

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Percobaan Pendahuluan

Pembuatan fitosom alfa mangostin dilakukan dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi sehingga di dapatkan sediaan fitosom yang homogen, dengan ukuran partikel yang masih dalam ukuran nanometer yaitu 50-500 nm (Tripathy *et al.* 2013). Pada awal penelitian dilakukan percobaan pendahuluan yang bertujuan untuk mengetahui kondisi percobaan dan metode yang terbaik yang dapat menghasilkan fitosom yang stabil dan homogen.

Proses pembuatan fitosom adalah dengan melarutkan alfa mangostin dan fosfatidilkolin dalam etanol, kolesterol dalam kloroform. Keduanya dicampur dengan *magnetic stirrer*. Kemudian pelarut diuapkan dengan *rotary evaporation* hingga terbentuk lapisan tipis dan di hidrasi dengan PBS (*Phosphat buffer saline*). Untuk memperkecil ukuran partikel digunakan sonikator *probe*.

Fitosom dibuat 5 formula dengan perbandingan mol. Fosfatidilkolin berfungsi sebagai senyawa biofungsional, yang memiliki kelarutan ganda bertindak sebagai pengemulsi senyawa aktif alfa mangostin sehingga terbentuk fitosom yang memberikan stabilitas dan penyerapan yang lebih baik (Kulkarni *et al.* 2011). Penambahan kolesterol dalam formula dapat meningkatkan stabilitas fitosom karena adanya interaksi antara kolesterol dan fosfatidilkolin yang menyebabkan struktur fitosom menjadi lebih *rigid*.

Hidrasi dilakukan untuk mengembangkan vesikel dan mengoptimalkan penyerapan obat. Hidrasi dilakukan dengan menggunakan fase air yaitu larutan PBS pH 7,4 yang dapat melarutkan obat. Proses hidrasi menyebabkan fosfatidilkolin terdispersi pada larutan PBS yang menghasilkan fitosom yang heterogen, untuk membentuk vesikel unilamellar kecil maka perlu teknik baru yaitu dengan sonikasi (Picard *et al.* 1999)

B. Pembuatan Formula Fitosom

Fitosom alfa mangostin dibuat variasi konsentrasi dengan 5 formula.

Tabel 2. Formula Fitosom Alfa Mangostin

Komposisi	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
Alfa mangostin(mg)	98	98	98	98	98
Fosfatidilkolin(mg)	184	367	550	733	917
Kolesterol (mg)	18,5	18,5	18,5	18,5	18,5
Etanol 96 % (ml)	5	5	5	5	5
Kloroform	5	5	5	5	5
Larutan PBS ad (ml)	30	30	30	30	30

Keterangan:

Formula 1 menggunakan perbandingan mol Alfa Mangostin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:1:0,2)

Formula 2 menggunakan perbandingan mol Alfa Mangostin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:2:0,2)

Formula 3 menggunakan perbandingan mol Alfa Mangostin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:3:0,2)

Formula 4 menggunakan perbandingan mol Alfa Mangostin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:4:0,2)

Formula 5 menggunakan perbandingan mol Alfa Mangostin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:5:0,2)

Fitosom alfa mangostin dibuat dengan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi. Metode ini dilakukan dengan cara alfa mangostin dan fosfatidilkolin masing-masing dilarutkan dalam pelarut etanol, kolesterol dilarutkan dalam kloroform. Campuran alfa mangostin, fosfatidilkolin dan kolesterol dicampur dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit dengan kecepatan 2000 rpm dan suhu 45°C. *Magnetic stirrer* dilengkapi dengan lempeng pemanas (*hot plate*) sehingga proses untuk mempercepat pelarutan atau pencampuran dapat dilakukan dengan dua mekanisme sekaligus yaitu pengadukan dan pemanasan sehingga dinilai efektif menghomogenkan sampel (Faisal *et al.* 2013).

Setelah masing-masing bahan dalam keadaan terlarut, semua bahan dimasukkan ke dalam labu alas bulat untuk menguapkan pelarut dengan *rotary evaporation* suhu 60°C pada kecepatan 50 rpm, hingga terbentuk lapisan tipis kering. Pada formula 1 lapisan tipis kering terbentuk gelembung, hal ini akan dapat mempengaruhi efisiensi penjerapan fitosom. Kemudian lapisan tipis kering dihidrasi dengan larutan PBS pH 7,4 sebanyak 30 ml. Fitosom yang sudah jadi dilakukan sonikasi dengan menggunakan sonikator *probe* selama 5 menit yang

berfungsi untuk menghomogenkan dan memperkecil ukuran partikel agar masuk dalam *range* nanometer.

