

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Nanopartikel

Nanopartikel adalah partikel koloid atau padatan dengan diameter yang berkisar antara 10-1000 nm. Beberapa sumber menyebutkan bahwa nanopartikel akan menunjukkan sifat khasnya pada ukuran diameter di bawah 100 nm, namun batasan tersebut sulit dicapai untuk sistem nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat. Nanopartikel dengan menggunakan polimer dapat dimanfaatkan untuk sistem penghantaran tertarget, meningkatkan bioavailabilitas, pelepasan obat terkendali, atau melarutkan obat untuk penghantaran sistemik. Sistem ini dapat digunakan untuk melindungi agen terapeutik akibat adanya degradasi enzim (*nuklease dan protease*) (Rauhatun dan Iis 2013).

Kelebihan nanopartikel yaitu kemampuannya untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal, kemampuan untuk menembus dinding sel yang lebih tinggi, baik melalui difusi maupun opsonifikasi, dan fleksibilitasnya untuk dikombinasi dengan berbagai teknologi lain sehingga membuka potensi yang luas untuk dikembangkan pada berbagai keperluan dan target. Kelebihan lain dari nanopartikel adalah adanya peningkatan afinitas dari sistem karena peningkatan luas permukaan kontak pada jumlah yang sama (Rauhatun dan Iis 2013).

Pembentukan nanopartikel dapat dicapai dengan berbagai teknik yang sederhana. Nanopartikel pada sediaan farmasi dapat berupa sistem obat dalam matriks seperti nanosfer dan nanokapsul, nanoliposom, nanoemulsi, dan sebagai sistem yang dikombinasikan dalam perancah (*scaffold*) dan penghantaran transdermal. Kemampuan nanopartikel untuk meningkatkan ketersediaan hayati obat dengan kelarutan yang rendah dalam sirkulasi sistemik telah banyak dibuktikan (Martien *et al.* 2012). Kemampuan ini berlaku umum pada berbagai aplikasi penghantaran : oral, intravena, pulmonar, dan transdermal (Martien *et al.* 2012).

Peningkatan jumlah obat dalam darah pada penghantaran sistemik juga akan meningkatkan resiko munculnya efek samping maupun efek balik, hingga pada resiko tercapainya batas kadar toksik (Martien *et al.* 2012). Peningkatan kadar obat dalam darah sangat diperlukan bagi obat untuk dapat menimbulkan efek farmakologis, oleh karena itu, nanopartikel memberikan solusi yang baik karena dapat memberikan efek farmakologis pada dosis yang lebih kecil (efisien) (Martien *et al.* 2012).

B. NLC (*Nanostructured Lipid Carriers*)

Sistem pembawa NLC merupakan generasi baru dari *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN) yang banyak diteliti dalam beberapa tahun terakhir karena memiliki berbagai kelebihan salah satunya dapat digunakan sebagai pembawa obat (Pardeike *et al.* 2009). Keuntungan SLN yaitu, memungkinkan pelepasan obat terkendali dan obat yang ditargetkan, bioavailabilitas yang tinggi, meningkatkan stabilitas obat, tidak adanya toksisitas dari pembawa, menghindari penggunaan pelarut organik. Kelemahan dari SLN adalah menyebabkan degradasi obat jika pembuatannya dengan tekanan tinggi (Mehnert dan Mader 2001).

Sistem NLC merupakan sistem penghantaran obat yang terdiri dari campuran lipid padat dan lipid cair, membentuk matrik inti lipid yang distabilkan oleh surfaktan (Puri *et al.* 2009). NLC merupakan matriks koloidal yang terbuat dari lipid padat dan lipid cair dengan diameter rata-rata antara 50 sampai 1000 nm (Sriarumtias *et al.* 2017). NLC diperkenalkan untuk mengatasi masalah yang terkait dengan SLN, seperti kapasitas pemuatan obat yang terbatas, pengendapan obat selama penyimpanan, penyesuaian pelepasan obat, stabilitas fisik jangka panjang dari suspensi, dll. (Pardeshi *et al.* 2012).

Sistem pengiriman obat nano telah menarik banyak perhatian dari para ilmuwan salah satunya adalah NLC (*nanostructured lipid carriers*) yang menunjukkan keunggulan luar biasa dalam meningkatkan bioavailabilitas obat (Sriarumtias *et al.* 2017). Pertama, penggabungan sejumlah kecil lipid cair kedalam matriks lipid padat yang dapat meningkatkan kapasitas pemuatan obat

dalam pembawa lipid. Kedua, lipid fisiologis yang digunakan NLC memiliki biokompatibilitas tinggi dengan fosfolipid pada kulit (Muller *et al.* 2002).

