

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 tablet pitavastatin.

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 adalah *solid-SNEDDS supersaturable* Pitavastatin menggunakan adsorpsi mesoporous manitol.

B. Variabel 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 *liquid* dan *solid state supersaturable* SNEDSS Pitavastatin.

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 *liquid* SNEDDS, *solid* SNEDDS *supersaturable*.

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 pitavastatin, *emulsification time*, persen transmitan, dan *drug loading*.

2.3 Variabel terkontrol. Variabel terkontrol adalah variabel yang dapat dikendalikan sehingga mempengaruhi variabel tergantung dan variabel bebas.

Variabel terkontrol dari penelitian ini adalah suhu, kecepatan *magnetic stirrer* serta waktu pencampuran *solid* SNEDDS, kecepatan difusi ketika menggunakan *horizontal franz diffusion cells*.

3. Definisi operasional variabel utama

Solid state supersaturable SNEDDS Pitavastatin adalah suatu nanoemulsi yang mampu membentuk agitasi yang ringan ketika bertemu dengan media air, dengan ukuran < 300 nm. Teknik penghantar obat ini terdiri atas campuran isotropik antara obat, minyak, surfaktan dan ko-surfaktan yang disolidkan dengan bahan pengadsorben serta diuji dengan alat difusi yaitu *horizontal franz diffusion cells*.

Ukuran partikel merupakan ukuran droplet yang kecil akan memperluas permukaan kontak droplet dengan cairan lambung sehingga memudahkan enzim lipase untuk mencegah sistem sehingga pelepasan obat lebih cepat dibandingkan ukuran droplet yang besar. *Emulsification time* menggambarkan waktu yang dibutuhkan SNEDDS untuk membentuk nanoemulsi ketika bertemu dengan cairan saluran cerna.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Pitavastatin yang didapat dari Thahen Chemical (Changzhou, Cina), Metanol pro analisis, Tween 80, Capryol, Transcutol P, *Mesoporous* manitol, Dapar fosfat buffer saline pH 6,8 dan pH 7,4 menurut (USP 2015).

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus®), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu® UV-1280), *magnetic stirrer* (IKA® C-MAG HS 4), *horizontal franz diffusion cells* (Prima Medicha®), *stopwatch*, pH meter (Lutron® pH Electrode PE-03), Mikropipet, seperangkat alat kaca (Pyrex®), alat scanning electron microscopy (Model: JSM-5510Jeol Ltd, Tokyo, Jepang). Alat PSA (Horiba) dan Sentrifugasi.

D. Jalannya Penelitian

1. Tempat Penelitian

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

2. Pembuatan kurva kalibrasi

2.1 Pembuatan Dapar Phospat Buffer Saline. Pembuatan larutan dapar phospat buffer saline 1 L dilakukan dengan cara, menimbang semua bahan yaitu NaCl sebanyak 8 gram; KCl sebanyak 0,2 gram; Na₂HPO₄ sebanyak 1,44 gram; KH₂PO₄ sebanyak 0,24 gram, kemudian dimasukkan ke dalam wadah 1000 mL, ditambahkan 800 mL *water for injeksi* (WFI)/ Aquadestilata dan dikocok sampai homogen dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit. Kemudian ditambahkan WFI/ Aquadestilata sampai 1000 mL, kemudian di cek pH BPS dengan pH meter yang sudah dikalibrasi sebelumnya hingga diperoleh larutan dapar phospat pH 7.4 sebanyak 1 L dan pembuatan PBS diulangi hingga diperoleh larutan dapar phospat pH 6,8 sebanyak 1 L.

2.2 Pembuatan larutan induk Pitavastatin. Standar Pitavastatin ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan dalam metanol di labu takar 10 mL. Didapat larutan dengan konsentrasi 5000 µg/mL. Larutan tersebut dilakukan pengenceran 50x dengan cara dipipet 1 mL dan diencerkan dengan metanol dalam labu takar 50 mL sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 µg/mL.

2.3 Pembacaan panjang gelombang maksimal. Mengambil dari larutan stok Pitavastatin 100 µg/mL di ambil 1 mL kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu takar 10 mL, sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 10 µg/mL. Larutan tersebut dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-300 nm. Hasil *scan wavelength* menunjukkan nilai absorbansi tertinggi terdapat pada panjang gelombang maksimum.

