

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan semua objek yang menjadi sasaran dalam penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu fitosom alfa mangostin dengan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.

2. Sampel

Sampel merupakan bagian dari populasi yang diteliti, yang ciri-ciri, sifat dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili atau mendeskripsikan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini fitosom alfa mangostin yang dibuat dengan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi dengan komponen lipid fosfatidilkolin dengan berbagai variasi konsentrasi.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung. Variabel utama dalam penelitian ini adalah formula dari fitosom alfa mangostin dibuat dengan fosfatidilkolin dengan berbagai variasi konsentrasi.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah karakteristik, stabilitas dan mutu fisik dari fitosom alfa mangostin (ukuran partikel).

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah metode pembuatan fitosom alfa mangostin (alat dan lama sonikasi).

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan dalam berbagai variabel, antara lain variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas yaitu yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung yaitu penggunaan lipid fosfatidilkolin bervariasi.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian yaitu karakterisasi fitosom alfa mangostin yaitu ukuran partikel, zeta potensial, dan efisiensi penjerapan.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat yaitu proses pembuatan fitosom alfa mangostin dengan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Zat aktif alfa mangostin dengan variasi fosfatidilkolin. Menentukan ukuran partikel pada fitosom kurang dari 500 nm. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari fitosom alfa mangostin. Pengukuran ukuran partikel dilakukan dengan alat PSA.

Zeta potensial merupakan prediktor yang baik dari fenomena glasi karena potensial zeta mengatur derajat tolak-menolak antara partikel-partikel yang terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan. Potensial zeta merupakan uji untuk mengetahui dan mengkarakterisasi sifat muatan permukaan partikel yang berikatan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Potensial zeta medium tempat nanopartikel terdispersi. Alat yang digunakan dalam penelitian ini *Zeta Analyzer*.

Efisiensi penjerapan merupakan analisis yang digunakan untuk mengetahui zat aktif yang terjerap dalam sistem pembawa fitosom dengan cara melakukan sentrifugasi fitosom kemudian pellet diukur dengan alat spektrofotometri UV-Vis dan dihitung sebagai obat yang tidak terjerap.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *magnetic stirrer* (Tempo Scientific, China), alat untuk memperkecil ukuran partikel *probe sonicator* (Qsonica, Newtown U.S.A), alat ukuran partikel dan zeta potensial *particle size analyzer* (Malvern, USA), *sentrifuse (SPLC Series, Gemmy 8 Hole, Taiwan)*, Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10s, Thermo scientific), timbangan analitik

(Ohaus), *rotary evaporation*, alat-alat gelas (Pyrex, Jepang), dan non gelas yang terdapat dilaboratorium.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah alfa mangostin (Shaanxi Dideu Medichem Co. Ltd, Cina), fosfatidilkolin (Lipoid, Jerman), Kolesterol (PT. Bratachem, Indonesia), Kloroform (Merck), Etanol 96 % (Merck), aquadest (Merck).

D. Rencana Jalannya Penelitian

1. Percobaan Pendahuluan

Percobaan pendahuluan dilakukan untuk menentukan kondisi percobaan terbaik dan komposisi bahan yang sesuai untuk menghasilkan sediaan fitosom yang stabil. Pembuatan fitosom ini menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi. Rancangan formula fitosom alfa mangostin dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rancangan Formula Fitosom Alfa Mangostin

Komposisi	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
Alfa mangostin (mg)	98	98	98	98	98
Fosfatidilkolin (mg)	184	367	550	733	917
Kolesterol (mg)	18,5	18,5	18,5	18,5	18,5
Etanol 96 %	5	5	5	5	5
Kloroform	5	5	5	5	5
Larutan PBS ad(ml)	30	30	30	30	30

Keterangan:

Formula 1 menggunakan perbandingan mol Alfa Mangostin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:1:0,2)

Formula 2 menggunakan perbandingan mol Alfa Mangostin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:2:0,2)

Formula 3 menggunakan perbandingan mol Alfa Mangostin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:3:0,2)

Formula 4 menggunakan perbandingan mol Alfa Mangostin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:4:0,2)

Formula 5 menggunakan perbandingan mol Alfa Mangostin:Fosfatidilkolin:Kolesterol (1:5:0,2)

2. Pembuatan Fitosom Alfa Mangostin

Dalam pembuatan fitosom metode hidrasi lapis tipis, semua komponen pembentuk vesikel berupa bahan aktif alfa mangostin, fosfatidilkolin, kolesterol dilarutkan dalam pelarut. Alfa mangostin dan fosfatidilkolin larutkan dalam etanol 96 % (campuran 1), kolesterol dilarutkan dalam pelarut kloroform (campuran 2). Campuran 1 dan 2 dimasukkan dalam beaker dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer selama 15 menit suhu 45°C, pelarut diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C kecepatan 50 rpm sampai terbentuk lapisan tipis kering pada dinding labu. Lapisan tipis pada dinding labu dihidrasi dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 lalu nyalakan *rotary evaporator* tanpa vakum suhu 60°C kecepatan 50 rpm sampai terbentuk fitosom yang homogen. Kemudian di sonikasi dengan sonikator tipe *probe* selama 5 menit.

