

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Gemfibrozil yang diperoleh dari PT.Phapros Semarang, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kristal sferis Gemfibrozil dengan berbagai konsentrasi PVP.

B. Variable Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama memuat indentifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama dari penelitian ini adalah kristal sferis gemfibrozil.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi polimer

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variable tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak menyebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah metode pembuatan kristal sferis (alat, lama pencampuran, kecepatan putaran mixer), pemilihan pelarut (pelarut baik, pelarut buruk, briging), dan metode uji disolusi (suhu, intensitas pengadukan, volume medium, jenis medium).

Variabel tergantung adalah titik permasalahan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah karakterisasi kristal sferis yaitu uji SEM, uji mikroskop, dan uji XRD.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, gemfibrozil adalah obat untuk mengobati hiperlipidemia, yaitu kondisi ketika kadar lemak(seperti kolesterol dan trigliserida) dalam darah terlalu tinggi yang diambil dari PT. Phapros Semarang, Jawa Tengah.

Kedua, *spherical agglomeration* adalah teeknik yang digunakan untuk memperbaiki kelarutan dengan mengubah bentuk kristal obat menjadi bentuk kristal sferis.

Ketiga, Mikroskop adalah alat yang digunakan untuk melihat bentuk dan ukuran partikel secara sedrhana.

Keempat, *Scanning Electron Mikroskop* (SEM) adalah mikroskop elektron yang digunakan untuk menggambarkan sampel dengan perbesaran hingga puluhan ribu kali.

Kelima, *X-ray Difragtion* (XRD) adalah suatu metode analisa yang digunakan untuk mengidentifikasi fasa kristalin dalam material dengan cara menentukan parameter struktur kisi serta untuk mendapatkan ukuran partikel.

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

Ketuju, Rendemen adalah persentase produk didapatkan dari perbandingan berat akhirnya.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Neraca analitik Ohaus PA213, Stopwatch, pH meter, Spektro UV-Vis Shimadzu 1800(Tokyo, Jepang), mikroskop, *Magnetic*, Labu takar, FEI Quanta 200 Scanning Electron Mikroskop (SEM), X-ray Difrraction D2 Phaser bruker, alat-alat gelas (*Pyrex, Jepang*) dan non gelas pendukung lainnya.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Gemfibrozil (PT. Phapros), etanol, aquadest, etil asetat, PVP, PVA, PEG serta bahan-bahan lain yang digunakan untuk uji kelarutan dan validasi metode.

D. Jalannya Penelitian

1. Percobaan pendahuluan

Percobaan pendahuluan dilakukan untuk menentukan polimer pada pembuatan kristal sferis gemfibrozil menggunakan metode *spherical agglomeration* dengan dilakukakan percobaan terlebih dahulu terhadap polimer yang digunakan. Percobaan dilakukan dengan mengubah variasi polimer yang digunakan pada setiap formula sehingga akan diperoleh kristal yang sferis pada saat diamati menggunakan mikroskop optik.

2. Formula *Spherical Cristalization Agglomeration*

Tabel 1. Formula *Spherical Cristalization Agglomeration* dengan brigging dan polimer

Bahan	F1	F2	F3
Gemfibrozil (gr)	2	2	2
Etanol (mL)	2	2	2
Etil Asetat (mL)	1,5	1,5	1,5
PVP 2%(mL)	10	-	-
PVA 2%(mL)	-	10	-
PEG 4000 2% (mL)	-	-	10

Pembuatan formulasi *Spherical cristal agglomeration* diawali dengan mencampurkan larutan baik terlebih dahulu yaitu etanol, cairan buruk yaitu air, cairan penghubung etil asetat kemudian polimer yaitu PVP, PVA, dan PEG 4000.