Prosedur pembuatan yang identik pada NLC adalah lipid padat atau campuran lipid padat-cair yang dilelehkan, untuk bahan aktif dilarutkan dalam fase lipid yang sudah dilelehkan kemudian terdispersi dalam suatu surfaktan berair panas dengan suhu setara dengan pengadukan berkecepatan tinggi. Pra-emulsi yang didapatkan dihomogenisasi dalam *homogenizer* bertekanan tinggi yang menghasilkan tipe o/w nano panas-emulsi, setelah itu dilakukan pendinginan. Tetesan emulsi akan mengkristal membentuk nanopartikel lipid dengan matriks partikel padat yang tergantung pada bahan awal, baik SLN ataupun NLC (Pardeshi *et al.* 2012).

C. Metode Pembuatan NLC

Pembuatan NLC dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain: *high shear homogenization and ultrasound*, *high pressure homogenization*, *emulsification solven evaporation*, *teknik emulsifikasi*, metode *bottom-up* dan metode *top down* (Mehnert, 2001).

1. Metode Pengadukan Berkecepatan Tinggi & Ultrasonikasi (*High shear homogenization and ultrasound*)

Metode pengadukan berkecepatan tinggi dan ultrasonikasi dilakukan dengan cara mendispersikan partikel pada tabung *ultrasound* dengan kecepatan tinggi. Gabungan kedua metode ini sangat sederhana dan bisa menguntungkan dibandingkan metode lain seperti homogenisasi panas dan dingin karena peralatan yang digunakan dalam teknik ini sangat umum di setiap laboratorium. Kerugiannya seperti mendistribusikan ukuran partikel yang lebih besar mulai dari kisaran mikrometer menyebabkan ketidakstabilan fisik seperti pertumbuhan partikel pada penyimpanan dan juga kontaminasi logam akibat *ultrasonication*.

Metode ultrasonikasi sendiri merupakan teknik yang paling banyak digunakan karena peralatan yang dibutuhkan adalah umum di setiap laboratorium. Terdapat 2 alat yang dapat digunakan pada metode *ultrasound*, yang pertama yaitu dengan menggunakan alat probe sonikator dengan bagian ujungnya

menyediakan masukan energi tinggi untuk dispersi lipid tetapi kadang-kadang menyebabkan degradasi lipid karena terlalu panas dari dispersi lipid, yang kedua dengan menggunakan alat *sonikator bath* dengan prinsip kerja cenderung melepaskan partikel logam ke dalam dispersi, yang harus dihilangkan dengan sentrifugasi sebelum digunakan (Pardeshi *et al.* 2012).

Masalah apabila hanya menggunakan metode ultrasound adalah terbentuknya partikel yang lebih luas bahkan dalam ukuran mikrometer. Upaya yang dapat dilakukan untuk mendapatkan formulasi yang stabil yaitu dengan menggunakan gabungan pengadukan berkecepatan tinggi dan teknik ultrasonikasi yang dilakukan pada suhu tinggi. Ukuran dan distribusi ukuran dari dispersi lipid dipengaruhi oleh komposisi dan konsentrasi lipid, waktu, kekuatan *sonication*, dan suhu (Pardeshi *et al.* 2012).

Tabel 1. Kondisi optimal pembuatan NLC dengan HSH/Ultrasonikasi

Kondisi	Kecepatan putaran (rpm)	Waktu proses (min)
> Suhu ruangan	20.000	8
< Suhu ruangan	5000	10

Sumber : Rahmi 2010

2. Metode Homogenisasi Tekanan Tinggi (*High Pressure Homogenization*)

Metode homogenisasi tekanan tinggi dibagi menjadi 2 macam, yaitu *piston gap homogenization* dan *jet stream arrangement*. Metode *piston gap homogenization* dapat menghancurkan suspensi kasar dengan mendorong partikel kasar masuk ke dalam suatu celah (*gap*). Daya dorong, kavitasi dan tumbukan antar partikel dapat mempengaruhi proses pengecilan ukuran 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, dengan demikian partikel, sel dan makromolekul yang tersuspensi dalam cairan akan mengalami tekanan mekanik yang tinggi, menjadi bengkok dan cacat (Rahmi 2015).

3. Metode Emulsifikasi Pelarut (*Emulsification Solvent Evaporation*)

Metode ini melibatkan tiga langkah persiapan:

3.1 Persiapan fase organik. Bahan lipofilik yang pertama dilarutkan dalam pelarut organik yang sesuai dengan pengadukan magnet.

