

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi sebagai subjek penelitian secara lengkap, yang mencakup orang, objek, dan apa pun yang dapat dikumpulkan untuk memberikan informasi bagi penelitian (Roflin *et al.*, 2021). Populasi dalam penelitian ini adalah SNEDDS nifedipine.

Sampel merupakan bagian dari populasi yang akan diteliti. Sampel yang digunakan pada penelitian adalah SNEDDS nifedipine yang dibuat dengan variasi perbandingan kombinasi dari asam oleat sebagai fase minyak, dan transcutol sebagai kosurfaktan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama merupakan variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol. Variabel dalam penelitian ini adalah nanoemulsi nifedipine dengan kombinasi asam oleat, tween 80, dan transcutol menggunakan perbandingan yang berbeda-beda.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

2.1. Variabel Bebas. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi asam oleat sebagai fase minyak, dan transcutol sebagai kosurfaktan.

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi dengan adanya variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah karakterisasi SNEDDS nifedipine berupa *drug loading*, % transmisi, waktu emulsifikasi, dan penetapan kadar nifedipine.

2.3. Variabel terkontrol. Variabel terkontrol adalah variabel yang memengaruhi variabel tergantung dan variabel bebas, serta variabel ini dapat dikendalikan. Variabel terkontrol adalah kecepatan *magnetic stirrer*, suhu dan waktu pencampuran pembuatan SNEDDS nifedipine.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

SNEDDS nifedipine dibuat menggunakan perbandingan yang berbeda dari kombinasi dengan asam oleat sebagai fase minyak, dan transcutool sebagai kosurfaktan, kemudian dilanjutkan dengan pengujian karakterisasi dan optimasi dari sediaan tersebut.

SNEDDS merupakan campuran minyak, surfaktan dan kosurfaktan yang dibuat untuk meningkatkan bioavailabilitas obat yang memiliki kesukaran kelarutan.

Fase minyak adalah komponen yang bekerja dengan meningkatkan disolusi obat dalam usus dan obat yang tidak larut air sehingga obat akan masuk ke jalur limfatik.

Surfaktan adalah komponen yang dapat menurunkan tegangan permukaan dan diklasifikasikan berdasarkan nilai HLBnya berupa surfaktan hidrofilik ($HLB > 10$) dan surfaktan lipofilik ($HLB = 10$)

Kosurfaktan adalah komponen yang mengurangi iritasi lokal dari surfaktan dan variabilitas dosis formulasi dengan meningkatkan fluiditas antarmuka.

Karakterisasi SNEDDS nifedipine berupa *drug loading*, % transmitan, waktu emulsifikasi, dan penetapan kadar nifedipine. Selanjutnya parameter kritis: *drug loading*, % transmitan, dan waktu emulsifikasi dilakukan optimasi menggunakan metode SLD untuk didapatkan hasil yang memenuhi persyaratan.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam pembuatan SNEDDS nifedipine adalah Nifedipine (Sigma-Aldrich), Asam oleat (Kimia Jaya Abadi), Tween 80 (Jaya Mulyo Kimia), Transcutol (Aneka Chemical), Metanol pa (Griya Medica), dan Aquadest (Griya Medica).

2. Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam pembuatan dan karakterisasi SNEDDS nifedipine adalah vial, alat-alat gelas (pyrex), pipet tetes, pipet volume (pyrex), magnetic stirrer (thermo scientific), timbangan analitik (pioneer), sentrifugasi (centrifuge PLC series) dan spektrofotometer Uv-Vis (UV-1800 series).

D. Jalannya Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian tugas akhir dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi dan Laboratorium Analisis Instrumen Universitas Setia Budi.

