

BAB VI**PEMBAHASAN**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi lipid cair (kombinasi minyak kedelai dan asam oleat) dengan kadar lipid 30%. (dengan perbandingan setil palmitat: minyak kedelai: asam oleat 4:4:0 (F1), 4:0:4 (F2), 4:3:1 (F3), 4:2:2 (F4), 4:1:3 (F5), Tween 20%, propilenglikol 20% terhadap karakteristik (ukuran partikel, morfologi, titik lebur, kristalisasi, viskositas, pH, zeta potensial), efisiensi penjebakan, uji mikroskopis penetrasi secara in vivo dengan mikroskop fluoresensi, uji iritasi secara in vivo secara histologi dan stabilitas penyimpanan pada 8-15°C selama 60 hari.

Tahap awal penelitian ini adalah melakukan analisis kualitatif bahan-bahan penelitian antara lain resveratrol, setil palmitat, asam oleat, minyak kedelai, tween 80, propilenglikol. Analisis ini bertujuan untuk menjamin kebenaran bahan-bahan penelitian yang digunakan sudah sesuai pustaka dan sertifikat analisis bahan. Analisis yang dilakukan meliputi pemeriksaan organoleptis, spektra IR, pengukuran suhu lebur menggunakan Differential Scanning Calorimetry (DSC). Berdasarkan hasil pemeriksaan kualitatif organoleptis, spektra IR, maupun suhu lebur, baik resveratrol, setil palmitat, minyak kedelai, asam oleat, Tween 80, propilenglikol dan etanol memiliki karakteristik yang sesuai dengan pustaka.

Tahap selanjutnya adalah pembuatan sistem NLC dengan menggunakan metode High Shear Homogenization menggunakan alat Ultra-Turrax pada kecepatan 16000 rpm selama 13 menit terbagi dalam 5 cycle. Metode tersebut dipilih karena sesuai untuk obat bersifat lipofil. Prinsip metode ini didasarkan pada

kavitasi fase aqua, kekuatan kavitasi didalam partikel cukup tinggi untuk mengubah mikropartikel obat menjadi nanopartikel (Savjani et al, 2012). Pada penerapan metode ini, suhu pemanasan sangat penting untuk diperhatikan selama proses pembuatan, untuk menghindari pemanasan berlebihan yang dapat menurunkan stabilitas obat.

Tahap selanjutnya pemeriksaan terhadap terbentuknya sistem NLC resveratrol. Pemeriksaan dilakukan dengan FTIR. Pemeriksaan dengan FTIR bertujuan untuk mengamati munculnya atau hilangnya gugus fungsi yang terjadi pada sistem NLC resveratrol yang terbentuk. Berdasarkan hasil pemeriksaan FTIR memiliki puncak karakter formula NLC RSV memiliki profil spektrum FTIR yang identik dengan resveratrol, Hal tersebut mengindikasikan bahwa resveratrol terdispersi dalam matriks lipid dan tidak ada interaksi kimia antara resveratrol dengan matriks lipid.

Pemeriksaan karakter NLC dilakukan dengan DSC dan XRD. Pemeriksaan dilakukan pada bulk material dan sistem NLC blank maupun NLC RSV. Berdasarkan hasil overlay pada termogram NLC blank dengan lipid padat setil palmitat (Gambar 5.16). Menunjukkan adanya 2 puncak endotermik pada sistem NLC. Puncak yang pertama dengan titik lebur antara $47,43^{\circ}\text{C}$ - $50,22^{\circ}\text{C}$ lebih rendah dari titik lebur setil palmitat. Hal tersebut berkaitan dengan bentuk α -polimorfik (ketidakstabilan termodinamik). Bentuk α -polimorfik merupakan bentuk yang kurang order, bentuk tersebut mengindikasikan lipid cair melebur dengan setil palmitat dan menurunkan kepadatan struktur kristal setil palmitat. Sedangkan puncak kedua memiliki titik lebur $113,14^{\circ}\text{C}$ - $127,15^{\circ}\text{C}$, yang menunjukkan titik lebur lebih tinggi dari titik lebur setil palmitat. Hal tersebut

