deteksi (LOD) medium aquadestillata	0,166ppm
Batas deteksi (LOD) medium dapar fhosfat PH 7,4	0,571ppm
Batas kuantifikasi (LOQ) medium aquadestillata	1.540ppm
Batas kuantifikasi (LOQ) medium dapar fhosfat PH 7,4	1,730ppm

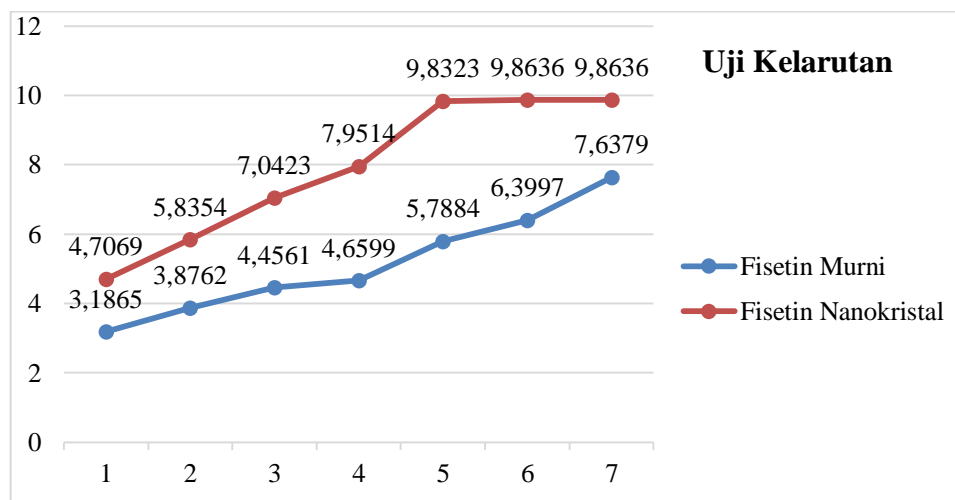
Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dilakukan dengan metode perhitungan yaitu berdasarkan standar deviasi respon dan kemiringan (slope) kurva baku. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blangko pada standar deviasi residual garis regresi linier atau standar deviasi intersep-y pada garis regresi. Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi (Gandjar & Rahman 2012). konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi adalah 0.166 ppm dan 0.571 ppm.

3. Penyetaraan Dosis antara Fisetin Murni dan Nanokristal

Penyetaraan dosis dilakukan dengan mencampur 10 mg fisetin nanokristal pada formula 6 ad 20 ml dibaca dengan spektrofotometri UV didapatkan kadar setara 0,596 mg fisetin murni. Hasil yang terlalu sedikit disebabkan kadar fisetin dalam 10 mg sampel tidak hanya fisetin, tetapi campuran dari stabilizernya dan manitol. Fisetin nanokristal yang dibutuhkan supaya didapat setara fisetin murni 10 mg sebanyak 16,8 mg, dibutuhkan bobot yang lebih banyak memenuhi syarat dosis.

K. Uji Kelarutan Kinetik

Kelarutan fisetin nanokristal merupakan perbandingan karakteristik kelarutan fisetin murni dengan fisetin dalam surfaktan sodium lauryl sulfat. Medium yang digunakan untuk menguji kelarutan dengan menggunakan aquabidestillata perlakuan dilakukan selama 8 hari pada suhu kamar sampai didapat kadar yang konstan. Hasil grafik perbandingan kelarutan fisetin nanokristal selama 4 hari dapat dilihat pada gambar 24.

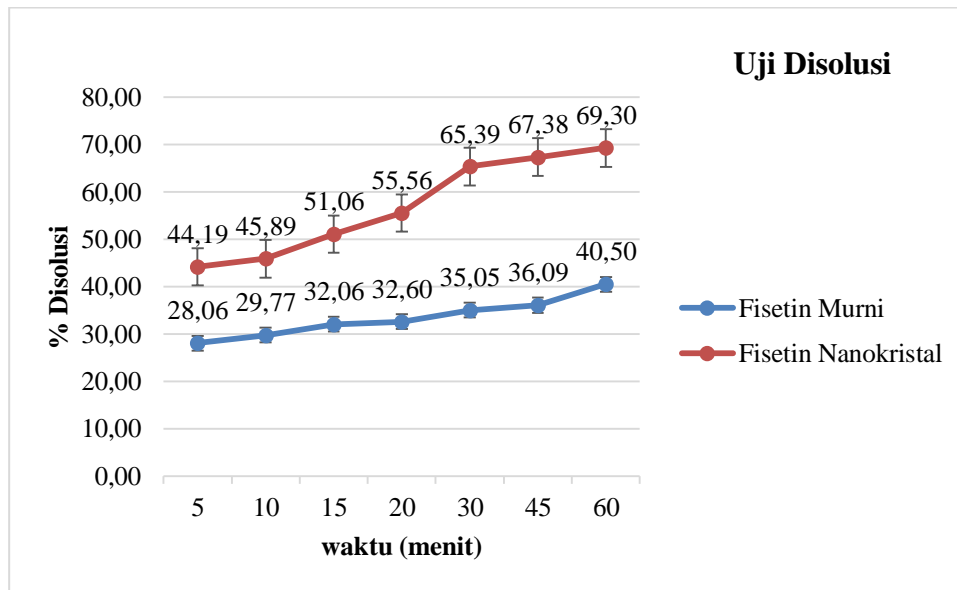


Gambar 24. Kelarutan fisetin murni dan nanokristal

Pembuatan fisetin nanokristal menggunakan metode *top-down* dapat meningkatkan kelarutan cukup signifikan dibandingkan fisetin murni. Fisetin nanokristal selama 6 hari terjadi peningkatan yang cukup konstan dan stabil dibandingkan dengan peningkatan fisetin murni yang semakin lama semakin meningkat dibawah kadar fisetin murni. Fisetin merupakan senyawa yang sukar larut dalam air, sedangkan SLS pada fisetin nanokristal adalah senyawa memiliki sifat hidrofilik sehingga selektif terhadap air. Sifat hidrofilik ini disebabkan adanya gugus $-SO_4$ yang berinteraksi dengan moleku air melalui ikatan hidrogen. terdiri dari senyawa fisetin murni dengan halangan elektrostatis dengan menggunakan surfaktan SLS.

L. Uji Disolusi

Pengukuran uji disolusi bertujuan untuk membandingkan kadar pelepasan dari fisetin murni dengan fisetin nanokristal. Hasil disolusi dapat dilihat pada peningkatan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang berbanding lurus dengan waktu. Disolusi fisetin nanokristal pada formula 6 dengan SLS 0.75% menunjukkan hasil yang lebih tinggi konsentrasinya di menit yang sama dengan fisetin murni. Hal tersebut menunjukkan bahwa menurunnya ukuran partikel dapat meningkatkan kadar pelepasan obat didalam tubuh. SLS mempunyai mekanisme halangan elektrostatis.



Gambar 25. Disolusi fisetin murni dan nanokristal

M. Analisis Hasil

Untuk mengetahui data % disolusi terdistribusi normal dilakukan uji dengan ANAVA yaitu kolmogorov semirnov test dengan hasil:

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Murni	7	33.29	4.152	28	40
Nano	7	56.57	10.486	44	69

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Murni	Nano
N		7	7
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	33.29	56.57
	Std. Deviation	4.152	10.486
Most Extreme Differences	Absolute	.135	.218
	Positive	.135	.151
	Negative	-.101	-.218
Kolmogorov-Smirnov Z		.356	.576
Asymp. Sig. (2-tailed)		1.000	.894

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Nilai sig(2-tailed) adalah lebih dari 0.05 yang artinya data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan dengan uji berikutnya yaitu ANOVA Paired Samples T test.

Analisis hasil yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA Paired Samples T test yaitu untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antara %Disolusi fisetin yang telah dalam ukuran nano dan yang mikro. Sebagai berikut:

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	fisetinmurni & fisetinnano	7	.944	.001

Correlation 0.944 artinya adalah memiliki hubungan yang kuat dan positif

N =7, artinya semua data telah masuk seluruhnya

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Fisetin murni – Fisetin nanokristal	-23.51963	6.64391	2.51116	-29.66423	-17.37504	-9.366	6	.000

Sig. (2-tailed)= artinya nilai probabilitas atau p-value uji t- Paired 0.000 artinya ada perbedaan yang signifikan antara sebelum dan sesudah perlakuan, karna nilai p-value lebih kecil dari 0.05

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diperoleh kesimpulan bahwa:

Pertama, fisetin nanokristal dapat dibuat menggunakan metode *top-down* (sonikasi).

Kedua, Stabilizer yang dapat mengubah fisetin menjadi nanokristal dengan ukuran partikel paling kecil dibandingkan stabilizer lainnya adalah *sodium lauryl sulfat* dengan konsentrasi 0,75%.

Ketiga, fisetin nanosuspensi stabil dalam proses penyimpanan.

Keempat, fisetin nanokristal dapat mempercepat kelarutan kinetik dan disolusi dibandingkan serbuk fisetin murni.

B. Saran

Penelitian ini masih banyak kekurangan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai:

Pertama, perlu dilakukan analisis dengan metode kombinasi untuk pembentukan nanokristal yang lebih kecil ukuran partikelnya.

Kedua, perlu dilakukan variasi kombinasi stabilizer untuk menelusuri stabilitas terbaik pada fisetin nanokristal.

Ketiga, perlu dilakukan skrining atau optimasi formula yang sesuai

DAFTAR PUSTAKA

- Abdou, Hamed M. (1989). *Dissolution, Bioavailability, and Bioequivalence*. Pennsylvania: Mack Publishing Company
- Abdullah M. 2009. *Pengantar Nanosains*. Bandung: ITB.
- Adhami VM, Syed D, Khan N, Mukhtar H. Dietary flavonoid fisetin: a novel dual inhibitor of PI3K/Akt and mTOR for prostate cancer management. *Biochem Pharmacol*. 2012; 84 :1277–1281.
- Akhtar, F., Rizvi, M. M., dan Kar, S. K. (2012). Oral Delivery of Curcumin Bound to Chitosan nanoparticles Cured Plasmodium yoelii Infected Mice. *Biotechnology Advances*. Vol 30 No. 1. Hlmn 310-320.
- Alanzi, F.K., et al. 2007. Improvement of Albendazole Disolution by Preparing Microparticle Using Spray-drying Tehnique. *Scientia Pharmaceutica (Sci.Phar.)*. 75, 63-79.
- Ansel, HC., 1989, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, diterjemahkan oleh Farida Ibrahim, Asmanizar, Iis Aisyah, Edisi keempat, Jakarta, UI Press.
- Arbiser JL, Fisher DE. Fisetin: a natural fist against melanoma. *J Invest Dermatol*. 2011; 131 :1187–1189.
- Baba, K., dan Nishida, K., (2011) : Drug Nanocrystal : Their Physicochemical Properties and Production Technology, *Recent Patent on Nanomedicines*, **1**, 123-129.
- Bajaj, R., Girotra, L., Khurana, B., dan Gupta, M.M., (2012) : Cyclo-Oxygenase Enzyme Inhibitors and Inflammatory Disorders : A Review, *International Journal of Pharm Research & Development*, **4 (8)**, 146-152.
- Bastos da Fonseca, L., Labastie, M., Pereira de Sousa, V., dan Volpato, N.M., (2009) : Development and Validation of a Discriminative Dissolution Test for Nimesulid Suspensions, *AAPS PharmSciTech*, **10 (4)**, 1145-1151.
- Buckton, G., dan Beezer, A.E., (1992): The Relationship Between Particle Size and Solubility, *Int.J. Pharm*, **82**, 7-10
- Carini, M., Aldini, G., Stefani, R., Marinello, C., dan Facino, R. M., (1998) : Mass Spectrometric Characterization and HPLC Determination of The Main Urinary Metabolites of Nimesulide in Man. *J. Pharm. Biomed. Anal*, **18**: 201-211.