3.2 Langkah pra-emulsifikasi. Lipid yang mengandung fase organik terdispersi dengan tepat dalam larutan berair pada volume tertentu menggunakan *homogenizer* berkecepatan tinggi secara berurutan untuk membentuk pre-emulsi kasar.

3.3 Langkah nanoemulsifikasi. Pre-emulsi kasar yang dihasilkan akan dilewatkan melalui *homogenizer* bertekanan tinggi pada tekanan operasi untuk mendapatkan nanodispersion. *Nanodispersion* yang diperoleh kemudian disimpan pada pengaduk magnet selama semalam, atau disimpan di lemari asam untuk menguapkan pelarut organik yang tidak diinginkan. *Nanodispersion* dibentuk oleh pengendapan bahan lipid dalam media berair. *Nanodispersion* yang dipadatkan kemudian disaring melalui suatu filter kaca sinter untuk menghilangkan lipid dan *aglomerat* obat. Nanopartikel yang diperoleh dengan metode ini kecil, kecuali *monodisperse* dengan enkapsulasi tinggi. Proses ini dapat diotomatisasi dan ditingkatkan untuk produksi sejumlah besar nanopartikel (Pardeshi *et al.* 2012).

4. Teknik Emulsifikasi

Teknik emulsifikasi memiliki keuntungan dibandingkan metode pembuatan yang lainnya, metode ini lebih mudah dan dapat memberikan hasil penjemakan yang baik (Yuan *et al.* 2007). Metode emulsifikasi dilakukan dengan cara melelehkan fase lipid dengan menggunakan perbandingan lipid yang berbeda, serta bahan aktif pada suhu 65°C. Larutan surfaktan disiapkan dan dipanaskan pada suhu 65°C pada saat yang sama. Larutan surfaktan panas kemudian didispersikan ke dalam fase lipid panas menggunakan *ultra-turax* dengan kecepatan 3400 rpm selama 30 menit. Tahap selanjutnya adalah tahap pendinginan, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 100 rpm hingga mencapai suhu 25°C. NLC yang telah jadi ditimbang untuk mengetahui berat akhir NLC (Rahmi *et al.* 2016). Teknik emulsifikasi dengan kapasitas pemuatan obat yang lebih tinggi dan ukuran partikel yang lebih kecil,

dapat meningkatkan bioavailabilitas potensial. Kekurangan dari metode ini adalah ukuran partikel yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh perpaduan lemak dengan surfaktan/*emulsifier* dan konsentrasi lemak dalam formula (Pardeshi *et al.* 2012).

5. Metode *Bottom Up*

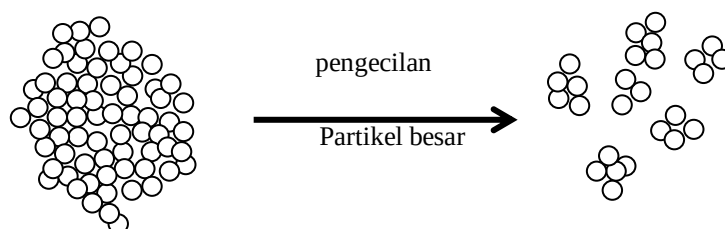
Metode *bottom up* berupa pembentukan nanostruktur atom demi atom atau molekul demi molekul. Metode *bottom up* dilakukan dengan cara obat dilarutkan dalam pelarut organik dan kemudian diendapkan tanpa penambahan pelarut dalam adanya *stabilizer* (Patravale *et al.* 2004). Keuntungan dari metode *bottom up* adalah menggunakan peralatan yang sederhana. Kekurangan metode *bottom up* yaitu obat harus dapat larut setidaknya dalam satu pelarut dimana pelarut tersebut harus dapat bercampur dengan *non-pelarut*. Keterbatasan metode *bottom up* adalah kesulitan saat *scale up* adanya residu dari pelarut yang digunakan (Gupta dan Kompella 2006).