berkaitan dengan bentuk β -polimorfik (kestabilan termodinamik). Bentuk β -polimorfik mengindikasikan modifikasi struktur kristal setil palmitat menjadi bentuk kristal lebih order. Adanya dua bentuk polimorfisme tersebut kemungkinan disebabkan lipid telah melebur sebelum dan selama dilakukan proses analisis, hal ini berkaitan dengan kondisi selama pembuatan sistem NLC (Alexandra, 2011). Jika dibandingkan antar formula, formula NLC blank F1 dengan lipid minyak kedelai menunjukkan nilai titik lebur yang lebih tinggi dibanding formula F2 dan F4. Hal ini karena lipid cair minyak kedelai (minyak tak jenuh) dengan adanya setil palmitat (minyak jenuh) selama proses pembuatan sistem berubah menjadi jenuh sehingga berpengaruh pada peningkatan titik lebur. (Scrimgeour, 2005). Selanjutnya gambar 5.17 merupakan overlay sistem NLC RSV dibandingkan dengan NLC blank. Pada NLC RSV, puncak yang pertama memiliki titik lebur antara $46,65^{\circ}\text{C}$ - $48,94^{\circ}\text{C}$ dan puncak yang kedua memiliki titik lebur antara 117°C - $136,66^{\circ}\text{C}$. Hal ini menunjukkan bahwa sistem NLC-RSV memiliki titik lebur lebih rendah dibanding NLC blank dengan titik lebur $47,43^{\circ}\text{C}$ - $50,22^{\circ}\text{C}$ dan $117,05^{\circ}\text{C}$ - $136,66^{\circ}\text{C}$, sehingga mengindikasikan bahwa resveratrol terlarut dalam lipid matriks (Alexandra, 2011). Namun perbedaan nilai ini tidak begitu signifikan dalam hal polimorfisme. Pada gambar 5.18 dan tabel 5.8. NLC RSV F2 menunjukkan titik lebur yang paling rendah diantara F1 dan F4 dan (%) RI yang lebih tinggi dibanding formula F1 dan F4. Fenomena ini dipengaruhi karena adanya penambahan resveratrol. Hal ini sesuai dengan ukuran partikel formula NLC RSV F2 yang lebih kecil dibanding dengan NLC Blank F2. Selanjutnya pada formula F2 melting entalpi meningkat lebih tinggi dari $190,7^{\circ}\text{C}$ menjadi $259,71$. Peningkatan melting entalpi diikuti meningkatnya (%) RI, hal ini karena ada penambahan resveratrol

dalam sistem NLC yang berinteraksi dengan matriks lipid sehingga menyebabkan peningkatan (%) RI NLC RSV F2 (Metin dan Hartel, 2005; Paula et al, 2015).

Pada pemeriksaan XRD (Gambar 5.19), bulk setil palmitat memiliki puncak difraksi yang tajam pada sudut 5° , 6° , 21° , 23° , 40° hal ini mengindikasikan bahwa setil palmitat berada dalam bentuk kristal. Setelah penambahan lipid cair minyak kedelai dan asam oleat yang dibuat dalam sistem NLC, terjadi penurunan intensitas puncak dengan karakteristik yang sama dengan bulk setil palmitat, namun dengan intensitas yang lebih lemah. Apabila hasil difraktogram dihubungkan dengan data DSC dapat disimpulkan bahwa penambahan lipid cair menurunkan struktur kristal setil palmitat yang ditandai dengan menurunnya (%) RI (Alexandra, 2011). Selanjutnya pada gambar 5.20. Terlihat karakteristik puncak resveratrol yang tajam pada sudut 6° , 16° , 19° , 22° , 28° . Setelah dibuat dalam bentuk NLC, puncak karakteristik resveratrol untuk semua formula (NLC RSV F1, F2, F4) tidak tampak pada difraktogram. Hal ini menunjukkan bahwa resveratrol terdispersi menjadi bentuk amorf pada matriks lipid (Yang et al, 2008; Sun et al, 2011). Sementara itu bila dibandingkan antara NLC RSV F1, F2 dan F4, didapatkan hasil puncak difraksi yang lebih tajam pada NLC RSV F2 jika dibandingkan NLC RSV F1 (minyak kedelai) dan NLC RSV kombinasi (kedelai dan oleat). Hal ini terkait dengan data DSC NLC RSV F2 memiliki melting entalpi yang tinggi, tingginya melting entalpi mengindikasikan tingginya kristalisasi (Tofani et al, 2016).