- Chan LA. 2010. *Membuat Es Krim*. Jakarta: PT Agromedia Pustaka. Hal 11-12
- Chan, H.K., dan Kwok, P.C., (2011) : Production Methods for Nanodrug Particles Using the Bottom-up Approach, *Adv Drug Deliv Rev*, **63**, 406-416.
- Chen RH ,ML, Bai SW. 2008. Cavitation effects versus stretch effects resulted in diferent size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan– sodium tripolyphosphate nanoparticle. *Carbohydrate Polymers* 71: 448– 457.
- Chen WS. Lee YJ. Yu YC. Hsaio CH. Yen JH. Yu SH. Tsai YJ. Chiu SJ. Enhancement of p53-mutant human colorectal cancer cells radiosensitivity by flavonoid fisetin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010; 77 :1527–1535.
- Chen YC. Shen SC. Lee WR. Lin HY. Ko CH. Shih CM. Yang LL. Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch Toxicol*. 2002; 76 :351–359.
- Chien CS. Shen KH. Huang JS. Ko SC. Shih YW. Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K/Akt and JNK signaling pathways with downregulation of MMP-2/9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Mol Cell Biochem*. 2010; 333 :169–180.
- Colombo, P., Sonvico, F., dan Bettini, R., (2009) : Novel Platforms for Oral Drug Delivery, *Pharm Res*, **26 (3)**, 601-611.
- Cooper, E.R., (2010) : Nanoparticle : a Personal Experience for Formulating Poorly Water Soluble Drugs, *J Control Release*, **141 (3)**, 300-302.
- Cullity BD, Stock SR. 2001. *Elements of X- Ray Diffraction*. New Jersey: Prentice Hall.
- Dahan, A., dan Miller, J.M., (2012) : The Solubility Permeability interplay and Its Implications in Formulation Design and Development for Poorly Soluble Drugs, *The AAPS Journal*, **14 (2)**, 244-250.
- Dandan, L., Heming, X., Baocheng, T., Kun, Y., Hao, P., dan Shilin, M., (2012) : Fabrication of Carvedilol Nanosuspensions through the Antisolvent Precipitation-Ultrasonication Method for the Improvement of Dissolution Rate and Oral Bioavailability, *AAPS PharmSciTech*, **13(1)**, 295-304.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta
- Douroumis, D and Fahr, A., (2013) :Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs, *1st Edition*, John Willey & Sons, Ltd, United Kingdom, 248-259

- Falkiewicz, M.J., (1988): *Theory of Suspensions, Pharmaceuticals Dosage Form : Disperse System*, Marcel Dekker, New York, **1**, 13-48.
- Fennema. 2008. *Food Chemistry*. Fourth edition. New York and Basel. Inc
- Gosh, I., Bose, S., Vippagunta,RR., dan Harmon, F., (2011) : Nanosuspension for Improving the Bioavaibility of a Poorly Soluble Drug and Screening of Stabilizing Agent to Inhibit Crystall Growth, *Intenational Journal of Pharmeceutics*, **409**, 260-268.
- Gupta, R. B., dan Kompella, U.B., (2006) : *Fundamentals of Drug Nanoparticles, Naoparticles Technology for Drug Delivery*, Taylor and Franscis,New York, 1-20.
- Gupta, R. B., dan Kompella, U.B., (2006) : *Fundamentals of Drug Nanoparticles, Naoparticles Technology for Drug Delivery*, Taylor and Franscis,New York, 1-20.
- Hanson, William A. (1991). *Handbook of Dissolution Testing*. Oregon: Aster Publishing Corporation
- Honary, S.; & Zahir, F. 2013. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Trop. J. of Pharmaceutical Research* April 12 (2): 255-264
- Hong, C., Dang ,Y., Lin,G.,Yao, Y.,Li, G.,Ji, G., Shen ,H.,Xie, Y., (2014) : Effects of Stabilizing Agents on The Development of Myricetin Nanosuspension and its Characterization: *An in Vitro and in Vivo Evaluation, International Journal of Pharmaceutics*,**477**.251–260
- Hu-Jun, X.,Wang-Shu, M., Fu-Rong, L., Jie-Hui, X.,LEI Qun-Fang, L.,Wen-Jun, F., (2013) :Radical Scavenging Activity of Myricetin, *Acta Phys. -Chim. Sin*,**29 (7)**, 1421-1432.
- Jahanshahi, M. dan Babaei, Z., (2008). Protein Nanopartikel: A Unique system as Drug Delivery Vehicle. *J.Biotechnology*. Vol.7 (25). 4926-4934.
- Jonassen, H. 2014. *Polysaccharide Based Nanoparticles for Drug Delivery Applications. Thesis School of Pharmacy*, Faculty of Matematics and Natural Sciences, University of Oslo.
- Jumadi, S.; Sari, A. A. 2014. *Pembuatan dan Karakterisasi Plastik Biodegradable dari Campuran Onggok Singkong-Poli Asam Laktat Menggunakan Metode Solution Casting*. Program Studi Kimia, FMIPA Universitas Lampung.

- Junghanns, A.H., dan Müller, R.H., (2008) : Nanocrystal Technology, Drug Delivery and Clinical Applications, *International Journal of Nanomedicines*, **3** (3), 295-309.
- Junghanns, A.H., dan Müller, R.H., (2008) : Nanocrystal Technology, Drug Delivery and Clinical Applications, *International Journal of Nanomedicines*, **3** (3), 295-309.
- Junyaprasert, V. B., Morakul, B., (2015) : Nanocrystals for Enhancement of Oral Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs, *Asiaan Journal of Pharmaceutical Science*, **10**. 10-23
- Kapoor, A., Majumdar, D. K., dan Yadav, M. R.. (1998) : Crystal Forms of Nimesulide Sulfonanilide (NSAID). *Indian J. Chem*, **37**, 572- 575.
- Keck, C.M., Muller, R.H, (2006) Drug Nanocrystal of Poorly Soluble Drugs Produced by High Pressure Homogenization. *Eur J Pharm Biopharm*, **62** (1) 3-16.
- Keck, C.M., Muller, R.H, (2006) Drug Nanocrystal of Poorly Soluble Drugs Produced by High Pressure Homogenization. *Eur J Pharm Biopharm*, **62** (1) 3-16.
- Keck, C.M., Muller, R.H, (2006) Drug Nanocrystal of Poorly Soluble Drugs Produced by High Pressure Homogenization. *Eur J Pharm Biopharm*, **62** (1) 3-16.
- Keil, F. J. 2007. Modeling of Process Intensification. In Alupului, A., Ioan Calinescu, and Vasile Lavric. 2009. Ultrasonic Vs. Microwave Extraction Intensification of Active Principles From Medicinal Plants. *AIDIC Conference Series*, Vol. 9 2009 page 1-8.
- Kume, G., Gallotti, & Nunes, G. (2008). Review on Anionic/Cationic Surfaktan Mixture. *J Surfact Deterg* **11**, 1743-007-1047-1.
- Lalatendu Panigrahi, Snigdha P dan Saroj K.G. 2004. Design and Characterization of Mucoadhesive Buccal Patches of Salbutamol Sulphate. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. Vol 61 No. 5 Hal : 351 - 360.
- Lei Gao., Liu,G., Ma, J., Wang, X., Zhou,L., Li,X., dan Wang, F., (2013) : Application of Drug Nanocrystal Technologies on Oral Drug Delivery of Poorly Soluble Drugs, *Pharm Res*, **30**, 307-324.
- Lei Gao., Liu,G., Ma, J., Wang, X., Zhou,L., Li,X., dan Wang, F., (2013) : Application of Drug Nanocrystal Technologies on Oral Drug Delivery of Poorly Soluble Drugs, *Pharm Res*, **30**, 307-324.

- Libo Wu, Zhang, J., dan Watanabe, W., (2011) : Physical and Chemical Stability of Drug Nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **63**, 456-469.
- Lida, Y., Tuziuti T., Yasui K., Towata A., and Kozuka T. 2002. *Control of Viscosity in Starch and Polysaccharide Solution with Ultrasound After Gelatinization*. Journal of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST). Nagoya, Japan.
- Lipinski, C., (2002) : Poor Aqueous Solubility –An Industry Wide Problem in Drug Discovery, *Am. Pharm.Rev*, **5**, 82-85.
- Lipinski, C., (2002) : Poor Aqueous Solubility –An Industry Wide Problem in Drug Discovery, *Am. Pharm.Rev*, **5**, 82-85.
- Liu, Q. M., *et al.* 2010. Optimization of Ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Folium eucommiae* and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(23), pp. 2503-2511.
- Martin, A., Swarbrick, J., dan Cammarata, A. (1983). *Physical Pharmacy* 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger
- Mason TJ, Lorimer JP. 2002. *Applied Sonochemistry : The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*. Verlag: Wiley-VCH
- Mauludin, R., Möschwitzer, J., Muller, R.H., (2012) : Fast Dissolving Ibuprofen Nanocrystal Loaded Solid Dosage Forms, *Internatioanl Jornal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, Vol 4, 543-549.
- Mauludin, R., Möschwitzer, J., Muller, R.H., (2012) : Fast Dissolving Ibuprofen Nanocrystal Loaded Solid Dosage Forms, *Internatioanl Jornal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, Vol 4, 543-549.
- Mauludin, R., Muller, R.H., dan Keck, C.M., (2009) : Kinetic Solubility and Dissolution Velocity of Rutin Nanocrystal, *European Journal of Pharmaceutical Science*, **36**, 502-510.
- Mauludin, R., Muller, R.H., dan Keck, C.M., (2009) : Kinetic Solubility and Dissolution Velocity of Rutin Nanocrystal, *European Journal of Pharmaceutical Science*, **36**, 502-510.
- Mauludin, R., Muller, R.H., Keck, C.M., (2009) : Development of an Oral Rutin Nanocrystal Formulation. *International Journal of Pharmacy*, **370**. 202-209.
- Mauludin, R., Muller, R.H., Keck, C.M., (2009) : Development of an Oral Rutin Nanocrystal Formulation. *International Journal of Pharmacy*, **370**. 202-209.

- Merisko, L.E., Liversidge, G.G., dan Cooper, E.R., (2003) : Nanosizing : a Formulation Approach for Poorly Water Soluble Compounds, *Eur J Pharm Sci*, **18 (2)**, 113-120.
- Möschwitzer, J.P., (2012) : Drug Nanocrystal in The Commercial Pharmaceutical Development Process, *International Journal of Pharmaceutics*, **9 (34)**, 1-14.
- Mu, X., & Zhong, Z. (2006). Preparation and Properties of Poly(vinylalcohol)-Stabilized Liposomes. *Int J Pharm*, *318 (1-2)*, 55-61.
- Müller, R.H., (1996) : Zeta Potential and Particle Drug, *International Journal of Pharmaceutics*
- Müller, R.H., Akkar, A., (2004) : Drug Nanocrystal of Poorly Soluble Drugs, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Nalwa American Scientific Publisher. 627-638.
- Müller, R.H., Böhm, B.H.L., Grau, M.J., (2002) : Nanosuspension –A Formulation Approach for Poorly Soluble and Poorly Bioavailable Drugs, in *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release*, Marcel Dekker, New York. 345-357.
- Müller, R.H., dan Peters, K., (1998) : Nanosuspension for the Formulation of Poorly Soluble Drugs : I. Preparation by a Size-Reduction Technique. *International Journal of Pharmaceutics*, **160 (2)**, 229-237.
- Müller, R.H., Moschwitzer, J., dan Bushrab, F.N., (2006) : *Manufacturing Nanoparticles by Milling and Homogenization Techniques, Nanoparticles Technology for Drug Delivery*, Taylor and Francis, New York, 21-46.
- Müller, R.H., Moschwitzer, J., dan Bushrab, F.N., (2006) : *Manufacturing Nanoparticles by Milling and Homogenization Techniques, Nanoparticles Technology for Drug Delivery*, Taylor and Francis, New York, 21-46.
- Müller, R.H., Moschwitzer, J., dan Bushrab, F.N., (2006) : *Manufacturing Nanoparticles by Milling and Homogenization Techniques, Nanoparticles Technology for Drug Delivery*, Taylor and Francis, New York, 21-46.
- Mutmainnah, Siti. 2008. Pembuatan Counter waktu pada percobaan viskositas berbasis mikrokontroler HRS8000. UIN. Malang. *Jurnal farmasi sains Indonesia*. Hal. 11-14.
- Myers D. 2006. *Surfactant Science and Technology. Edisi III*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

- Nireesha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Babu MN, Lavakuma V. Lyophilization/Freeze Drying An Review. *International Journal of novel Trends In Pharmaceutical Sciences*. 2013;3(4):2277-2782.
- Noyes, A.A and Whitney, W.R., (1897) : The Rate of Solution of Solid Substances in Their Own Solutions, *J.Am.Chem.Soc.* **19**. 930-934.
- Noyes, A.A and Whitney, W.R., (1897) : The Rate of Solution of Solid Substances in Their Own Solutions, *J.Am.Chem.Soc.* **19**. 930-934.
- Odeh, F., Al-Jaber, H and Khater, D., (2014) : *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, InTech, New York, 344-368.
- Peck, G.E., Baley, G.J., Curdy, V.E., dan Banker, G.S., (1990) : Tablet Formulation and Design, **2nd** ed, Pharmaceutical Dosage Form: Tablet, ed.L.Lachman, H.A.Lieberman, and J.B. Schawart, vol 1, New York :Marcel Dekker Inc, 74-130.
- Peukert, W., Schwarzer, H.C., dan Stenger, W., (2005) : Control Aggregation in Production and Handling Nanoparticle, *Chem.Eng Process*, **44**, 245 – 252.
- Pirrung MC. 2007. *The Synthetic Organic Chemist's Companion*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., (2011) : Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids, *Fitoterapia*, **82**.513–523
- Raju, YP, Garbhapu, A, Prasanna, S, Rao, BS, Ramana, dan Murthy, KV. (2007). Studies on Enhancement of Dissolution Rate of Etoposide. *Indian Journal Pharmaceutical Sciences* 69, 269-273
- Rauhatun Napsah dan Iis Wahyuningsih. (2013). Preparasi Nanopartikel Kitosan TPP/ Ekstrak Etanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleriamacrocarpa* (Scheff) Boerl) dengan Metode Gelasi Ionik. Yogyakarta: *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, Vol. 11 No.1, Mei 2014, hlm.7-12. ISSN : 1693- 5683.
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S. (2006). Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biol Pharm Bull.* 29(9). 1790-1798.
- Rawat, M., Singh, S., (2006) : Nanocarriers : Promising Vehicles for Bioactive Drugs, *Biol Pharm Bull*, **29** (9), 1790-1798.
- Rhainsford, K.D., (1999) : Relationship of Nimesulid Safety ti It's Pharmacokinetic Assesment of Adverse Reactions, *Rheumatology*, **38** (1), 4-10.


