

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran penelitian atau keseluruhan unit dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah gel piroxicam.

Sampel adalah beberapa sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian yang ciri-ciri dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili keberadaan populasi yang sebenarnya, sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah gel piroxicam dengan variasi *gelling agent* yaitu kontrol basis; konsentrasi HPMC 0,5% dan Carbopol 1,5%; konsentrasi HPMC 1 % dan Carbopol 1% serta konsentrasi HPMC 1,5% dan Carbopol 0,5%

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah sediaan gel piroxicam dengan varian konsentrasi *gelling agent* yang konsentrasinya berbeda-beda serta pengujian stabilitas fisik sediaan gel dengan macam pengujian.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas penyembuhan luka pada penderita diabetes sediaan gel piroxicam dengan variasi *gelling agent* pada kelinci *New Zealand*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang terlebih dahulu telah diidentifikasi, selanjutnya dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yakni variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung dengan perubahan yang dilakukan. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah

variasikonsentrasi dari basis *gelling agent* pada sediaan gel piroxicam yaitu karbopol dan HPMC.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah variabel akibat dari variabel utama yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung yang dimaksud adalah adanya aktivitas penyembuhan luka pada tikus yang menderita diabetes serta stabilitas mutu fisik sediaan yaitu uji organoleptik, homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, stabilitas, dan daya lekat.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas. Variabel ini perlu ditetapkan atau dinetralisir kualifikasinya sehingga hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali yang dimaksud yakni cara pembuatan sediaan gel, kondisi penelitian, serta kondisi laboratorium penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, diabetes melitus tipe II ditunjukkan dengan pemeriksaan kadar gula darah ≥ 250 mg/Dl.

Kedua, sediaan gel piroxicam adalah hasil formulasi zat piroxicam yang didapatkan dari PT. Coronet Crown Pharmaceutical Sidoarjo yang dibuat sediaan topikal.

Ketiga, varian *gelling agent* yang digunakan yaitu karbopol dan HPMC. *Gelling agent* yaitu bahan tambahan yang dapat digunakan sebagai bahan pembentuk gel. Karbopol merupakan polimer asam akrilat yang berupa hasil silang dengan salah satu ally sukrosa atau ally eter dari pentaritriol. Sedangkan HPMC merupakan turunan dari metilselulosa yang memiliki ciri-ciri serbuk atau butiran putih, tidak memiliki bau dan rasa, sangat sukar larut dalam eter, etanol atau aseton serta mampu menjaga penguapan air.

Keempat, uji sifat fisik mutu sediaan adalah pengujian sediaan gel piroxicam terhadap uji organoleptik, homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, stabilitas dan daya lekat.

Kelima, uji stabilitas sediaan adalah pengujian yang dilakukan untuk memastikan bahwa sediaan stabil secara fisika dan kimia.

Keenam, kecepatan penyembuhan luka adalah satuan laju per waktu luka pada hewan uji dapat sembuh yang ditandai dengan parameter penutupan luka.

Ketujuh, uji aktivitas penutupan luka adalah pengujian penutupan luka sayat pada kelinci yang telah diinduksi dengan aloksan dari sediaan gel piroxicam dengan variasi konsentrasi *gelling agent* yang ditunjukkan dengan presentase daya penutupan luka.

Kedelapan, formula gel terbaik yaitu formula yang memiliki sifat fisik dan stabilitas fisik gel yang memenuhi standar sediaan semisolid.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital, beaker glass, batang pengaduk, pipet tetes, seperangkat alat uji homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, daya lekat, sudip, *stopwatch*, viskometer, pH meter, mortir, stamper, holder, glukometer, spuit injeksi, pinset, gunting dan lancet.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah piroxicam, aloksan monohidrat, karbopol 940, HPMC, TEA, metil paraben, propilenglikol, gliserin dan kapas.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan bahan

Zat piroxicam didapatkan dari PT. Coronet Crown Pharmaceutical Sidoarjo.

2. Karakterisasi piroxicam

Karakterisasi piroxicam ini bertujuan untuk memastikan zat aktif yang didapatkan benar-benar asli sesuai dengan sertifikat analisis yang diterima.

Menurut Farmakope Indonesia (FI) edisi V (2015) piroxicam berbentuk serbuk, hampir putih, atau coklat terang atau kuning terang, tidak berbau serta memiliki bentuk monohidrat berwarna kuning. Piroxicam ini memiliki kelarutan sangat sukar larut dalam air, dalam asam encer dan sebagian besar pelarut organik, sukar larut dalam etanol dan dalam larutan alkali mengandung air.

