

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

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

*Solid lipid nanoparticles* dibuat menggunakan lipid golongan wax dengan metode ultrasonikasi. Penelitian awal dilakukan terlebih dahulu percobaan pendahuluan yang bertujuan untuk menentukan lipid yang homogen dan terbaik untuk digunakan dalam formula SLNs Fisetin. SLNs Fisetin dibuat dengan melarutkan lipid kemudian dicampurkan dengan surfaktan yang sudah dicampur dengan aquademineralisata. Menurut Cho *et al.* (2008) fisetin mempunyai aktivitas antioksidan yang dapat terdegradasi kurang lebih pada suhu 70°C, sehingga fisetin dicampurkan ke dalam lipid pada saat lipid dan surfaktan tercampur agar tidak merubah aktivitas farmakologi dari fisetin.

Dalam percobaan ini, dilakukan menggunakan tiga lipid yaitu apifil, polawax dan carnauba wax. Lipid yang digunakan untuk formulasi ialah lipid yang homogen ketika ditambah dengan surfaktan, tidak beraglomerasi, dan memiliki bentuk seperti emulsi. Pada percobaan pendahuluan dapat dilihat di lampiran 4 lipid apifil (formula 1, 2 dan 3) membentuk larutan koloid yang homogen dan tidak beraglomerasi. Lipid polawax (formula 3, 4 dan 5) menghasilkan larutan koloid homogen berwarna putih agak kental bahkan sampai memadat seperti lilin dan lipid carnauba wax cenderung memiliki bentuk larutan koloid kental, beraglomerasi dan tidak homogen, sehingga dalam penelitian ini lipid yang digunakan adalah apifil untuk digunakan dalam formula SLNs fisetin. Penggunaan apifil lebih mudah karena titik leleh dari lipid ini bisa digunakan pada suhu antara 60°C - 70°C sehingga tidak akan mempengaruhi aktivitas antioksidan dari fisetin yang dapat terdegradasi pada suhu >70°C. Penggunaan lipid polawax dan carnauba wax cenderung memiliki titik leleh yang tinggi sehingga ketika nanti akan dicampurkan dengan fisetin akan mempengaruhi aktivitas farmakologi dari fisetin.

**Tabel 2. Hasil percobaan pendahuluan**

Formula	Hasil
1	Terbentuk larutan koloid yang homogen
2	Terbentuk larutan koloid agak kental yang homogen
3	Terbentuk larutan koloid kental, warna putih tetapi homogen
4	Agak kental, warna putih cenderung memadat dalam suhu ruang, tetapi reversible dan homogen
5	Kental, warna putih, homogen lama kelamaan memadat pada suhu ruang
6	Homogen, tidak beraglomerasi, bentuknya padat
7	Larutan koloid agak kental tapi homogen
8	Larutan koloid agak kental, beraglomerasi dan memisah
9	Larutan koloid kental, terbentuk aglomerasi sehingga memisah

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%.

### **B. Pembuatan Emulsi *Solid Lipid Nanoparticle* Fisetin**

*Solid lipid nanoparticles* Fisetin telah berhasil dibuat dengan metode ultrasonikasi. Metode ini menggunakan gelombang ultrasonik sehingga dapat menimbulkan efek kavitasi, efek kavitasi dapat memisahkan penggumpalan partikel (*agglomeration*) sehingga dengan adanya penambahan surfaktan terjadi dispesi yang sempurna dan stabil.

**Tabel 3. Formula SLNs 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

Keterangan: \*= formula 1 apifil 2%, formula 2 apifil 4%, formula 3 apifil 6%

Pembuatan emulsi SLNs fisetin dilakukan dengan meleburkan apifil pada suhu 70°C kemudian ditambahkan dengan surfaktan sebagai pengstabil dan penghambat aglomerasi globul lemak terdispersi. Pada penelitian ini menggunakan surfaktan tunggal yaitu tween 80, surfaktan ini merupakan surfaktan yang bersifat nonionik hidrofilik digunakan untuk menstabilkan suspensi dan emulsi.