- Riskafuri, H. 2011. *Pengaruh Mikronisasi Vibrating Mill terhadap Kecepatan Disolusi Tablet Gliklazid*. Skripsi Sarjana Farmasi: FMIPA UI.
- Rowe, R.C., (2009) : *Handbook of Pharmaceutical Excipient*, Pharmaceutical Press, London, 6, 326-329; 581-583;549-553;651-653;782-784.
- Rowe, R.C., Paul, J.S., and Marian, E.Q. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipient Sixth Edition*. Chicago, London : Pharmaceutical Press. Hal : 326-329
- Roy, S et al.,2009. *Polymers in Mucoadhesive Drug Delivery System: A Brief Note*. *Designed Monomers and Polymers* 12. Hal ; 483-495
- Salager, J.L. 2002, *Surfactants Type and Uses*, Universidad De Los Andes: Venezuela.
- Shah, A., Shah, S., Patel, V., dan Potdar, A., (2012) : *Nanoization : A Dissolution Enhancement Approach for BCS Class II Drugs*, *Drug Development & Delivery*, **12** (1), 48 -51.
- Shegokar, R., dan Müller, R.H., (2010) : *Nanocrystal : Industrially Feasible Multifunctional Formulation Technology for Poorly Soluble Actives*, *International Journal of Pharmaceutics*,**399**, 129-139.
- Shi, J., (2002) : *Steric Stabilization*, Center for Industrial Sensor and Measurement Departement Materials Science and Engineering Group Inorganic, *Materials Science*, 1-13.
- Sinko PJ. 2006. *Martin Farmasi Fisika dan Ilmu Farmasetika Edisi 5*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Sinko, P.J., (2006) *Martin's Physician Pharmacy and Pharmaceutical Science*, Lippincot Williams & Wilkins, **6**, 646-666.
- Stevens, Malcolm P. (2001). *Polymer Chemistry: An Introduction*. Oxford University Press. Diterjemahkan oleh Iis Sopyan. (2001). *Kimia Polimer*. Jakarta : PT Pradnya Paramita.
- Sulisk KS, Price GJ. 1999. *Applications of ultrasound to materials chemistry*. *Annu Rev Mater Sci*. 29:295-326.
- Sweetman, S.C., (2005) *Martindale, Pharamceuticals Press*, **34**, 95-96.
- Tipler PA. 1998. *Fisika untuk Sains dan Teknik*. Prasetyo L & Adi RW, penerjemah. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: *Physics for Scientists and Engineers*

- Tiyaboonchai, Waree. (2003). Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal* 11 (3): 51–66.
- United States, P.C., (2011) *The United States Pharmacopoeia*, The United States Pharmacopoeia Conventional Inc, 34.
- Van Eerdenbrugh, B., Van den Mooter, G., dan Augustijns, P., (2008) : Top-down Production of Drug Nanocrystal : Nanosuspension Stabilization, Miniaturization and Transformation into Solid Product, *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 64-75.
- Van Eerdenbrugh, B., Van den Mooter, G., dan Augustijns, P., (2008) : Top-down Production of Drug Nanocrystal : Nanosuspension Stabilization, Miniaturization and Transformation into Solid Product, *International Journal of Pharmaceutics*, **364**, 64-75.
- Wade, A., and Waller, P.J.1994. *Hand Book of Pharmaceutical Excipients. Second Edition*. London : The Pharmaceutical Press. Pp. 437-438
- Wang, M., dan Thanou, M., (2010) : Targeting Nanoparticle to Cancer, *Pharmacol Res*, **60** (2), 90-99.
- Wardiyati S. 2004. *Pemanfaatan ultrasonik dalam bidang kimia. Di dalam: Penguasaan IPTEK Bahan untuk Meningkatkan Kualitas Produk Nasional*. Prosiding Pertemuan Ilmiah IPTEK Bahan; Serpong, 7 Sep 2004. Serpong: P3IB Batan. Hlm 419-424.
- Williams, A.R. 1983. *Ultrasound: Biological Effects and Potential Hazards*. Academic Press.
- Yadav, V.B., dan Yadav, A.V., (2010) : Enhancement of Solubility and Dissolution Rate of BCS Class II Pharmaceutical by Nonaqueous Granulation Technique, *International Journal of Pharm Research & Development*, **1** (12), 1-7.
- Yao, Y., Lin, G., Xie, Y., Ma, P., Li, G., Meng, Q., Wu, T., (2013) : Preformulation Studies of Myricetin: a Natural Antioxidant Flavonoid, *Pharmazie* **69**. 19-26 .
- Zaheer. A., Naveen, M., Santosh, M.K., dan Imran, K., (2011) : Solubility Enhancement of Poorly Water Soluble Drug : A Review, *International Journal of Pharmacy & Technology*, **3** (1), 807-823.

**L
A
M
P
I
R
A
N**

Lampiran 1. Sertifikat analisis fisetin

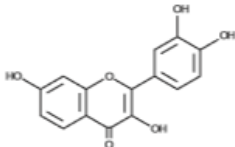
PRODUCT INFORMATION



Fisetin
Item No. 15246

CAS Registry No.: 528-48-3
Formal Name: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one
CI-75620, NSC 407010, NSC 656275

Synonyms:
MF: $C_{15}H_{10}O_6$
FW: 286.2
Purity: $\geq 90\%$
UV/Vls.: λ_{max} : 207, 250, 320, 364 nm
Supplied as: A crystalline solid
Storage: -20°C
Stability: As supplied, 2 years from the QC date provided on the Certificate of Analysis, when stored properly



Laboratory Procedures

Fisetin is supplied as a crystalline solid. A stock solution may be made by dissolving the fisetin in the solvent of choice. Fisetin is soluble in organic solvents such as ethanol, DMSO, and dimethyl formamide (DMF), which should be purged with an inert gas. The solubility of fisetin in ethanol is approximately 5 mg/ml and approximately 30 mg/ml in DMSO and DMF.

Fisetin is sparingly soluble in aqueous buffers. For maximum solubility in aqueous buffers, fisetin should first be dissolved in DMSO and then diluted with the aqueous buffer of choice. Fisetin has a solubility of approximately 0.5 mg/ml in a 1:1 solution of DMSO:PBS (pH 7.2) using this method. We do not recommend storing the aqueous solution for more than one day.

Description

Fisetin is a natural flavonol that is structurally and functionally related to kaempferol (Item No. 11852), myricetin (Item No. 10012600), and quercetin (Item No. 10005169). All are potent antioxidants and have anti-inflammatory actions with possible relevance to cancer.¹⁻³ Fisetin and other flavonols act as activators of sirtuin 1, inhibitors of the spleen tyrosine kinase SYK, and suppressors of CD36 gene expression.⁴⁻⁶

References

- van Acker, F.A.A., Schouten, O., Haenen, G.R.M.M., et al. *FEBS Lett.* **473**, 145-148 (2000).
- Duthie, G. and Monfice, P. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 1-7 (2012).
- Gupta, S.C., Kim, J.H., Prasad, S., et al. *Cancer Metastasis Rev.* **29**(3), 405-434 (2010).
- Szczepankiewicz, B.G. and Ng, P.Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**(17), 1533-1544 (2008).
- Singh, R., Masuda, E.S., and Payan, D.G. *J. Med. Chem.* **55**(8), 3614-3643 (2012).
- Ulan, T.-W., Wang, L., Lo, Y.-H., et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 601-609 (2008).

WARNING
THIS PRODUCT IS FOR RESEARCH ONLY - NOT FOR HUMAN OR VETERINARY DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE.

SAFETY DATA
This material should be considered hazardous until further information becomes available. Do not ingest, inhale, get in eyes, on skin, or on clothing. Wash thoroughly after handling. Before use, see user [page](#) within the [GHS Safety Data Sheet](#), which has been sent to you by e-mail.

WARRANTY AND LIMITATION OF REMEDY
Buyer agrees to purchase the material subject to Cayman's Terms and Conditions. Complete Terms and Conditions including Warranty and Limitation of Liability Information can be found on our website.

Copyright Cayman Chemical Company, 05/22/2014

CAYMAN CHEMICAL
1180 EAST ELLSWORTH RD
ANN ARBOR, MI 48106 - USA
PHONE: (800) 264-9897
 (734) 971-3335
FAX: (734) 971-3640
CUSTOMER SERVICE@CAYMANCHEM.COM
WWW.CAYMANCHEM.COM

Lampiran 2. Skrining waktu dan amplitude

Data skrining amplitude dan waktu pada sonikator

1. HPMC 0,75% (polimer)

	A=20%	A=30%	A=40%	A=50%	A=60%
T= menit	F1	F2	F3	F4	F5
T= menit	F6	F7	F8	F9	F10
T= menit	F11	F12	F13	F14	F15

2. Sodium lauryl sulfat 0.75% (surfaktan)

	A=20%	A=30%	A=40%	A=50%	A=60%
T= menit	F16	F17	F18	F19	F20
T= menit	F21	F22	F23	F24	F25
T= menit	F26	F27	F28	F29	F30

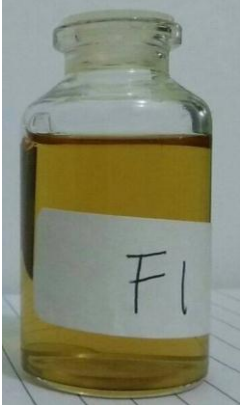

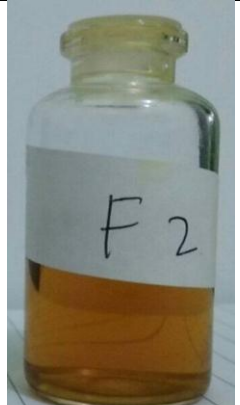



Hasil skrining amplitude dan waktu pada sonikator





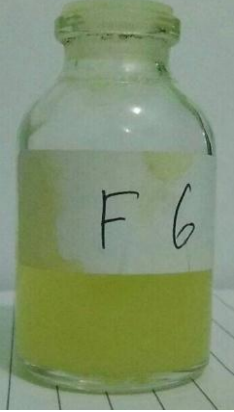

NO	FORMULA	UKURAN PARTIKEL(nm)	INDEKS POLIDISPERSITAS
1	F1H	1224.2	0.407
2	F2H	928.8	0.332
3	F3H	1591.1	0.546
4	F4H	935.7	0.472
5	F5H	1244.9	0.412
6	F6H	1251.2	0.341
7	F7H	963	0.37
8	F8H	711.1	0.474
9	F9H	1019.8	0.323
10	F10H	944.4	0.404
11	F11H	8462.3	2.157
12	-	-	-
13	F13H	1237.8	0.403
14	F14H	1145.6	0.383
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	F22H	430	0.311
23	-	-	-
24	-	-	-
25	F25H	415.4	0.351
26	-	-	-
27	F27H	477.1	-0.256
28	F28H	361.7	0.414
29	-	-	-
30	-	-	-

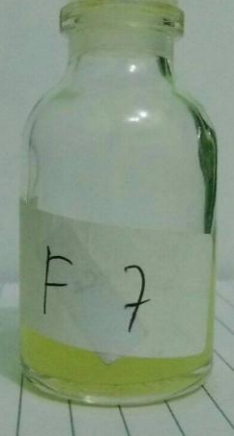



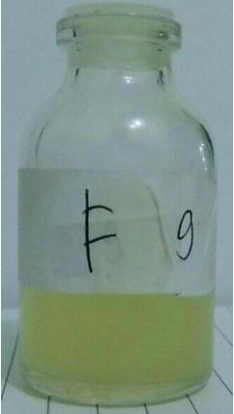

KESIMPULAN



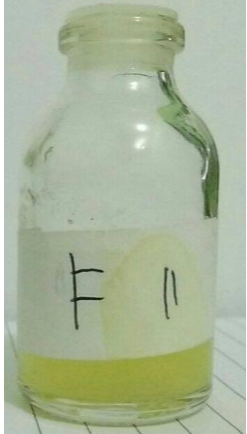

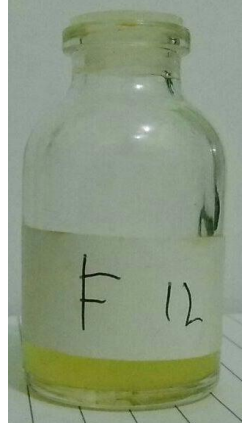

Waktu dan amplitude terpilih dari data skrining adalah F28H, yaitu amplitude 40% dan waktu 30 menit.