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

6. Metode *top down*

Metode *top down* terdiri atas pengurangan ukuran partikel dari partikel obat yang besar menjadi partikel yang lebih kecil dengan menggunakan teknik penggilingan yang bervariasi seperti penggilingan media, mikrofluidisasi dan homogenisasi tekanan tinggi. Pelarut yang bersifat keras tidak digunakan dalam teknik ini, walaupun demikian, semua proses penggilingan media membutuhkan energi yang tinggi dan tidak efisien. Pertimbangan terhadap banyaknya panas yang dihasilkan dalam metode ini membuat pengolahan material yang termolabil menjadi sulit. Metode pembuatan dengan teknologi ini terdiri dari 2 cara, yaitu dengan *High Pressure Homogenizer* (homogenisasi tekanan tinggi) dan *Pearl Milling* (obat didispersikan dalam larutan surfaktan) (Patravale *et al.* 2004)



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

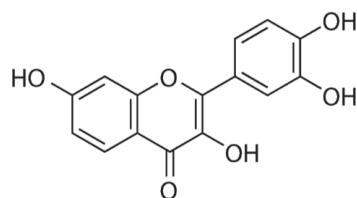
D. Fisetin

Fisetin (3,3',4',7' - tetrahydroxyflavone) dikenal sebagai *Natural Brown* yaitu flavonoid tanaman bioaktif yang berperan penting sebagai obat terapi dengan potensi yang berguna untuk berbagai radikal bebas yang dimediasi serta penyakit lainnya (Sengupta *et al.* 2005). Fisetin telah dilaporkan memiliki sifat sangat mengikat antara kepala polar dan ekor hidrofobik dari fosfolipid di sekitar wilayah *interfacial* dari fosfatidilkolin telur liposom. Wilayah ini dengan mudah tersedia untuk radikal bebas dan berfungsi sebagai situs reaksi untuk antioksidan dalam menghambat lipid peroksidasi (Khan *et al.* 2013).

Salah satu penelitian melaporkan bahwa fisetin dapat menghambat oksidasi *low-density lipoprotein* (LDL) manusia secara *in vitro* dengan menginduksi aktivitas oksidoreduktase kuinon pada sel murine hepatoma 1c1c7 dalam waktu dan dosis tertentu. Fisetin praktis tidak larut dalam air, tetapi mudah larut dalam etanol, metanol, aseton dan DMSO. Fisetin 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). Penelitian Subramanian *et al.* (2014) mengatakan bahwa fisetin memberikan efek maksimum pada dosis 10 mg/kg BB.

Fisetin dapat diperoleh melalui proses isolasi dan pemurnian dari bahan alam, namun proses tersebut umumnya memerlukan waktu yang cukup panjang dan biaya yang besar, selain itu upaya menyintesis fisetin perlu dilakukan dalam rangka memenuhi kebutuhan obat dan pengembangan ilmu pengetahuan, di antaranya untuk sintesis turunan flavonol atau flavonoid lain yang lebih rumit. Firmansyah (2009) telah melaporkan sintesis turunan fisetin 7,4'-dialiloksi-3'-etoksiflavonol dari resasetofenon dan vanilin (3-etoksi-4-hidroksibenzaldehida).

Rendemen intermediat kalkon didapatkan sebesar 47.8% dan disiklisasi menjadi fisetin melalui reaksi Algar-Flynn-Oyamada (AFO) dengan rendemen 42.7%.

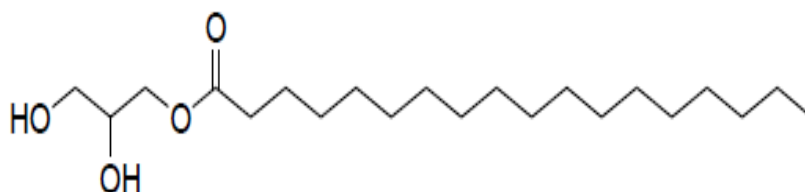


Gambar 3. Struktur kimia fisetin (Michal *et al.* 2014)

