

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Alat dan bahan

3.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sentrifugator, vortex, *magnetic stirrer*, seperangkat alat gelas (Pyrex), timbangan analitik (Metler Toledo xs205), *micropipette* (Thermo Scientific dan Finnpiette), *waterbath* (Memmert), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV Spectrophotometer, UV-1800), ultrasonikator (Biologis Inc model 300 v/t), *particle size analyzer* (HORIBA Scientific Nano Partica SZ 100). Semua peralatan tersebut tersedia di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Islam Indonesia.

3.1.2. Bahan

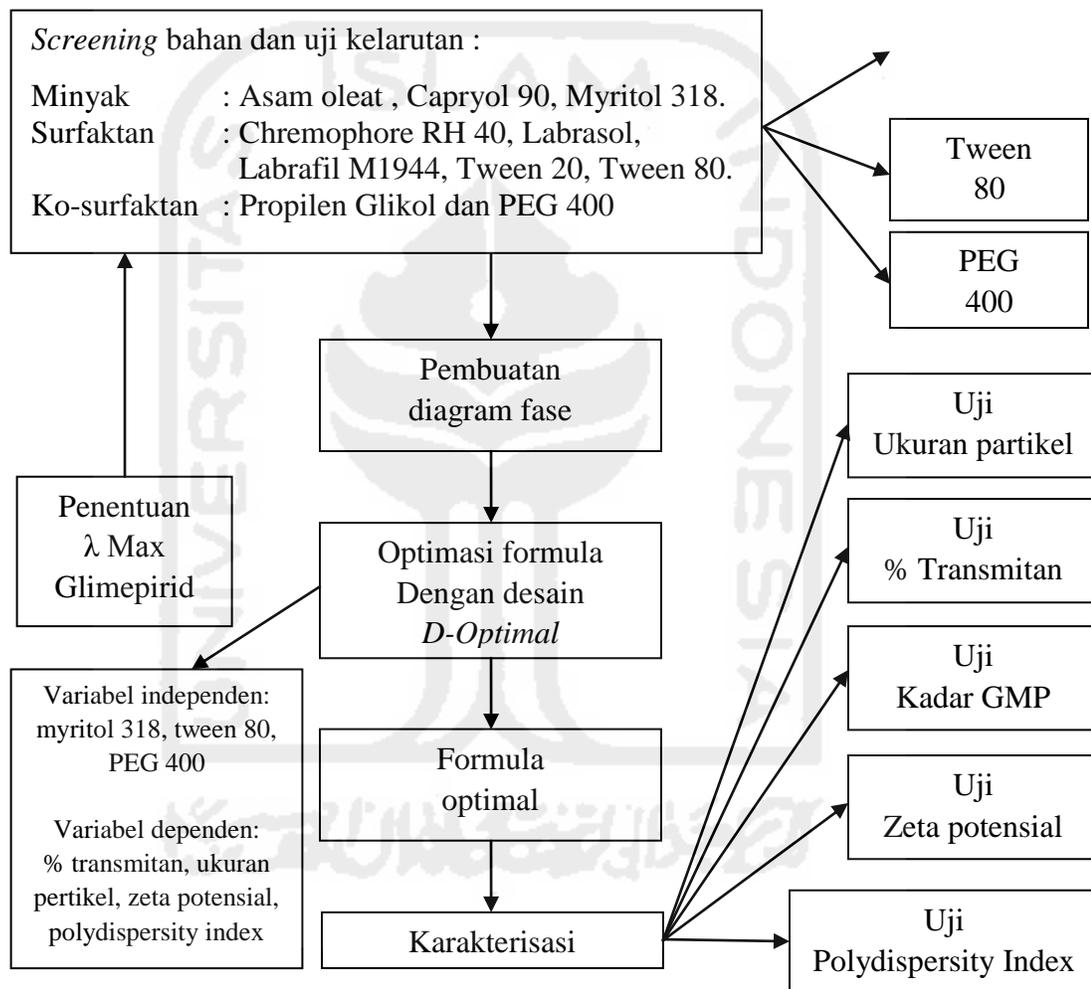
Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Aqua pro injection* (PT. Ika Pharmindo Putramas), metanol (CV. Pancasakti Putra Kencana), glimepirid (Gatefosse, Prancis), asam oleat (PT. Brataco), Myritol 318 (BASF, Hongkong), Capryol 90 (Gatefosse, Prancis), labrasol (Gatefosse, Prancis), tween 80 (Vivantis, USA), tween 20 (Vivantis, USA), labrafil M1944 (Gatefosse, Prancis), *Chremophore* RH 40 (Gatefosse, Prancis), propilen glikol (PT. Brataco), dan PEG 400 (PT. Brataco). Semua bahan yang digunakan tersedia di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Islam Indonesia.