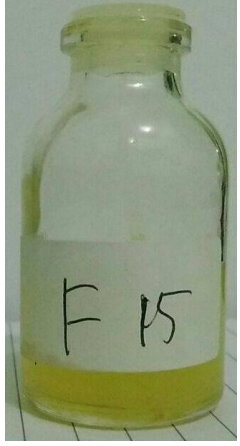

Lampiran 3. Skrining stabilizer**Lampiran skrining stabilizer**

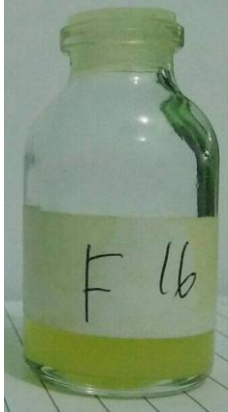

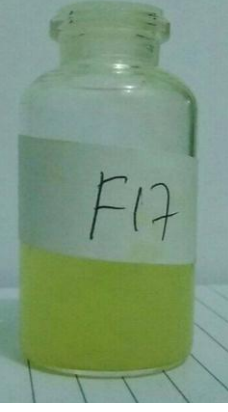



Formula	Komposisi	Setelah disonikasi	
F 1	F 1(10 mg fisetin + tween 80 1%)	 A glass bottle labeled 'F1' containing a clear, pale yellow liquid.	 A glass bottle containing a clear, pale yellow liquid, similar to the one before sonication.
F 2	F 2(10 mg fisetin + tween 80 2%)	 A glass bottle labeled 'F2' containing a clear, pale yellow liquid.	 A glass bottle containing a clear, pale yellow liquid, similar to the one before sonication.
F 3	F 3(10 mg fisetin + tween 80 3%)	 A glass bottle labeled 'F3' containing a clear, pale yellow liquid.	 A glass bottle containing a clear, pale yellow liquid, similar to the one before sonication.

Formula	Komposisi	Setelah disonikasi	
F 4	F 4(10 mg fisetin + SLS 0,25%)	 A glass bottle containing a yellow liquid with a distinct white, foamy layer on top. A small white label with the number '4' is attached to the front.	 A glass bottle containing a uniform yellow liquid, with the white foam layer completely dispersed.
F 5	F 5(10 mg fisetin + SLS 0,5%)	 A glass bottle containing a yellow liquid with a distinct white, foamy layer on top. A white label with 'F 5' is attached to the front.	 A glass bottle containing a uniform yellow liquid, with the white foam layer completely dispersed.
F 6	F 6(10 mg fisetin + SLS 0,75%)	 A glass bottle containing a yellow liquid with a distinct white, foamy layer on top. A white label with 'F 6' is attached to the front.	 A glass bottle containing a uniform yellow liquid, with the white foam layer completely dispersed.

Formula	Komposisi	Setelah disonikasi	
F 7	F 7(10 mg fisetin + Poloxamer 188 1%)	 A glass bottle with a white label 'F 7' containing a small amount of yellow liquid at the bottom.	 A glass bottle containing a larger volume of yellow liquid, indicating emulsification.
F 8	F 8(10 mg fisetin + Poloxamer 188 2%)	 A glass bottle with a white label 'F 8' containing a small amount of yellow liquid at the bottom.	 A glass bottle containing a larger volume of yellow liquid, indicating emulsification.
F 9	F 9(10 mg fisetin + Poloxamer 188 3%)	 A glass bottle with a white label 'F 9' containing a small amount of yellow liquid at the bottom.	 A glass bottle containing a larger volume of yellow liquid, indicating emulsification.

Formula	Komposisi	Setelah disonikasi	
F 10	F10(10 mg fisetin + PVA 0,15%)	 A glass bottle with a white label 'F 10' containing a clear, colorless liquid.	 A glass bottle containing a yellowish, opaque emulsion.
F 11	F 11(10 mg fisetin + PVA 0,25%)	 A glass bottle with a white label 'F 11' containing a clear, colorless liquid.	 A glass bottle containing a yellowish, opaque emulsion.
F 12	F 12(10 mg fisetin + PVA 0,5%)	 A glass bottle with a white label 'F 12' containing a clear, colorless liquid.	 A glass bottle containing a yellowish, opaque emulsion.

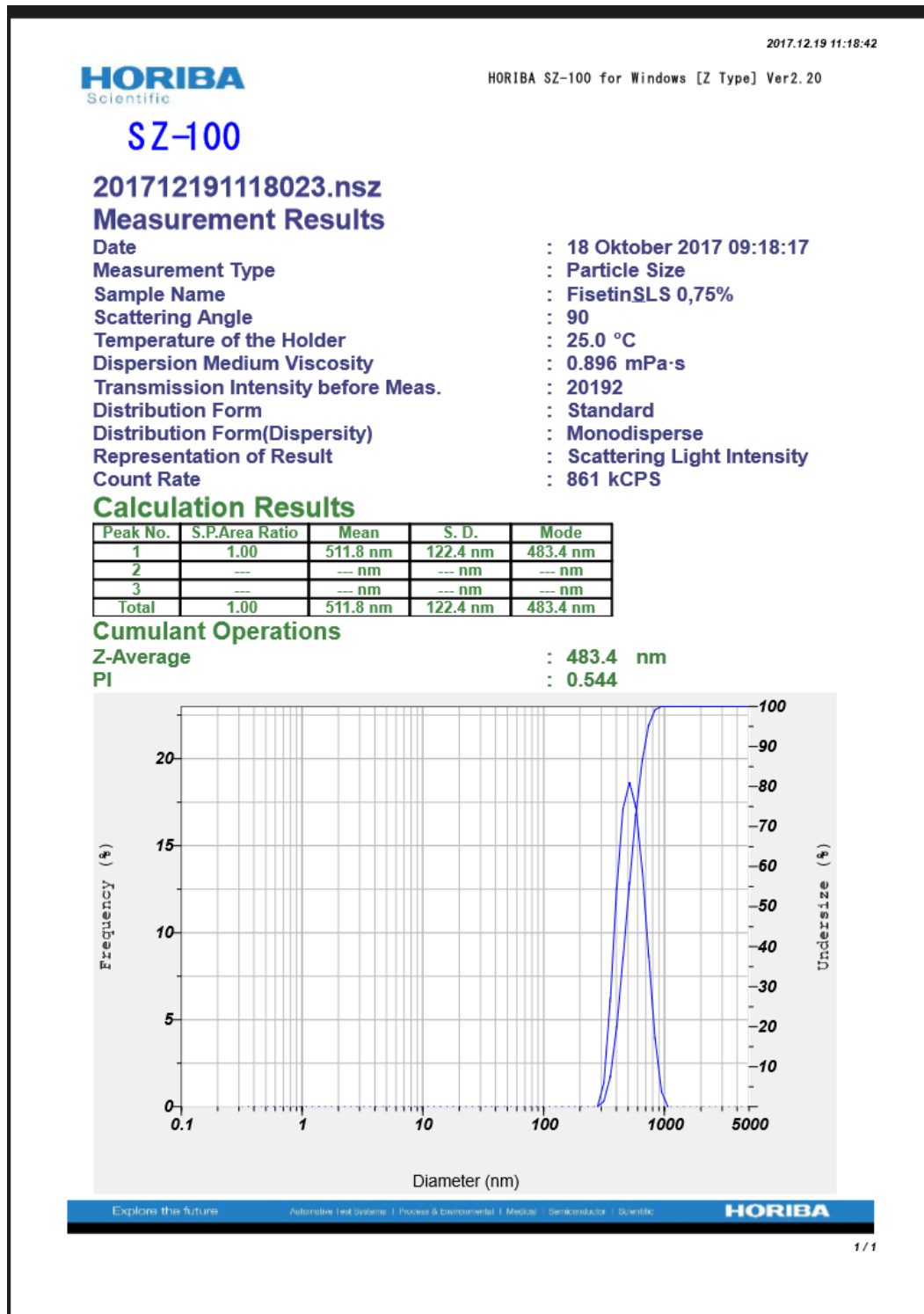
Formula	Komposisi	Setelah disonikasi	
F 13	F13(10 mg fisetin + PVP 0,5%)	 A glass bottle with a white label that reads 'F 13'. The bottle contains a clear, colorless liquid at the bottom, with a white, opaque layer above it.	 A glass bottle containing a uniform, pale yellow liquid. The white layer from the previous image is no longer visible.
F 14	F 14(10 mg fisetin + PVP 0,75%)	 A glass bottle with a white label that reads 'F 14'. The bottle contains a clear, colorless liquid at the bottom, with a white, opaque layer above it.	 A glass bottle containing a uniform, pale yellow liquid. The white layer from the previous image is no longer visible.
F 15	F 15(10 mg fisetin + PVP 1%)	 A glass bottle with a white label that reads 'F 15'. The bottle contains a clear, colorless liquid at the bottom, with a white, opaque layer above it.	 A glass bottle containing a uniform, pale yellow liquid. The white layer from the previous image is no longer visible.

Formula	Komposisi	Setelah disonikasi	
F 16	F16(10 mg fisetin + HPMC 0,25%)	 A glass bottle labeled 'F 16' containing a yellow liquid. The liquid is concentrated at the bottom, and the upper portion of the bottle is mostly clear.	 The same glass bottle labeled 'F 16' after sonication. The yellow liquid is now more uniformly distributed throughout the bottle, with a slight white layer visible at the top.
F 17	F17(10 mg fisetin + HPMC 0,5%)	 A glass bottle labeled 'F17' containing a yellow liquid. The liquid is concentrated at the bottom, and the upper portion of the bottle is mostly clear.	 The same glass bottle labeled 'F17' after sonication. The yellow liquid is more uniformly distributed, with a white layer visible at the top.
F18	F18(10 mg fisetin + HPMC 0,75%)	 A glass bottle labeled 'F18' containing a yellow liquid. The liquid is concentrated at the bottom, and the upper portion of the bottle is mostly clear.	 The same glass bottle labeled 'F18' after sonication. The yellow liquid is more uniformly distributed, with a white layer visible at the top.