E. Studi Preformulasi

1. Glyceryl Monostearat

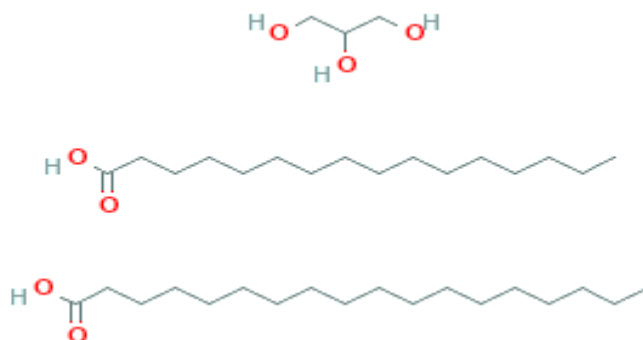
Gliseril monostearat ($C_{21}H_{42}O_4$) adalah monogliserida yang digunakan sebagai *emulsifier*. Secara kimia gliseril monostearat adalah ester gliserol dari asam stearat. Gliseril monostearat memiliki pemerian berupa serbuk berwarna putih hingga krem, seperti lilin padat dalam bentuk manik-manik, serpih, atau bubuk. Gliseril monostearat pada penelitian ini bertindak sebagai *elmulsifier* nonionik, yang dapat membentuk emulsi air dalam minyak atau minyak di dalam air. Gliseril monostearat juga berguna sebagai pendispersi agen untuk pigmen dalam minyak atau padatan dalam lemak, atau sebagai pelarut untuk fosfolipid, seperti lesitin. Gliseril monostearat memiliki nilai HLB 3,8, titik nyala 240°C dan titik lebur $55\text{--}60^{\circ}\text{C}$. Gliseril monostearat memiliki kelarutan larut dalam etanol panas, eter, kloroform, aseton panas, minyak mineral, dan minyak, praktis tidak larut dalam air, tetapi dapat bercampur di dalam air dengan bantuan sedikit sabun atau surfaktan lainnya. Gliseril monostearat dapat membentuk nanopartikel lipid padat dan sebagai sistem pembawa koloid untuk pengiriman obat terkontrol (Rowe *et al.* 2009).



Gambar 4. Glyceryl monostearat (Rowe *et al.* 2009).

2. Glyceryl Behenate (Compritol)

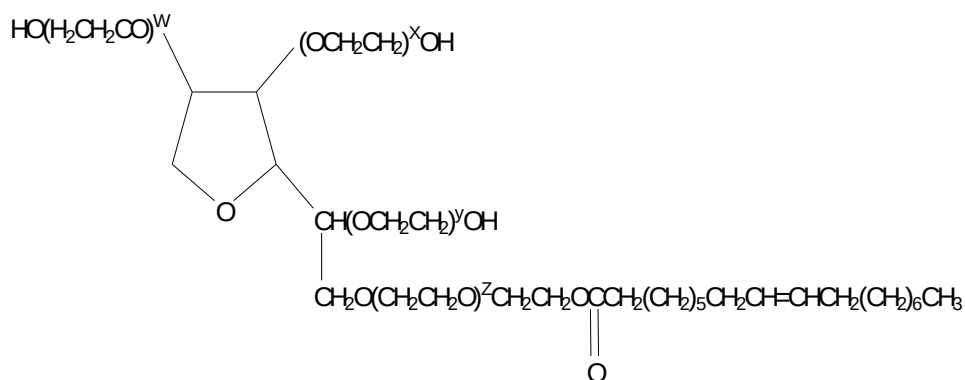
5–15°C dalam wadah kedap udara, terlindung dari cahaya dan kelembaban. Gliseril palmitostearate tidak dapat bercampur dengan penambahan ketoprofen dan naproxen. (Rowe *et al.* 2009).



Gambar 6. Struktur Gliseril Palmitostearate (Aburahma *et al.* 2014).

4. Polysorbate 80 (Tween 80)

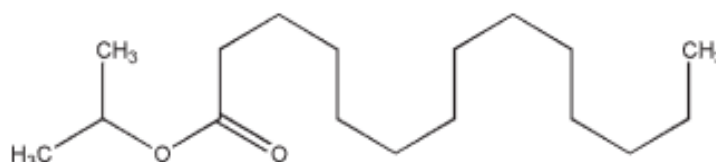
Tween 80 atau *Polysorbate 80* ($C_{64}H_{124}O_{26}$) adalah ester oleat dari sorbitol dan anhidridanya berkopolimerisasi dengan kurang lebih 20 molekul etilen oksida untuk tiap molekul sorbitol dan anhidrida sorbitol. Tween 80 memiliki rumus kimia $C_{64}H_{124}O_{26}$. Tween 80 merupakan cairan seperti minyak, jernih, bewarna kuning muda hingga cokelat muda, bau khas lemah, rasa pahit, dan hangat (Anonim 2014). Tween 80 larut dalam air dan etanol, tidak larut dalam minyak mineral (Rowe *et al.* 2009). Tween 80 memiliki harga HLB sejumlah 15 (Voigt 1995). Pada penelitian ini tween 80 merupakan surfaktan nonionik hidrofilik yang digunakan sebagai eksipien untuk menstabilkan emulsi pada sistem NLC (*nanostructured lipid carriers*) (Rowe *et al.* 2009).



Gambar 7. Struktur Tween 80 (Rowe *et al.* 2009).

