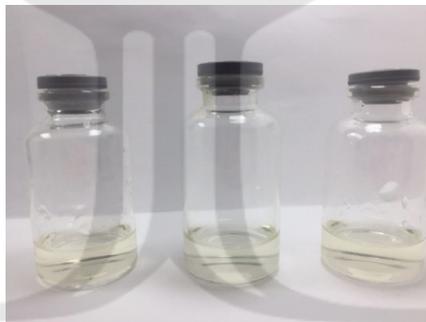


BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Nanosuspensi

Penelitian ini membuat sediaan nanosuspensi ekstrak *Pueraria mirifica* menggunakan teknik ultrasonikasi. Metode yang digunakan adalah metode gelasi ionik. Prinsip dari metode ini adalah terbentuknya ikatan sambung silang yang rigid antara polielektrolit dan ion multivalen (Park and Yeo, 2007). Polielektrolit yang dimaksud yaitu natrium alginat sedangkan ion multivalennya adalah kalsium klorida. Keduanya dapat berikatan dikarenakan perbedaan muatan yang dimiliki oleh masing-masing senyawa. Ikatan sambung silang ini bersifat rigid dan akan menjerap ekstrak *Pueraria mirifica* didalamnya (Sun et al., 2013). Ikatan ini membentuk suatu padatan halus berukuran nanometer yang disebut nanosuspensi (Khakim dan Atun, 2017). Nanosuspensi yang dihasilkan memiliki ukuran molekul yang kecil, hidrofilik dan bersifat polar. Kelebihan inilah yang dapat meningkatkan penetrasi obat melalui jalur paraseluler (Deferme, 2008).



(a1) (a2) (a3)

Gambar 4.1 Hasil preparasi nanosuspensi ekstrak pueraria mirifica 0,2% secara berturut turut a1, a2 dan a3 dengan variasi waktu homogenisasi adalah 2;4 dan 6 menit.

Ekstrak *Pueraria mirifica* merupakan ekstrak yang memiliki sifat polar. Proses preparasi diawali dengan melarutkan ekstrak *Pueraria mirifica* ke dalam larutan natrium alginat yang menggunakan pelarut air (Tyagi et al., 2017). Kemudian larutan ekstrak *Pueraria mirifica*-natrium alginat diteteskan dengan teknik *drop by drop* ke dalam larutan kalsium klorida yang menggunakan pelarut air. Pada tahap ini natrium alginat yang bermuatan negatif akan berikatan dengan

kalsium klorida yang bermuatan positif. Ikatan tersebut akan menjerap ekstrak pueraria mirifica di dalamnya membentuk ikatan sambung silang yang tidak mudah lepas (Mandal et al., 2010).

4.2 Karakterisasi Nanosuspensi

Sistem nanopartikel memiliki karakteristik tersendiri. Karakteristik merupakan ciri khas dari sediaan yang telah dibuat. Terdapat beberapa karakteristik yang perlu ditinjau untuk memastikan bahwa sediaan yang telah dibuat termasuk dalam sistem nanopartikel. Karakteristik tersebut meliputi uji organoleptis, distribusi dan ukuran partikel, zeta potensial, morfologi serta uji stabilitas.

4.2.1 Uji Organoleptis

Ukuran dari sistem nanopartikel dapat dikarakterisasi secara visual menghasilkan dispersi yang relatif transparan (Martien et al., 2012). Ukuran partikel berskala nanometer akan menghasilkan larutan yang jernih dan transparan karena partikel di dalam sediaan tidak dapat terlihat secara kasat mata (Perdana, 2007). Pengujian organoleptis pada penelitian ini membutuhkan 20 responden untuk menilai bau, warna dan tekstur dari ketiga sediaan yang telah dibuat. Penilaian menggunakan skala 0 hingga 2. Angka 0 memiliki makna keruh, bau menyengat dan tekstur lengket. Sedangkan angka 2 memiliki makna jernih, bau tidak menyengat dan tekstur tidak lengket. Data hasil pengujian oleh 20 responden telah terlampir pada lampiran 5. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa sediaan yang paling baik ditinjau dari warna, bau dan tekstur adalah sediaan nanosuspensi dengan waktu homogenisasi 2 menit.