Leburan lipid ditambahkan dengan fase air berupa tween 80 yang didispersikan dalam aquademineralisata membentuk emulsi minyak dalam air (m/a). Emulsi SLNs ditambahkan dengan fisetin yang sudah dilarutkan dengan etanol 96% kemudian distirer selama 30-45 menit dengan suhu kurang dari 70°C selanjutnya disonikasi selama 5 menit dengan amplitudo 35% untuk memisahkan *agglomerasi* partikel menjadi partikel yang lebih kecil. Emulsi SLNs fisetin yang terbentuk berupa larutan koloid berwarna kuning pucat.

### C. Verifikasi Metode Analisis

#### 1. Pembuatan kurva kalibrasi

**1.1 Penentuan panjang gelombang maksimum.** Panjang gelombang maksimum dari serbuk fisetin dilakukan dengan *scanning* larutan fisetin dengan konsentrasi 46 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum diperoleh pada panjang gelombang 364 nm dengan serapan sebesar 0,3545. Data dapat dilihat pada lampiran 5a.

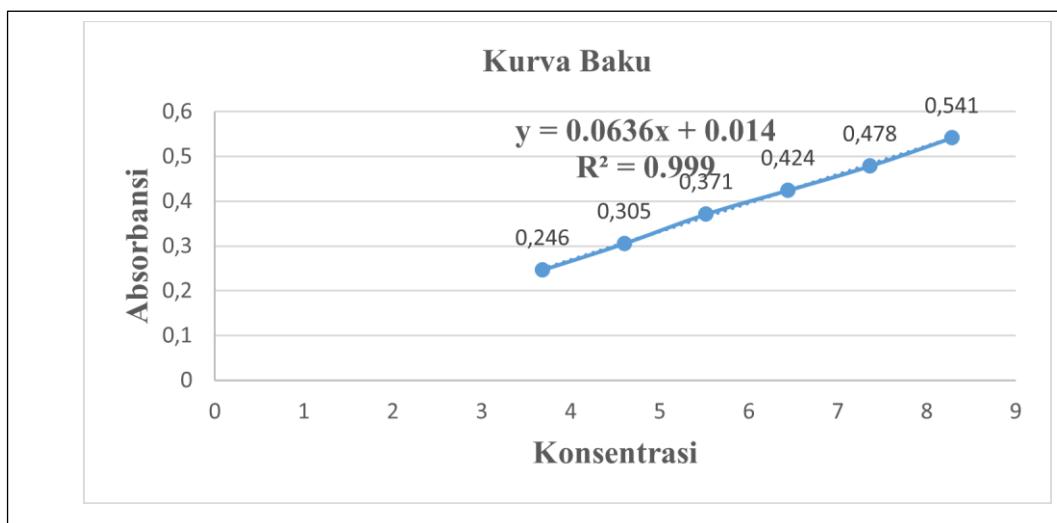
**1.2 Penentuan *operating time*.** Penentuan *operating time* bertujuan untuk melihat kestabilan reaksi suatu senyawa yang dianalisis. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk fisetin pada panjang gelombang maksimum fisetin, dibaca mulai dari menit 0 sampai menit didapatkan nilai serapan yang stabil. Pada lampiran 5b, didapatkan serapan yang stabil pada menit ke-10 sampai menit ke-13.

**1.3 Kurva kalibrasi.** Kurva kalibrasi fisetin dibuat dengan konsentrasi 3,68 ppm; 4,6 ppm; 5,52 ppm; 6,44 ppm; 7,36 ppm dan 8,28 ppm. Seri konsentrasi 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*. Hasil persamaan yang diperoleh yaitu dengan koefisien korelasi sebesar 0,9995. Hasil penentuan kurva baku dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil penentuan kurva baku fisetin**

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
3,68	0,246
4,6	0,305
5,52	0,371
6,44	0,424
7,36	0,478
8,28	0,541

Hubungan antara konsentrasi (ppm) dengan absorbansi fisetin dapat dilihat pada gambar :

**Gambar 10. Grafik hubungan antara konsentrasi fisetin dengan absorbansi**

**1.4 Verifikasi metode analisis.** Verifikasi metode analisis yang dilakukan yaitu penentuan linieritas, akurasi dan presisi. Hasil verifikasi metode analisis ditunjukkan pada Tabel 5.

