

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian dari benda nyata, abstrak, peristiwa dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi sampel dalam penelitian ini adalah kristal sferis loratadin.

Sampel adalah bagian dari populasi yang ingin diteliti, yang ciri dan keberadaannya mampu mewakili populasi sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kristal sferis yang dibuat dengan variasi konsentrasi polimer.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Identifikasi variabel utama memuat identifikasi dari variabel yang diteliti langsung. Variabel utama dari penelitian ini dengan variasi konsentrasi polimer.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel terganggu. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi polimer PVP.

Variabel terganggu adalah titik pusat permasalahan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel terganggu dalam penelitian ini adalah karakteristik kristal *sferis* meliputi : topografi permukaan partikel, sifat kristalinitas, kelarutan dan rendemen.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel terganggu selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak menyebar dan dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah proses pembuatan kristal sferis, alat, suhu, pengadukan, penambahan larutan *bridging*, penambahan polimer.

### 3. Definisi Operasional Variabel Utama

Loratadin adalah obat yang digunakan untuk meredakan gejala-gejala yang berkaitan dengan rhinitis alergi seperti bersin-bersin pilek (*rhinorea*) dan rasa gatal pada hidung, demikian juga rasa gatal dan tanda-tanda urtikaria kronis serta penyakit-penyakit dermatologis lainnya.

*Spherical Agglomeration* adalah teknik yang digunakan untuk memperbaiki kelarutan obat dengan cara mengubah kristal secara langsung menjadi bentuk sferis yang didapatkan selama tahap kristalisasi.

Mikroskop optik adalah alat yang digunakan secara sederhana untuk melihat bentuk dari partikel obat.

SEM (Scanning Electron Microscopy) adalah analisis untuk menggambarkan sampel dengan perbesaran hingga puluhan ribu kali untuk melihat ukuran partikel yang tersebar.

Uji XRD (X-ray diffraction) adalah metode analisa untuk mengidentifikasi fase kristal, jenis struktur, susunan atom dalam material dengan cara menentukan parameter struktur kisi.

Kelarutan adalah kuantitas maksimal suatu zat kimia terlarut (solut) untuk dapat larut pada pelarut tertentu membentuk larutan homogen.

Rendemen adalah presentase produk yang di dapatkan dari perbandingan berat awal bahan dengan berat akhirnya.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik (Ohaus), *magnetic stirrer*, mikroskop binokuler, SEM (Scanning Electron Microscopy), Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10s, Thermo scientific), XRD, alat-alat gelas (Pyrex, Jepang), pH meter dan alat non gelas yang terdapat di laboratorium.

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Loratadin (PT. Meprofarm, Indonesia), DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*), Etil Asetat, PVP (*Polyvinil Piroolidon*), aquadest (semua bahan berkualitas farmasi).

## D. Rencana Penelitian

### 1. Percobaan Pendahuluan

Percobaan pendahuluan dilakukan untuk menentukan kondisi percobaan terbaik dan komposisi bahan yang sesuai untuk menghasilkan kristal sferis yang baik. Pembuatan kristal sferis menggunakan metode *spherical agglomeration*. Percobaan pendahuluan yang dilakukan yaitu menggunakan DMSO untuk melarutkan loratadin dan skrining penggunaan variasi konsentrasi polimer.

### 2. Formulasi Kristal Sferis Loratadin

Formulasi kristal sferisloratadin disajikan dalam tabel berikut :

**Tabel 1. Formula kristal sferis loratadin**

Bahan	F1	F2	F3
Loratadin	1 gram	1 gram	1 gram
PVP (%)	3 ml	5 ml	7 ml
DMSO	5 ml	5 ml	5 ml
Etil Asetat	1 ml	1 ml	1ml

### 3. Pembuatan Kristal Sferis Loratadin

Pembuatan kristal sferis diawali dengan melarutkan serbuk loratadin dengan pelarut DMSO sebagai *good solvent* menggunakan *magnetic stirrer* sampai menghasilkan larutan jenuh, endapan disaring dengan kertas saring whatman no 41, filtrat ditambahkan larutan polimer PVP yang sudah dilarutkan dengan aquadest. Selanjutnya ditambahkan etil asetat sebagai *bridging solvent* tetes demi tetes, di *stirrer* hingga terbentuk kristal yang stabil.