5. Isopropyl Myristate

Isopropil miristat dibuat dengan esterifikasi asam miristat dengan propan-2-ol atau dengan reaksi myristoyl klorida dan propan-2-ol dengan bantuan dehidroklorinasi dengan agen yang cocok. Isopropil miristat pada penelitian ini bertindak sebagai lipid cair yang digunakan dalam hal pengebakan obat karena dapat menurunkan keteraturan kisi kristal matriks lipid disebabkan oleh perbedaan panjang rantai karbon lipid padat dan minyak, selain itu digunakan sebagai emolien yang mudah diserap oleh kulit, digunakan juga sebagai komponen basis semipadat dan sebagai pelarut untuk banyak zat yang diterapkan secara topikal. Isopropil miristat memiliki titik didih 140,2°C pada 266 Pa (2 mmHg), titik nyala 153,5°C (cawan tertutup) dan titik beku 58°C. Kelarutan dari isopropil miristat yaitu dapat larut dalam aseton, kloroform, etanol (95%), etil asetat, lemak, alkohol lemak, minyak, hidrokarbon cair, toluen, dan lilin. Praktis tidak larut dalam gliserin, glikol, dan air. Isopropil miristat telah digunakan dalam bahan dasar mikroemulsi menghasilkan nanopartikel sebagai jalur pengiriman obat yang potensial untuk protein dan peptida (Rowe *et al.* 2009).



Gambar 8. Struktur Isopropyl Myristate (Rowe *et al.* 2009).

F. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan salah satu proses penilaian terhadap metode analisis tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa metode tersebut memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam hal ini berarti valid (Harmita, 2004).

Parameter-parameter dalam proses validasi metode dapat ditentukan dengan menggunakan peralatan yang memenuhi spesifikasi, bekerja dengan baik dan terkalibrasi. Parameter validasi metode analisis yaitu linearitas, presisi, akurasi, selektifitas, limit deteksi serta limit kuantitasi.

1. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon secara langsung atau dengan matematik, untuk mendapatkan hasil dari variabel data (absorbansi dan kurva kalibrasi) dengan adanya konsentrasi, serta untuk mengetahui kemampuan standar dalam mendeteksi analit (Chan *et al.* 2004).

Penentuan uji linearitas dilakukan dengan larutan baku yang terdiri dari 5 konsentrasi yang naik dengan rentang 50–100 % dari rentang komponen uji. Kemudian data diolah dengan regresi linear (nilai r), sehingga dapat diperoleh respon linier terhadap konsentrasi larutan baku dengan nilai koefisien korelasi yang diharapkan mendekati angka 1 untuk suatu metode analisis yang baik. Hasil ini selanjutnya digunakan untuk menentukan linearitas yaitu dengan membandingkan nilai r hitung dengan nilai r tabel pada taraf kepercayaan 95%. Nilai linearitas dikatakan baik dan dapat digunakan untuk menghitung akurasi serta presisi bila r hitung $>$ r tabel (Chan *et al.* 2004).

2. Akurasi (Kecermatan)

Akurasi menggambarkan kesalahan sistematis dari suatu hasil pengukuran. Berbagai macam kesalahan yang mungkin terjadi meliputi kelembaban, bahan referensi serta metode analisis. Akurasi dapat dinyatakan sebagai persen kembali analit yang ditambahkan sedangkan nilai akurasi dapat dinyatakan dengan persen perolehan kembali (% *recovery*) (Chan *et al.* 2004).

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{Kadar hasil analisis}}{\text{Kadar sesungguhnya}} \times 100 \%$$

3. Presisi (Keseksamaan)

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji dengan cara memperoleh pengukuran dari penyebaran hasil uji jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran homogen. Diukur sebagai simpanan baku atau simpangan relatif (koefisien variasi). Presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Dikatakan seksama jika metode memberikan simpangan baku relatif yaitu ≤ 2 (Chan *et al.* 2004).

4. Selektifitas

Selektifitas atau spesifitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matrik sampel. Selektifitas sering kali dapat dinyatakan dengan derajat penyimpanan metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa campuran senyawa yang dianalisis dengan membandingkannya (Harmita 2004).

5. Limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibanding dengan blangko. Batas kuantitasi merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama serta dapat dikuantifikasi dengan penentuan kuantitatif senyawa yang terdapat dalam konsentrasi rendah dalam matriks (Harmita 2004). Batas deteksi dan batas kuantifikasi penetapan kadar obat ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan membuat lima seri konsentrasi dibawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai b (*slope*) pada persamaan regresi linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x).