**Tabel 5. Parameter verifikasi metode analisis kurva kalibrasi fisetin**

Parameter	Hasil

R2 (koefisien determinasi)	0,999
Akurasi	99,2 – 100,1%
Presisi	1%

Hasil verifikasi metode analisis menunjukkan nilai akurasi yang didapat adalah antara 99,2 – 100,1%, hal ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki tingkat akurasi yang baik. Penetapan proses akurasi peneliti menggunakan tiga macam konsentrasi yaitu 80%, 100% dan 120%, menurut Gandjar dan Rohman (2007) rentang nilai % recovery yaitu antara 98-102% sehingga dapat disimpulkan metode yang digunakan memiliki tingkat akurasi yang baik. Menurut Harmita (2004) Persen akurasi ditetapkan dengan menentukan beberapa persen analit yang ditambahkan yang dapat ditemukan.

Hasil perhitungan nilai RSD untuk verifikasi metode analisis adalah 0,56%, ini menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan memiliki presisi yang baik karena persyaratan presisi yang baik menurut Harvey (2000) adalah  $\leq 2\%$ . Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relative (RSD) (Gandjar & Rohman 2007).

#### **D. Karakterisasi *Solid lipid nanoparticle* Fisetin**

##### **1. Ukuran Partikel.**

Karakterisasi sistem nanopartikel yang paling penting adalah ukuran partikel, dalam penelitian ini alat yang digunakan untuk mengetahui ukuran partikel adalah PSA (*Particel Size Analyzer*). Hasil pengukuran partikel SLNs fisetin terlihat pada range ukuran nanopartikel yaitu 50-1000 nm. Perbedaan konsentrasi lipid dari SLNs menghasilkan ukuran partikel yang berbeda. Ukuran partikel yang didapat pada formula dengan konsentrasi 2% lebih kecil dibanding dengan konsentrasi 4% dan 6%, konsentrasi 4% memberikan hasil ukuran partikel lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi 2% dan 6%. Ukuran partikel SLNs yang kecil, menyebabkan kontak antara bahan obat dan membran lebih besar sehingga penetrasi lebih cepat (Annisa 2016).

Keseragaman ukuran partikel dapat diketahui pada nilai indeks polidispersitas. Nilai indeks polidispersitas yang dihasilkan berbeda-beda tiap konsentrasi, semakin rendah nilai PI semakin pada formula 1 (apifil 2%) nilai PI adalah 0,698, formula 2 (Apifil 4%) nilai PI adalah 1, formula 3 (Apifil 6%) nilai PI adalah 0,562. Pada tabel 6 terlihat hasil PI tersebut menunjukkan bahwa hanya formula 3 yang merupakan dispersi koloid yang cukup homogen karena nilai tersebut mendekati nilai 0.

**Tabel 6. Hasil pengukuran ukuran partikel**

Sampel	Ukuran Partikel (nm) $\pm$ SD	PI
F1	104,67 $\pm$ 1,53	0,698
F2	333,67 $\pm$ 11,06	1
F3	309,33 $\pm$ 4,04	0,562

Keterangan: \*= formula 1 apifil 2%, formula 2 4%, formula 3 6%

## 2. Efisiensi penjerapan

Pengukuran persen efisiensi penjerapan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Efisiensi penjerapan digunakan untuk mengetahui seberapa besar presentase zat aktif yang terjerap dalam sistem SLN (Annisa 2016). Dilihat pada tabel 7 hasil persentase penjerapan fisetin terhadap lipid apifil tidak terlalu tinggi (>40%). Menurut Annisa *et al.* (2016) semakin besar jumlah senyawa aktif yang terjebak dalam lipid (pembawa), semakin cepat penetrasinya karena semakin besar gradien konsentrasi yang mendorong terjadinya proses difusi pasif dalam penetrasi. Pada formula 3 (Apifil 6%) memiliki nilai EE lebih besar daripada formula 1 dan 2, hal ini mungkin dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu kelarutan obat dalam lemak yang dilelehkan, ketercampuran (*misibilitas*) obat cair dalam lemak cair, dan struktur fisik dan kimia matriks lemak padat (Uner & Yener 2007).

