

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan semua objek yang menjadi sasaran dalam penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (S-SNEDDS)* Naringenin.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari populasi yang diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini variasi komposisi Stearin dan Kolliphor EL dalam *solid* SNEDDS Naringenin.

B. Variabel dalam Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung. Variabel utama dari penelitian ini yaitu optimasi formula *solid* SNEDDS Naringenin dan karakterisasi *solid* SNEDDS Naringenin.

2. Klasifikasi variabel

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Stearin dan Kolliphor EL.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian ini dan memberikan respon jika dihubungkan dengan variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah *emulsification time*, persen tansmitan, uji disolusi, serta uji difusi dengan *dialysis bag*.

2.3 Variabel terkontrol. Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas.

Variabel terkendali dari penelitian ini adalah suhu dan kecepatan *magnetic stirrer* serta waktu pencampuran *solid SNEDDS*.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Naringenin yang diperoleh dari China PT. Thanen Chemicals) dengan kemurnian 98% (HPLC), Stearin (PT. BASF The Chemical Company), Kolliphor EL (PT.BASF The Chemical Company), PEG 1000 (PT.BASF The Chemical Company), Kalium dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Natrium monohidrat fosfat, Natrium hidroksida (NaOH), Metanol p.a, dan aquadestilata.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas (Pyrex), timbangan analitik (Ohaus PA213 ketelitian 1 mg dan Ohaus AV264 ketelitian 0,1 mg), termometer, spatel, pinset, *magnetic stirrer* (Thermo Scientific, China), *micropipet*, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10s, Thermo scientific), alat uji disolusi tipe II.

D. Jalannya Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Instrumen Universitas Setia Budi di Surakarta.

2. Pembuatan kurva kalibrasi

2.1 Pembuatan dapar fosfat pH 6,8. Sebanyak 0,5 gram kalium dihidroksi fosfat dimasukkan ke dalam beaker glass 1 liter, kemudian ditambah 8,86 natrium monohidrat fosfat dan ditambah aquadestilata hingga 1 liter. Derajat keasaman (pH) disesuaikan dengan asam fosfat 10% atau larutan NaOH 1N hingga diperoleh nilai pH 6,8 (USP. 2015).

2.2 Pembuatan dapar fosfat buffer saline pH 7,4. Sebanyak 8 gram NaCl; 0,2 gram KCl; 1,44 gram Na_2HPO_4 ; 0,24 gram KH_2PO_4 dimasukkan kedalam beaker glass 1 liter, kemudian ditambah 800 ml WFI atau air destilasi, dikocok hingga homogen menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit dan

ditambah dengan WFI atau air destilasi hingga 1 liter. Derajat keasaman (pH) dicek dengan pH meter yang sudah dikalibrasi hingga diperoleh nilai pH 7.4 (USP, 2015).

2.3 Pembuatan larutan HCl 0,1 N. Sebanyak 165 mL HCl 37,1% dimasukkan kedalam beakerglass 1 liter, kemudian tambahkan aquadestilata, dikocok hingga homogen. Masukkan ke dalam wadah masing-masing 250 mL kemudian tepatlan volume masing-masing wadah hingga sebanyak 5 liter. Volume akhir HCl 0,1 N adalah 20 liter.

2.4 Pembuatan larutan standar Naringenin. Larutan induk dibuat dengan menimbang seksama lebih kurang 50,0 mg standar Naringenin, kemudian dilarutkan metanol dalam labu ukur 50 mL sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 1.000 $\mu\text{g/mL}$, larutan tersebut dipipet 1 mL dan diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 sampai 100 mL sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ (larutan stok).

2.4 Penetapan panjang gelombang maksimum (*Wavelength*). Larutan stok Naringenin dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang antara 400-200 nm dengan dapar fosfat pH 7,4 sebagai blangko. Hasil *scan wavelength* menunjukkan nilai absorbansi tertinggi terdapat pada panjang gelombang maksimum.