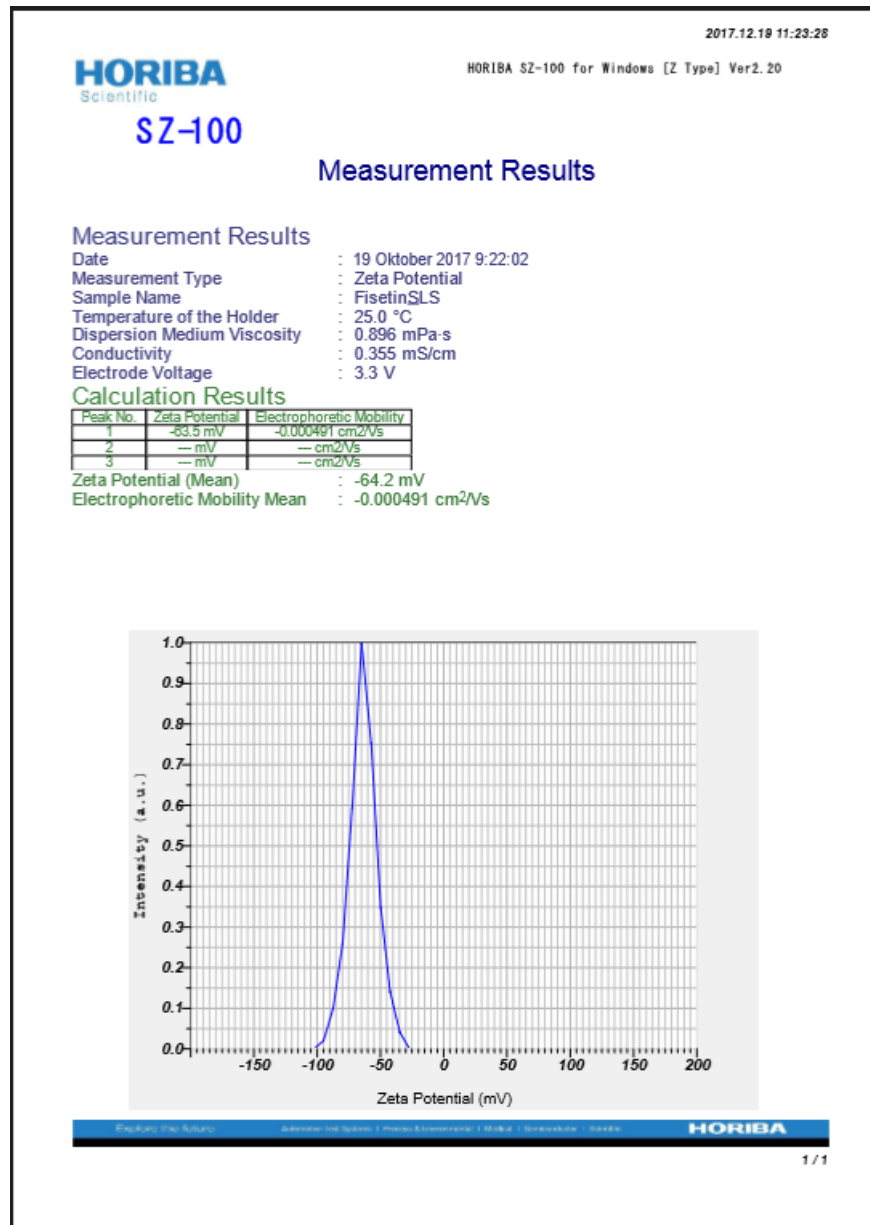
Lampiran 4. Gambar formula dalam jumlah 600 ml






Lampiran 5. Ukuran, IP, dan zeta potensial sebelum freez drying


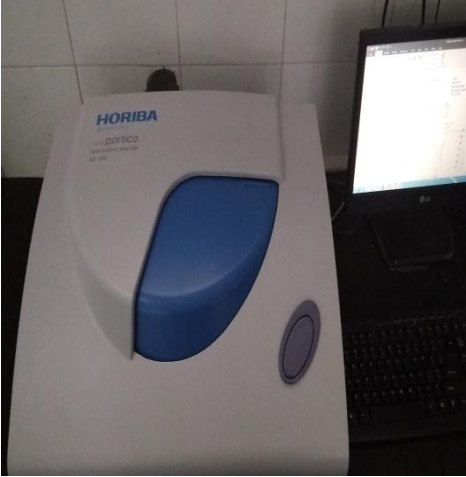


Gambar zeta potensial


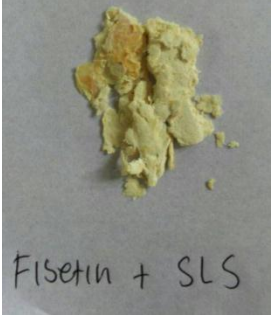
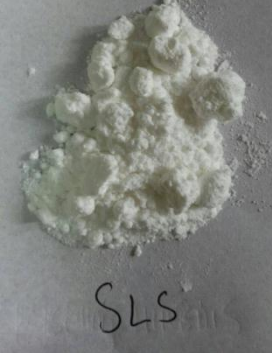



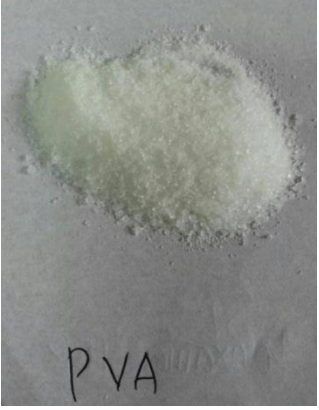
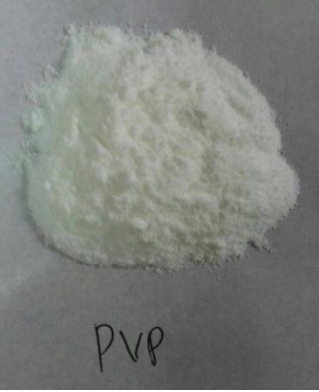
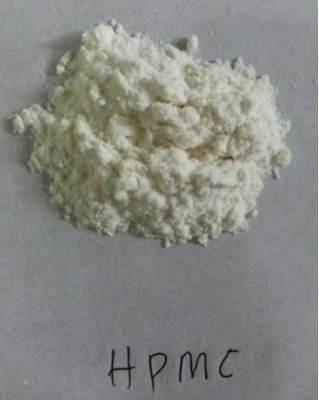
Lampiran 6. Gambar alat

No	Alat	Nama Alat	Kegunaan
1		Neraca analitik	Menimbang bahan, baik bahan baku maupun <i>eksipien</i> .
2		<i>Magnetic stirer</i>	Mencampur dan menghomogenkan komponen
3		<i>Spektrofotometer UV-Vis</i>	Membaca serapan bahan aktif dan pembacaan <i>transmitan</i>

No	Alat	Nama Alat	Kegunaan
4		sonikator	Memperkecil ukuran partikel
6		PSA (<i>Particle Size Analyzer</i>)	Mengukur ukuran partikel.

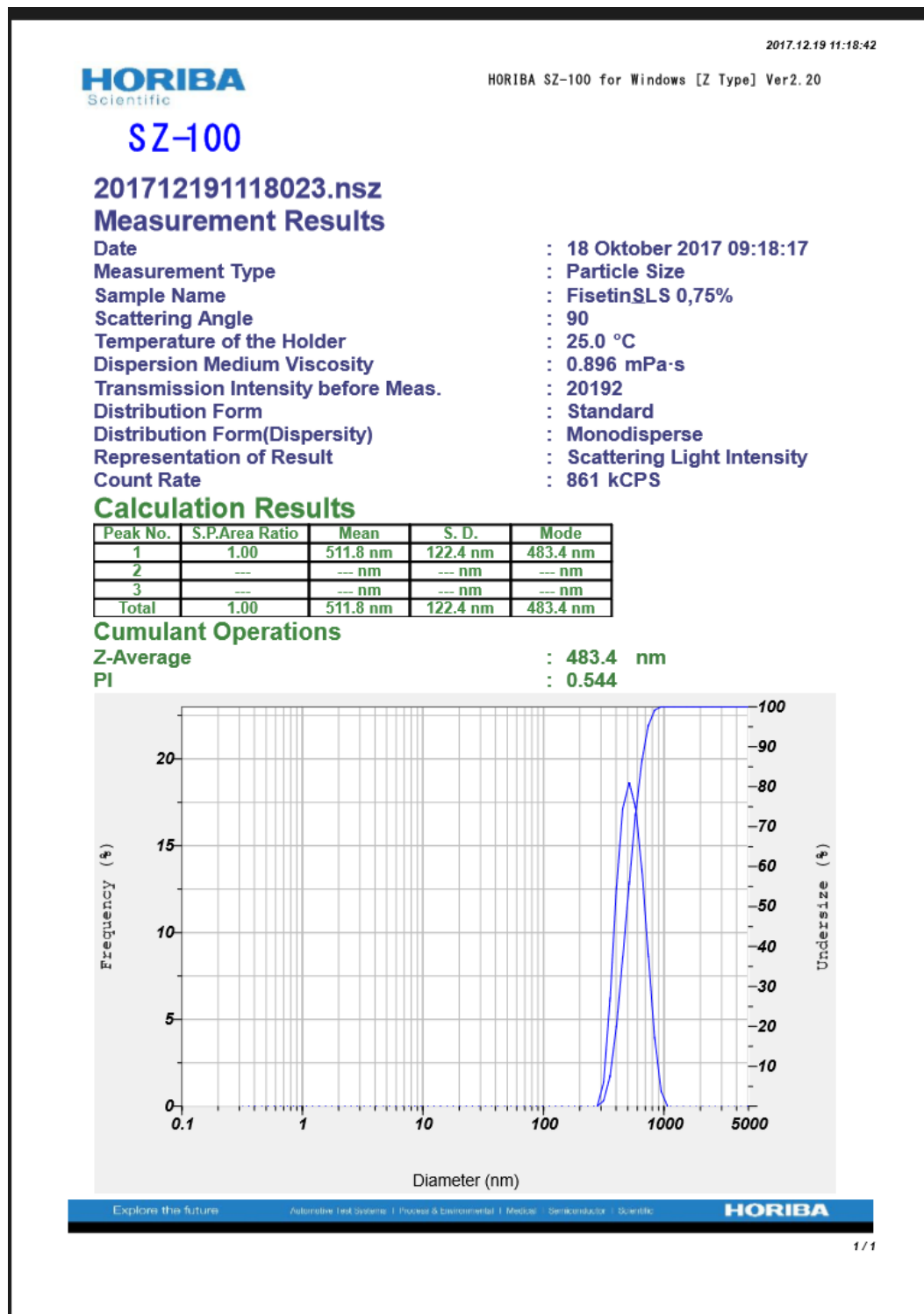
Lampiran 7. Gambar bahan

No	Bahan	Nama bahan
1		Fisetin murni
2		<i>Fisetin + SLS</i>
3		<i>SLS</i>
4		<i>Poloxamer 188</i>

No	Bahan	Nama bahan
5		PVA
6		PVP
7		HPMC

Lampiran 8. Ukuran, IP, dan zeta potensial setelah penyimpanan

Ukuran partikel



HORIBA
Scientific

2017.12.19 11:17:52

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.20

SZ-100

201712191107020.nsz Measurement Results

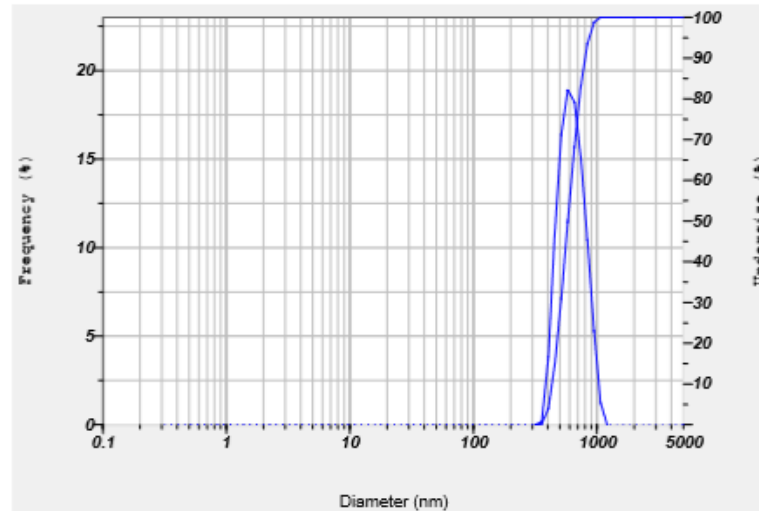
Date : 18 Nopember 2017 10:07:08
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : Fisetin_SLS
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 25.1 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.893 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 20045
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1344 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	600.9 nm	139.4 nm	549.3 nm
2	---	--- nm	--- nm	--- nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	600.9 nm	139.4 nm	549.3 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 549.3 nm
 PI : 0.612



Explores the future

HORIBA Ltd. Japan | France | Switzerland | Mexico | United Kingdom | Germany

HORIBA
Scientific

1/1

2017.12.19 11:06:47

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.20

SZ-100

201712191104019.nsz

Measurement Results

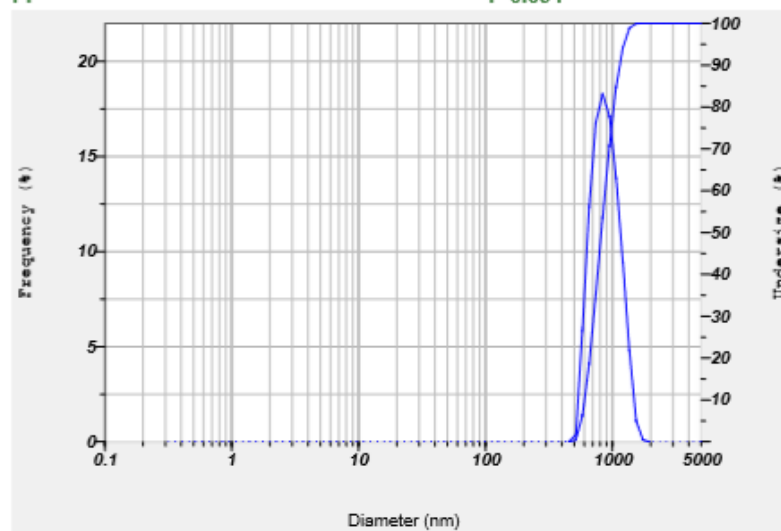
Date : 19 Desember 2017 11:04:48
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : Fisetin SLS
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.895 mPa-s
 Transmission Intensity before Meas. : 20045
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1189 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	848.0 nm	204.5 nm	788.4 nm
2	---	--- nm	--- nm	--- nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	848.0 nm	204.5 nm	788.4 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 788.4 nm
 PI : 0.694