3. Formula sediaan gel

Pada penelitian ini sediaan yang akan dibuat adalah gel dengan penambahan piroxicam yang didapatkan dari PT. Coronet Crown Pharmaceutical Sidoarjo dengan variasi gelling agent yaitu HPMC dan carbopol. Formula sediaan tersebut merupakan modifikasi dari formula Rowe *et al* (2009) yaitu:

Tabel 3. Formula Gel (Rowe *et al* 2009).

Bahan	Standar
HPMC	1-3 %
Carbopol	0,5-2 %
TEA	1-4 %
Propilen glikol	<15 %
Gliserol	≤30%

Tabel 4. Rancangan Formula Sediaan Gel Piroxicam

Bahan	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
Piroxicam	-	0,5 g	0,5 g	0,5 g
HPMC	1 g	0,5 g	1 g	1,5 g
Carbopol 940	1 g	1,5 g	1 g	0,5 g
TEA	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
Propilen glikol	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Gliserin	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
Metil Paraben	0,3 g	0,3 g	0,3 g	0,3 g
Aquadest ad	100 g	100 g	100 g	100 g

Keterangan:

F1: Kontrol negatif/kontrol basis

F2: Sediaan gel dengan konsentrasi HPMC 0,5% dan Carbopol 1,5 %

F3: Sediaan gel dengan konsentrasi HPMC 1% dan Carbopol 1 %

F4: Sediaan gel dengan konsentrasi HPMC 1,5% dan Carbopol 0,5%

4. Pembuatan sediaan gel

Empat rancangan formulasi sediaan gel piroxicam seperti terlihat pada Tabel 4, hasil dari modifikasi rancangan formulasi terdapat faktor yang diubah

yaitu variasi basis *gelling agent*. Prosedur pembuatan gel yaitu mengembangkan carbopol 940 dan TEA dalam aquades pada suhu 70 - 80°C lalu dilanjutkan dengan mengembangkan HPMC dengan aquadest kemudian diaduk sampai benar-benar homogen. Pembuatan sediaan lalu dilanjutkan dengan menambahkan propilenglikol, gliserin, dan metil paraben lalu diaduk kembali hingga tercampur, lalu dilanjutkan dengan menambahkan zat aktif yang telah dilarutkan dengan etanol 96% (Sarung *et al* 2018).

5. Pengujian sifat fisik gel

5.1 Uji organoleptik. Uji organoleptik dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan cara melakukan pengamatan terhadap bentuk, warna dan bau dari sediaan yang telah dibuat (Sarlina *et al* 2017)

5.2 Uji homogenitas. Sediaan diambil pada masing-masing formula secukupnya kemudian dioleskan pada plat kaca, kemudian diamatai dan diraba massa sediaan harus menunjukkan susunan homogen yaitu tidak terasa adanya bahan padat pada kaca (Lestari 2002).

5.3 Uji viskositas. Pengukuran viskositas dilakukan terhadap sediaan dengan menggunakan viskometer RionVT-04F dengan menggunakan spindel sesuai konsistensi sediaan. Hal ini dilakukan dengan cara mencelupkan spindle ke dalam sediaan gel kemudian dilihat viskositasnya (Hurria 2014). Viskositas dapat diketahui setelah jarum skala pada viskometer stabil. Pengujian ini diulangi sebanyak tiga kali tiap formulasinya (Sharon *et al* 2013)

5.4 Uji pH. Uji pH dilakukan menggunakan pH meter. Mula-mula elektroda dikalibrasi dengan dapar standar pH 4 dan pH 7. Kemudian elektroda dicelupkan ke dalam sediaan. Nilai pH yang muncul di layar dicatat. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang (Sharon *et al* 2013).

5.5 Uji daya sebar. Pengujian dilakukan dengan menggunakan sampel sebanyak 0,5 gram dengan beban tertentu diletakkan dipusat antara lempeng gelas, dimana lempeng sebelah atas dalam interval waktu tertentu

dibebani anak timbangan diatasnya. Permukaan penyebaran yang dihasilkan dengan meningkatkan beban merupakan karakteristik daya sebar (Hurria 2014).

5.6 Uji daya lekat. Sebanyak 0,5gram sediaan diatas gelas obyek yang sudah diketahui luasnya. Diletakkan gelas obyek yang lain pada bagian atas sediaan tersebut kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Gelas obyek tersebut dipasang pada alat uji kemudian di beri beban seberat 80 gram dan dicatat waktu hingga kedua gelas obyek terpisah (Azkia *et al* 2017).

5.7 Uji stabilitas. Pengujian dilakukan dengan metode *Freeze thaw* yaitu dengan menyimpan sediaan pada suhu 4°C selama 48 jam kemudian dipindahkan ke suhu 40°C selama 48 jam (1 siklus). Setelah itu dilanjutkan sampai lima siklus. Pada siklus terakhir, dilihat ada tidaknya pemisahan fase atau perubahan secara fisik, uji pH dan uji viskositas sediaan(Sharonet *al* 2013).

