

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan unit atau individu yang menjadi sasaran dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah fisetin yang dibuat dalam sistem SLNs dan dilihat uji karakteristik dan kestabilan fisik.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari populasi yang ingin diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaannya mampu mewakili atau menggambarkan ciri-ciri dan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel dalam penelitian ini adalah fisetin yang dibuat menjadi SLNs dengan proporsi lipid padat golongan wax (apifil, polawax, carnauba wax) dengan surfaktan (tween 80).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung. Variabel dalam penelitian ini adalah formula dari fisetin *solid lipid nanoparticle* yang dibuat dengan beberapa variasi konsentrasi lipid yang berbeda, dan karakterisasi SLNs dengan berbagai macam pengujian.

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 jenis dan variasi konsentrasi lipid padat (apifil, polawax, canauba wax).

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian ini adalah karakterisasi fisetin yaitu ukuran partikel,

zeta potensial, stabilitas dalam penyimpanan, efisiensi penjerapan dan pengujian aktivitas antioksidan.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat yaitu proses pembuatan nanopartikel dengan metode ultrasonikasi.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Solid lipid nanoparticles fisetin dengan proporsi lipid padat dan variasi konsentrasi yang berbeda (apifil, carnauba wax, polawax).

Ukuran partikel pada SLNs adalah 10-1000 nm. Muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas nanopartikel dipengaruhi oleh ukuran partikel. 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.

Pengujian aktivitas antioksidan digunakan untuk mengetahui absorbansi DPPH yang tersisa setelah ditambahkan senyawa fisetin. Penurunan absorbansi yang terjadi pada DPPH menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan.

Efikasi penjerapan (*entraptment efficiency*) digunakan untuk mengetahui presentasi bahan aktif yang terjebak didalam partikel lipid. Untuk bahan aktif yang bersifat lipofilik biasanya memiliki nilai EE antara 90-98%. Uji stabilitas dilakukan selama 2 minggu untuk mengetahui kestabilan SLNs berupa emulsi yang homogen dan pengujian zeta potensial. Proses pembuatan SLNs fisetin dilakukan dengan metode ultrasonikasi.

C. Bahan dan alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fisetin (Tocris, China), apifil (Gattefosse, France), polawax (PT. Rocchem Jaya Sentosa, Indonesia), carnauba wax, tween 80 (Cipta Kimia, Solo), aquademineralisata (PT. Bratachem, Indonesia).

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat uji ukuran partikel dan potensial zeta seri ZS 100 (Malvern Instrument. Ltd, UK), *sonicator* (Qsonica, Newton, U.S.A), *magnetic stirer*, *hotplate stirer* (Thermo Scientific, China), *sentrifuge* (SPLC Series, Gemmy 8 Hole, Taiwan), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, Jepang), 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 SLNs yang stabil dan homogen yang dapat memuat zat aktif dilihat dari parameter menggunakan spektrofotometri *UV-Vis*. Pembuatan SLNs ini menggunakan metode ultrasonikasi. Percobaan pendahuluan yang pertama dilakukan melakukan skrinning lipid dan variasi konsentrasi yang berbeda untuk mengetahui lipid mana yang bisa digunakan untuk selanjutnya dibuat SLNs.

2. *Screening* lipid fisetin dengan Metode Ultrasonikasi

Tabel 1. *Screening* lipid fisetin.

Formula	Fisetin (g)	Solid Lipid (%)	Tween 80 (%)	Aquades
F1	0,01	2	20	Add 50 ml
F2	0,01	4	20	Add 50 ml
F3	0,01	6	20	Add 50 ml
F4	0,01	2	20	Add 50 ml
F5	0,01	4	20	Add 50 ml
F6	0,01	6	20	Add 50 ml
F7	0,01	2	20	Add 50 ml
F8	0,01	4	20	Add 50 ml
F9	0,01	6	20	Add 50 ml

Keterangan: formula 1 apifil 2%, formula 2 apifil 4%, formula 3 apifil 6%, formula 4 polawax 2%, formula 5 polawax 4%, formula 6 polawax 6%, formula 7 carnauba wax 2%, formula 8 carnauba wax 4%, formula 9 carnauba wax 6%.

