

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

Bahan utama pada penelitian ini adalah isolat andrografolida (Universitas Islam Indonesia, Nanopharmacy), dan sebagai bahan tambahan adalah PLGA (*Poly Lactic-co-Glycolic Acid*) p.a (Aldrich), PVA (*Polyvinyl Alcohol*) p.a (diperoleh dari Brataco), kalium dihidrogen fosfat p.a (diperoleh dari Brataco), natrium hidroksida p.a (diperoleh dari Brataco), Natrium Klorida (diperoleh dari Brataco) etil asetat p.a (Merck), aquadest (Lab. Teknologi Farmasi Universitas Islam Indonesia), *fluoroescinamine*, *4-dimethylamino benzaldehyde* (DMAB), formalin 10%, aqua pro injeksi p.a (Ikapharmindo), alumunium foil, *microfilter* 0,45 μm , membran *cellophane*, dan tikus galur wistar BB 300-400 gram (Lab Farmakologi Farmasi Universitas Islam Indonesia).

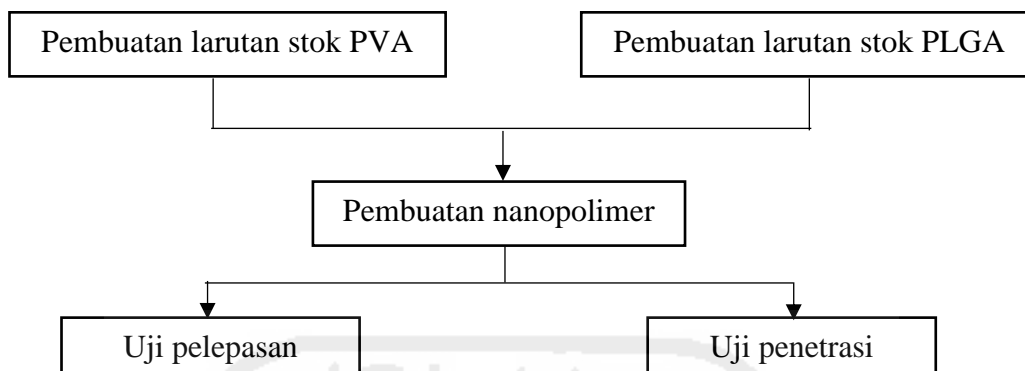
3.1.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *magnetic stirrer* (Ika werke), mikropipet (Thermoscientific FinnpiPETTE), High Performance Liquid Chromatography (Hitachi), seperangkat alat *franz diffusion cell* (PermeGear®), timbangan analitik (Metler Toledo), *ultrathurax* (Ika T25), *microtome*, viva spin, spuit, mikroskop fluoroesen (Olympus Mikroskop fluoroesen BX 53) seperangkat alat bedah tikus dan seperangkat alat gelas.

3.2 Cara Penelitian

3.2.1 Sistematika Kerja Penelitian

Sistematika kerja pada penelitian ini dilakukan secara berurutan. Dimulai dari proses pembuatan larutan PVA, pembuatan larutan stok PLGA, pembuatan nanopartikel, uji pelepasan dan uji penetrasi. Untuk proses yang lebih rinci dapat dilihat pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema kerja penelitian diawali dari pembuatan PVA, pembuatan PLGA, uji pelepasan dan uji penetrasi

3.2.2 Pembuatan Larutan PVA 1%; 2,5 %; dan 5%

Ditimbang masing-masing 1 g, 2,5 g, dan 5 g PVA dalam gelas beker 100 ml, kemudian dilarutkan dengan 100 ml aquadest. Campuran tersebut dihomogenkan dengan cara diaduk menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 2000 rpm sampai PVA larut sempurna.

3.2.3 Pembuatan Larutan Stok PLGA

Ditimbang 1 g PLGA dalam gelas beaker 50 ml, kemudian dilarutkan dengan 10 ml etil asetat. Campuran tersebut dihomogenkan dengan cara diaduk menggunakan *stirrer* selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm.