Tahap selanjutnya dilakukan validasi metode dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-VIS yang diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimal dan pembuatan kurva baku resveratrol. Dari screening yang dilakukan diperoleh panjang gelombang maksimum resveratrol 306 nm. Kemudian diperoleh

kurva baku resveratrol dalam etanol dengan kadar 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 ppm dan persamaan regresi linear $Y = 0,12562x + 0,0265$ dengan $r = 0,9992$ (gambar 5.23). Untuk memastikan bahwa bahan tambahan tidak mengganggu serapan resveratrol, dilakukan pemeriksaan bahan tambahan pada serapan resveratrol dalam larutan etanol. Berdasarkan hasil pemeriksaan diketahui bahwa bahan penyusun sistem NLC tidak memberikan serapan resveratrol pada panjang gelombang maksimalnya, untuk menjamin repeatability, proses pembuatan formula dilakukan tiga kali replikasi. Berdasarkan hasil uji perolehan kembali diketahui perolehan kembali dari tiap formula yaitu 102,02-108,43%, sesuai dengan persyaratan standar 80-120% (ICH Harmonised Guideline) dan pada penelitian ini memiliki nilai % KV 0,04- 0,45 %, sesuai dengan persyaratan nilai KV yang kurang dari 2,7% (Yuwono dan Indrayanto, 2005). Sehingga metode ini dianggap memiliki repeatability baik.

Pada penentuan efisiensi penjejakan, didapatkan hasil formula F2 menunjukkan efektifitas penjejakan yang paling rendah 91,78%. Hal ini dapat disebabkan oleh pengaruh kelarutan resveratrol dalam lipid karena kelarutan resveratrol dalam asam oleat lebih rendah (0,07 mg/g) dibanding dengan minyak kedelai (2 mg/g), sehingga menghasilkan penjejakan yang lebih rendah pada formula dengan lipid cair asam oleat (Sun et al, 2014; Juiskaie et al, 2015). Tingginya % RI pada formula F2 juga berpengaruh pada berkurangnya ruang untuk mengakomodasi obat lebih banyak, sehingga menghasilkan penjejakan yang lebih rendah. Namun dengan adanya kombinasi lipid cair pada formula F3, F4 dan F5 mampu meningkatkan efektifitas penjejakan 94,46 % - 95,17 %, sehingga dapat disimpulkan bahwa kombinasi lipid cair berpengaruh pada peningkatan efisiensi penjejakan. Selain itu, viskositas juga berpengaruh pada efisiensi penjejakan. Formula NLC RSV F2 memiliki viskositas

lebih besar dibanding formula NLC RSV yang lain, besarnya viskositas dapat menghambat enkapsulasi obat sehingga menghasilkan efisiensi penjebakan yang lebih rendah (Martien, 2011).

Sementara pada hasil pemeriksaan organoleptis (gambar 5.26), Formula F2 bewarna putih kekuningan dari formula lainnya, Hal ini bisa disebabkan karena pengaruh pemanasan, kontak dengan udara luar serta lamanya waktu pembuatan sistem NLC, sehingga berpengaruh pada hasil akhir, dalam hal ini F2 dengan lipid cair asam oleat dengan adanya paparan udara secara bertahap dapat mengabsorpsi oksigen, sehingga menghasilkan warna lebih kuning dari pada formula NLC lainnya (Rowe et al, 2009)