3.2. Cara Penelitian

3.2.1. Sistematika umum penelitian

Penelitian ini secara umum dilakukan dengan melakukan *screening* bahan dan uji kelarutan, menentukan panjang gelombang maksimal glimepirid, membuat

campuran komponen perbandingan antara glimepirid dengan smix yang dilanjutkan dengan pembuatan diagram fase, optimasi formula dilakukan dengan menggunakan bantuan desain *D-Optimal*, kemudian formula optimal yang didapat dikarakterisasi menggunakan uji % transmitan, zeta potensial, ukuran partikel, PDI, dan kadar. Di bawah ini adalah skema umum penelitian yang dapat dilihat pada gambar 3.1



Gambar 3.1. Skema umum penelitian

3.2.2. Penentuan Panjang Gelombang (λ) Maksimal

Ditimbang 10 mg glimepirid untuk dilarutkan kedalam 100 ml metanol sebagai larutan stok glimepirid. Dibuat konsentrasi larutan pada 10 ppm dari larutan stok

glimepirid. Kemudian larutan tersebut dibaca pada spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan panjang gelombang maksimal.

3.2.3. Pembuatan Kurva Baku

Dibuat larutan stok glimepirid dengan melarutkan 10 mg glimepirid ke dalam 100 ml metanol. Dilakukan pengenceran larutan stok dengan berbagai seri kadar yaitu 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm, dan 16 ppm. Kemudian dibaca absorbansinya pada λ 227,5 nm pada spektrofotometer UV-Vis. Persamaan regresi linear dari kurva baku yang didapatkan digunakan untuk mengetahui kelarutan glimepirid pada masing-masing bahan.

3.2.4. Screening Bahan dan Uji Kelarutan

Diambil masing-masing 1 ml minyak (myritol 318, capryol 90, dan asam oleat.), surfaktan (labrafil, labrasol, chremophore RH 40, tween 80, dan tween 20), dan kosurfaktan (propilen glikol dan PEG 400) kemudian ditambahkan 10 mg GMP dan dimasukkan ke dalam *eppendorf*. Kemudian sampel diletakkan pada *shaker* selama 72 jam pada suhu 37°C. Sampel di vortex selama 15 menit setiap harinya. Kemudian sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit pada suhu 37°C. Diambil supernatan dan di tambahkan metanol kemudian dianalisis dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 227,5 nm untuk mengetahui konsentrasi dan kelarutan obat berdasarkan persamaan regresi linear yang diperoleh. Bahan yang terpilih kemudian ditetapkan sebagai fase minyak, surfaktan, dan kosurfaktan.

3.2.5. Pembuatan Diagram Fase

Disiapkan campuran larutan dengan rasio perbandingan minyak : smix (1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5) dalam volume total 5 ml. Diambil masing – masing bahan dari

perbandingan yang telah dibuat dan dimasukkan ke dalam flakon kemudian dilakukan ultrasonikasi selama 3 menit. Didiamkan selama 24 jam kemudian dilakukan pengenceran dengan *aqua pro injection* sebanyak 10 ml dalam gelas beaker sambil diaduk dengan menggunakan pengaduk magnetik dan diamati kejernihan tiap larutan secara visual pada masing-masing perbandingan minyak dan smix untuk mengetahui apakah perbandingan tersebut dapat membentuk nanoemulsi yang jernih atau tidak. Kemudian dibuat diagram fase yang menunjukkan daerah pembentukan nanoemulsi menggunakan perangkat lunak *Triplot*[®]. Dibawah ini adalah tabel yang menunjukkan perbandingan minyak dan smix.

Tabel 3.1 Perbandingan komposisi minyak : smix

No	Perbandingan	% Minyak : Smix		
		X ₁	X ₂	X ₃
1	1 : 9	10	80	10
		10	70	20
		10	60	30
2	2 : 8	20	70	10
		20	60	20
		20	50	30
3	3 : 7	30	60	10
		30	50	20
		30	40	30
4	4 : 6	40	50	10
		40	40	20
		40	30	30
5	5 : 5	50	40	10
		50	30	20
		50	20	30

Keterangan : X₁: Myritol 318 ; X₂: Tween 80 ; X₃: PEG 400

Dari pembuatan diagram fase tersebut maka didapatkan konsentrasi batas atas dan batas bawah dari masing-masing bahan.

3.2.6. Optimasi Formula Menggunakan *D-Optimal*

Optimasi formula SNEDDS dilakukan dengan menggunakan bantuan desain *D-Optimal*. Campuran komponen yang digunakan pada penelitian ini dirancang dengan berdasar pada 3 komponen sebagai variabel independen, yaitu fase minyak X_1 (Myritol 318), surfaktan X_2 (Tween 80), dan ko-surfaktan X_3 (PEG 400) dengan total konsentrasi dari ketiga komponen adalah 100%. Sedangkan respon sebagai variabel dependen yang meliputi % transmitan (Y_1), zeta potensial (Y_2), ukuran partikel (Y_3) dan *Polydispersity Index* (PDI) (Y_4). Adapun batas bawah dan atas yang didapatkan dari pembuatan digram fase dimasukkan kedalam desain ini untuk menjadi acuan dalam pembuatan SNEDDS. Di bawah ini adalah tabel perbandingan 3 komponen yang direkomendasikan desain *D-Optimal*.