2.5 Pembuatan larutan seri konsentrasi. Larutan stok diambil pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$, kemudian dibaca terlebih dahulu absorbansinya untuk mengetahui rentang seri konsentrasi yang akan digunakan. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh digunakan untuk pengukuran serapan Naringenin selanjutnya. Larutan stok 10 $\mu\text{g/mL}$ dibuat dalam seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 $\mu\text{g/mL}$ dengan diencerkan menggunakan dengan dapar fosfat pH 7,4 sampai 10 mL. Larutan seri dibaca serapannya masing-masing pada panjang gelombang maksimum Naringenin menggunakan dapar fosfat pH 7,4 sebagai blangko. Model obat masing-masing dibuat suatu fungsi antara konsentrasi obat ($\mu\text{g/mL}$) dengan nilai serapan dan menggunakan analisis regresi linear. Replikasi dilakukan 4 kali pada setiap seri konsentrasi.

3. Validasi metode spektrofotometer UV-VIS

3.1 Penentuan Akurasi dan Presisi. Pada model obat Naringenin 100 µg/mL, diambil 3 titik dari seri kurva kalibrasi yang mendekati (masing-masing dengan 3 replikasi) dan dimasukkan ke dalam labu takar 50 mL ditambahkan dapar phospat pH 7,4 sebanyak 25 mL dan dikocok selama 15 menit kemudian ditambahkan dapar phospat pH 7,4 sampai tanda batas 50 mL. Larutan dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum Naringenin terhadap dapar phospat pH 7,4 sebagai blangko. Nilai perolehan kembali (%) diperoleh dari persentase antara jumlah obat yang terukur dibandingkan dengan jumlah obat yang ditambahkan. Rata-rata perolehan kembali kemudian ditentukan dan dihitung nilai simpangan baku relatifnya. Nilai perolehan kembali yang diterima antara 85-115% dan nilai simpangan baku relative tidak lebih dari 2% (USP. 2017).

4. Pembuatan basis *solid* SNEDDS

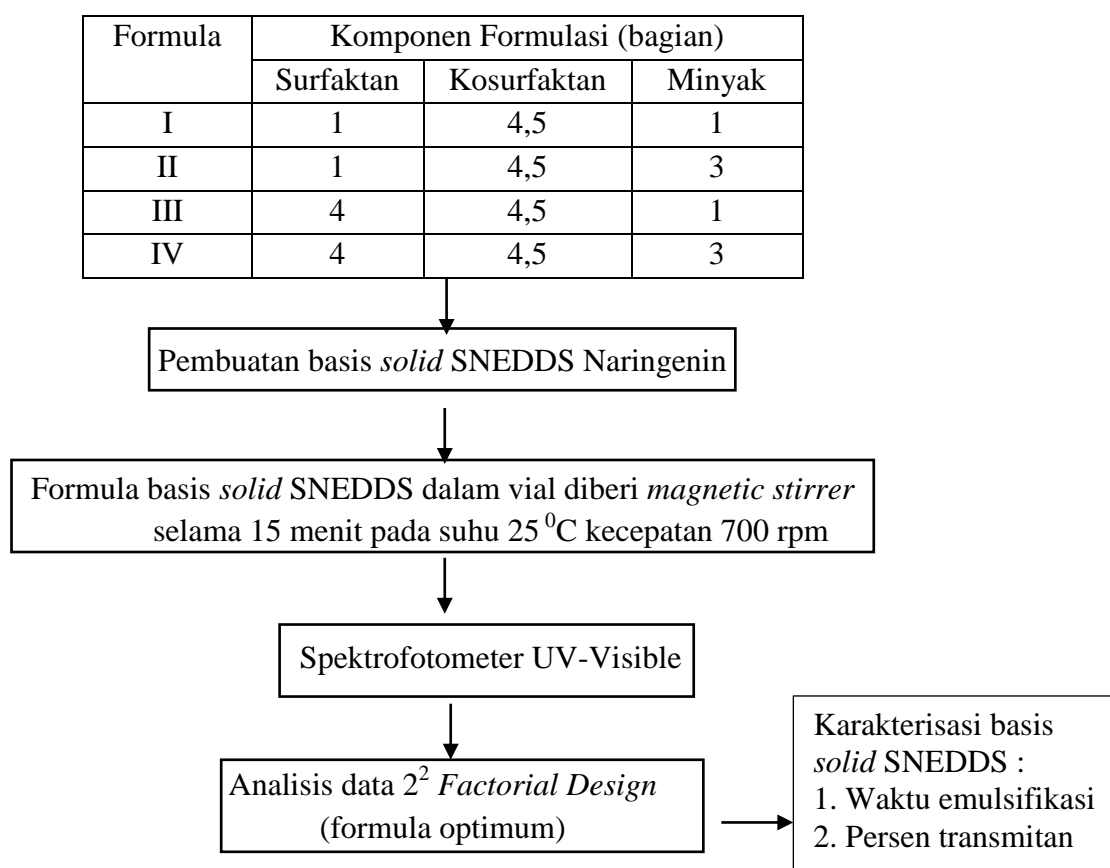
Basis *solid* SNEDDS terdiri dari Stearin sebagai minyak, Kolliphor EL sebagai surfaktan, dan PEG 1000 sebagai kosurfaktan. Tahap pertama dalam pembuatan basis *solid* SNEDDS yaitu masing-masing komponen ditimbang secara terpisah dengan berat total masing-masing yaitu 3 gram. Tahap selanjutnya, masing-masing campuran bahan dilebur pada waterbath suhu 50⁰C kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 5 menit dengan kecepatan 700 rpm.