4.2.2 Distribusi dan Ukuran Partikel

Penentuan ukuran dan distribusi ukuran nanopartikel merupakan komponen yang penting dari suatu sistem nanopartikel karena dapat mempengaruhi sifat dari nanopartikel (Mohanraj dan Chen, 2006). Karakteristik ini dapat diukur menggunakan instrumen *Particle Size Analyzer* (PSA).

Data hasil karakterisasi rata-rata ukuran partikel dari sediaan yang telah dibuat ditunjukkan pada **tabel 4.1**. Dapat disimpulkan bahwa ketiga sediaan yang dibuat sudah dapat dikatakan sediaan nanopartikel karena memiliki ukuran yang

masuk dalam range suatu sistem nanopartikel yaitu 1-1000 nm (Rawat et al., 2006).

Tabel 4.1 Pengaruh waktu homogenisasi terhadap ukuran partikel

Waktu homogenisasi (menit)	Ukuran partikel (nm)
2	342,6 ± 22,50 nm
4	313,93 ± 3,13 nm
6	245,6 ± 3,31 nm

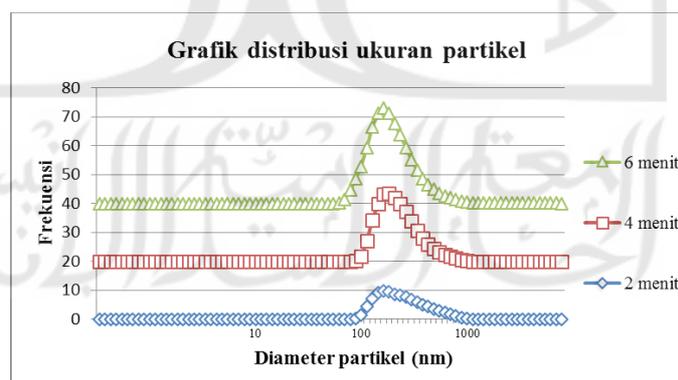
Indeks polidispersitas merupakan salah

satu parameter yang dapat menunjukkan distribusi ukuran partikel dalam suatu sistem nanopartikel (Nidhin et, al. 2008). Rentang nilai 0,1 – 0,5 menunjukkan distribusi ukuran yang sempit sedangkan di atas 0,5 – 0,7 menunjukkan distribusi ukuran yang sedang, dan diatas 0,7 menunjukkan distribusi ukuran yang luas (Lu, et al. 2011). Hasil nilai rata-rata PI dari sediaan nanosuspensi yang telah dibuat ditunjukkan pada **Tabel 4.2**. Secara keseluruhan nilai PI yang dihasilkan masuk ke dalam rentang distribusi partikel yang sempit dan dapat dikatakan homogen.

Tabel 4.2 Pengaruh waktu homogenisasi terhadap nilai PI

Waktu homogenisasi (menit)	Indeks polidispersitas
2	0,51 ± 0,06
4	0,52 ± 0,01
6	0,44 ± 0,05

Gambar 4.2 grafik distribusi partikel sediaan nanosuspensi dengan variasi waktu



homogenisasi 2, 4 dan 6 menit.

Distribusi partikel merupakan salah satu faktor penting yang perlu diperhatikan dalam karakteristik nanopartikel. Distribusi partikel yang baik menunjukkan kemampuan sediaan yang semakin baik dalam memuat dan

melepaskan obat untuk mencapai efek terapi yang diharapkan (Kharia, et al. 2012). Grafik distribusi nanosuspensi yang telah dibuat ditunjukkan pada **gambar 4.2**. Dari gambar tersebut dihasilkan 3 peak yang menunjukkan pengaruh waktu homogenisasi terhadap distribusi partikel. Pada waktu homogenisasi 6 menit peak yang dihasilkan paling sempit dibandingkan dengan waktu homogenisasi 2 dan 4 menit. Hal ini bermakna bahwa waktu homogenisasi 6 menit memiliki pemerataan distribusi partikel yang paling baik. Selain itu ukuran partikel yang dihasilkan pada waktu homogenisasi 6 menit merupakan ukuran partikel yang paling kecil dibandingkan dengan ukuran partikel pada waktu homogenisasi 2 dan 4 menit. Hasil dari nilai PI waktu homogenisasi 6 menit juga paling homogen dibandingkan dengan nilai PI waktu homogenisasi 2 dan 4 menit. Dapat disimpulkan bahwa semakin lama waktu homogenisasi yang dilakukan dalam pembuatan nanosuspensi ini menghasilkan pemerataan distribusi partikel yang semakin baik ditinjau dari hasil ukuran partikel, nilai zeta potensial dan grafik distribusi partikel.