2.4 Pembuatan larutan seri kurva kalibrasi. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh digunakan untuk pengukuran serapan pitavastatin selanjutnya. Dari larutan 100 µg/mL, dipipet masing-masing 0,1 mL; 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; 1 mL dan 1,2 mL, kemudian diencerkan dalam methanol masing-masing dalam labu takar 10 mL sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 1

$\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ dan 12 $\mu\text{g/mL}$. Larutan tersebut kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Visibel dengan panjang gelombang sebelumnya. Selanjutnya dibuat persamaan regresi liniernya.

3. Validasi metode spektrofotometer UV-Visibel

Validasi metode UV untuk metode validasi berdasarkan berbagai parameter seperti akurasi dan presisi.

3.1 Studi pemulihan akurasi. Metode untuk sampel obat yang diketahui jumlah pitavastatin sesuai dengan 80, 100, 120% dimana konsentrasi yang terpilih adalah 6 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$ dan 10 $\mu\text{g/mL}$ dengan pengukuran panjang gelombang sebelumnya, pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali. Nilai perolehan kembali (% *recovery*) yang diterima berdasarkan *Association of Official Analytical Chemists* (2002) yaitu antara 85-115% dan nilai simpangan baku relative tidak lebih dari 2%

3.2 Penentuan presisi. Dalam studi antar-hari, sepuluh larutan yang berbeda dengan konsentrasi yang sama dari 1 konsentrasi terpilih pada pengujian akurasi disusun dan dianalisis, kemudian absorbansi yang didapat dicatat.

4. Pembuatan SNEDDS Pitavastatin

Pembuatan supersaturable SNEDDS dibuat dengan komponen minyak, surfaktan dan ko-surfaktan yaitu, capryol 2,337 mL, tween 80 3,659 mL dan transcutool P 4,004 mL dengan cara masing-masing komponen tersebut setelah diambil dicampur menggunakan *magnetic stirrer* IKA C-MAG HS7 (Staufen, Jerman) selama 5 menit, kemudian serbuk PVT ditambahkan berlebih sampai tercapainya kondisi jenuh (pencampuran selama 72 jam pada suhu 26°C). Campuran tersebut disentrifugasi (Waltham, MA) dan supernatan diambil sebagai *liquid SNEEDS supersaturable*. Jumlah PVT yang terkandung di dalam formulasi S-SNEDDS ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Visibel setelah pengenceran dengan metanol pada panjang gelombang 245 nm (Kuncahyo *et al.* 2018). Hasil ini kemudian dilakukan karakterisasi terhadap ukuran partikel, zeta potensial, waktu emulsifikasi, *drug load*.

5. Uji karakteristik SNEDDS Pitavastatin

5.1 Waktu emulsifikasi. Waktu emulsifikasi menggambarkan waktu yang dibutuhkan SNEDDS untuk membentuk nanoemulsi ketika bertemu dengan cairan saluran cerna. Supernatan formula SNEDDS pitavastatin diambil 100 mL diteteskan vial yang sudah berisi aquadestilata 10 mL dan diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 500 rpm pada suhu 37°C. Diamati secara visual kejernihan dan diukur waktu terbentuknya nanoemulsi.

5.2 Drug loading. Supernatan diambil 20 mL kemudian diencerkan dengan metanol 1 mL. dilakukan pengenceran dari larutan sebelumnya dengan cara diambil 20 mL kemudian ditambahkan metanol 3 mL. Sampel dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Visibel pada $\lambda = 245$ nm. Konsentrasi formula SNEDDS dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear yang telah dibuat pada kurva kalibrasi.

5.3 Persen transmittan (%T). Pengujian % transmittan dilakukan dengan mengukur kejernihan nanoemulsi yang terbentuk. Hasil uji emulsification time dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 633 nm menggunakan aquadestilata sebagai blangko. Jika hasil transmittan mendekati 100% maka sampel mendekati transmittan aquadestilata.

5.4 Ukuran droplet dan potensial zeta. Sampel dari hasil filtrasi diambil dan dimasukkan dalam botol kaca 20 mL. Aquadestilata ditambahkan dengan perbandingan 1 : 10 dan dicampur selama 1 menit menggunakan *cyclo mixer*. Ukuran tetes dari emulsi ditentukan pada 25°C dengan teknik hamburan cahaya dinamis (DLS) di sudut 90° dan potensial zeta ditentukan dengan teknik hamburan cahaya elektroforesis menggunakan *malvern zeta sizer nano ZS90*.