2. Pembuatan SNEDDS Nifedipine

Asam oleat, tween 80, dan transcitol ditimbang sesuai formula, kemudian diaduk dengan magnetic stirrer menggunakan kecepatan 300 rpm selama 5 menit sampai campuran menjadi homogen. Setelah SNEDDS terbentuk dilanjutkan dengan penambahan sedikit demi sedikit nifedipine sampai kondisi jenuh tercapai (kondisi ruangan dengan suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$). Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 50.000 rpm selama 30 menit. Selanjutnya hasil supernatant SNEDDS obat disimpan dalam microtube serta disimpan pada suhu ruang dan terhindar dari paparan sinar matahari.

3. Formula SNEDDS Nifedipine

Tabel 1. Range Komposisi Komponen SNEDDS

Komponen	Batas Bawah	Batas Atas
Asam Oleat	10	30
Transcutol	10	30

Tabel 2. Run SNEDDS Nifedipine berdasarkan *Simplex Lattice Design*

Formula	Komposisi SNEDDS	
	Asam Oleat	Transcutol
1	20	20
2	20	20
3	15	25
4	25	15
5	10	30
6	30	10
7	30	10
8	10	30

Tabel 3. Perbandingan Komposisi Pembuatan SNEDDS

Formula	Komposisi SNEDDS	
	Asam Oleat	Transcutol
1	1	1
2	1	1
3	0,75	1,25
4	1,25	0,75
5	0,5	1,5
6	1,5	0,5
7	1,5	0,5
8	0,5	1,5

Masing-masing formula SNEDDS Nifedipine sebanyak 5 ml sesuai perbandingan asam oleat sebagai fase minyak dan transcutool sebagai kosurfaktan, serta Tween 80 sebagai surfaktan yang ditetapkan nilai persentase 60% sebesar 3 ml.

4. Penentuan Kurva Kalibrasi

4.1. Membuat larutan induk nifedipine. Ditimbang 9,6 mg nifedipine dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 ml. Ditambahkan metanol pa sesuai tanda batas dan dihomogenkan untuk membuat larutan baku nifedipine. Larutan tersebut merupakan larutan induk nifedipine 200 ppm, yang selanjutnya diencerkan menjadi larutan baku 38,4 ppm dengan cara dipipet 5 ml dimasukkan ke dalam labu tentukur 25 ml kemudian ditambahkan metanol pa sampai tanda batas dan homogenkan.

4.2. Penentuan λ max. Larutan baku nifedipine 38,4 ppm dilakukan pengukuran λ max menggunakan spektrofotometri uv-vis. Selanjutnya lakukan pengukuran serapan pada panjang gelombang 200-400 nm (Khoirunisa., 2018). Penentuan λ max dilakukan untuk menentukan nilai absorbansi optimal nifedipine yang berada di antara rentang 0,2-0,8 dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Selanjutnya λ max yang didapatkan digunakan sebagai panjang gelombang untuk pengukuran drug loading.

4.3. Penentuan *Operating Time*. Setelah didapatkan λ max, selanjutnya dilakukan pengukuran operating time menggunakan spektrofotometri uv-vis yang ditunjukkan dengan serapan yang stabil selama waktu tertentu.

4.4. Pembuatan kurva kalibrasi. Dipipet larutan stok 38,4 ppm sebanyak 0,52; 1,04; 1,56; 2,08; 2,6; 3,12 mL, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu tentukur 25 ml dan selanjutnya tambahkan metanol pa sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen. Didapatkan larutan dengan konsentrasi 2; 4; 6; 8; 10; 12 ppm. Kemudian diukur serapannya menggunakan panjang gelombang maksimum yang diperoleh dan sebagai blangko digunakan metanol pa (Khoirunisa., 2018).

4.5. Pengukuran Ukuran Partikel. Ukuran partikel dilakukan pengukuran menggunakan *Particle size analyzer* (PSA). Alat PSA digunakan untuk mengukur diameter globul setelah 100 mL aquadest digunakan untuk melarutkan 100 μ L formula SNEDDS (Zhao *et al.*, 2010; Priani *et al.*, 2017). SNEDDS memiliki ukuran globul kurang lebih dari 200 nm (Seema and Kuma., 2014; Priani *et al.*, 2017).