4.2.3. Zeta Potensial

Nilai zeta potensial menunjukkan muatan permukaan suatu partikel (Mujamilah and Sulungbud, 2013). Muatan partikel menyebabkan partikel mengalami kecenderungan agregasi maupun tolak menolak (Vaughn dan Williams, 2007). Menurut Murdock 2008, nilai zeta potensial dari sediaan yang stabil adalah lebih dari +30 mV atau kurang dari -30 mV. Nilai zeta potensial yang baik menunjukkan kekuatan partikel untuk saling tolak menolak semakin kuat sehingga menghasilkan dispersi sediaan yang stabil. Sedangkan nilai zeta potensial yang tidak baik menunjukkan kekuatan partikel untuk tolak menolak semakin lemah sehingga partikel mengalami kecenderungan agregasi dan menyebabkan dispersi sediaan yang kurang stabil (Prasetiowati et al., 2018).

Penelitian ini menghasilkan nilai zeta potensial negatif dari sediaan nanosuspensi yang telah dibuat. Nilai zeta potensial negatif dapat disebabkan karena terdapat ekstrak *Pueraria mirifica* yang tidak terjerap oleh natrium alginat dan kalsium klorida. Selain itu juga dapat disebabkan oleh natrium alginat bebas yang tidak berikatan membentuk sistem nanopartikel. Dapat disimpulkan bahwa

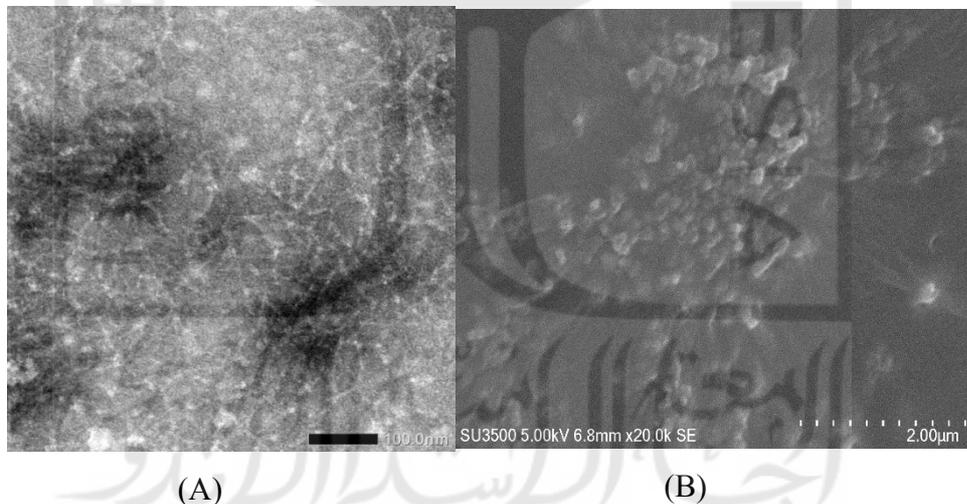
partikel ekstrak *Pueraria mirifica* dan natrium alginat mengandung muatan negatif.

Hasil zeta potensial pada sediaan yang telah dibuat ditunjukkan pada **tabel 4.3**. Nilai zeta potensial dari ketiga sediaan yang dibuat dengan waktu homogenisasi 2, 4 dan 6 menit secara berturut-turut yaitu $-25,5 \pm 1,4$ mV, $-26,47 \pm 1,32$ mV dan $-24,6 \pm 0,87$ mV. Menurut Murdock 2008, nilai zeta potensial yang dihasilkan pada penelitian ini dianggap tidak baik karena tidak lebih dari $+30$ mV dan tidak kurang dari -30 mV.