6. Persiapan hewan uji

Adapun hewan yang akan digunakan dilakukan pemilihan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi, adapun kriteria inklusi yang diinginkan antara lain: kelinci dalam keadaan sehat, berjenis kelamin jantan, berumur 8-12 minggu serta memiliki berat badan 2,5-3kilogram. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu kelinci tampak sakit, terdapat abnormalitas serta mengalami obesitas.

Hewan coba diaklimasi sebelum perlakuan, dilakukan adaptasi (*Animal house*) pada hari pertama sampai hari kelima. Sampel diadaptasikan dengan tempat tinggal barunya, dengan pemberian makanan dan minuman. Perlakuan ini disamakan pada semua kelinci. Adaptasi cukup dilakukan selama 5 hari. Adaptasi ini bertujuan untuk semua objek penelitian supaya hewan coba dalam kondisi tidak stress dan dalam keadaan yang sama saat dimulai penelitian.

7. Uji aktivitas formula sediaan gel piroxicam

Enam ekor kelinci ditimbang, lalu lima kelinci yang digunakan sebagai perlakuan diabetes diinjeksi aloksan monohidrat secara intravena dengan dosis 150 mg/kgBB, 48 jam setelah diinduksi lalu dilihat kadar gula darahnya, dimana kelinci yang memiliki kadar gula darah diatas 250 mg/dL dinyatakan sebagai

kelinci yang terkena diabetes. Satu kelinci digunakan sebagai kelompok normal dimana kelinci tidak dikondisikan terkena diabetes. Semua kelinci lalu dicukur punggungnya lalu dibilas dengan kapas basah hingga tampak kulit punggungnya. Kulit punggung kelinci dibagi menjadi 5 bagian lalu kemudian dianastesi dengan menggunakan obat anastesi topikal Emla cream yang mengandung lidokain dan prilokain pada setiap bagian, selanjutnya dilakukan eksisi dengan panjang diameter 2 mm tiap bagiannya. Sediaan uji lalu dioleskan ke punggung kelinci tiap 12 jam hingga luka menutup.

E. Analisis Data

Sediaan dari masing-masing formula diuji sifat fisiknya yang meliputi organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, stabilitas, dan daya lekat, dianalisis secara statistik menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji ANOVA dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney*.

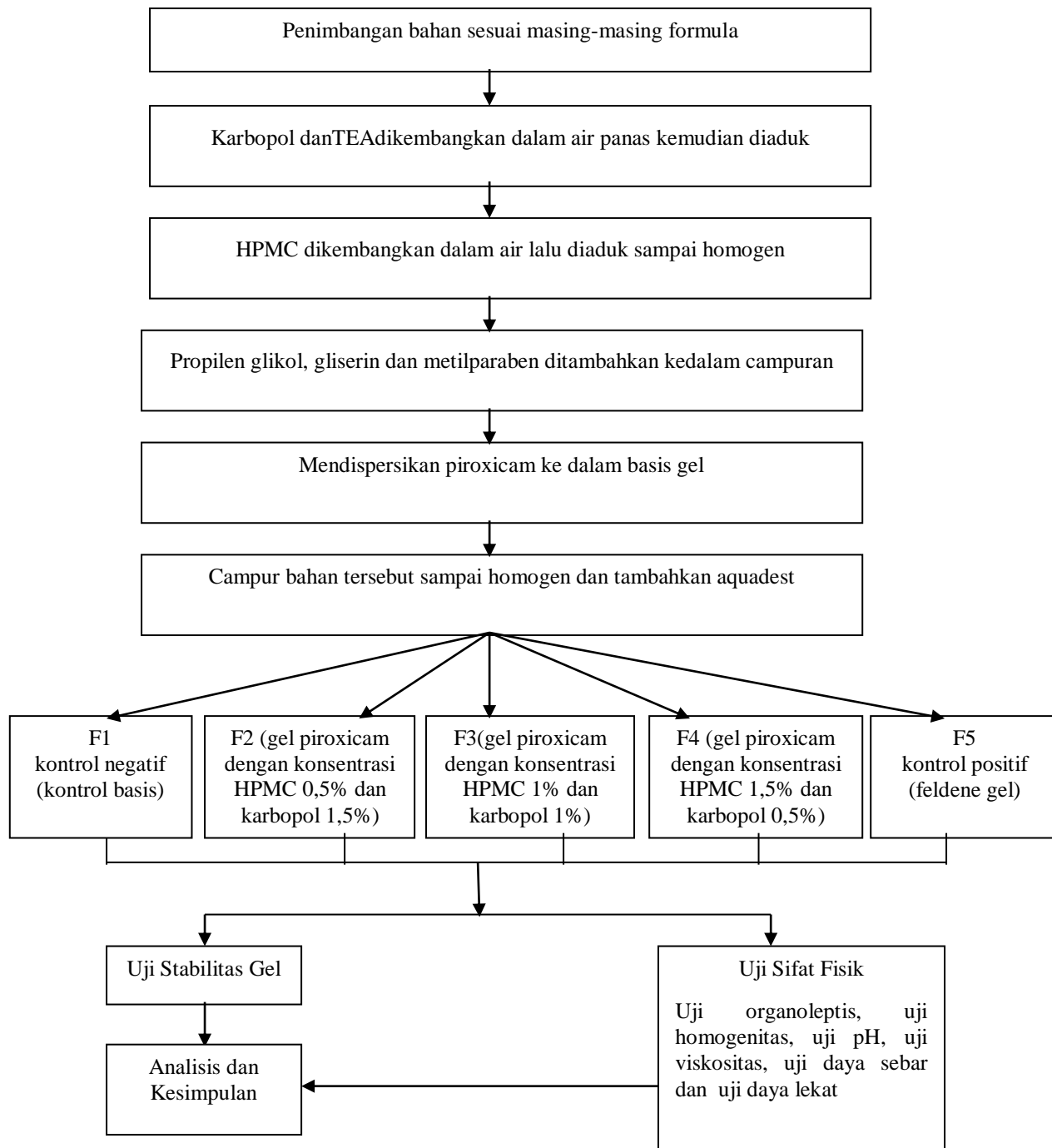
Pengukuran efek penyembuhan luka sayat pada kelinci *New Zealand* dihitung dengan persamaan:

Wound closure (%):

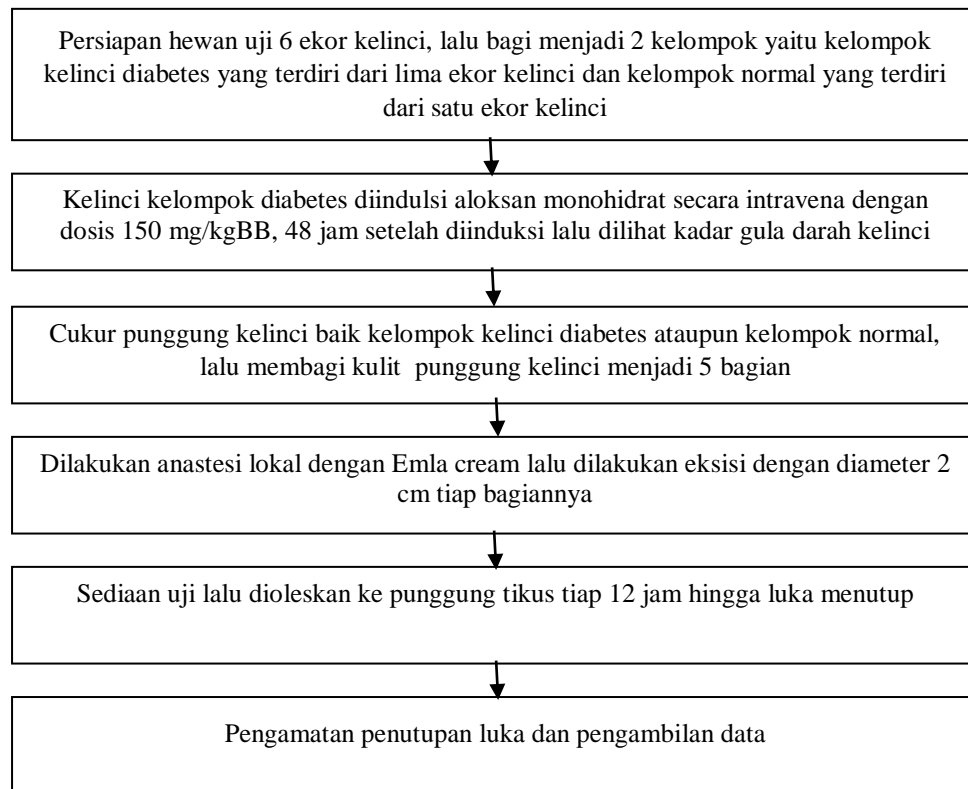
$$\frac{\text{Area luka pada hari ke 0} - \text{Area luka pada hari ke } n}{\text{Area luka pada hari ke } 0} \times 100\%$$

Pengukuran % penutupan luka ini dilakukan setiap hari dari awal pemberian luka hingga luka menutup. Waktu penyembuhan luka lalu dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA satu jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji *Friedman*.

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 10. Skema pembuatan sediaan gel piroxicam



Gambar 11. Skema pengujian aktivitas sediaan gel piroxicam untuk penyembuhan luka kelinci diabetes secara invivo