C. Karakterisasi Fitosom Alfa Mangostin

1. Penetapan ukuran partikel

Ukuran partikel dan zeta potensial fitosom alfa mangostin diukur dengan menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*). Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat dan stabilitas nanopartikel (Singh *et al.* 2009). Partikel yang berukuran kecil memiliki luas permukaan yang lebih besar, dimana akan mengakibatkan pelepasan zat aktif yang lebih cepat.

Tabel 3. Penetapan ukuran partikel fitosom alfa mangostin

	Replikasi	Z-ave psa (nm)	Rata-rata	Sd	Pdi
Formula 1	1	154,6			0,376
	2	151,7	152,567	1,767	0,348
	3	151,4			0,353
Formula 2	1	144,2			0,356
	2	153,4	148,867	4,601	0,272
	3	149			0,365
Formula 3	1	167,8			0,348
	2	164,1	170,033	7,310	0,367
	3	178,2			0,286
Formula 4	1	170,3			0,328
	2	166,5	167,800	2,166	0,357
	3	166,6			0,347
Formula 5	1	187,2			0,416
	2	182,5	183,700	3,081	0,555
	3	181,4			0,59

Hasil pengukuran partikel fitosom alfa mangostin pada semua formula 1 hingga formula 5 menunjukkan hasil dalam ukuran nanopartikel yaitu rentang 10-500 nm Berdasarkan tabel, ukuran rata-rata diameter partikel nano fitosom alfa mangostin pada rentang 148,9-183,70 nm. Formula 2 menunjukkan hasil rata-rata terbaik yaitu 148,9, dengan nilai indeks polidispersitas 0,331. Dilihat dari hasil peak (Lampiran) formula 2 menunjukkan kualitas : *good*, yang artinya indeks polidispersitas pada 3 kali replikasi kecil atau hampir sama.

Keseragaman ukuran partikel suatu sampel dapat diketahui dengan indeks polidispersitas. Nilai indeks polidispersitas terbaik yaitu pada angka dibawah 0,5 atau sekecil mungkin untuk menjamin homogenitas sediaan. Semakin nilai indeks polidispersitas semakin kecil maka stabilitas fitosom terjamin. Pada tabel terlihat nilai indeks polidispersitas yang dihasilkan dibawah 0,5 kecuali formula 5 terdapat nilai lebih dari 0,5 pada pengukuran replikasi ke 2 dan 3 yaitu 0,555 dan 0,59. Nilai indeks polidispersitas yang semakin kecil maka dikatakan sediaan memiliki ukuran yang homogen dengan partikel lainnya, hal ini menunjukan bahwa fitosom alfa mangostin homogen.

Berdasarkan hasil evaluasi ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel, fitosom yang dibuat memenuhi kriteria inklusi yang ditetapkan yaitu ukuran partikel ≤ 200 nm dengan indeks polidispersitas 0-0,5. Oleh karena itu, dapat dilakukan evaluasi efisiensi penjerapan untuk formula yang dibuat.

2. Penetapan potensial zeta

Tabel 4. Penetapan potensial zeta fitosom alfa mangostin

Formula	Replikasi	Potensial Zeta
	1	-3,33
2	2	-3,71
	3	-3,06

Potensial zeta adalah ukuran umum dari besarnya muatan elektrostatik partikel dalam dispersi, dan sangat sesuai dalam studi stabilitas suspensi nanopartikel. Nilai potensial zeta di atas (+)30mV atau dibawah (-)30mV menunjukkan sistem koloid yang stabil karena besarnya muatan partikel dapat mencegah agregasi partikel berdasarkan pada gaya tolak menolak elektrostatik.

Sampel yang diuji potensial zeta yaitu formula 2, hasil potensial zeta yaitu -3,366. Muatan (-) atau negatif menunjukkan terjadi tolak-menolak antar partikel sehingga tidak cepat terjadi aglomerasi menjadi partikel yang lebih besar.