3.2.4 Pembuatan Nanopartikel Andrografolida

Nanopartikel dibuat dengan metode *solvent evaporation*. Disiapkan fase air yang terdiri dari PVA 2,5 ml konsentrasi PVA 1%, 2,5% dan 5%. Disiapkan fase organik yang terdiri dari larutan stok PLGA 500 μ L, etil asetat 2 ml dan andrografolida 2 mg. Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Low, M (2015), pada dosis 2mg/hari andrografolida memiliki efek antiinflamasi tanpa menimbulkan efek samping yang serius⁽²⁾. Fase organik diteteskan secara perlahan (1 tetes tiap 20 detik) kedalam fase air diatas *stirrer* dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam. Setelah itu campuran dihomogenkan dengan *ultrasonix* 12.500 rpm selama 2 menit dalam *ice bath*. Campuran yang terbentuk diencerkan dengan 50 ml

akuades. Selanjutnya, pelarut etil asetat diuapkan 24 jam dengan pengadukan menggunakan *stirrer* pada kecepatan 2000 rpm.

Tabel 3.1 formulasi nanopartikel isolat andrografolida

Nama Bahan	Formula I	Formula II	Formula III
Andrografolida	2 mg	2 mg	2 mg
PLGA	500 μ L	500 μ L	500 μ L
PVA 1%	2,5ml	-	-
PVA 2,5%	-	2,5ml	-
PVA 5%	-	-	2,5ml
Etil asetat	2 ml	2 ml	2 ml
Aquabidest	50 ml	50 ml	50 ml

Keterangan:

*Penambahan PVA dalam bentuk larutan sebanyak 2,5 ml untuk masing-masing formula

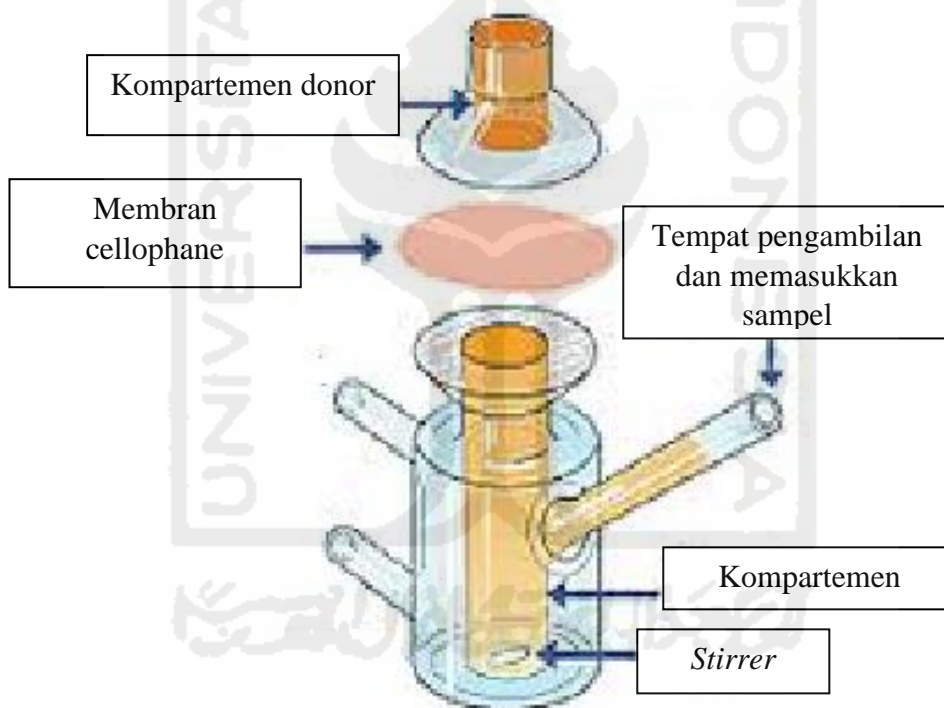
3.2.5 Studi Pelepasan Nanopartikel Andrografolida menggunakan Sel Difusi Franz