5. Uji karakterisasi basis *solid* SNEDDS

Uji karakterisasi basis *solid* SNEDDS meliputi uji *emulsification time* dan diikuti persen transmittan yang diukur dengan panjang gelombang 633 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Seluruh formula basis *solid* SNEDDS yang telah dikarakterisasi kemudian dipilih yang paling optimum dengan optimasi menggunakan *Design Expert*.

5.1 *Emulsification time.* *Emulsification time* menggambarkan waktu yang dibutuhkan basis *solid* SNEDDS untuk membentuk nanoemulsi ketika bertemu dengan cairan saluran cerna. Sampel basis *solid* SNEDDS 0,05 g dan aquadestilata 5 ml dimasukkan dalam vial kemudian *distirrer* dengan kecepatan 500 rpm, kemudian catat waktu yang diperlukan untuk menjadi emulsi. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

5.2 Persen Transmitan. Pengujian persen transmitan dilakukan untuk mengukur kejernihan nanoemulsi yang terbentuk. Pengukuran persen transmitan merupakan salah satu faktor penting melihat sifat fisik nanoemulsi yang terbentuk. Hasil emulsifikasi dari uji *emulsification time* dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 633 nm menggunakan aquadestilata sebagai blangko. Hasil persen transmitan yang mendekati 100% menunjukkan sampel mendekati transmitan aquadestilata, maka sampel memiliki kejernihan yang menyerupai air. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.