D. Efisiensi Penjerapan

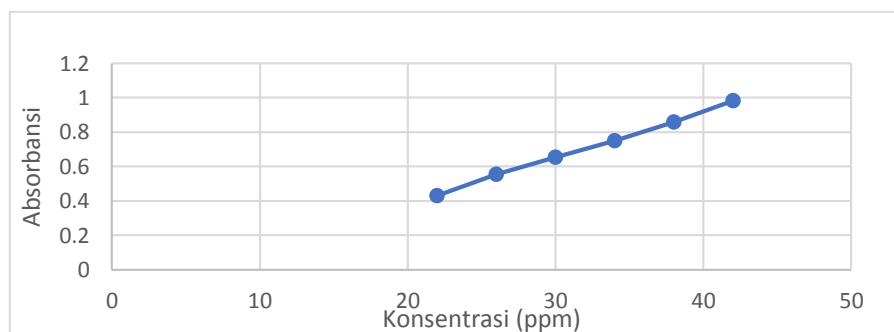
1. Penentuan kurva kalibrasi

1.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum dimaksudkan untuk mendapatkan nilai absorbansi yang memberikan sensitivitas pengukuran tertinggi (Kusumawardhani *et al.* 2015). Hasil penentuan panjang gelombang maksimum pada medium dapar fosfat pH 7,4 yaitu 326 nm. Panjang gelombang teoritis dari alfa mangostin yaitu sebesar 316 nm. Perubahan panjang gelombang maksimum alfa mangostin disebabkan karena adanya gugus auksokrom pada alfa mangostin yang terikat pada gugus kromofor sehingga mengakibatkan pergeseran pita absorbansi menjadi lebih besar (Tulandi *et al.* 2015).

1.2 Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu stabil suatu senyawa yang akan dianalisis. Larutan yang stabil ditunjukkan dengan serapan yang tidak berubah pada waktu tertentu. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk alfa mengostin pada panjang gelombang maksimum alfa mangostin mulai menit ke 0-30. Hasil serapan stabil pada medium dapar fosfat pH 7,4 pada menit ke-18.

1.3 Kurva Kalibrasi. Kurva kalibrasi alfa mangostin dengan medium dapar fosfat pH 7,4 dilakukan dengan membuat konsentrasi 22 ppm, 26 ppm, 30 ppm, 34 ppm, 38 ppm, dan 42 ppm. Hasil persamaan regresi linier dengan pelarut dapar fosfat pH 7,4 yang diperoleh yaitu $y = 0,02690x - 0,156470$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,9991. Hasil koefisien korelasi mendekati +1 sehingga pasangan data variabel x dan y memiliki korelasi linier positif (Utama 2016).



Tabel 5. Efisiensi penjerapan dan jumlah obat yang terjerap

Formula	Absorbansi	Efisiensi penjerapan
1	0,533	97,43%
2	0,480	97,63%
3	0,681	96,887%
4	0,826	96,348%
5	0,813	96,396%

Efisiensi penjerapan untuk mengetahui % obat yang terjerap dalam pembawa fitosom. Obat yang tidak terjerap dapat dihilangkan atau dipisahkan dengan berbagai teknik, salah satunya sentrifugasi. Fitosom disentrifugasi dan supernatan dipisahkan. Pellet yang diperoleh dicuci kemudian disuspensikan kembali untuk mendapatkan fitosom yang bebas dari obat terjerap. Efisiensi penjerap vesikel ditentukan dengan memisahkan obat bebas dari vesikel penjerap obat dengan menggunakan teknik ultrasentrifugasi. Fitosom disentrifugasi selama 50 menit pada 5.000 rpm dan suhu 4⁰ C dengan tujuan untuk memisahkan obat yang tidak terjerap. Supernatan hasil sentrifugasi ditetapkan kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Pham *et al.* 2012). Absorbansi pada spektrofotometer dimasukkan pada rumus.

Dari kelima formula didapatkan rata-rata untuk nilai efisiensi penjerap yaitu sekitar 96,34-97,43%. Dari kelima formula, formula 1 dan 2 menunjukkan hasil efisiensi penjerap yang lebih tinggi yaitu 97,43% dan 97,63%. Untuk formula 1 jumlah zat yang terjerap yaitu 97,43 mg dari total 100 mg. Formula 2 jumlah zat yang terjerap 97,63 mg dari total jumlah zat alfa mangostin 100 mg. Efisiensi penjerapan formula 1 lebih kecil dari formula 2, karena formula 1 pada proses penguapan pelarut terbentuk lapisan tipis namun terdapat gelembung, hal ini berpengaruh pada nilai efisiensi penjerapan yang dihasilkan. Semakin tinggi efisiensi penjerapan maka efek yang ditimbulkan dan kadar obat yang didapatkan semakin tinggi. Untuk hasil efisiensi penjerap lebih rendah yaitu formula 4 dan 5, beraglomerasi lebih cepat sehingga berpengaruh pada stabilitas sediaan menyebabkan efisiensi penjerapan lebih rendah.

E. Stabilitas Fitosom Alfa Mangostin Dalam Penyimpanan

1. Pengamatan secara visual

Pengujian stabilitas dilakukan dengan cara menyimpan semua formula fitosom pada suhu kamar selama 21 hari. Penyimpanan di suhu kamar dimaksudkan merupakan penyimpanan yang cocok dan terbaik untuk alfa mangostin. Penyimpanan pada suhu kamar dilakukan untuk menjamin kestabilan fitosom alfa mangostin.