Batas deteksi dan kuantifikasi dapat ditentukan dengan persamaan :

$$LOD = \frac{3 Sy/x}{b} \dots\dots\dots(1)$$

$$LOQ = \frac{10 Sy/x}{b} \dots\dots\dots(2)$$

G. Karakterisasi NLC (*Nanostructured Lipid Carriers*)

1. Ukuran Partikel

Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas nanopartikel (Singh *et al.* 2009). Pengukuran partikel dilakukan dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA). Persyaratan parameter ini adalah partikel mempunyai ukuran 50-1000 nm dan stabil pada periode waktu tertentu (Muller *et al.* 2000). Distribusi ukuran partikel dapat diketahui melalui gambar

yang dihasilkan. Ukuran tersebut dinyatakan dalam jari-jari untuk partikel yang berbentuk bola.

Prinsip kerja PSA yaitu sol silika yang dihasilkan dilakukan analisa ukuran partikel dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer (PSA) Zeta Nanosizer ZS* dengan prinsip gerak *Brownian*. Penentuan ukuran dan distribusi partikel menggunakan PSA dapat dilakukan dengan : difraksi sinar laser untuk partikel dari ukuran submikron sampai dengan milimeter. *Counter principle* untuk mengukur dan menghitung partikel yang berukuran mikron sampai dengan milimeter. Penghamburan sinar untuk mengukur partikel yang berukuran mikron sampai dengan nanometer (Muller *et al.* 2000).

2. Stabilitas Selama Penyimpanan

Potensial zeta dapat menggambarkan prediksi mengenai stabilitas penyimpanan dari dispersi koloid. Potensial zeta mengatur derajat tolak-menolak antara partikel-partikel terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan kecuali sistem yang mengandung stabilisator sterik atau hidrofilik karena adsorpsi stabilisator sterik akan menurunkan potensial zeta melalui pergeseran partikel (Pardeshi *et al.* 2012). Potensial zeta diukur dengan menggunakan *zetalyzer*. Besarnya potensial zeta dapat memprediksi stabilitas koloid. Nanopartikel dengan nilai potensi zeta lebih besar dari +25 mV atau kurang dari -25 mV biasanya memiliki derajat stabilitas tinggi. Dispersi dengan nilai potensial zeta rendah akan menghasilkan agregat karena atraksi *Van Der Waals* antar-partikel (Ronson 2012).

3. Efisiensi penjerapan

Efisiensi penjerapan atau *entrapment efficiency (Ee)* adalah persentase bahan aktif yang terjerap di dalam partikel lipid, untuk bahan aktif yang bersifat lipofilik biasanya memiliki nilai Ee antara 90-98% (Zhang *et al.* 2007). Efisiensi penjerapan (EE) sesuai dengan persentase obat yang dikemas dan teradsorpsi pada nanopartikel. Dispersi nanopartikel (1 ml) disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm (*Eppendorf mini-centrifuge*) selama 20 menit sampai nanopartikel terpisah. Untuk memfasilitasi pemisahan nanopartikel, digunakan larutan elektrolit NaCl. Supernatan yang didapatkan dianalisis menggunakan metode *spektrofotometer*

UV-Vis yang divalidasi setelah dilakukan pengenceran yang sesuai (Abhijit *et al.* 2011). Pengaruh *entrapment efficiency* (Ee) dan dapat dihitung dengan persamaan berikut :

$$Ee = \left(\frac{W_a - W_s}{W_a} \right) \% \times 100\%$$

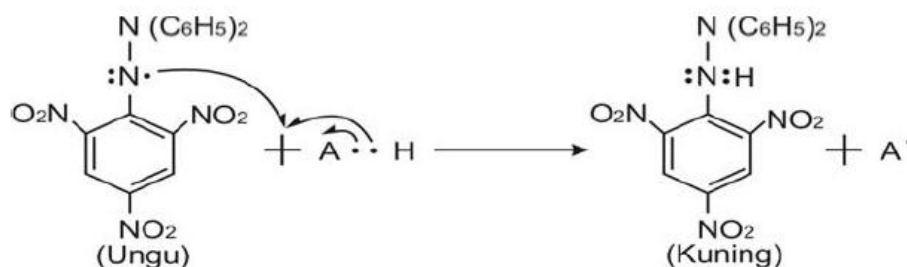
Keterangan :

W_a : Jumlah obat yang ditambahkan ke dalam sistem

W_s : Jumlah bahan obat bebas dalam supernatan

4. Uji aktifitas antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa terhambat. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Winarsi, 2007). Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan salah satunya adalah metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH dan membentuk DPPH tereduksi, jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang (Rohman *et al.* 2010).