5. Validasi Metode Analisa

Berdasarkan Farmakope Indonesia edisi V (2014), dijelaskan bahwa validasi metode analisis adalah proses yang ditetapkan melalui penelitian laboratorium dengan karakteristik kinerja prosedur sesuai dengan persyaratan untuk tujuan penggunaannya.

5.1. Linieritas. Pertama dilakukan pembuatan larutan larutan baku nifedipine dengan konsentrasi 38,4 ppm. Kemudian dilakukan penentuan linieritas dengan pembuatan 6 seri konsentrasi dari larutan baku, dan dilanjutkan pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer UV serta dicari persamaan regresi liniernya ($y = a+bx$). Kemudian dilanjutkan dengan perhitungan nilai koefisien determinasi (R^2).

5.2. LOD dan LOQ. Analisis dilakukan menggunakan excel dengan langkah awal penentuan linieritas, kemudian dilanjutkan pencarian LOD dan LOQ.

Perhitungan nilai LOD

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \frac{SY}{x}}{b}$$

Perhitungan nilai LOQ

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \frac{SY}{x}}{b}$$

6. Karakterisasi SNEDDS Nifedipine

6.1. Drug Loading. 1 mL dipipet ke dalam labu tentukur 10 mL, lalu encerkan hingga batas menggunakan metanol. Larutan sampel diukur serapannya ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS yang dilengkapi dengan blangko metanol pada panjang gelombang maksimal nifedipine (Sulistiana., 2017)

6.2. %Transmitan. Sebanyak 0,1 mL formula SNEDDS nifedipine masing-masing ditambahkan menggunakan 10 mL aquadest, selanjutnya dikocok hingga homogen. Pengukuran % transmitan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 235 nm menggunakan blangko aquadest. Persyaratan % transmitan yang optimal untuk SNEDDS yaitu >90% sehingga formula tersebut dapat dikatakan membentuk medium nanoemulsi ketika diemulsi dalam air (Costa *et al.*, 2012; Pratiwi *et al.*, 2017)

6.3. Waktu emulsifikasi. SNEDDS nifedipine sebanyak 0,1 mL dimasukkan langsung dalam tiap-tiap 10 mL air suling pada suhu $37 \pm 2^\circ\text{C}$ kemudian diaduk perlahan dengan magnetic stirrer pada kecepatan