### 4. Karakterisasi Kristal Sferis Loratadin

**4.1. Uji morfologi dengan mikroskop optik.** Uji organoleptis secara mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop Nikon E50iPol, dipindai dengan menggunakan Nikon DS-Fil dan ditampilkan dengan digital sight DS-U2. Dengan cara meneteskan 1 tetes sampel pada *object glass* kemudian ditutup dengan *deck glass* dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x, untuk melihat bentuk dari kristal sferis loratadin.

**4.2. Uji (Scanning Electron Microscopy).** Topografi permukaan, jenis kristal (polimorfisme) dari kristal bulat dianalisis oleh menggunakan scanning electron microscopy (SEM). Uji SEM (Scanning Electron

Microscopy) adalah analisis untuk menggambarkan sampel dengan perbesaran hingga puluhan ribu kali. Dengan analisis SEM dapat melihat ukuran partikel yang tersebar pada sampel. SEM (Scanning Electron Microscopy) bekerja dengan memanfaatkan electron sebagai sumber cahaya untuk membentuk sampel. Sampel yang ditembak akan menghasilkan penggambaran dengan ukuran hingga ribuan kali lebih besar. Instrumen SEM lebih sering digunakan karena memiliki resolusi yang tinggi dalam menggambarkan permukaan suatu partikel dengan perbesaran 20 – 500.000 kali.

**4.3. Uji XRD (X-ray diffraction).** Difraksi sinar X adalah suatu metode analisa digunakan untuk mengidentifikasi fase kristal, jenis struktur, susunan atom dalam material dengan cara menentukan parameter struktur kisi serta untuk mendapatkan partikel. Teknik ini penting untuk membangun reproduktifitas batch-ke-batch dari bentuk kristal, XRD obat murni dan aglomerat direkam menggunakan sistem difraktometer. Prinsip kerja dari XRD ini menggunakan difraksi sinar X yang dihamburkan oleh sudut kristal material yang diuji..

**4.4. Penentuan % rendemen dari kristal sferis loratadin.** Kristal sferis loratadin dikeringkan di dalam oven suhu 40°C sampai kering. Kemudian setelah kering ditimbang bobotnya sehingga diperoleh berat kering dan dihitung persen rendemennya.

**4.5. Uji kelarutan.** Pengujian dilakukan terhadap loratadin standar dan kristal sferis loratadin. Ditimbang sejumlah 50 mg loratadin standar dan kristal sferis loratadin kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* 50 ml yang telah berisi 50 ml dapar fosfat 6,8, di *stirrer* selama 1 jam dengan kecepatan 100 rpm. Larutan kemudian disaring dengan kertas saring whatman no 41 dan diencerkan, filtrat yang dihasilkan dianalisis secara spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum.

## **5. Pembuatan kurva baku loratadin dengan metode spektrofotometri UV**

**5.1. Pembuatan larutan dapar fosfat pH 6,8.** Sebanyak 6,8 gram kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dan 2 gram natrium hidroksida (NaOH) masing-masing dimasukkan pada labu ukur 250 ml kemudian dicukupkan dengan aquadest sampai tanda batas, sehingga didapat kalium dihidrogen fosfat dan

NaOH 0,2 M. Larutan kalium dihidrogen fosfat 0,2 M dimasukkan pada beaker glass yang telah dikalibrasi 1 liter, kemudian dicek pH dengan alat pH meter dan ditambahkan larutan NaOH 0,2 M  $\pm$  2 ml dicukupkan dengan aquadestillata (Depkes 2014).

**5.2. Pembuatan larutan induk loratadin.** Pembuatan larutan induk loratadin dibuat dengan menimbang seksama 9,5 mg serbuk loratadin murni, dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml, dilarutkan sedikit dengan etanol lalu dicukupkan sampai tanda batas dengan dapar fosfat pH 6,8.