3.2.5.1 Pembuatan buffer fosfat pH 7,4

Buffer fosfat pH 7,4 dibuat dengan mencampurkan larutan NaOH dan KH_2PO_4 . Ditimbang masing-masing NaOH dan KH_2PO_4 secara seksama sebanyak 0,8 g dan 2,72 g. Kemudian, dilarutkan dengan akuades secukupnya dalam gelas beker ditempat yang berbeda. Larutan kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Dipipet 39,1 mL larutan NaOH dalam labu ukur 100 mL kemudian dimasukkan dalam labu ukur 200 mL. Dipipet juga 50 mL larutan KH_2PO_4 dalam labu ukur 100 mL kemudian dicampurkan dengan larutan NaOH dalam labu ukur 200 mL yang sama. Diukur larutan menggunakan pH meter. Apabila pH terlalu asam ditambahkan dengan NaOH dan bila pH terlalu basa maka dapat ditambahkan KH_2PO_4 hingga pH mencapai 7,4.

3.2.5.2 Studi pelepasan nanopartikel andrografolida

Sel difusi *franz* terdiri dari 2 bagian, bagian atas terdiri dari kompartemen donor, yaitu bahan aktif dan pembawa andrografolid. Pada bagian bawah terdapat kompartemen reseptor dan tempat sampling, suhu diatur pada $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Medium reseptor terdiri dari buffer fosfat pH 7,4. Secara periodik cairan reseptor dipipet sebanyak 1 mL dan digantikan dengan cairan buffer yang sama dengan volume yang sama. Jumlah andrografolida yang dilepas, ditentukan dengan HPLC dengan panjang gelombang maksimum 229 nm (Syukri, Y (unpublished)). Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing sampel dengan variasi PVA 1%; 2,5%; dan 5% yang dilakukan selama 8 jam.



Gambar 3.2. Sel difusi *franz* (permagear.com)

3.2.6 Studi Penetrasi Nanopartikel Andrographolia menggunakan Jaringan Usus Tikus

Penelitian ini telah lolos kaji etik dari komite etik penelitian kedokteran dan kesehatan fakultas kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor protokol 14/A/IX/16. Penelitian ini dilakukan studi penetrasi menggunakan tikus *Sprague*

Dawley dengan berat 300-400 gram. Tikus dikorbankan terlebih dahulu dengan pemberian larutan kloroform. Selanjutnya tikus dibedah dan diambil jaringan ususnya dengan kisaran panjang 1-2 cm. Usus tikus segar (jejunum) diambil dan dibilas hati-hati dengan garam fisiologis (NaCl 0,9%) untuk menghapus semua residu. Jaringan dipotong dengan panjang 2 cm. Setiap segmen diisi dengan 0,1 ml *fluorescent* yang telah diberi nanopartikel (5 mg / ml di air pada pH 6.5) dengan menggunakan jarum suntik dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Jaringan dibilas secara menyeluruh dengan NaCl untuk menghilangkan semua partikel yang tidak terserap sebelum dibuka melalui pertengahan garis sayatan. Bagian jaringan diawetkan dalam formalin. Jaringan diiris dengan ketebalan 10µM kemudian dibaca dengan mikroskop *fluorescence*.

3.3. Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan secara deskriptif. Dengan cara membandingkan data yang diperoleh dari hasil penelitian seperti uji pelepasan andrografolida dengan variasi PVA 1%, 2,5%, dan 5% dibandingkan dengan data penelitian sebelumnya yang diperoleh dari jurnal. Sedangkan uji penetrasi diamati menggunakan mikroskop *fluorescence* untuk melihat kemampuan nanopartikel yang terserap dalam jaringan usus.