**Tabel 7. Hasil efisiensi penjerapan**

Formula	Efisiensi Penjerapan (%)
1	46,1
2	45,8
3	58,4

Keterangan: \*= formula 1 apifil 2%, formula 2 4%, formula 3 6%

Hasil nilai efisiensi penjerapan untuk formula 1 (Apifil 2%) 46,1%, formula 2 (Apifil 4%) 45,8% dan formula 3 (Apifil 6%) 58,4%. Hasil efisiensi penjerapan formula dengan lipid lebih banyak menghasilkan efisiensi penjerapan yang lebih baik. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa lipid apifil dapat menjerap fisetin tidak lebih dari 60% pada konsentrasi tertinggi yaitu 6%, hal ini dikarenakan konsentrasi lipid yang digunakan akan mempengaruhi efisiensi penjerapan senyawa obat. Semakin rendah konsentrasi lipid yang digunakan maka kemampuan untuk pemuatan senyawa obat akan lebih kecil (Jafar *et al.* 2015).

### 3. Uji stabilitas SLNs fisetin

**3.1 Pengamatan secara visual.** Formula SLNs fisetin hanya menggunakan satu konsentrasi yaitu formula 3 (Apifil 6%), hal ini dikarenakan hasil ukuran partikel dan efisiensi penjerapan dari lipid yang paling baik adalah formula 3 dibandingkan formula 1 dan 2. Pengamatan secara visual yang disimpan pada suhu ruang dalam waktu kurun 14 hari formula 3 pada minggu pertama tidak terjadinya pemisahan, tetapi pada minggu kedua dilihat pada lampiran 10b sedikit terlihat adanya pemisahan, namun bersifat *reversible*. Hal ini terjadi dikarenakan kenaikan suhu akan meningkatkan energi kinetis dari tetesan-tetesan, sehingga memudahkan terjadinya aglomerasi, suhu penyimpanan yang tidak sesuai menyebabkan rusaknya gerak brown. Gerak brown adalah gerak tidak beraturan atau gerak acak atau zig-zag partikel koloid, dengan adanya gerak brown ini maka partikel koloid terhindar dari pengendapan karena terus-menerus bergerak (Wanibesak 2011).

**3.2 Zeta potensial.** Pengujian zeta potensial digunakan untuk mengetahui karakterisasi sifat muatan permukaan yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Interaksi elektrostatik antara partikel ini yang akan menentukan agregasi dan fenomena tolak menolak dari partikel, jadi semakin bagus nilai zeta potensial yang didapat maka larutan tersebut semakin stabil. Nilai zeta potensial dikatakan baik jika nilai lebih besar dari  $\pm 30\text{mV}$  memiliki derajat stabilitas tinggi (Bagul *et al.* 2018). Hasil pengukuran potensial zeta pada formula 3 selama 2 minggu adalah  $-20,52\text{ mV}$ , dapat disimpulkan bahwa zeta potensial

dari formula 3 sangat rendah. Dispersi dengan nilai zeta potensial sangat rendah akan menghasilkan agregat karena adanya atraksi *Van Der Waals* antar-partikel.

### **E. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.**

#### **1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Penentuan panjang gelombang maksimum DDPH dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri berdasarkan nilai absorbansi dari jumlah radikal DPPH yang diukur panjang  $\lambda$ maks dari DPPH adalah 516 nm dengan serapan sebesar 0,9096. Data dapat dilihat pada lampiran 12a.