Tabel 3.2. Rekomendasi perbandingan $X_1 : X_2 : X_3$ oleh desain D-Optimal

Run	X_1 : Myritol 318	X_2 : Tween 80	X_3 : PEG 400
1	30	60	10
2	30	60	10
3	20	70	10
4	15	55	30
5	20	50	30
6	10	60	30
7	30	50	20
8	30	50	20
9	10	70	20
10	20	60	20
11	10	80	10
12	10	80	10

Keterangan :

Masing-masing formula ditentukan nilai respon % transmitan, zeta potensial, PDI dan ukuran partikel.

Selanjutnya nilai-nilai ini akan dianalisis hasilnya oleh desain *D-Optimal* kemudian akan ditetapkan model yang cocok pada masing-masing komponen. Setelah

didapatkan satu formula SNEDDS yang optimal akan diuji kembali karakteristik formula optimal yang meliputi % transmittan, ukuran partikel, PDI, dan zeta potensial yang akan dibandingkan dengan nilai yang dirokemendasikan oleh desain *D-Optimal*.

3.2.7. Pembuatan Sediaan SNEDDS Glimepirid

Pembuatan sediaan SNEDDS glimepirid dilakukan dengan cara mencampurkan 2 mg glimepirid dengan fase minyak (Myritol 318), kemudian dilakukan ultrasonikasi selama 3 menit. Pada flakon yang berbeda dicampurkan surfaktan (Tween 80) dengan ko-surfaktan (PEG 400) dan dilakukan ultrasonikasi selama 3 menit. Campuran glimepirid dan minyak di campur kedalam flakon campuran surfaktan dan ko-surfaktan kemudian dilakukan ultrasonikasi kembali selama 3 menit hingga terbentuk sediaan SNEDDS yang homogen.

3.2.8. Karakterisasi Sediaan SNEDDS Glimepirid

3.2.8.1. Uji % Transmittan

Penetapan nilai % transmittan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis. Pengukuran % transmittan didapat dengan cara mengambil 40 µl SNEDDS dan dilarutkan ke dalam 10 ml *aqua pro injection* kemudian diaduk hingga homogen dan dibaca % transmittan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada λ 650 nm⁽²¹⁾.

3.2.8.2. Analisis Ukuran Partikel, PDI, dan Zeta Potensial

Penetapan ukuran partikel, PDI dan zeta potensial menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*). Pengukuran ukuran partikel dan PDI didapatkan dengan cara mengambil 40 µl SNEDDS kemudian dilarutkan dalam 10 ml *Aqua Pro Injection* dan dimasukkan dalam flakon. Kemudian dianalisis ukuran partikel dan PDI dengan kisaran yang diharapkan 5 nm - 200 nm untuk ukuran partikel dan 0,2 - 0,7 untuk PDI. Pengukuran zeta potensial juga dilakukan pada alat yang sama, namun pengaturan menu analisis pada alat PSA diubah dari "*particle size*" menjadi

“zeta” adapun nilai zeta potensial yang diharapkan yakni lebih besar atau sama dengan + 30 mV atau – 30 mV⁽²²⁾.

3.2.8.3. Uji Kadar Glimepirid

3.2.8.3.1. Pembuatan Kurva Baku SNEDDS

Dilartukan 1 ml SNEDDS glimepirid pada 10 ml metanol, kemudian dibuat seri kadar 0,3 ppm, 0,4 ppm, 0,5 ppm, 0,6 ppm, 0,7 ppm dan 0,8 ppm. Kemudian dibaca absorbansinya pada λ maksimal. Setelah diperoleh persamaan kurva baku, maka kadar glimepirid dapat diketahui.

3.2.8.3.2. Penetapan Kadar Glimepirid Pada SNEDDS

Ditimbang glimepirid sebanyak 2 mg kemudian dilarutkan dalam campuran minyak dan smix dengan volume total 5 ml. Nilai perbandingan minyak dan smix diperoleh dari formula optimal yang didapat dari desain *D-Optimal*. Kemudian SNEDDS tersebut dilakukan pengenceran bertingkat untuk mendapatkan konsentrasi akhir 0,5 ppm dengan menggunakan pelarut metanol dalam labu ukur 10 ml. Selanjutnya dianalisis kadar glimepirid dalam SNEDDS dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada λ maksimal. Diharapkan kadar glimepirid yang didapat adalah 0,4 mg/ml dengan perolehan kembali 95%-105%⁽²³⁾.

3.3. Analisis Hasil

Hasil nilai dari masing-masing respon sebagai variabel dependen yang didapatkan dianalisis menggunakan analisis statistik ANOVA yang terdapat pada desain *D-Optimal*. Model ANOVA yang terdapat pada desain *D-Optimal* adalah *linear, quadratic, special cubic, dan cubic*. Dari masing-masing respon dapat ditentukan signifikansi terhadap variabel independen.