Gambar 9. Reaksi DPPH dan Antioksidan (Dehpour *et al.* 2009)

H. Landasan Teori

Fisetin praktis tidak larut dalam air dan memiliki permeabilitas tinggi sehingga digolongkan dalam *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) kelas II. Penggunaan fisetin sebagai senyawa aktif obat masih sangat sedikit digunakan karena, dengan kelarutan yang kecil dan permeabilitas yang tinggi akan membatasi proses absorpsi pada obat yang sukar larut dalam air dan mempengaruhi ketersediaan farmasetiknya (Madaan 2014).

Salah satu teknologi untuk meningkatkan kelarutan yang rendah dari bahan aktif fisetin tersebut yaitu dengan menggunakan teknologi NLC (*nanostructured lipid carriers*) (Rauhatun dan Iis 2013). Sistem pembawa *Nanostructured Lipid Carriers* (NLC) yang merupakan generasi baru dari *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN) dapat digunakan sebagai pembawa obat karena apabila dengan sistem SLN memiliki kelemahan yaitu jumlah muatan obat yang terbatas dan adanya kerusakan obat selama penyimpanan, sehingga dilakukan pengembangan formulasi NLC karena pada NLC memiliki jumlah muatan obat yang lebih tinggi dan dapat meminimalkan kerusakan senyawa aktif fisetin selama penyimpanan (Muller *et al.* 2002).

Formulasi pada sistem NLC menggunakan kombinasi lipid padat (lemak) dan lipid cair (minyak) membentuk matrik inti lipid yang distabilkan oleh surfaktan. Lipid padat yang digunakan pada penelitian ini adalah golongan gliserida yaitu gliseril monostearat, compritol dan presinol. Perbedaan dari ketiga lipid padat yang digunakan tersebut terletak pada panjang rantai karbon, makin panjang rantai karbon maka makin tinggi titik lebur lipid tersebut, sehingga akan memudahkan campuran lipid untuk bercampur membentuk fase emulsi dengan dispersi koloid yang stabil (Rowe *et al.* 2009). Minyak atau lipid cair yang digunakan pada penelitian ini yaitu isopropil miristat yang digunakan dalam hal penyerapan obat karena dapat menurunkan keteraturan kisi kristal matriks lipid disebabkan oleh perbedaan panjang rantai karbon lipid padat golongan gliserida dan minyak (Tamjidi *et al.* 2013).

Pembuatan NLC fisetin dilakukan dengan menggunakan metode *emulsifikasi*. Kelebihan pada metode ini yaitu hasil pencampuran yang dihasilkan

berupa matriks yang dapat menjerap obat dalam jumlah yang relatif besar dibandingkan metode yang lain (Souto & Muller 2007). Tahapan pada metode ini dilakukan dengan cara mencampurkan lipid padat dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan dengan lipid cair. (Sjostrom *et al.* 1992).

Lipid padat golongan gliserida (compritol, precinol dan gliseril monostearat) dengan rentang konsentrasi 2-6% dibuat dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi manakah yang dapat membentuk formula NLC fisetin terbaik yang stabil selama proses penyimpanan.

Karakterisasi NLC fisetin yang dilakukan yaitu pengujian efisiensi penjerapan, ukuran partikel, potensial zeta, stabilitas selama penyimpanan NLC fisetin dan aktifitas antioksidan yang terkandung didalamnya.

Pengukuran ukuran partikel dilakukan dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA). Ukuran partikel yang dihasilkan antara 50-1000 nm dan memiliki kestabilan yang baik pada periode waktu tertentu karena dapat berpengaruh terhadap muatan obat, pelepasan obat dan stabilitas nanopartikel yang dihasilkan (Singh *et al.* 2009). *Presentase* bahan aktif (fisetin) yang terjerap di dalam partikel lipid diperoleh dari perhitungan efisiensi penjerapan atau *entrapment efficiency* (Ee). (Zhang *et al.* 2007). Analisis terhadap supernatan yang didapatkan dianalisis dengan menggunakan metode *spektrofotometer UV-Vis* yang divalidasi setelah dilakukan pengenceran yang sesuai (Abhijit *et al.* 2011). Kandungan antioksidan yang terdapat dalam NLC fisetin dapat diperoleh dengan menggunakan uji aktivitas antioksidan yaitu metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).

I. Hipotesis

1. Fisetin dapat dibuat NLC (*nanostructured lipid carriers*) menggunakan lipid golongan gliserida dengan metode *emulsifikasi*.
2. Fisetin dalam NLC (*nanostructured lipid carriers*) stabil selama proses penyimpanan.
3. Fisetin dalam NLC (*nanostructured lipid carriers*) dapat dikarakterisasi.