Gambar 8. Skema pembuatan dan uji karakterisasi basis *solid* SNEDDS

6. Optimasi basis *solid* SNEDDS Naringenin

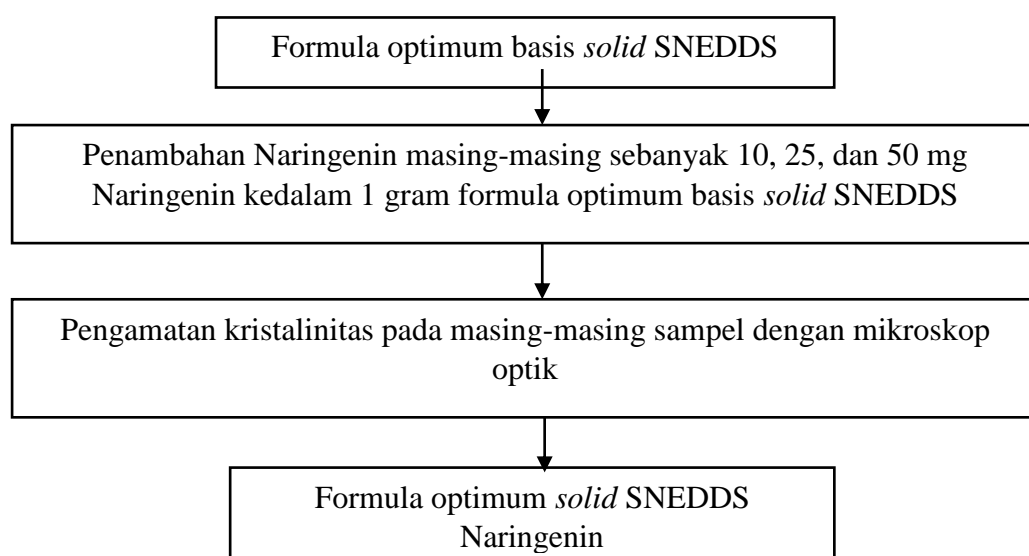
Data hasil optimasi basis *solid* SNEEDS dimasukkan ke dalam persamaan matematis untuk model *D-optimal design*. Parameter yang diperoleh dibuat *contour plotnya* berdasarkan persamaan masing-masing. Pemilihan model,

penilaian pengaruh dan interaksi antar komponen dengan taraf kepercayaan 95% ($p\text{-value} = 0,05$). *Contour plot* masing-masing parameter dijadikan satu (*superimposed contour plot*) sehingga dapat ditentukan daerah optimum dengan sifat basis *solid* SNEDDS. Data yang distribusinya tidak normal dilakukan proses transformasi sampai diperoleh residual data yang terdistribusi secara normal. Pengolahan data

optimasi menggunakan software *Design Expert* (*Stat-Ease Inc.; Minneapolis, MN*) versi 7.1.5” (Ainurofiq dan Choiri, 2018).

7. Uji kadar Naringenin dalam basis *solid* SNEDDS.

Pengujian muatan Naringenin dalam basis *solid* SNEDDS dilakukan untuk mengetahui banyaknya Naringenin yang mampu termuat ke dalam basis *solid* SNEDDS tanpa terbentuk kristal. Masing-masing sebanyak 20 mg, 25 mg, dan 50 mg Naringenin diinkorporasikan dalam 1 gram basis *solid* SNEDDS pada formula yang terpilih. Pengamatan kristalinitas dilakukan menggunakan mikroskop optik, kemudian dari hasil pengamatan dapat diketahui pada konsentrasi berapa Naringenin tersebut mampu termuat kedalam basis *solid* SNEDDS tanpa membentuk kristal. Pada ketiga konsentrasi tersebut jika ketiganya membentuk kristal, maka dibuat lagi rentang konsentrasi yang lebih tinggi hingga tidak ditemukan kristal. Bentuk kristal berpengaruh terhadap disolusi dan bioavailabilitas (Huang. 2014).



Gambar 9. Skema uji kadar Naringenin dalam basis *solid* SNEDDS

8. Pembuatan *solid* SNEDDS Naringenin

Tahap pertama dalam pembuatan *solid* SNEDDS Naringenin adalah ditimbang semua bahan. Konsentrasi Naringenin dijaga konstan pada semua formulasi sesuai dengan hasil uji kadar Naringenin dalam basis *solid* SNEDDS. Campuran minyak, surfaktan, dan kosurfaktan sebagai basis *solid* SNEDDS dibuat dengan perbandingan sesuai proporsi formulasi terpilih. Naringenin ditimbang akurat dan dicampurkan dalam Stearin, kemudian campuran surfaktan dan kosurfaktan ditambahkan ke dalam campuran obat-minyak. Tahap kedua, campuran bahan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit dengan kecepatan 700 rpm, setelah itu disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm.

9. Uji karakterisasi *solid* SNEDDS Naringenin

Uji karakterisasi *solid* SNEDDS Naringenin yang harus dilakukan adalah *emulsification time*, persen transmittan, uji difusi, dan uji disolusi. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali pada masing-masing pengujian.