6. Pembuatan mesoporous manitol pitavastatin

Pembuatan mesoporous manitol dilakukan dengan metode *spray drying*. Manitol 92,5% dan amonium karbonat 7,5% dilarutkan dalam aquadestilata pada konsentrasi *solid* total 15% b/v. Spray drying dikondisikan pada suhu 120 dan 50°C dengan aspirator 90%, tingkat pompa 25% dan tekanan -50 mBar. Manitol

yang dipadatkan dikumpulkan dan disimpan pada desikator (Kuncahyo *et al.* 2018).

7. Solidifikasi *Solid* SNEDDS Pitavastatin

Solidifikasi dilakukan dengan cara menimbang 5 gram baham adsorben serbuk mesoporous manitol larut dalam air ditimbang seksama. Kemudian formula *liquid* SNEDDS dicampur sampai homogen, adsorben serbuk mesoporous manitol yang larut dalam air ditambahkan dengan hati-hati menggunakan spatula. S-SNEDDS yang dihasilkan dari dilakukan karakterisasi terhadap *drug load*, waktu emulsifikasi, ukuran droplet, zeta potensial, SEM.

8. Karakterisasi *solid* SNEDDS pitavastatin

8.1. Emulsification time. S-SNEDDS diambil 100 mL diteteskan vial yang sudah berisi aquadestilata 10 mL dan diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 500 rpm pada suhu 37°C. Diamati secara visual kejernihan dan diukur waktu terbentuknya nanoemulsi.

8.2. Drug loading. S-SNEDDS yang mengandung pitavastatin ditimbang secara seksama setara dengan 4 mg dan dilarutkan dengan metanol. Larutan disonikasi selama 10 menit dan disaring. Absorbansi filtrat diukur pada $\lambda = 245$ nm menggunakan spektrofotometer UV-Visibel.

8.3. Ukuran droplet dan zeta potensial. S-SNEDDS ditimbang secara seksama sebanyak 40 mg dan diencerkan dengan 100 mL aquadestilata dalam tabung reaksi dan dicampur selama 1 menit menggunakan *cyclo mixer*. Ukuran tetesan dari nanoemulsi ditentukan pada 25°C dengan teknik hamburan cahaya dinamis (DLS) di sudut 90° dan potensial zeta ditentukan dengan teknik hamburan cahaya elektroforesis menggunakan *malvern zeta sizer nano ZS90*.

8.4. SEM. Morfologi permukaan PVT diperiksa yang meliputi serbuk mesoporous manitol dan S-SNEDDS. Gambar diambil pada tegangan eksitasi 20 kv menggunakan Quanta FEG 250 *scanning electron microscope* (FEI, USA).

9. Pengujian difusi S-SNEDDS pitavastatin

Uji pelepasan dilakukan menggunakan sel difusi franz dengan mekanisme kerjanya kompartemen aseptor diisi dengan dapar phospat pH 7,4 dan dijaga suhunya $37 \pm 0,5$ °C, serta diaduk dengan stirrer dengan kecepatan yang sama.

Membran selofan diletakkan di antara kompartemen donor dan kompartemen aseptor (Agustin *et al.* 2014 Sampel uji dilakukan penyamplingan pada waktu 0; 0,05; 0,08; 0,12; 0,17; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; dan 6 dalam satuan jam dari kompartemen aseptor menggunakan pipet mikro dan segera digantikan dengan dapat phospat pH 7,4 sejumlah volume yang sama. Sampel dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Visibel pada $\lambda = 245$ nm (Kuncahyo *et al.* 2018).

E. Metode Analisa

Berdasarkan hasil uji karakteristik *nano-emulsifying* Pitavastatin dengan komponen minyak, surfaktan dan ko-surfaktan (Capryol, Tween 80 dan Transcutol P) meliputi uji *emulsification time*, transmitan, ukuran droplet, potesial zeta formula S-SNEEDS masing-masing dibandingkan dengan persyaratan pada pustaka serta dianalisis menggunakan uji statistik dengan *Independent T-Test* menggunakan progam SPSS 21 dengan taraf kepercayaan 95%.