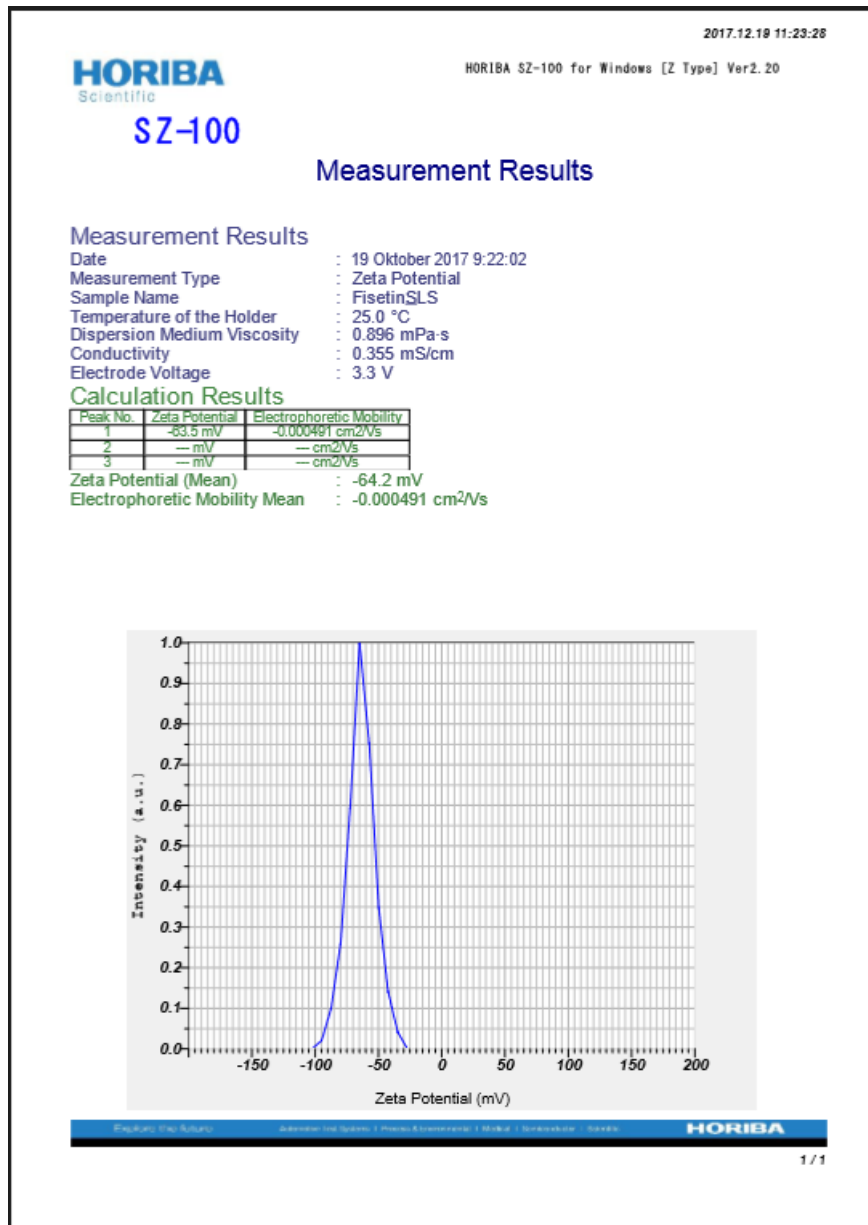


Explore the full line

[Add-on modules](#) | [Training courses](#) | [Technical support](#) | [Contact](#) | [Service network](#) | [Sitemap](#)
HORIBA

1/1

Gambar zeta potensial



2017.12.18 11:24:07

HORIBA
 Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.20

SZ-100

Measurement Results

Measurement Results

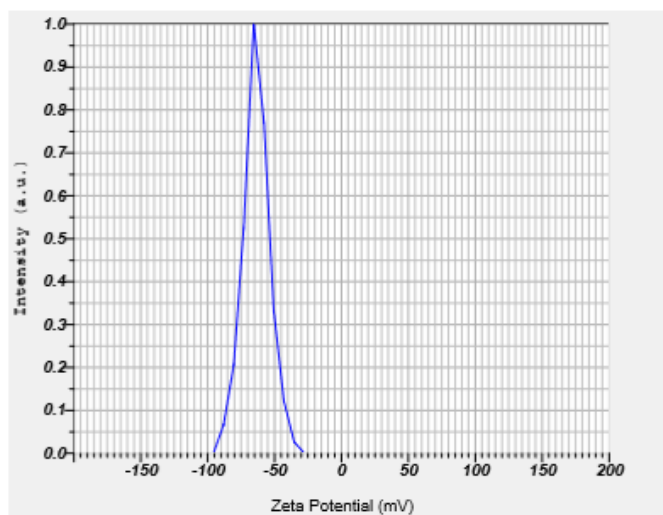
Date : 18 November 2017 10:23:37
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : FisetinSLS
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.896 mPa·s
 Conductivity : 0.355 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.3 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-63.8 mV	-0.000492 cm ² /Vs
2	— mV	— cm ² /Vs
3	— mV	— cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -63.6 mV

Electrophoretic Mobility Mean : -0.000492 cm²/Vs



Enabling the Future

Addressing the System | Process Economics | Risk | Sustainability | Service

HORIBA

1 / 1

2017.12.19 11:25:57

HORIBA
 Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.20

SZ-100

Measurement Results

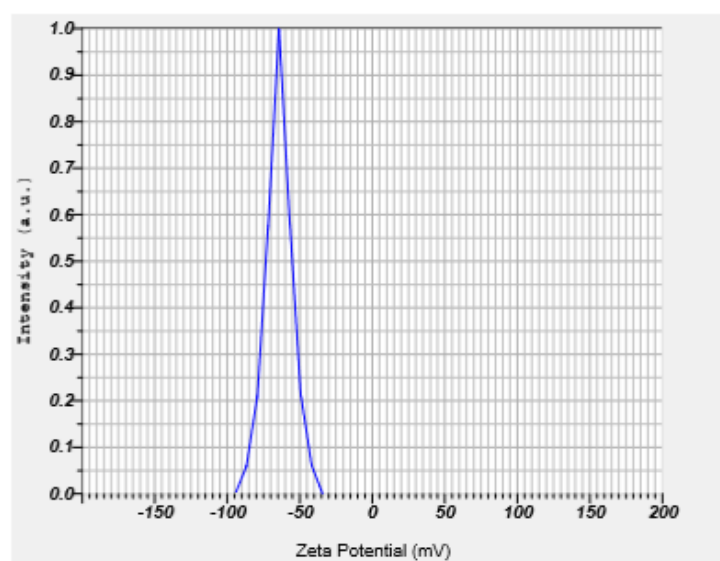
Measurement Results

Date : 19 Desember 2017 11:25:28
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : FisetinSLS
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.894 mPa·s
 Conductivity : 0.355 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.3 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-64.2 mV	-0.000498 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -63.5 mV
 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000498 cm²/Vs

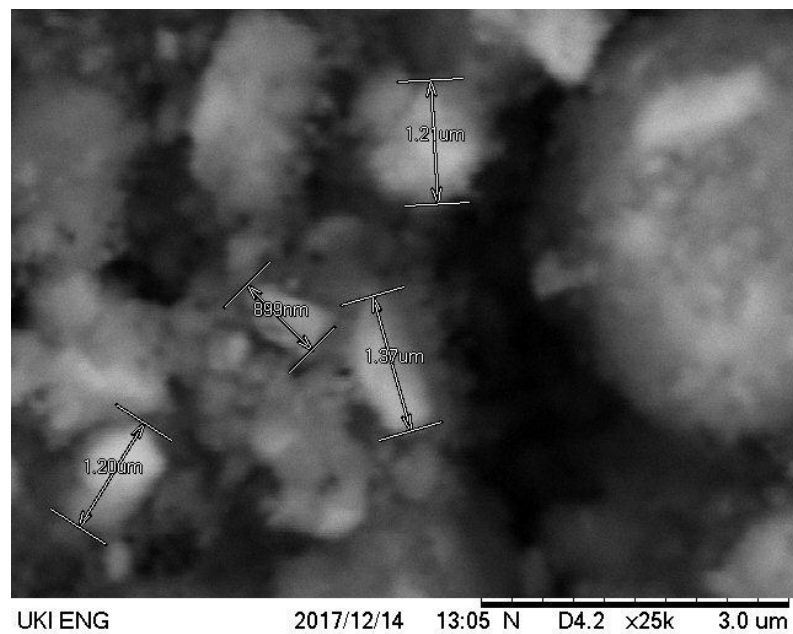


Explains the future

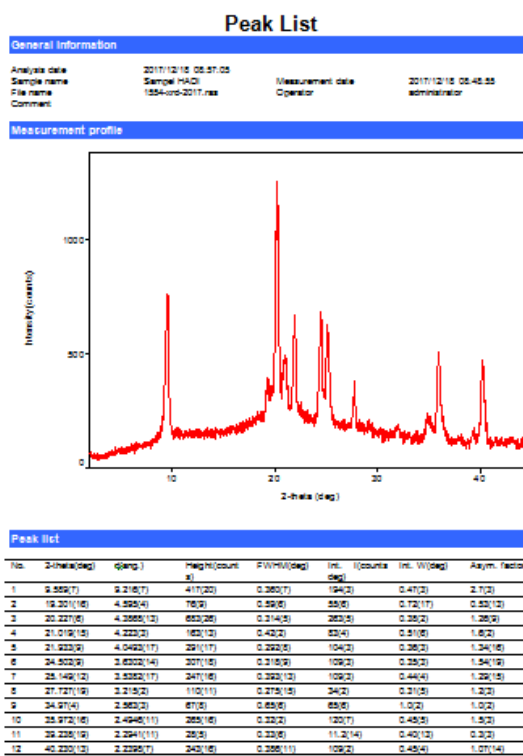
Horiba Ltd. Tokyo | Paris | Amsterdam | Madrid | Stockholm | Berlin

HORIBA
 Scientific

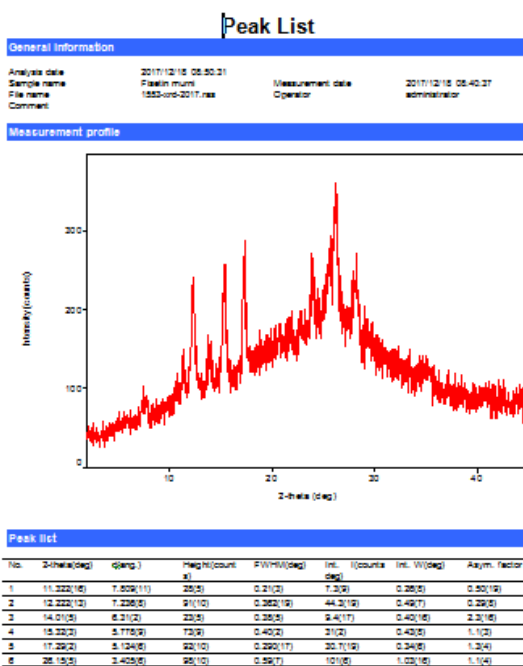
1 / 1

Lampiran 9. Hasil SEM**Gambar sfisetin nanokristal****Gambar fisetin murni**

Lampiran 10. Hasil XRD



Gambar Sampel fisetin +SLS



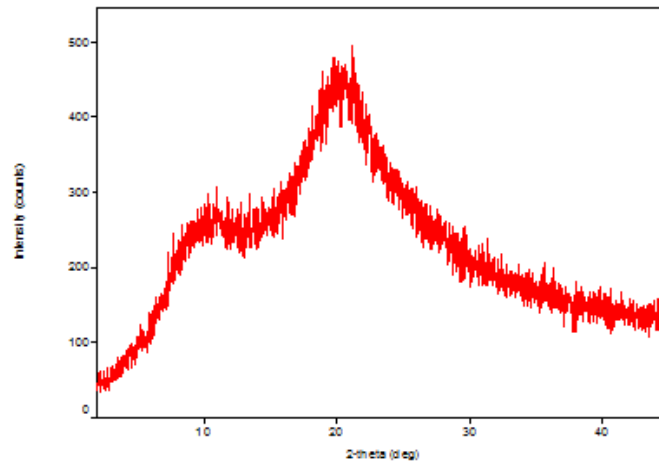
Gambar Sampel Fisetin murni

Peak List

General information

Analysis date: 2017/12/18 09:09:02
 Sample name: Sodium (auyl) kulfat
 File name: 1556-xrd-2017.res
 Measurement date: 2017/12/18 09:03:28
 Operator: administrator
 Comment:

Measurement profile



Peak list

No.	2-theta(deg)	d(ang.)	Height(counts)	FWHM(deg)	Int. I(counts deg)	Int. W(deg)	Asym. factor
1	9.33(12)	9.47(12)	86(9)	9.3(7)	1408(172)	16(4)	0.31(3)
2	20.59(9)	4.309(19)	160(13)	6.6(3)	1651(204)	10(2)	1.01(8)

Gambar Sampel SLS

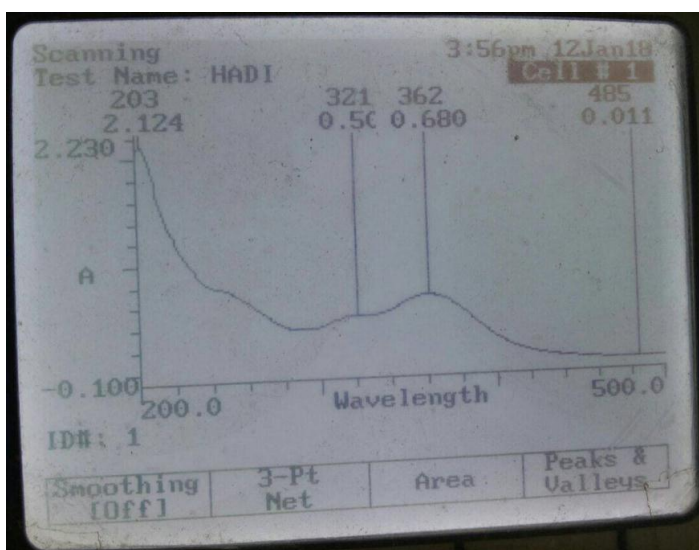
Lampiran 11. Disolusi dan kelarutan kinetic

Pembuatan kurva kalibrasi dan verifikasi metode analisa

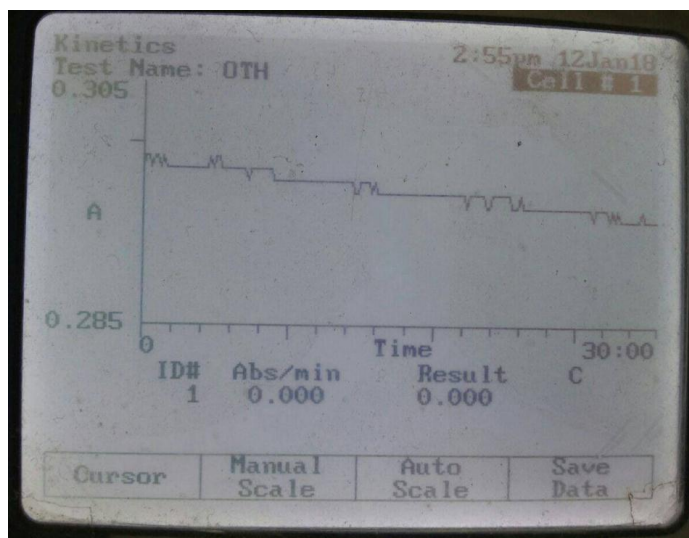
1. Medium daparfosfat pH 7.4

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh yang diperoleh dari *scanning* larutan Fisetin murni 10 ppm yaitu panjang gelombang maksimum sebesar 362 nm, serapan 0.680ppm dengan pelarut aquabidestillata



b. Penentuan operating time



a. Kurva kalibrasi

Konsentrasi (ppm)	pembacaan 1	pembacaan 2	pembacaan 3	rata rata
2	0,147	0,149	0,151	0,149
4	0,274	0,273	0,272	0,273
6	0,390	0,389	0,388	0,389
8	0,508	0,509	0,510	0,509
10	0,649	0,648	0,647	0,648
12	0,789	0,790	0,790	0,790

$$a = 0,0147$$

$$b = 0,0636$$

$$r = 0,9983$$

Persamaan regresi linier

$$y = a + bx$$

$$= 0,0147 + 0,0636x$$

Keterangan

x = konsentrasi (ppm)

y = serapan

b. Linearitas

Konsentrasi (ppm)	pembacaan 1	pembacaan 2	pembacaan 3	rata rata
2	0,147	0,149	0,151	0,249
4	0,274	0,273	0,272	0,273
6	0,390	0,389	0,388	0,389
8	0,508	0,509	0,510	0,509
10	0,649	0,648	0,647	0,648
12	0,789	0,790	0,790	0,790

$$a = 0,0147$$

$$b = 0,0636x$$

$$r = 0,9983$$

Hasil linearitas diperoleh $R = 0,9983$, sehingga dapat disimpulkan bahwa data linier.

c. Penentuan LOD dan LOQ

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi (y)	\hat{y}	$ y-\hat{y} $	$ y-\hat{y} ^2$
1	0.149	0.1419	0.0071	0.0000504
2	0.273	0.2691	0.0039	0.0000152
3	0.389	0.3964	-0.0074	0.0000548
4	0.509	0.5235	-0.0145	0.0002102
5	0.648	0.6507	-0.0027	0.0000073
6	0.790	0.7779	0.0121	0.0001464
Jumlah total ($\sum y-\hat{y} ^2$)				0.00048433

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum |y-\hat{y}|^2}{n-2}}$$

$S_{x/y}$ = simpangan baku residual

n = jumlah data $\sum |y-\hat{y}|^2$

$\sum |y-\hat{y}|^2$ = jumlah kuadrat total residual

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{0,00048433}{6-2}} = \sqrt{0,0001210825} = 0,0110037494$$

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= 3,3 \times \frac{S_{x/y}}{b} \\ &= 3,3 \times \frac{0,0110037494}{0,0636} \\ &= 0,570949266 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} y &= 0,0147 + 0,0636 (0,57095) \\ &= 0,0510 \end{aligned}$$

serapan LOD = 0,0510

$$\begin{aligned} \text{LOQ} &= 10 \times \frac{S_{x/y}}{b} \\ &= 10 \times \frac{0,0110037494}{0,0636} \\ &= 1,73014929 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} y &= 0,0147 + 0,0636 (1,73015) \\ &= 0,1247 \end{aligned}$$

serapan LOQ = 0,1247

Perhitungan \hat{y}

Nilai \hat{y} diperoleh dari substitusi konsentrasi dalam persamaan $\hat{y} = 0,0142 + 0,12722 x$ dengan x adalah konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dan y absorbansi (\hat{y}).

$$\begin{aligned} 1. \hat{y} &= 0,0147 + 0,0636 x \\ &= 0,0147 + 0,0636 \times 2 \\ &= 0,1419 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 5. \hat{y} &= 0,0147 + 0,0636 x \\ &= 0,0147 + 0,0636 \times 10 \\ &= 0,6507 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \hat{y} &= 0,0147 + 0,0636 x \\
 &= 0,0147 + 0,0636 \times 4 \\
 &= 0,2691
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 3. \hat{y} &= 0,0147 + 0,0636 x \\
 &= 0,0147 + 0,0636 \times 6 \\
 &= 0,3963
 \end{aligned}$$

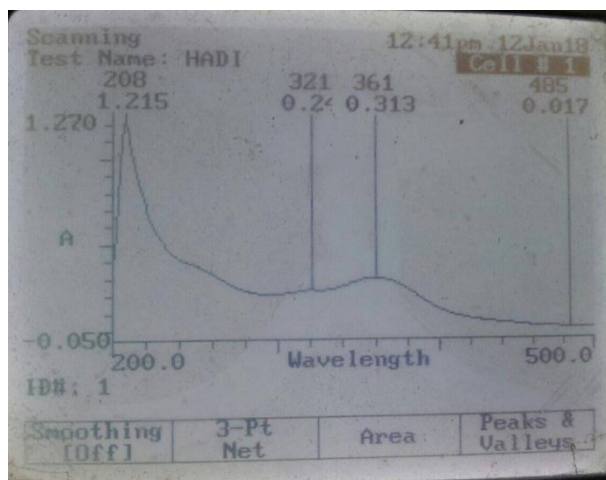
$$\begin{aligned}
 4. \hat{y} &= 0,0147 + 0,0636 x \\
 &= 0,0147 + 0,0636 \times 8 \\
 &= 0,5235
 \end{aligned}$$

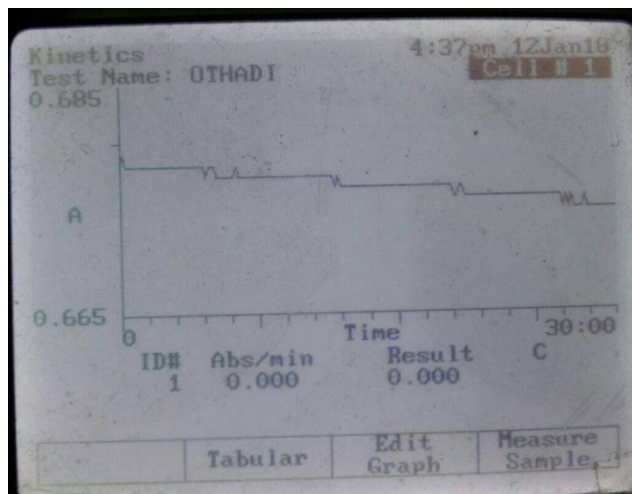
$$\begin{aligned}
 6. \hat{y} &= 0,0147 + 0,0636 x \\
 &= 0,0147 + 0,0636 \times 12 \\
 &= 0,7779
 \end{aligned}$$

2. Medium Aquadestillata

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh yang diperoleh dari *scanning* larutan fisetin murni konsentrasi 10 ppm yaitu panjang gelombang maksimum sebesar 361 nm, serapan 0,313 ppm



b. Penentuan *operating time*

c. Kurva kalibrasi

Konsentrasi (ppm)	pembacaan 1	pembacaan 2	pembacaan 3	rata rata
2	0,273	0,272	0,254	0.273
4	0,389	0,390	0,388	0.390
6	0,508	0,510	0,509	0.509
8	0,646	0,648	0,650	0.648
10	0,787	0,790	0,793	0.790
12	0,889	0,890	0,890	0,899

$$a = 0,0137$$

$$b = 0,0638$$

$$r = 0,9993$$

Persamaan

$$y = a + bx$$

$$= 0,0137 + 0,0638x$$

Keterangan

x = konsentrasi (ppm)

y = serapan

d. Linearitas

Konsentrasi (ppm)	pembacaan 1	pembacaan 2	pembacaan 3	rata rata
2	0,276	0,275	0,256	0.273
4	0,392	0,390	0,388	0.390
6	0,513	0,510	0,510	0.509
8	0,650	0,652	0,650	0.648
10	0,790	0,790	0,793	0.790
12	0,889	0,890	0,890	0,899

$$a = 0,0137$$

$$b = 0,0638$$

$$r = 0,9993$$

Hasil linearitas diperoleh $R = 0,9993$, sehingga dapat disimpulkan bahwa data linier.

e. Penentuan LOD dan LOQ

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi (y)	\hat{y}	$ y - \hat{y} $	$ y - \hat{y} ^2$
1	0.273	0.1413	0.1317	0.01734489
2	0.389	0.2689	0.1201	0.01442401
3	0.509	0.3969	0.1121	0.01256541
4	0.648	0.5241	0.1239	0.01535121
5	0.790	0.6517	0.1383	0.01912689
6	0,899	0.7793	0.1197	0.01432809
Jumlah total ($\sum y - \hat{y} ^2$)				0.0931405

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum |y - \hat{y}|^2}{n - 2}}$$

$S_{x/y}$ = simpangan baku residual

n = jumlah data $\sum |y - \hat{y}|^2$

$\sum |y - \hat{y}|^2$ = jumlah kuadrat total residual

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{0.0931405}{6 - 2}} = 0.1525946428 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{S_{x/y}}{b}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{S_{x/y}}{b}$$

$$\begin{aligned}
 &= 3,3 \times \frac{0.1525946428}{0,0638} &= 10 \times \frac{0.1525946428}{0,0638} \\
 &= 2.391765561 \mu\text{g/ml} &= 23.91765561 \mu\text{g/ml} \\
 y &= 0,0137+0,0638(2.3918) &y &= 0,0137+0,0638(23.9176) \\
 &= 0,1663 &&= 1.5396 \\
 \text{serapan LOD} &= 0,1663 &\text{serapan LOQ} &= 0,1247
 \end{aligned}$$