Tahap selanjutnya dilakukan pemeriksaan ukuran partikel dengan alat Delsa Nano Particle Size Analyzer. Dari pemeriksaan ukuran partikel (tabel 5.13) didapatkan ukuran partikel NLC RSV F1 dan F5 lebih kecil dibandingkan F2, F3 dan F4. Formula F1 dengan lipid cair minyak kedelai menghasilkan ukuran yang lebih kecil, dalam hal ini berkaitan dengan kelarutan resveratrol yang tinggi dalam minyak kedelai, sehingga berpengaruh pada kecilnya ukuran partikel (Svajani et al, 2012). Namun sebaliknya pada F3 dengan lipid kombinasi perbandingan (3:1), dimana konsentrasi minyak kedelai lebih besar dari asam oleat, menghasilkan ukuran yang besar. Bila dihubungkan dengan hasil data stabilitas penyimpanan, ukuran partikel formula F3 tidak stabil yang ditandai dengan terjadi peningkatan ukuran partikel selama penyimpanan. Pada formula F5 yang mengandung kombinasi lipid cair minyak kedelai (SO) dan asam oleat (OA) dengan perbandingan konsentrasi asam oleat lebih besar dari minyak kedelai (1:3), menghasilkan ukuran partikel yang kecil. Namun sebaliknya pada F3 dengan

perbandingan konsentrasi asam oleat yang lebih kecil dari minyak kedelai (3:1), menghasilkan ukuran partikel yang besar, hal ini menunjukkan bahwa penurunan ukuran partikel tergantung jumlah OA, semakin tinggi jumlah OA semakin kecil ukuran partikel. Tidak demikian pada formula F2, dengan konsentrasi OA tunggal yang tinggi, namun menghasilkan ukuran partikel yang lebih besar, dalam hal ini energi yang dihasilkan setiap NLC sama, namun fase yang terdispersi meningkat 20- 30 %, sehingga menyebabkan kurangnya energi yang tersedia per unit lipid, yang mengakibatkan ukuran partikel lebih besar. Hal ini sesuai dengan penelitian Teeranachaideekul et al and Phipps, bahwa tingginya konsentrasi lipid, berbanding lurus dengan besarnya ukuran partikel. Selain itu viskositas yang tinggi pada NLC RSV F2 berpengaruh pada meningkatkan ukuran partikel (Mangesama et al, 2008). Untuk keseragaman distribusi ukuran partikel NLC RSV dan NLC Blank dapat dilihat pada tabel 5.14, Pada hasil distribusi ukuran partikel, didapatkan tidak ada perbedaan bermakna nilai polidispersity index (PI) formula NLC blank dengan NLC RSV, sehingga dapat disimpulkan bahwa distribusi ukuran partikel homogen, dalam hal ini sesuai dengan persyaratan nilai PI kurang 0,3 dinyatakan homogen (Das dan Anumita, 2011).

Penentuan viskositas bertujuan untuk melihat pengaruh stabilitas NLC RSV. Pada pemeriksaan viskositas didapatkan NLC RSV F2 menunjukkan viskositas yang lebih besar dibanding NLC RSV F1, F3, F4 dan F5. Hasil ini berbanding lurus dengan hasil uji stabilitas penyimpanan selama 60 hari, bahwa formula F2 menghasilkan formula yang stabil dibanding NLC RSV F1, F3, F4. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan Raymundo et al, (2001), bahwa semakin besar viskositas maka stabilitas akan meningkat.

Tahap selanjutnya penentuan zeta potensial, zeta potensial merupakan parameter untuk menilai stabilitas fisik dispersi koloid (Loo et al, 2012). Besarnya PZ mengindikasikan stabilitas potensial sistem koloid, Apabila semua partikel dalam suspensi memiliki PZ lebih positif +30 mV atau lebih negatif -30 mV, maka dinyatakan stabil. Pada pengujian NLC RSV (tabel 5.17), semua formula menunjukkan nilai antara 42,7 - 57,2 sehingga semua formula dinyatakan stabil. Pada NLC RSV formula F4 menunjukkan nilai potensial zeta yang paling tinggi diantara semua formula. Formula F4 merupakan kombinasi lipid cair minyak kedelai dan asam oleat, dimana kedua lipid cair merupakan asam lemak tak jenuh yang memiliki ikatan rangkap rantai karbon yang sejenis, dan jika dikombinasikan akan menghasilkan tingginya tingkatan tolak - menolak antar partikel yang bermuatan sama, dan mencegah terjadi flokulasi. Hal ini sesuai dengan teori DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek theory) bahwa sistem dapat dikatakan stabil jika tolakan elektrostatis mendominasi gaya van der Waals. (Legaly,1984).