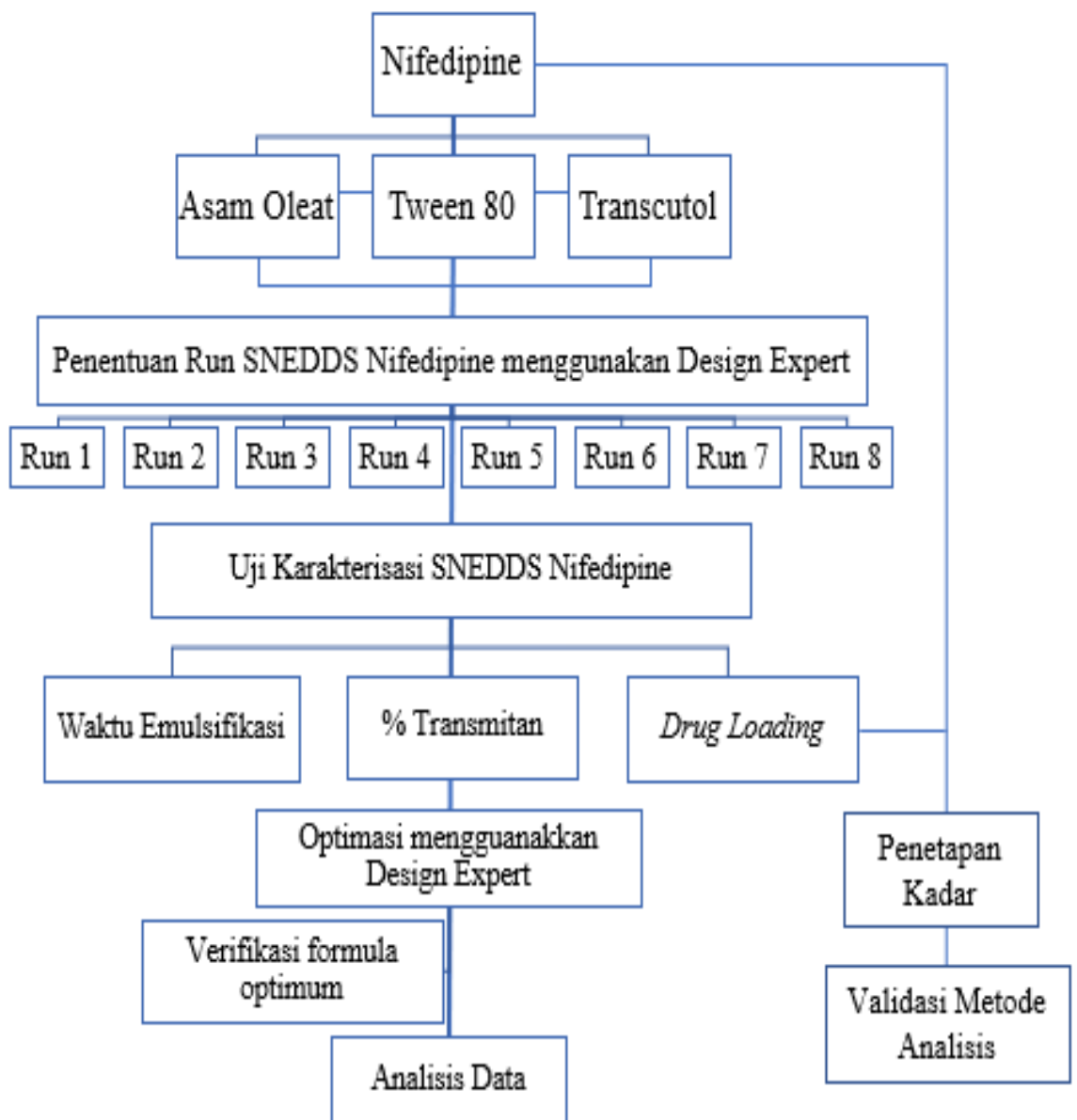
100 rpm. Waktu emulsifikasi diukur ketika SNEDDS nifedipine sudah masuk ke dalam media dan diberhentikan ketika sudah terbentuk hasil nanoemulsi yang homogen. Waktu emulsifikasi SNEDDS yang baik memiliki nilai yang kurang dari 1 menit (Parmar *et al.*, 2015; Nisa *et al.*, 2021)

6.4. Optimasi SNEDDS Nifedipine. Hasil data 8 run yang diperoleh dari uji karakteristik kemudian dilanjutkan dengan parameter kritis berupa waktu emulsifikasi, *drug loading*, dan % transmittan dimasukkan dalam software *Design Expert* menggunakan metode *Simplex Lattice Design*. Sehingga didapatkan hasil yang optimum untuk SNEDDS Nifedipine.

E. Analisis Hasil

Hasil dari pembuatan SNEDDS nifedipine, selanjutnya dilakukan analisis hasil pada karakterisasi berupa waktu emulsifikasi, *drug loading*, dan % transmittan. Masing-masing dibandingkan dengan persyaratan yang terdapat pada hasil prediksi formula optimum dari SLD serta dianalisis menggunakan uji statistik dengan menggunakan metode One Sample T-Test(Uji-t) menggunakan program SPSS dengan taraf kepercayaan 95%.

F. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema Penelitian