Perhitungan \hat{y}

Nilai \hat{y} diperoleh dari substitusi konsentrasi dalam persamaan $\hat{y} = 0,0137+0,0638x$ dengan x adalah konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dan y absorbansi (\hat{y}).

$$\begin{aligned}
 5. \hat{y} &= 0,0137+0,0638x & 5. \hat{y} &= 0,0137+0,0638x \\
 &= 0,0137+0,0638 \times 2 & &= 0,0137+0,0638 \times 10 \\
 &= 0.1413 & &= 0.6517 \\
 6. \hat{y} &= 0,0137+0,0638x & 6. \hat{y} &= 0,0137+0,0638x \\
 &= 0,0137+0,0638 \times 4 & &= 0,0137+0,0638 \times 12 \\
 &= 0.2689 & &= 0.7793 \\
 7. \hat{y} &= 0,0137+0,0638x \\
 &= 0,0137+0,0638 \times 6 \\
 &= 0.3969 \\
 8. \hat{y} &= 0,0137+0,0638x \\
 &= 0,0137+0,0638 \times 8 \\
 &= 0.5241
 \end{aligned}$$

Lampiran 12. kesetaraan dosis

$$y = a + bx$$

$$= 0,0137 + 0,0638 x$$

Konsentrasi	Absorbansi	Faktor pengenceran	Volume	Kadar (mg)
100 ppm	0.251	10 kali	10 ml	0.055

Perhitungan kadar fisetin nanokristal $(y - a) / (b \times 1000) \times fp \times \text{volum pembuatan}(10 \text{ ml})$

Perhitungan : $(0.251 - 0,0137) / (0,0638 \times 1000) \times 10 \times 10 \text{ ml} = 0.372 \text{ mg}$

Yang artinya 10 mg fisetin nanokristal setara dengan 0.372 mg fisetin murni, sehingga 10 mg fisetin murni setara dengan 26.88 mg fisetin nanokristal.

Lampiran 13. Hasil uji kelarutan kinetic fisetin murni dan fisetin nanokristal

Perhitungan:

1. fisetin murni

Hari ke-	Absorbansi	Fp	Volum pembuatan	Kadar (ppm)	Kadar (mg)
1	0.217	10	100 ml	31.865	3.1865
2	0.261	10	100 ml	38.762	3.8762
3	0.298	10	100 ml	44.561	4.4561
4	0.311	10	100 ml	46.599	4.6599
5	0.383	10	100 ml	57.884	5.7884
6	0.422	10	100 ml	63.997	6.3997
7	0.501	10	100 ml	76.379	7.6379

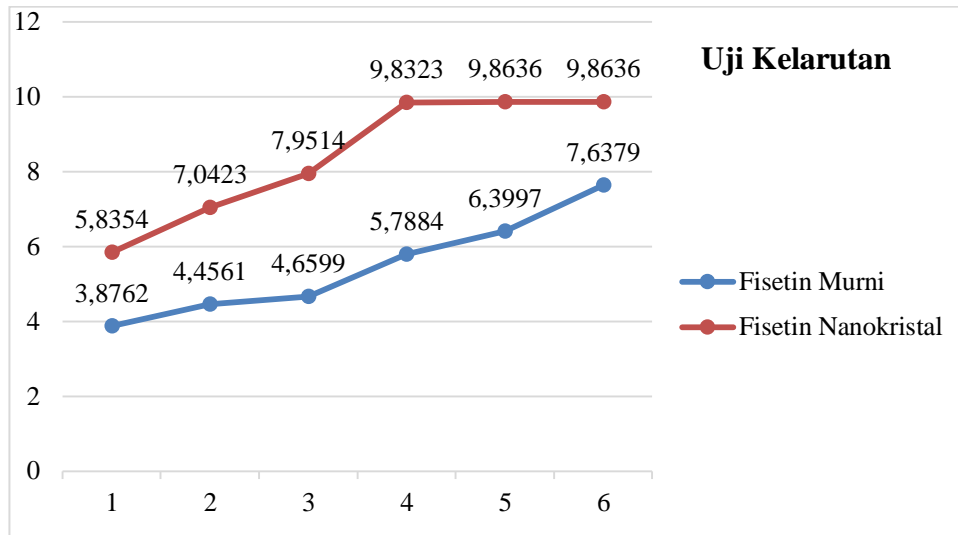
Keterangan : perhitungan kadar = $(x-0,0137) / (0,0638 \times 1000 \text{ ml}) \times \text{factor pengenceran}(10) \times \text{volum pembuatan (100ml)}$.

2. fisetin nanokristal

Hari ke-	Absorbansi	Fp	Volum pembuatan	Kadar (ppm)	Kadar (mg)
1	0.314	10	100 ml	47.069	4.7069
2	0.386	10	100 ml	58.354	5.8354
3	0.463	10	100 ml	70.423	7.0423
4	0.521	10	100 ml	79.514	7.9514
5	0.641	10	100 ml	98.323	9.8323
6	0.643	10	100 ml	98.636	9.8636
7	0.643	10	100 ml	98.636	9.8636

Keterangan : perhitungan kadar = $(x-0,0137) / (0,0638 \times 1000 \text{ ml}) \times \text{factor pengenceran}(10) \times \text{volum pembuatan (100ml)}$.

Kurva perbandingan kelarutan kinetic antara fisetin murni dengan nanokristal fisetin



Lampiran 14. Hasil uji disolusi

1. fisetin murni

Waktu (menit)	absorbansi	Fp	Kadar sampel (ppm)	Jumlah (mg)	Koreksi (mg)	Total koreksi (mg)	Terdisolusi (mg)	% disolusi
5	0.213	1	3.117924528	2.8061320750	0	0	2.8061320750	28.061320750
10	0.224	1	3.290880503	2.9617924530	0.0155896	0.01558962264	2.977382075	29.77382075
15	0.239	1	3.526729560	3.1740566040	0.0164544	0.03204402264	3.206100063	32.06100063
20	0.242	1	3.573899371	3.2165094340	0.0118559	0.04389992264	3.260409357	32.60409357
30	0.258	1	3.825471698	3.4429245280	0.0178694	0.06176932264	3.504693828	35.04693828
45	0.264	1	3.919811321	3.5277830189	0.0191272	0.08089652254	3.608673019	36.08673019
60	0.271	1	4.029874214	3.6276886792	0.0201544	0.1010519226	4.050028614	40.50028614

2. fisetin nanokristal

Waktu (menit)	absorbansi	Fp	Kadar sampel (ppm)	Jumlah (mg)	Koreksi (mg)	Total koreksi (mg)	Terdisolusi (mg)	% disolusi
5	0.327	1	4.91037735	4.419339623	0	0	4.419339623	44.19339623
10	0.339	1	5.09905660	4.589150943	0.02455	0.0245533	4.589150940	45.89150940
15	0.372	1	5.616226415	5.056316034	0.02549	0.0500433	5.106132075	51.06132075
20	0.402	1	6.089622642	5.480660377	0.02573	0.0757733	5.556433677	55.56433677
30	0.469	1	7.143081761	6.428773585	0.03430	0.1100733	6.538735850	65.38735850
45	0.478	1	7.284591195	6.556132075	0.03572	0.1815133	6.737645075	67.37645075
60	0.489	1	7.457547170	6.711792453	0.03642	0.2179333	6.929725753	69.29725753

Keterangan:

Persamaan regresi linier, $y = 0,0147 + 0,0636x$

Fp:=factor pengenceran

Jumlah=banyaknya fisetin dalam medium disolusi(900ml)

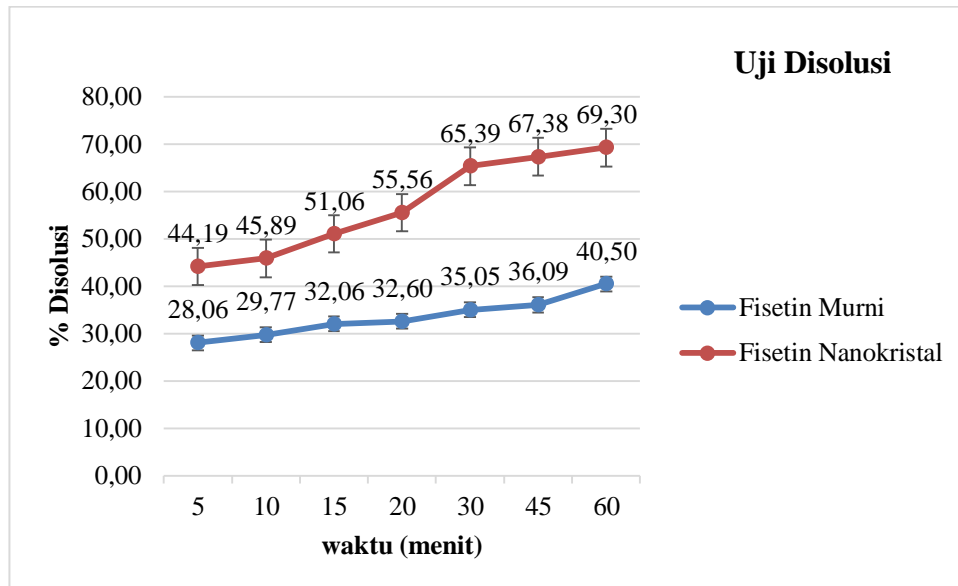
Koreksi=jumlah fisetin dalam cuplikan sampel(mg)

Total koreksi=jumlah kumulatif koreksi(mg)

Terdisolusi=jumlah fisetin yang terlarut

% disolusi=persentasi jumlah fisetin yang terlarut(%)

Gambar. Kurva perbandingan disolusi antara fisetin murni dengan nanokristal fisetin



Lampiran 15. Contoh perhitungan

- Contoh perhitungan disolusi

$$X = \frac{(A-a)}{b} \times \text{faktor pengenceran}$$

$$W = X \times \text{volume medium disolusi}$$

$$K = \frac{\text{volume sampling}}{\text{volume medium disolusi}} \times W_{n-1}$$

$$\text{TKW} = \text{TKW}_{n-1} + K$$

$$Q = W + \text{TKW}$$

$$\% W = \frac{Q}{10 \text{ mg}} \times 100\%$$

Keterangan :

X = kadar *fisetin* ($\mu\text{g/ml}$)

A = serapan sampel

W = jumlah obat yang terdisolusi (mg)

Medium disolusi = 900 mL dapar fosfat pH 7.4

Volume sampling = 5 mL

K = koreksi (mg)

W_{n-1} = jumlah obat terdisolusi pada pengambilan sampling sebelumnya (mg)

TKW = total koreksi (mg)

TKW_{n-1} = total koreksi pada sampling sebenarnya (mg)

Q = jumlah obat yang terdisolusi total (mg)

% W = persen disolusi (%)

Data disolusi nanokristal fisetin

Waktu (menit)	absorbansi	Fp	Kadar sampel (ppm)	Jumlah (mg)	Koreksi (mg)	Total koreksi (mg)	Terdisolusi (mg)	% disolusi
5	0.327	1	4.91037735	4.419339623	0	0	4.419339623	44.19339623
10	0.339	1	5.09905660	4.589150943	0.02455	0.0245533	4.589150940	45.89150940

Kadar fisetin dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva baku fisetin dalam medium dapas fosfat pH 7.4

$$X = \frac{(y - 0,0147)}{0,0636}$$

$$W = X * \text{volum medium disolusi}$$

$$K = \frac{\text{volum sampling}}{\text{volum medium dissolusi}} \times W_n - 1$$

$$TKW = TKW_{n-1} + K$$

$$W_{total} = TKW + W$$

$$\% W = \frac{W_{total}}{\text{kandungan fisetin}} \times 100\%$$

Contoh:

$$X_5 = \frac{(0,327 - 0,0147)}{0,0636} = 4,91037735 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar} &= \frac{(0,327 - 0,0147)}{(0,0636 \times 1000)} \times fp(1) \times \text{volum pembuatan} (900 \text{ ml}) \\ &= 4,419339623 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$K_5 = \frac{5 \text{ ml}}{900 \text{ ml}} \times 0 = 0$$

$$Q = 4,91037735 + 0 = 4,419339623 \text{ mg}$$

$$TKW = 0$$

$$\% W = \frac{4,91037735 \text{ mg}}{10 \text{ mg}} \times 100\% = 44,19339623\%$$

Dan seterusnya...