Tabel 4.3 Pengaruh waktu homogenisasi terhadap nilai zeta potensial

Waktu homogenisasi (menit)	Zeta potensial (mV)
2	$-25,5 \pm 1,4$ mV
4	$-26,47 \pm 1,32$ mV
6	$-24,6 \pm 0,87$ mV

4.2.4 Morfologi Nanopartikel



Gambar 4.3 Hasil analisis nanosuspensi secara berturut turut menggunakan instrumen TEM dan SEM dengan perbesaran (A) dan (B) secara berturut-turut adalah pada skala 100 nm dan 2.000 nm.

Bentuk dan permukaan nanopartikel dapat diamati menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) (Fatmawaty et al., 2018). Pemilihan instrumen TEM dilakukan karena instrumen TEM paling baik digunakan untuk menunjukkan morfologi sediaan liquid berskala nanometer (Schuh and de Jonge, 2014). Selain itu pemilihan

instrumen menggunakan SEM juga dilakukan untuk mendukung hasil analisis menggunakan instrumen TEM. Pengujian morfologi sediaan nanosuspensi ini hanya mengambil satu formula yang dianggap sebagai formula terbaik ditinjau dari ukuran dan distribusi partikel. Formula tersebut yaitu formula dengan waktu homogenisasi 6 menit.

Penelitian ini menghasilkan morfologi nanosuspensi yang kurang sferis diamati menggunakan instrumen TEM. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh viskositas polimer yang terlalu rendah mengakibatkan ikatan sambung silang kurang kuat sehingga mudah mengkerut dan tidak rata (Kohane, 2007). Menurut Gilbert et al. (2009), bentuk partikel yang kurang sferis dapat mempermudah interaksi antarpartikel sehingga terjadi agregasi yang mengakibatkan ukuran partikel semakin besar (Fatmawaty et al., 2018). Namun pengamatan menggunakan instrumen SEM menghasilkan bentuk morfologi nanopartikel yang cukup sferis walaupun terlihat penggumpalan pada sampel.

4.3 Uji Stabilitas Dipercepat

Uji stabilitas bertujuan untuk melihat stabilitas dari sediaan nanosuspensi yang telah dibuat terhadap pengaruh suhu. Pengujian yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji stabilitas dipercepat. Pengujian dilakukan dengan meletakkan sediaan pada suhu 4°C selama 24 jam kemudian dipindahkan pada suhu 40°C selama 24 jam juga. Setelah didapatkan 6 siklus dilakukan pengamatan terhadap ukuran partikel, zeta potensial dan indeks polidispersitas. Pengujian ini akan berlangsung hingga siklus ke 12 (Restu, et al. 2015). Selain itu juga dilakukan pengujian terhadap pH pada sediaan.

pH merupakan parameter umum yang dapat memengaruhi preparasi nanopartikel (Patil et al., 2012). Menurut Bu 2005, peningkatan pH akan menyebabkan kekuatan ikatan alginat berkurang sehingga menyebabkan sediaan makin tidak stabil. Hasil karakterisasi nilai pH nanosuspensi yang telah dibuat dengan waktu 2, 4 dan 6 menit pada siklus ke 0 hingga siklus ke 11 secara berturut-turut memiliki kisaran 4,68 - 6,32; 4,37 - 6,28 dan 4,52 - 6,17. Hasil ini dianggap sudah baik karena telah sesuai dengan pH kulit sehingga tidak bersifat mengiritasi kulit (Zulkarnain et al., 2013). Sediaan perlu dipastikan memiliki pH sesuai dengan pH kulit karena sediaan akan digunakan secara topikal.

Penelitian ini menghasilkan ukuran partikel yang berubah menjadi lebih setelah dilakukan pengujian stabilitas. Perubahan ukuran partikel menjadi lebih besar dimulai pada siklus ke 11. Hasil nanosuspensi dengan variasi waktu homogenisasi 2, 4 dan 6 menit secara berturut-turut memiliki ukuran partikel semula 342,6 nm; 313, 93 nm dan 245, 6 nm. Kemudian pada siklus ke 11 ukuran partikel mengalami pembesaran menjadi 1245,27 nm; 1739,2 nm dan 1958,77 nm. Hal ini menunjukkan bahwa sediaan dianggap tidak stabil. Peningkatan temperatur akan meningkatkan ukuran partikel. Sehingga peningkatan temperatur memiliki pengaruh terhadap ukuran partikel yang semakin besar (Rosanti and Puryanti, 2015). Selain itu agregasi molekul juga dapat menyebabkan ukuran partikel menjadi besar.