3. Pembuatan kristal sferis gemfibrozil

Pembuatan kristal sferis gemfibrozil diawali dengan percobaan pendahuluan terlebih dahulu untuk mengetahui komposisi yang terbaik dari bahan yang tepat. Sehingga dalam pembuatan kristal sferis gemfibrozil yang didapatkan sediaan yang stabil. Kondisi yang harus diperhatikan dalam pembuatan kristal sferis adalah saat dilakukan pengadukan, waktu pengadukan, polimer dan komposisi bahan yang dipakai untuk pembuatan kristal sferis.

Percobaan kristal sferis, tahap pertama yang dilakukan adalah melarutkan serbuk gemfibrozil dengan pelarut etanol sebagai *good solvent* dengan dilakukan pengadukan hingga diperoleh larutan jenuh, lalu disaring menggunakan whatman no 41 kemudian melarutkan polimer (PVP, PVA, PEG 4000) pada aquadest. Tahap kedua adalah mencampurkan larutan gemfibrozil dengan larutan polimer

sebagai *poor solvent* dan dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 500 rpm selama 30 menit kemudian ditambahkan etil asetat sebagai *briggig solvent* dan menambahkan kecepatan menjadi 600 rpm selama 1,5 jam terbentuk kristal yang stabil. Kristal disaring menggunakan kertas saring, dikeringkan dengan suhu ruang selama 24 jam.

4. Evaluasi kristal sferis gemfibrozil

4.1 Uji mikroskop. Uji organoleptis secara mikroskop dilakukan menggunakan mikroskop Leica. Dengan cara mengambil sedikit sampel letakkan pada *object glass* kemudian ditutup dengan *deck glass* dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10x, 40x, 100x untuk melihat bentuk kristal sferis gemfibrozil.

4.2 Uji SEM (*Scanning Electron Microscopy*). Uji SEM (*Scanning Electron Microscopy*) adalah analisis untuk penggambaran sampel dengan perbesaran hingga puluhan ribu kali. Dengan analisis SEM dapat melihat ukuran partikel yang tersebar pada sampel. SEM bekerja dengan memanfaatkan elektron sebagai sumber cahaya untuk menembak sampel. Sampel yang ditembak akan menghasilkan penggambaran dengan ukuran hingga ribuan kali lebih besar.

4.3 Uji kelarutan. Ditimbang 50 mg aglomerat gemfibrozil dimasukkan dalam erlenmeyer 100ml ditambah 50 ml dapar fosfat 7,5 kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Larutan yang dihasilkan kemudian disaring melalui kertas saring Whatman no.41 dan selanjutnya diencerkan dengan dapar fosfat 7,5. Amati absorbannya dan tentukan kadarnya melalui spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 274 nm.

4.4 Penentuan % rendemen dari kristal sferis gemfibrozil. Dilakukan dengan cara menimbang kristal sferis gemfibrozil dari larutan kristal sferis gemfibrozil yang dikeringkan dalam oven pada suhu 40⁰C sebelumnya dan dibagi bobot gemfibrozil awal dikali 100% dihitung rendemen.

4.5 Difraksi sinar-X (*X-ray Diffraction*). Sampel kristal sferis dikarakterisasi secara difraksi sinar-X serbuk menggunakan difraktometer Philip PW-1710 dengan sumber radiasi Cu; tegangan 40 kV; arus 30 mA. Mula-mula alat X-ray difraktometer dan komputer sebagai kontrol otomatis dengan sebagai

pengolah data dihidupkan, kemudian sampel diletakkan pada *holder* bentuk lempeng yang terbuat dari aluminium. Permukaan sampel diratakan sejajar dengan permukaan atas *holder*. *Holder* yang berisi sampel dimasukkan dalam Goniometer kemudian dilakukan pengukuran dengan alat *X-ray difraktometer*. Difraktogram akan terbaca secara otomatis pada komputer.

5. Pembuatan Kurva kalibrasi

5.1 Pembuatan dapar phosphat. Ditimbang sebanyak 6,8 gram kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dan NaOH sebanyak 1,6 gram dimasukkan dalam beaker glass 1 liter ditambahkan aquadest ad 1 liter. Derajat keasaman (pH) disesuaikan dengan asam fosfat 10% atau larutan NaOH hingga diperoleh pH 7,5.