Proses skrinning diawali dengan meleburkan lipid padat pada suhu 70 °C yang ditambahkan dengan zat aktif (fisetin) yang sebelumnya sudah dilarutkan dengan etanol 96%, kemudian tuangkan fase air (tween 80) suhu 70 °C tambahkan aquademineralisata sedikit demi sedikit lalu disonikasi selama 5 menit dengan amplitudo sonikasi 35%, dilanjutkan ke tahap pengujian *entraptment efficiency* untuk melihat lipid mana yang paling baik dan bisa digunakan untuk pembuatan SLNs Fisetin dengan menggunakan spektrofotometri *UV-Vis*.

3. Pembuatan Kurva Kalibrasi

3.1. Pembuatan larutan induk. Pembuatan larutan induk fisetin dibuat dengan menimbang seksama sejumlah 5 mg serbuk fisetin murni, di masukan dalam labu takar 100 ml, kemudian ditambahkan etanol pro analisis sampai tanda batas sehingga didapat konsentrasi didapat konsentrasi 50 ppm.

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

3.3. Pembuatan larutan seri kurva kalibrasi. Seri konsentrasi 2 ppm; 4 ppm; 6 ppm; 8 ppm; 12 ppm dan 14 ppm, kemudian masing-masing diencerkan sampai tanda batas dengan etanol pro analisis. Seri larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum fisetin, kemudian dibuat kurva regresi *linear* antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi fisetin sehingga diperoleh persamaan regresi linear yang selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar dan efisiensi penyerapan fisetin.

4. Verifikasi Metode Analisis

4.1. Akurasi. Penentuan akurasi ditetapkan dengan menentukan beberapa persen analit yang ditambahkan yang dapat ditemukan (Harmita 2004). Penetapan proses akurasi menggunakan tiga macam konsentrasi yaitu 80%, 100%, dan 120%. Pertama menimbang fisetin sebanyak 10 mg dalam 100 ml labu volumetrik (untuk 80%, 100% dan 120% *recovery*), kemudian ditambahkan 100 ml etanol dikocok selama 15 menit. Filtrat yang didapatkan diambil sebanyak 6 ml dimasukkan dalam labu ukur kemudian di tambahkan sampai tanda batas

dengan etanol. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Prosedur ini dilakukan selama 3 kali. Nilai recovery yang diperoleh pada rentang % *recovery* berdasarkan Gandjar dan Rohman (2012) yaitu antara 98-102% sehingga metode yang digunakan memiliki akurasi yang baik.

4.2. Presisi. Penentuan presisi ditetapkan dengan pengukuran larutan standar sebanyak 10 ppm, pengukuran dilakukan sebanyak 10 kali pengulangan. Sehingga diperoleh nilai *Relative Standard Deviation* (%RSD) dari beberapa ulangan (Sasongko 2017).

5. Pembuatan SLNs Fisetin

Formula lipid fisetin yang terpilih pada *screening* selanjutnya digunakan untuk membuat fisetin SLNs. Pembuatan fisetin SLNs dibuat dengan cara melelehkan fase lipid padat pada titik lelehnya kemudian tuangkan fase air (tween 80 dan aquademineralisata) dengan suhu yang sama sedikit demi sedikit ke dalam campuran lipid dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 60 menit dengan kecepatan 800 rpm. Fisetin yang sudah dilarutkan kemudian didispersikan pada fase lipid sambil diaduk perlahan pada suhu $<70^{\circ}\text{C}$ agar antioksidan yang terdapat dalam fisetin tidak terdegradasi. Pre-emulsi disonikasi selama 5 menit dengan amplitudo 35%.

6. Karakterisasi SLNs Fisetin

6.1. Penetapan Ukuran Partikel. Pengukuran nanopartikel menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA).

6.2. Uji stabilitas SLNs Fisetin. Uji stabilitas fisetin dilakukan pengamatan secara visual ada tidaknya endapan pada emulsi SLNs fisetin.

6.2.1. Pengamatan secara visual. Formula SLN fisetin yang sudah diketahui menghasilkan ukuran partikel terkecil dan efisiensi penjerapan terbaik di uji stabilitasnya pada suhu kamar selama 2 minggu.

6.3. Pengukuran potensial zeta. Untuk mengetahui nilai potensial zeta setelah penyimpanan diukur menggunakan *zeta potensial analyzer*.