Tabel 4.4 Uji stabilitas terhadap karakteristik ukuran partikel, nilai zeta potensial, nilai indeks polidispersitas dan pH.

Karakteristik	Waktu homogenisasi (menit)			
	Siklus	2	4	6
Ukuran partikel (nm)	Siklus 0	342,6 ± 22,50	313,9 ± 3,13	245,6 ± 3,31
	Siklus 6	334,3 ± 56,77	265,2 ± 17	342,2 ± 14,12
	Siklus 11	1245,3 ± 66,17	1739,2 ± 27,60	1958,8 ± 227,02
PI	Siklus 0	0,513 ± 0,3	0,522 ± 0,1	0,444 ± 0,1
	Siklus 6	0,548 ± 0,04	0,512 ± 0,04	0,557 ± 0,05
	Siklus 11	0,576 ± 0,08	0,651 ± 0,05	0,487 ± 0,03
Zeta Potensial (mV)	Siklus 0	-25,5 ± 1,4	-26,5 ± 1,32	-24,6 ± 0,87
	Siklus 6	-29,3 ± 0,7	-23,9 ± 0,15	-20,4 ± 1,99
	Siklus 11	-25,7 ± 0,4	-23,8 ± 0,96	-23,1 ± 0,82
pH	Siklus 0	4,68	4,37	4,52
	Siklus 6	5,14	5,09	5,07
	Siklus 11	6,32	6,28	6,17

Nilai PI dan nilai zeta potensial merupakan faktor yang dapat menentukan kehomogenan dari suatu sistem nanosuspensi. Nilai PI dari ketiga sediaan yang dihasilkan setelah melalui ujian stabilitas berkisar antara 0,44-0,651. Hasil ini memiliki makna bahwa sediaan yang dibuat memiliki kehomogenan yang baik. Sedangkan nilai zeta potensial yang dihasilkan setelah dilakukan uji stabilitas selama 11 siklus berkisar antara (-20,4) mV – (-29,3). Sediaan dengan waktu

homogenisasi selama 2 menit memiliki rata-rata nilai zeta potensial $-25,5$ mV pada siklus ke 0 kemudian mengalami penurunan nilai zeta potensial menjadi $-29,3$ mV pada siklus ke 6 dan mengalami kenaikan zeta potensial menjadi $-25,7$ mV. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang terlalu jauh antara nilai zeta potensial pada siklus ke 0 dan nilai zeta potensial pada siklus ke 11. Akan tetapi nilai zeta potensial ini mengalami perubahan fluktuatif yang tidak terduga, sehingga sediaan dikatakan tidak stabil. Sediaan dengan waktu homogenisasi selama 4 menit memiliki rata-rata nilai zeta potensial $-26,5$ mV pada siklus ke 0 kemudian mengalami kenaikan nilai zeta potensial menjadi $-23,9$ mV pada siklus ke 6 dan mengalami kenaikan zeta potensial menjadi $-23,8$ mV. Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang terlalu jauh antara nilai zeta potensial pada siklus ke 0 dan nilai zeta potensial pada siklus ke 11. Akan tetapi nilai zeta potensial sediaan dengan waktu homogenisasi 4 menit pada siklus 0 hingga 11 semakin tidak baik karena semakin menjauhi angka -30 mV. Menurut Murdock 2008, sediaan dengan nilai zeta potensial semakin jauh dari -30 mV maka sediaan dianggap memiliki sifat yang makin tidak stabil. Sediaan dengan waktu homogenisasi selama 6 menit memiliki rata-rata nilai zeta potensial $-24,6$ mV pada siklus ke 0 kemudian mengalami kenaikan nilai zeta potensial menjadi $-20,4$ mV pada siklus ke 6 dan mengalami penurunan zeta potensial menjadi $-23,1$ mV. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang terlalu jauh antara nilai zeta potensial pada siklus ke 0 dan nilai zeta potensial pada siklus ke 11. Akan tetapi sama seperti sediaan dengan waktu homogenisasi 2 menit, nilai zeta potensial yang dimiliki oleh sediaan dengan waktu homogenisasi 6 menit mengalami perubahan fluktuatif yang tidak terduga, sehingga sediaan dikatakan tidak stabil. Nilai zeta potensial yang tidak stabil dapat menunjukkan bahwa terdapat agregasi molekul dalam sediaan yang dihasilkan. Hasil nilai PI dan nilai zeta potensial yang diperoleh ditunjukkan pada **tabel 4.4**.