Tabel 6. Stabilitas fitosom alfa mangostin pada suhu kamar

Formula	Minggu ke 1	Minggu ke 2	Minggu ke 3
1	-	+	+
2	-	+	+
3	-	+	+
4	-	+	+
5	+	+	+

Ket. Negatif (-) tidak ada endapan, positif (+) ada endapan.

Fitosom alfa mangostin untuk semua formula disimpan pada suhu kamar selama 21 hari. Pada minggu ke-1 fitosom alfa mangostin yang disimpan dalam suhu kamar tidak timbul endapan, kecuali formula ke-5. Pada minggu ke-2, kelima formula timbul endapan dalam jumlah sedikit. Hal ini karena kenaikan suhu akan meningkatkan energi kinetis dari partikel-partikel, sehingga memudahkan penggabungan antar partikel, suhu penyimpanan yang tidak sesuai menyebabkan rusaknya gerak *brown*. Pada pengamatan fisik setelah minggu ke-2 teramat gumpalan kolesterol yang tidak terdispersi homogen. Hal ini disebabkan karena kelarutan kolesterol yang rendah dalam media dan kolesterol tidak mampu membentuk struktur vesikel seperti fosfolipid (Liang *et al.* 2004).

2. Penetapan ukuran partikel dan zeta potensial setelah penyimpanan

Uji stabilitas dilakukan pada formula yang terpilih yaitu formula 2, yang memiliki ukuran partikel terkecil diantara semua formula serta kriteria lain yaitu nilai efisiensi penyerapan. Uji stabilitas ini dilakukan 21 hari setelah penyimpanan

pada suhu kamar. Uji stabilitas yang dilakukan meliputi uji ukuran partikel, indeks polidispersitas dan zeta potensial.

Tabel 7. Ukuran partikel dan zeta potensial setelah penyimpanan

Formula	Ukuran partikel (nm)	Indeks polidispersitas	Zeta potensial (mV)
2	141,3	0,257	-2,173

Uji stabilitas setelah penyimpanan dilakukan pada formula 2 dengan ukuran partikel rata-rata 141,3 nm dan indeks polidispersitas sebesar 0,257, nilai zeta potensial -2,173 mV. Hasil ukuran partikel formula 2 masih dalam ukuran nanometer, hasil setelah 21 hari penyimpanan ukuran partikel tidak berbeda signifikan dibandingkan pengukuran sebelum penyimpanan.

F. Verifikasi Metode Analisis

1. Linearitas

Linieritas merupakan kemampuan metode analisis yang memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel Menurut Harmita (2004) sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $Y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Hasil nilai koefisien korelasi sampel alfa mangostin pada medium dapar fosfat pH 7,4 yaitu 0,9991 menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proporsional antara respon analitik dengan konsentrasi yang diukur karena nilai koefisien korelasi $\leq 0,99$ mendekati 1.

2. Penentuan LOD dan LOQ

Tabel 8. batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)

Parameter	Hasil
Batas deteksi (LOD) medium dapar fosfat pH 7,4	1,1393 ppm
Batas kuantifikasi (LOQ) medium dapar fosfat pH 7,4	3,4524 ppm

Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa keberadaan alfa mangostin dalam medium dapar fosfat pH 7,4 dapat dideteksi apabila kadar yang terkandung lebih dari atau sama dengan 1,1393 ppm, jumlah tersebut merupakan

jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibandingan dengan blangko. Batas kuantitasi atau LOQ menunjukkan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria cermat dan seksama yaitu pada konsentrasi alfa mangostin terendah dalam dapar fosfat pH 7,4 sebesar 3,4524 ppm.

3. Akurasi

Pengujian akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya. Metode simulasi, sejumlah alalit bahan murni ditambahkan kedalam campuran bahan permbawa lalu dianalisis dan dibandingkan dengan hasil sebenarnya. Larutan alfa mangostin dengan konsentrasi 22 ppm, 30 ppm dan 34 dinyatakan sebagai persen perolehan kembali. Dari data yang dapat dilihat pada lampiran, selisih kadar pada tiga kali penentuan yaitu 1%, hal ini dapat masuk dalam kriteria cermat karena parameter untuk akurasi selisih kadar pada berbagai peneetuan harus kurang dari 5%. Untuk hasil rentang kesalahan kosnentrasi analit yaitu 100%, masuk dalam kriteria rata-rata perolehan 98-102%.

4. Presisi

Presisi atau keseksamaan dikukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif. Metode pengujian presksi dilakukan pembacaan atau replikasi 10 kali terhadap sampel 30 ppm. Diperoleh nilai simpangan baku relatif pada sampel alfa mangostin yaitu 1 %, hal ini memenuhi kriteria presisi atau keseksamaan dengan nilai simpangan baku relatif kurang atau sama dengan 2%.