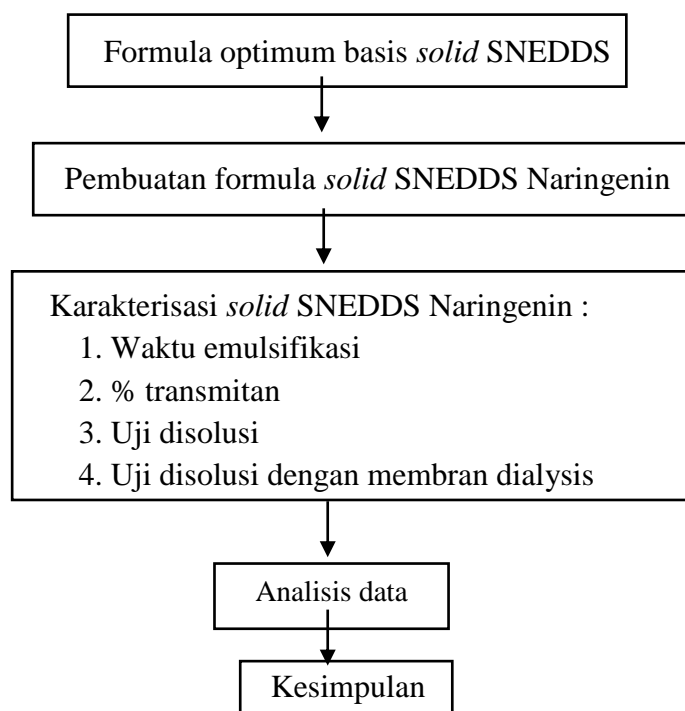
9.1 *Emulsification time*. Penentuan waktu emulsifikasi dilakukan dengan mencampur *solid* SNEDDS Naringenin 0,05 gram dengan 5 mL aquadestilata. Campuran dimasukan ke dalam erlenmeyer kemudian *distirrer* dengan kecepatan 500 rpm, kemudian dicatat waktu yang diperlukan untuk menjadi emulsi.

9.2 *Transmittan*. Hasil emulsifikasi dari uji *emulsification time* dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 633 nm menggunakan aquadestilata sebagai blangko. Hasil transmittan yang mendekati 100% menunjukkan sampel memiliki kejernihan yang menyerupai air.

9.3 Uji difusi dengan *dialysis bag*. Peningkatan persen terdifusi dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan membran dialysis dan larutan dapar fosfat buffer saline (pH 7,4) sebagai pengganti cairan darah. Penggunaan membran dialysis sebagai media uji karena membran dialysis memiliki ukuran pori sebesar 330 nm, hampir serupa dengan dengan membran mukosa yaitu sebesar 240 – 270 nm. Uji disolusi dilakukan dengan mengambil sampel tiap 1; 3; 5; 7; 10; 15; 20; 25; 30; 60; 90; 120 menit, kemudian dibaca absorbansinya

masing-masing pada panjang gelombang maksimum. Sampel yang diambil diganti medium yang baru dengan volume yang sama.

9.4 Uji disolusi. Uji disolusi dilakukan menggunakan alat uji disolusi tipe II dengan kecepatan putaran 50 rpm dalam 500 mL dapar HCl 0,1 N pada suhu 37°C. Diambil 5 mL aliquot pada waktu 1; 3; 5; 7; 10; 15; 20; 25; 30; dan 60 menit kemudian konsentrasi Naringenin diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya (Shah *et al.*, 2013; Reddy *et al.*, 2015). Dilakukan juga pengujian uji disolusi terhadap Naringenin murni dengan kondisi uji yang sama. Sampel yang diperoleh pada uji terhadap basis pada setiap interval waktu, digunakan sebagai blangko pada pengujian spektrofotometri UV sampel uji disolusi *solid* SNEDDS Naringenin.



Gambar 10. Skema pembuatan dan uji karakteristik *solid* SNEDDS