**5.3. Penetapan panjang gelombang maksimum.** Larutan induk dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan dengan nilai serapan yang paling tinggi pada pelarut dapar fosfat pH 6,8.

**5.4. Penetapan *operating time*.** Penetapan *operating time* bertujuan untuk mengetahui kestabilan reaksi suatu senyawa. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk loratadin pada panjang gelombang maksimum loratadin, dibaca mulai dari menit 0 sampai menit didapatkan nilai serapan yang stabil.

**5.5. Pembuatan larutan seri kurva kalibrasi.** Seri konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8ppm, 10 ppm, 12 ppm dan 14ppm. Pembuatan seri konsentrasi dilakukan dengan cara dipipet dengan pipet ukur sebanyak 0,42 ml; 0,63 ml; 0,84 ml; 1,0; 1,2 ml dan 1,4 ml dari larutan induk lalu dimasukkan dalam labu takar 10 ml, ditambahkan dapar fosfat pH 6,8 sampai tanda batas labu takar 10 ml, kemudian dihomogenkan. Seri larutan kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum loratadin, lalu dibuat kurva regresi linier antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi loratadin sehingga diperoleh persamaan regresi linier

## **6. Uji Validasi Metode Spektrofotometri UV-Vis**

**6.1 Linearitas (Linearity).** Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan induk loratadin yaitu pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat persamaan regresi linier dan ditentukan koefisien korelasi (nilai r). Hasil ini selanjutnya digunakan untuk menentukan linearitas

yaitu dengan membandingkan nilai  $r$  hitung dengan nilai  $r$  tabel pada taraf kepercayaan 95%. Nilai linearitas dikatakan baik dan dapat digunakan untuk menghitung akurasi serta presisi bila  $r$  hitung  $>$   $r$  tabel.

**6.2 Penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan batas kuantifikasi (LOQ).** Batas deteksi dan batas kuantifikasi penetapan kadar obat loratadin ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan membuat lima seri konsentrasi dibawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai  $b$  (*slope*) pada persamaan regresi linear  $y = a + bx$ , sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residual ( $S_{y/x}$ ). Batas deteksi dan kuantifikasi dapat ditentukan dengan persamaan :

$$\text{LOD} = \frac{3 S_{y/x}}{b} \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_{y/x}}{b} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan :

$S_{x/y}$  = simpangan baku residual dari serapan

$B$  = slope persamaan regresi linier kurva kalibrasi

**6.3 Akurasi.** Pengujian akurasi dilakukan dengan sampel yang terpilih kemudian dimasukkan kedalam labu takar ditambahkan dapar fosfat pH 6,8 sampai 10 ml kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum. Diulang sebanyak 3 kali dan dihitung % akurasi. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali.

$$\% \text{ Perolehan Kembali} = (C1-C2)/C3 \times 100 \%$$

Keterangan

C1 = Konsentrasi sampel + baku

C2 = Konsentrasi sampel sebenarnya

C3 = Konsentrasi baku yang ditambahkan

Metode validasi memenuhi syarat jika persen perolehan kembali dengan nilai rentang 80-120%.

**6.4 Presisi.** Pengujian dilakukan pada tingkat keterulangan dengan cara mengukur kadar larutan baku dengan konsentrasi tertentu pada 3 waktu yang berbeda dalam satu hari (*intraday*) dengan pengulangan 3 kali serta pengukuran

larutan baku dengan konsentrasi yang sama selama 3 hari berturut-turut (*Interday*) dengan pengulangan 3 kali. Nilai RSD antara 1-2 % biasanya dipersyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah yang banyak, sedangkan untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, RSD berkisar antara 5-15 %.

Presisi dinyatakan dengan persen simpangan baku relatif (% RSD) atau persen koefisien variasi.

$$\% \text{ RSD} = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \%$$

Keterangan :

RSD = Simpangan baku relatif

S = Simpangan baku

$\bar{x}$  = Nilai rata-rata pengukuran

### E. Jalan Penelitian

Gambar 10. Skema jalannya penelitian