Berdasarkan data zeta potensial tabel 5.17, kombinasi lipid cair (minyak kedelai dan asam oleat) formula NLC resveratrol F4 (4:2:2) memiliki nilai zeta potensial yang paling tinggi dibanding formula kombinasi lipid cair F3 (4:3:1) dan F5 (4:1:3). Tingginya nilai zeta potensial menggambarkan kestabilan koloidal jangka panjang pada sistem NLC. Sehingga pada uji penetrasi dan uji iritasi, dipilih NLC RSV F4 (4:2:2) sebagai formula kombinasi lipid cair (minyak kedelai dan asam oleat) yang akan diuji.

Pada tahapan penelitian ini dibandingkan penetrasi sistem NLC resveratrol, formula F1 (4:4:0), F2 (4:0:4), F4 (4:2:2), NLC Blank (4:2:2) dan larutan (minyak kombinasi+resveratrol). Dari hasil pengamatan diketahui bahwa NLC resveratrol F1

dan NLC blank (4:2:2) dapat berpenetrasi lebih dalam dibandingkan formula NLC resveratrol F2, F4 dan larutan minyak. Hal ini karena NLC RSV F1 memiliki ukuran partikel yang kecil. Ukuran partikel yang kecil menyebabkan struktur antar partikel rapat sehingga oklusifitas meningkat, peningkatan oklusifitas berpengaruh pada peningkatan penetrasi bahan aktif kedalam kulit (Putranti, 2016). Selain itu kelarutan bahan aktif dalam lipid juga berpengaruh pada penetrasi, pada formula F1 dengan lipid cair minyak kedelai lebih larut dalam resveratrol, kelarutan lipid dalam bahan aktif dapat mempengaruhi koefisien difusi antara obat dan membran kulit sehingga bahan aktif dapat berpenetrasi lebih baik (Junyaprasety, 2008). Apabila dibandingkan antara NLC Blank F4, NLC RSV F4 dan Larutan (minyak kombinasi+ resveratrol). NLC Blank F4 terpenetrasi lebih dalam dibandingkan NLC RSV F4, hal ini karena ukuran partikel NLC Blank F4 lebih kecil dari NLC RSV F4 sehingga menghasilkan penetrasi yang lebih dalam.

Tahap selanjutnya adalah uji iritasi sistem NLC resveratrol secara hipastologi. Pada penelitian ini dibandingkan iritasi NLC RSV F4, NLC Blank F4, dan kelompok kontrol tanpa perlakuan. Dari hasil diketahui bahwa NLC Blank F4 menunjukkan iritasi yang lebih tinggi dibanding dengan NLC RSV F4 dan kelompok kontrol. Hal ini kemungkinan karena komponen yang ada dalam basis NLC yaitu lipid cair asam oleat. Menurut Kai et al (2017), asam oleat sebagai penetrasi enhancer bekerja dengan mengganggu stratum korneum sebagai fungsi barrier kulit, sehingga menginduksi terjadinya dermatitis. Selain itu penggunaan surfaktan dalam konsentrasi yang berlebih juga berpengaruh pada iritasi kulit (Hall et al, 1998), Namun pada NLC RSV F4 iritasinya menurun, hal ini karena adanya resveratrol sebagai anti inflamasi, sehingga iritasi NLC RSV F4 lebih rendah dibanding NLC