#### **2. Penentuan *Operating Time***

Penentuan *operating time* dari DPPH dilihat pada lampiran 12b didapatkan serapan yang stabil pada menit ke-15 sampai menit ke-33.

#### **3. Pengujian peredaman radikal DPPH**

Hasil pengukuran absorbansi DPPH aktivitas antioksidan fisetin pada menit ke-15 dengan adanya penambahan larutan uji dengan konsentrasi 0,97 ppm; 1,95 ppm; 3,89 ppm; 7,78 ppm dan 15,56 ppm. Menurut Molyneux (2004) adanya antioksidan dalam senyawa fisetin akan menetralisasi radikal DPPH dengan mendonorkan elektron pada DPPH sehingga menghasilkan perubahan warna dari ungu menjadi kekuningan.

**Tabel 8. Hasil seri konsentrasi zat aktif (fisetin)**

Konsentrasi (ppm)	%Inhibisi			Rata-rata $IC_{50}$
	1	2	3	
15,56	76,7	75,7	75,4	
7,78	55,5	54,3	54	
3,89	44,3	44	43,8	
1,95	39	38,8	38,5	
0,97	36,5	36,5	35,4	
<b><math>IC_{50}</math> (ppm)</b>	<b>5,895</b>	<b>6,087</b>	<b>6,240</b>	<b>6,074</b>

**Tabel 9. Hasil seri konsentrasi sampel formula**

Konsentrasi (ppm)	%Inhibisi			Rata-rata $IC_{50}$
	1	2	3	
25	44	44,9	44,5	
12,5	24	23,6	23,3	
6,25	12,5	12,8	13	
3,125	9,2	9,1	8,9	
1,25	6,3	6	5,6	
<b><math>IC_{50}</math> (ppm)</b>	<b>28,730</b>	<b>28,231</b>	<b>28,483</b>	<b>28,482</b>

Pengujian antioksidan metode DPPH dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 516 nm untuk mengetahui absorbansi DPPH yang tersisa setelah ditambahkan senyawa fisetin. Penurunan absorbansi yang terjadi pada DPPH menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan. Pengukuran absorbansi DPPH menggunakan etanol pro analisa. Dari tabel di atas, baik senyawa aktif maupun formula terjadi penurunan absorbansi DPPH, nilai absorbansi yang didapat dihitung persentase penghambatan radikal DPPH (% Inhibisi) kemudian diperoleh kurva regresi *linear* dengan konsentrasi sebagai sumbu x dan %inhibisi sebagai sumbu y. Penentuan nilai IC<sub>50</sub> dapat dihitung dengan cara menggunakan persamaan regresi *linear* yang sudah diperoleh dengan mengganti nilai y dengan 50. Menurut Molyneux (2004) nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan konsentrasi substrat yang menyebabkan hilangnya aktivitas antioksidan sebesar 50%, nilai IC<sub>50</sub> berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan, semakin tinggi aktivitas antioksidannya, maka nilai IC<sub>50</sub> semakin rendah.

Hasil penentuan IC<sub>50</sub> dari senyawa fisetin dengan sampel formula masing-masing adalah 6,074 ppm dan 28,482 ppm dapat dilihat pada lampiran 12d. Hal ini dapat disimpulkan bahwa senyawa zat aktif fisetin dan sampel formula masuk dalam kategori sangat kuat (<50 ppm). Dalam penelitian terlihat aktivitas antioksidan antara fisetin bebas dengan emulsi SLNs fisetin sangat jauh, fisetin bebas memiliki nilai aktivitas antioksidan lebih kecil dibandingkan dengan sampel formula. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> suatu senyawa maka semakin kuat pula aktivitas antioksidan tersebut karena dengan konsentrasi kecil dapat memberikan efek yang baik. Berdasarkan pengujian statistik *t-test* menggunakan *software* SPSS dilihat pada lampiran 12f, hasil *sig.2 (tailed)* dari SLNs  $0,000 < 0,05$  ini berarti fisetin terdapat perbedaan bermakna antara formula 3 dengan senyawa aktif fisetin.