3. Karakterisasi Fitosom Alfa Mangostin

3.1 Penetapan Distribusi Ukuran Partikel dan Potensial Zeta. Untuk mengetahui ukuran sediaan nanopartikel dilakukan pengukuran ukuran dan distribusi nanopartikel menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*). Dengan metode *light scattering* (pemendaran cahaya) pada suhu 25°C. Sebelum diukur, sampel didispersikan terlebih dahulu kedalam medium pendispersi. Media pendispersi yang digunakan sebagai *baseline* adalah larutan aquadest, dimasukkan kedalam *fluid tank*. Setelah itu, sampel diteteskan sedikit demi sedikit pada *baseline* dan akan terukur ukuran partikel dari globul fitosom.

3.2 Uji Stabilitas Fitosom Alfa Mangostin Setelah Penyimpanan. Formula fitosom alfa mangostin yang sudah diketahui menghasilkan ukuran partikel terkecil di uji stabilitasnya dengan cara disimpan pada suhu kamar selama 3 minggu dan diamati setiap minggu.

E. Efisiensi Penjerap

Fitosom disentrifugasi dan supernatan dipisahkan. Pellet yang diperoleh kemudian disuspensikan kembali untuk mendapatkan fitosom yang bebas dari obat

terjerap. Fitosom disentrifugasi selama 50 menit pada 5.000 rpm dengan tujuan untuk memisahkan obat yang tidak terjerap. Jumlah obat bebas (FD0) ditentukan pada supernatan. Supernatan hasil disentrifugasi ditetapkan kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

1. Pembuatan larutan induk

Larutan baku induk dibuat dengan menimbang dengan teliti 100 mg alfa mangostin dan dilarutkan dalam etanol 96%. Selanjutnya, masukkan secara kuantitatif kedalam labu ukur 100 ml ditambahkan larutan dapar fosfat pH 7,4 hingga tepat tanda untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Kocok hingga homogen.

2. Penetapan panjang gelombang maksimum

Larutan induk alfa mangostin dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan dengan nilai serapan yang paling tinggi.

3. Penetapan *operating time*

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

4. Kurva baku

Larutan baku dibuat seri konsentrasi 22 ppm, 26 ppm, 30 ppm, 34 ppm, 38 ppm, dan 42 ppm kemudian diencerkan dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 masing-masing dalam labu takar 10 ml. Seri larutan tersebut kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum alfa mangostin. Serapan yang diperoleh dibuat kurva regresi linier antara seri konsentrasi larutan induk alfa mangostin 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 standar yang diperoleh, dimana y adalah nilai absorbansi larutan.

F. Verifikasi Metode Analisis

1. Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi sesuai seri konsentrasi larutan induk alfa mangostin yaitu 22 ppm, 26 ppm, 30 ppm, 34 ppm, 38 ppm dan 42 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 hitung $>$ r tabel.

2. Penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan batas kuantifikasi (LOQ).

Batas deteksi dan batas kuantifikasi penetapan kadar alfa mangostin ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan membuat lima seri konsentrasi terkecil pada uji linearitas. 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)

$$LOQ = \frac{10 Sy/x}{b} \dots\dots\dots 4$$

$$LOD = \frac{3,3 Sy/x}{b} \dots\dots\dots 5$$

G. Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan untuk mengetahui suatu data terhadap terjadinya kesalahan dalam penelitian, penyimpangan dari aturan baku yang sudah ditentukan. Analisis hasil suatu pengujian yang mengacu pada parameter dapat dilakukan dengan cara, data yang diperoleh dari penelitian dilakukan analisis dan dilihat kesesuaian dengan persyaratan baku yang telah menjadi ketentuan dari sediaan fitosom alfa mangostin, misalnya pengacuan data hasil pengujian dengan referensi secara teori yang ada, dengan demikian hasil penelitian dengan referensi teori tersebut dibandingkan satu sama lainnya. Pengacuan terhadap referensi teori dilakukan untuk menghindari adanya kesalahan dalam penelitian.