Blank F4. Apabila dilihat pada tabel 5.21, kelompok kontrol tanpa perlakuan menunjukkan ada iritasi hal ini karena pengaruh mekanis pada saat pencukuran bulu mencit, sehingga menimbulkan iritasi. Pada gambar 5.38, Apabila dibandingkan antar formula NLC RSV F1, NLC RSV F2 dan NLC RSV F4 didapatkan hasil NLC RSV F1 lebih mengiritasi dibanding NLC RSV F2 dan NLC RSV F4. Hal ini karena ukuran partikel NLC RSV F1 yang lebih kecil, ukuran partikel yang kecil dapat meningkatkan luas permukaan partikel yang kontak dengan stratum korneum sehingga berpengaruh pada peningkatan hidrasi kulit. Hidrasi kulit diduga menyebabkan edema pada stratum korneum dan pergeseran susunan lemak sehingga berpengaruh pada peningkatan penetrasi dan iritasi kulit. Selain itu pada tabel 5.21 terlihat adanya iritasi pada Skin Appendages Degeneration, hal ini sesuai dengan rute penghantaran kulit melalui rute appendageal, rute appendageal merupakan rute yang memanfaatkan adanya kelenjar minyak dan folikel rambut, rute ini dapat menghasilkan difusi yang lebih cepat setelah penggunaan, dalam hal ini sesuai dengan data penetrasi NLC RSV F1, yang berpenetrasi lebih dalam dibandingkan formula yang lain.

Tahap terakhir uji stabilitas fisik sistem NLC resveratrol selama 60 hari, Pada pengujian ini diperiksa ukuran partikel, distribusi ukuran partikel dan pH, ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel dipilih sebagai parameter stabilitas nanopartikel karena berperan penting untuk evaluasi bentuk koloidal selama penyimpanan. Dari hasil pemeriksaan stabilitas ukuran partikel didapatkan hasil formula F2 dan F5 lebih stabil dibanding formula F1, F3, dan F4. Ketidakstabilan ukuran pada formula F1 dengan lipid cair minyak kedelai berkaitan dengan data XRD, dimana formula F1 lebih amorf dibanding formula yang lain, bentuk amorf

yang tinggi cenderung tidak stabil dan berubah menjadi bentuk kristal dari waktu ke waktu sehingga berpengaruh pada stabilitas ukuran partikel (Wu et al, 2011), Selain itu viskositas formula F1 lebih rendah dibanding formula F2, F3, F4 dan F5, rendahnya viskositas berpengaruh pada menurunnya stabilitas (Raymundo et al, (2001). Selain itu menurut teori sedimentasi hukum Stokes menyatakan bahwa nilai viskositas berbanding terbalik dengan kecepatan sedimentasi (Sinko, 2011). Kecepatan sedimentasi menggambarkan kecepatan terbentuknya aglomerat sehingga pada sistem dengan viskositas yang lebih rendah akan semakin mudah untuk terjadinya aglomerasi. Pada formula F3 dan F4 tidak stabil selama masa penyimpanan, apabila dilihat dari data penyimpanan terjadi peningkatan partikel dari waktu ke waktu, hal ini dihubungkan dengan teori ripening oswald mengenai pertumbuhan partikel, dimana partikel besar tumbuh mengorbankan partikel kecil menyebabkan pergeseran ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel menjadi lebih besar. Pada uji stabilitas distribusi ukuran partikel (PI), didapatkan distribusi ukuran NLC F1 dan NLC F3 tidak stabil dibanding dengan NLC F2, F4 dan F5. Hal ini terkait dengan data stabilitas ukuran partikel NLC F1 dan F3 yang tidak stabil sehingga berpengaruh pada ketidakstabilan distribusi ukuran partikel (PI). Selain itu ketidakstabilan distribusi ukuran partikel terkait dengan teori Ostwald Ripening yang sudah dijelaskan pada pembahasan diatas. Selanjutnya untuk hasil pengujian stabilitas pH NLC resveratrol, didapatkan pH semua formula stabil dan memenuhi rentang pH kulit 4-6 (Ali dan Yosipovitch, 2013).