6.4. Entrapment Efficiency (EE). Sampel yang mengandung fisetin diambil sebanyak 200 mg masukkan dalam labu takar 10 ml kemudian tambahkan etanol pro analisis ad 10 ml lalu disentrifugasi selama 45 menit pada kecepatan

4000 rpm, perlakuan ini untuk memisahkan fase lipid dan air. Supernatan yang didapat kemudian diencerkan dengan pelarut organik, lalu disaring menggunakan kertas saring dan kandungan obat ditentukan melalui oleh spektrofotometri UV-VIS (Sethurahman *et al.* 2018). Keberhasilan penjerapan SLN dapat diketahui sebagai berikut:

$$EE = \left(\frac{W_f}{W_t} \right) \times 100\% \dots\dots\dots(9)$$

Keterangan:

Wt : jumlah obat yang ditambahkan dalam sistem

Wf : jumlah bahan obat yang bebas dalam supernatan

7. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.

7.1. Pembuatan larutan DPPH. Sebanyak 16 mg senyawa DPPH ditimbang dan dilarutkan dengan etanol p.a masukkan ke dalam labu takar 100,0 ml ditambahkan sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi larutan DPPH 160 ppm. Larutan ditutup dengan aluminium foil dan tidak boleh terkena cahaya.

7.2. Penentuan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum radikal DDPH dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 400-600 nm.

7.3. Penentuan *operating time*. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk fisetin 1ml ditambahkan dengan larutan induk DPPH 1 ml kemudian ditambah 3 ml etanol p.a pada panjang gelombang maksimum, dibaca mulai dari menit 0 sampai menit 60 didapatkan nilai serapan yang stabil.

7.4. Pengujian peredaman radikal DPPH. Sampel senyawa zat aktif ditimbang sebanyak 0,05g masukkan dalam labu takar 100,0 ml ditambahkan etanol sampai tanda batas, kemudian dibuat beberapa seri konsentrasi 15,56 ppm; 7,78 ppm; 3,89 ppm; 1,95 ppm; dan 0,97 ppm. Setelah itu membuat beberapa seri konsentrasi sampel formula diambil sebanyak 5 ml masukkan dalam labu takar 10 ml kemudian di tambahkan etanol sampai tanda batas untuk membuat larutan stok, dari larutan stok dibuat beberapa seri konsentrasi yaitu 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,125 ppm, dan 1,25 ppm. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimal lalu dihitung %Ihibisinya, kemudian kurva *regresi*

linear antara konsentrasi (ppm) dan %Inhibisi sehingga diperoleh persamaan *regresi linear* lalu dihitung nilai IC₅₀. Persen inhibisi dapat dilihat sebagai berikut:

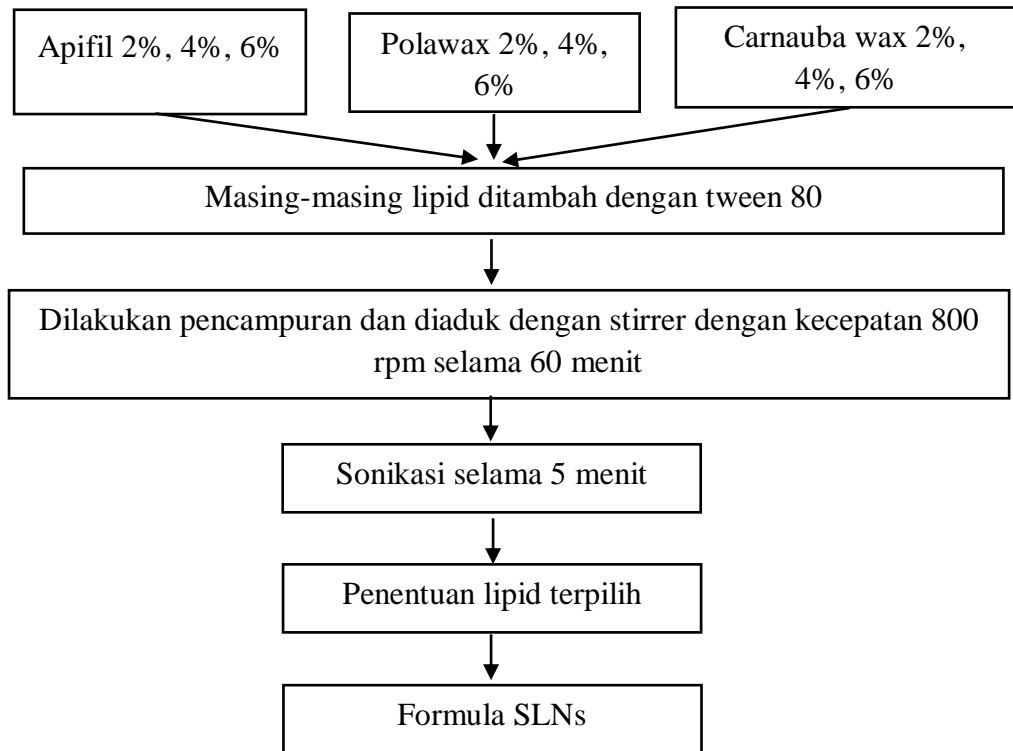
$$\% \text{Inhibisi} = \left(\frac{\text{abs kontrol} - \text{abs sampel}}{\text{abs kontrol}} \right) \times 100\% \dots\dots\dots(10)$$

E. Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan untuk mengetahui suatu data terjadi kesalahan dalam penelitian, atau penyimpangan dari aturan baku yang sudah ditentukan. Analisis hasil suatu pengujian yang mengacu pada parameter dapat dilakukan dengan cara, data yang diperoleh dari penelitian dilakukan analisis dan dilihat kesesuaian dengan persyaratan baku yang telah menjadi ketentuan dari sediaan SLN fisetin, misalnya pengacuan data hasil pengujian dibandingkan dengan referensi teori yang ada. Pembandingan terhadap referensi teori dilakukan untuk menghindari adanya kesalahan dalam penelitian.

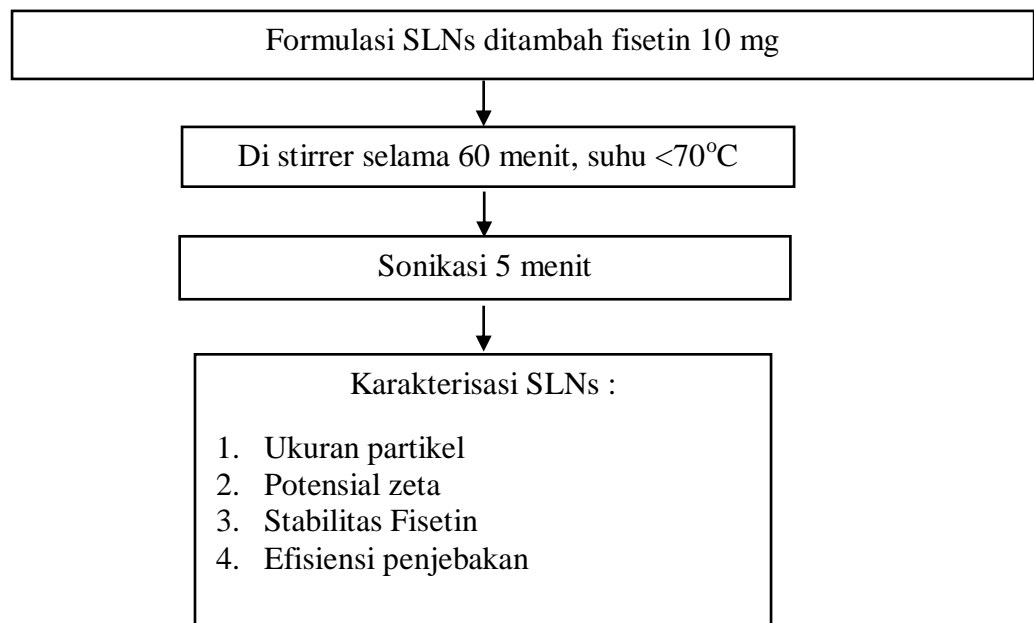
F. Skema Jalannya Penelitian

1. *Screening lipid padat*



Gambar 8. Skema *screening lipid*

2. Pembuatan SLNs fisetin



Gambar 9. Skema pembuatan SLNs