5.2 Pembuatan larutan induk. Larutan induk dibuat dengan menimbang teliti Gemfibrozil sejumlah 10 mg dan dilarutkan dalam etanol 1mL. Selanjutnya, masukkan secara kuantitatif kedalam labu ukur 100 mL ditambahkan larutan dapar pospat pH 7,5 hingga tepat tanda. Kocok sampai homogen.

5.3 Penetapan panjang gelombang maksimum. Larutan induk gemfibrozil dibaca dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan dengan nilai serapan yang paling tinggi.

5.4 Penetapan operating time. Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui kestabilan reaksi suatu senyawa. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk gemfibrozil pada panjang gelombang maksimum gemfibrozil, dibaca serapannya mulai dari menit 0 sampai 30 menit.

5.5 Kurva baku. Larutan baku kerja gemfibrozil dibuat dengan konsentrasi 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm, 100ppm, 120ppm. Larutan induk gemfibrozil dipipet dengan pipit ukur 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; 1 mL; 1,2 mL kemudian diencerkan dengan larutan dapar pH 7,5 masing-masing dalam labu takar 10mL. Seri larutan tersebut kemudian diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum gemfibrozil. Serapan yang diperoleh dibuat kurva regresi linier antara konsentrasi larutan induk gemfibrozil dengan serapannya sehingga diperoleh persamaan regresi linier. Penentuan konsentrasi (x) untuk setiap pengukuran diperoleh dengan cara menghitung nilai x yang

diperoleh pada persamaan regresi linier kurva standart yang diperoleh, dimana y adalah nilai absorbansi larutan.

6. Verifikasi metode analisis

6.1 Linearitas. Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu konsentrasi seri larutan induk gemfibrozil yaitu 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat persamaan garis regresi linier antara absorbansi terhadap konsentrasi larutan induk 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 dihitung >r tabel.

6.2 Presisi. Pengujian presisi yang dilakukan adalah kategori keterulangan (repeatability) analisis terhadap suatu sampel yang homogen. Presisi dapat dinilai dengan menggunakan minimum 9 penentuan. Ketelitian ditentukan sebagai simpangan baku (SD) atau koefisien variasi (KV). Ketelitian untuk keperluan analisis dikatakan baik jika $KV < 2\%$.

6.3 Akurasi. Pengujian akurasi dilakukan dengan membuat sampel obat yang telah diketahui jumlahnya kemudian masing-masing dimasukkan kedalam labu takar ditambah dengan dapar fosfat sampai 10 mL. Diambil 1 mL dimasukkan dalam labu takar ditambahkan dapar fosfat sampai 10 mL. Kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum. Diulang sebanyak 3 kali untuk masing-masing konsentrasi. Hitung nilai % akurasi. Akurasi diukur dengan perhitungan :

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

Ket :

C1 = konsentrasi sampel + baku

C2 = konsentrasi sampel sebenarnya

C3 = konsentrasi baku yang ditambahkan

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

6.4. Penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan batas kuantitas (LOQ). Batas deteksi deteksi dan batas kuantitas penetapan kadar gemfibrozil ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan membuat lima seri konsentrasi dibawah konsentrasi terkecil pada uji linieritas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai b(slope) pada persamaan regresi linier $y= a+bx$, sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x). Batas deteksi dan kuantifikasi dapat ditentukan dengan persamaan:

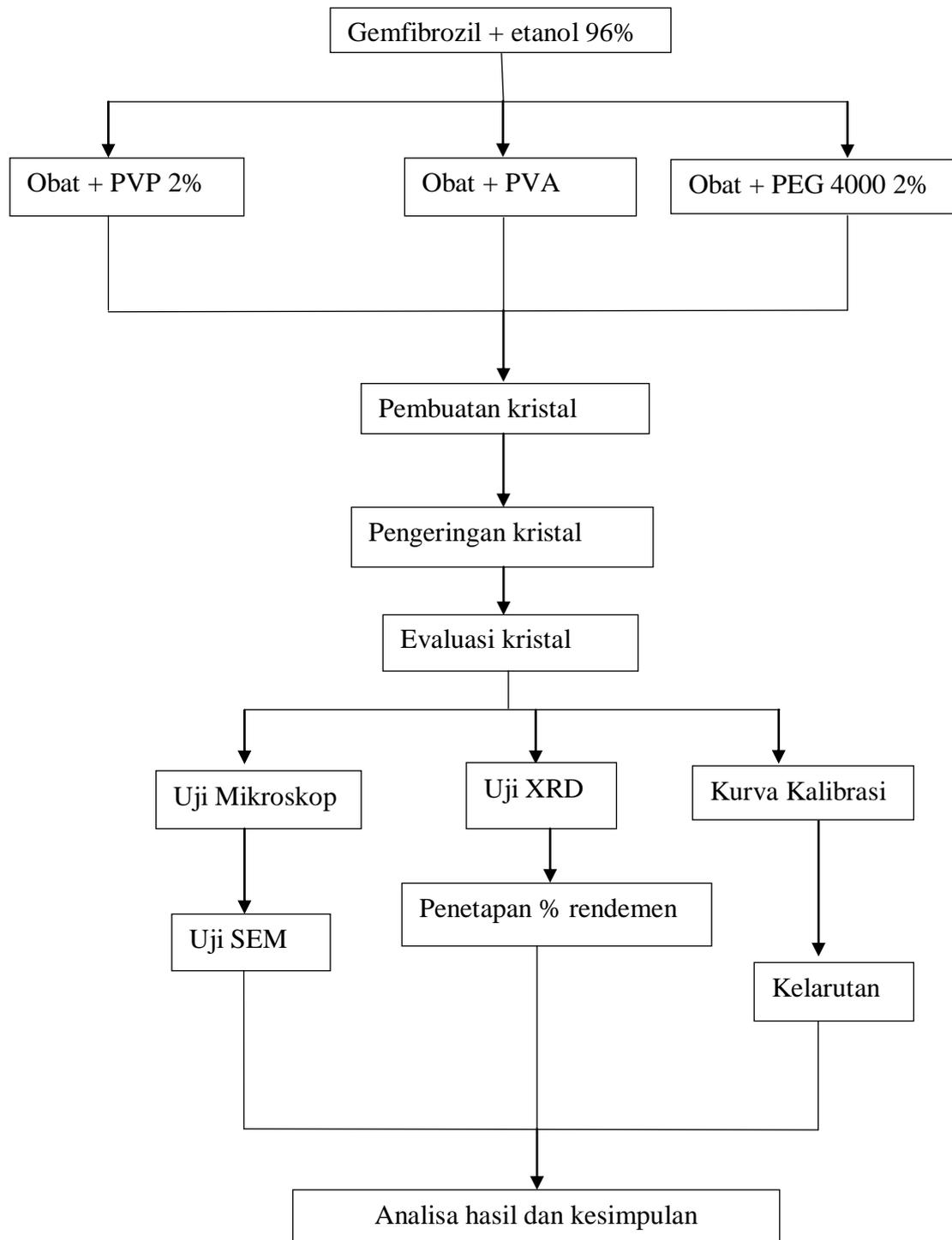
$$\text{LOD} = \frac{3sy/x}{b} \dots\dots\dots(1)$$

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

E. Analisa Hasil

Analisis hasil yang diperoleh untuk mengetahui hasil aglomerat sferis dari gemfibrozil menggunakan SEM, untuk melihat ada tidaknya perbedaan bentuk sferis dari masing-masing formula dengan berbagai macam konsentrasi polimer yang digunakan.

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 6. Skema jalannya penelitian