Hasil distribusi partikel dari nanosuspensi yang telah dibuat ditunjukkan pada **gambar 4.4**. Pada gambar tersebut, sediaan dengan waktu homogenisasi 2 menit memiliki 1 puncak pada siklus 0, 2 puncak pada siklus ke 6 dan 3 puncak pada siklus ke 11. Sediaan dengan waktu homogenisasi 4 menit memiliki 1 puncak pada siklus 0 dan 6 serta 2 puncak pada siklus ke 11. Akan tetapi puncak

pada siklus 0 lebih kecil jika dibandingkan dengan puncak pada siklus ke 6. Sedangkan sediaan dengan waktu homogenisasi 6 menit memiliki 1 puncak pada siklus ke 0 dan 6 serta 2 puncak pada siklus ke 11. Sama seperti sediaan dengan waktu homogenisasi 4 menit, puncak yang dihasilkan pada siklus 0 lebih kecil dibandingkan dengan puncak siklus ke 6. Gambar puncak pada grafik distribusi partikel memiliki makna jumlah distribusi partikel pada sediaan. Semakin banyak puncak yang dihasilkan, persebaran partikel dianggap semakin banyak sehingga sediaan dianggap tidak homogen. Selain itu semakin besar puncak yang dihasilkan juga memiliki makna bahwa semakin besar pula persebaran partikel dalam sediaan. Maka sediaan dianggap tidak homogen. Sehingga dari gambar grafik distribusi partikel yang dihasilkan dapat dikatakan sediaan yang dibuat secara umum mulai tidak homogen siklus ke 6. Ketidakhomogenan dari sediaan menunjukkan bahwa sediaan mulai mengalami agregasi. Sediaan yang mengalami agregasi menyebabkan dispersi sediaan yang tidak stabil. Kesimpulan yang dapat diambil adalah sediaan yang dibuat tidak memiliki kestabilan yang baik.

Tabel 4.5 Analisis statistika pengaruh waktu terhadap stabilitas nanosuspensi menggunakan uji MANOVA.

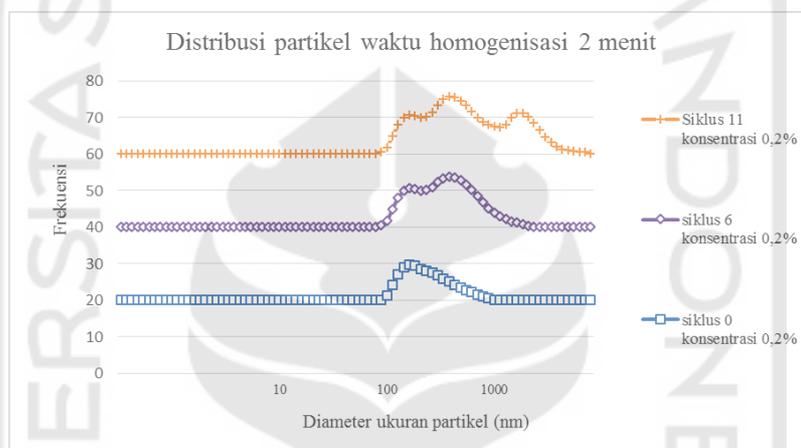
Formula	Karakteristik	Sig.
2 menit	Ukuran Partikel	0,000001
	Zeta Potensial	0,004011
4 menit	Ukuran partikel	0,000001
	Zeta potensial	0,021196
6 menit	Ukuran partikel	0,000006
	Zeta potensial	0,023594

Keterangan: analisis sediaan dengan variasi waktu homogenisasi meliputi data siklus ke 0, 6 dan 11.

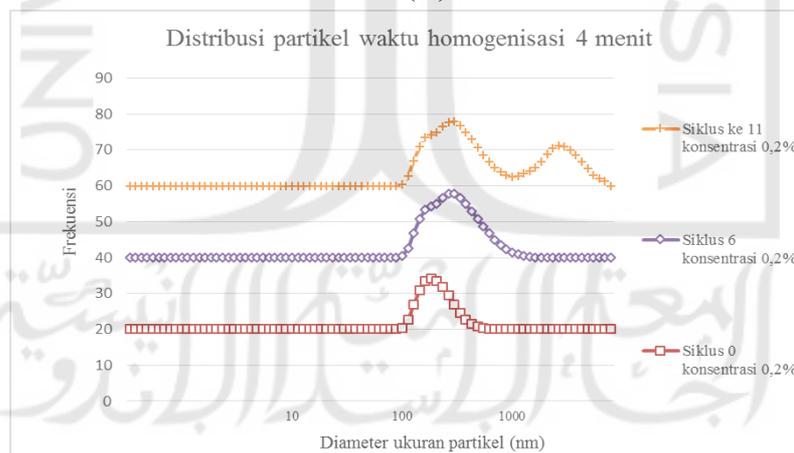
Penelitian ini menggunakan analisis statistika *Multivariat Analysis of Variance* (MANOVA). Analisis ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perbedaan waktu homogenisasi terhadap ukuran partikel dan nilai zeta potensial. Hasil analisis tertera pada **tabel 4.5**. Pada tabel tersebut menunjukkan nilai signifikansi dari ketiga sediaan kurang dari 0,05. Nilai signifikansi kurang dari

0,05 memiliki makna hasil analisis berbeda secara signifikan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ketiga sediaan mengalami perubahan ukuran partikel dan nilai zeta potensial setelah dilakukan uji stabilitas. Hal ini menunjukkan perbedaan waktu homogenisasi tidak berpengaruh terhadap kestabilan dari sediaan.

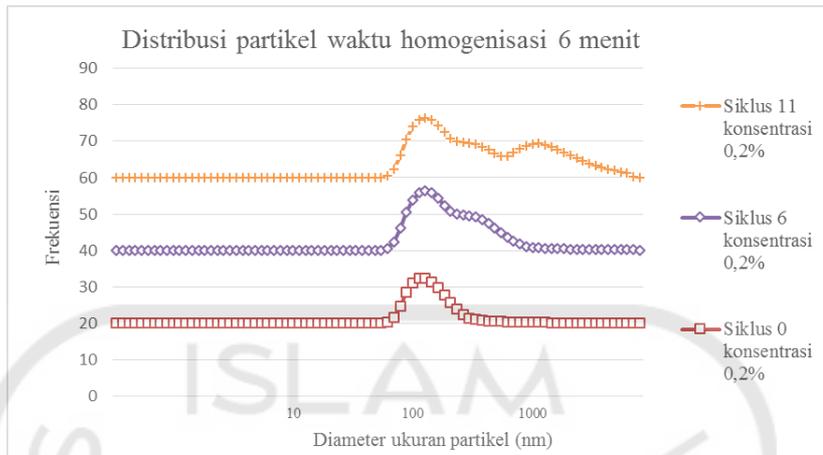
Hasil analisis statistika pada tabel juga menunjukkan bahwa dari ketiga sediaan yang telah dibuat, sediaan dengan waktu homogenisasi 6 menit memiliki nilai zeta potensial yang paling mendekati nilai signifikansi 0,05. Sehingga sediaan dianggap paling stabil didukung dengan gambar grafik distribusi partikel yang telah dilampirkan.



(A)



(B)



(C)

Gambar 4.4 Distribusi ukuran partikel sediaan nanosuspensi setelah dilakukan uji stabilitas secara berturut-turut A, B dan C adalah sediaan dengan waktu homogenisasi 2 menit, sediaan dengan waktu homogenisasi 4 menit, sediaan dengan waktu homogenisasi 6 menit.