

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah quercetin hidrat (Tokyo Chemical Industri Co., LTD, Japan Lot 83N20), PEG 8000 (Fluka, Switzerland Lot 452855), Asam sitrat (Emsure, Germani), NaOH (Emsure, Germani), Sodium Lauryl Sulphate, etanol absolut (Emsure, Germani) dan air demineralisata.

4.2 Alat-Alat Penelitian

Spektrofotometer UV-Vis (Cary 50 Conc), alat uji disolusi (Erweka DT 700), timbangan analitik (OHAUS), Digital termostat water bath (HH-4), *hot plate* (Thermolyne Cimarec), spuit injeksi, *filter holder*, mortir, stamper, dan alat-alat gelas.

4.3 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan penelitian eksperimental menguji kelarutan dan laju disolusi quercetin tunggal, campuran fisik quercetin-PEG 8000 dan dispersi padat quercetin-PEG 8000. Terdapat dua variabel yang digunakan yaitu variabel bebas dan variabel kontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pembuatan sistem dispersi padat quercetin-PEG 8000 (1:1; 1:2; 1:3) dan campuran fisik quercetin-PEG 8000 (1:1; 1:2; 1:3). Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kelarutan dan laju disolusi quercetin. Sedangkan variabel kontrolnya yaitu ukuran partikel, kecepatan pengadukan, suhu, volume media, pH media dan interval waktu uji disolusi.

Tabel IV.1. Komposisi Dispersi Padat dan Campuran Fisik

Bahan	QM	Dispersi Padat b/b			Campuran Fisik b/b		
		DP I	DP II	DP III	CF I	CF II	CF III
Quercetin	1	1	1	1	1	1	1
PEG 8000		1	2	3	1	2	3

Keterangan :

QM : Quercetin murni

DP I : Dispersi padat quercetin-PEG 8000 (1:1)

DP II : Dispersi padat quercetin-PEG 8000 (1:2)

DP III : Dispersi padat quercetin-PEG 8000 (1:3)

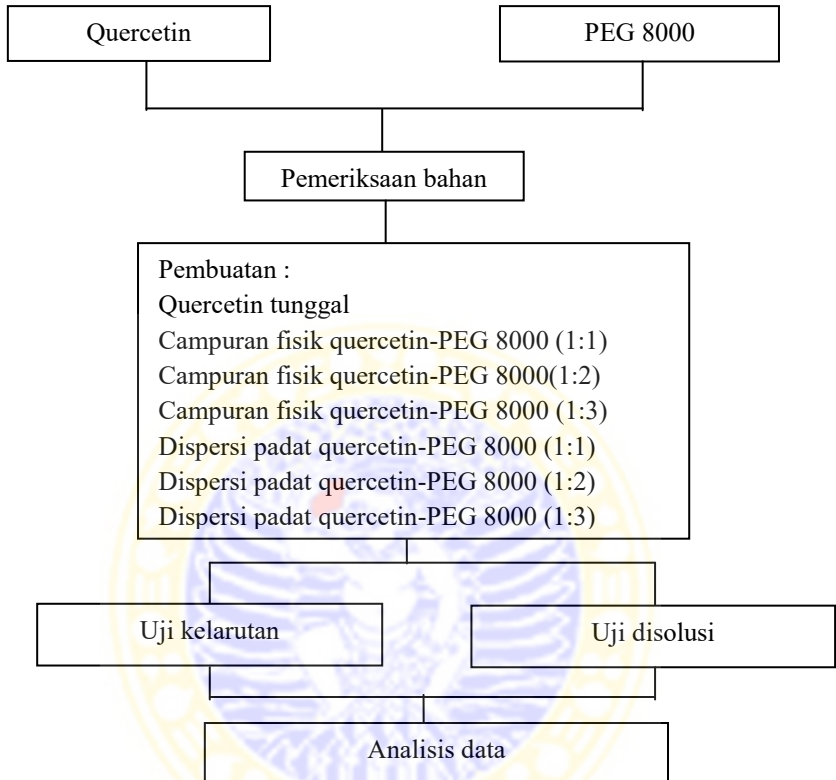
CF I : Campuran fisik quercetin-PEG 8000 (1:1)

CF II : Campuran fisik quercetin-PEG 8000 (1:2)

CF III : Campuran fisik quercetin-PEG 8000 (1:3)

Perbandingan antara quercetin merupakan perbandingan berat per berat. Pada masing-masing kelompok perlakuan dilakukan uji kelarutan dan uji laju disolusi. Untuk uji kelarutan sampel yang digunakan setara sengan quercetin 20 mg. Sedangkan untuk uji laju disolusi sampel yang digunakan setara 5 mg quercetin. Setiap uji kelarutan dan laju disolusi dilakukan replikasi tiga kali.

4.4 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Bagan kerangka operasional.

4.5 Metode Penelitian

4.5.1 Pemeriksaan Bahan Baku Penelitian

4.5.1.1 Quercetin

a. Analisis Termal dengan DTA (*Differential Thermal Analysis*)

Pemeriksaan titik lebur quercetin dengan menggunakan DTA dilakukan dengan cara menimbang quercetin 3-5 mg dalam krus aluminium. Kemudian krus aluminium dimasukkan ke dalam alat DTA yang diatur dengan kecepatan pemanasan 10°C/menit dan pengamatan dilakukan pada rentang suhu 30-370 °C. Pemeriksaan ini dimaksudkan untuk membandingkan titik lebur quercetin dengan pustaka yaitu sebesar 310°C.

b. Penentuan Spektrum Inframerah

Spektrum inframerah quercetin dibuat dengan metode cakram KBr. Sebanyak $\pm 1\%$ quercetin dalam KBr digerus sampai homogen dalam mortir, kemudian dimasukkan ke dalam pengering hampa udara. Selanjutnya dicetak dengan menggunakan penekan hidrolik sampai diperoleh cakram yang transparan. Kemudian cakram dimasukkan ke dalam kuvet dan dialiri sinar inframerah yang selanjutnya diamati spektrumnya. Hasil pemeriksaan nantinya akan dibandingkan dengan spektrum inframerah quercetin standar.

4.5.1.2 PEG 8000

a. Analisis Termal dengan DTA

Pemeriksaan titik lebur PEG 8000 dengan menggunakan DTA dilakukan dengan cara menimbang PEG 8000 3-5 mg dalam krus aluminium. Kemudian krus aluminium dimasukkan

kedalam alat DTA yang diatur dengan kecepatan pemanasan $10^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ dan pengamatan dilakukan pada rentang suhu $30\text{--}100^{\circ}\text{C}$. Pemeriksaan ini dimaksudkan untuk membandingkan titik lebur PEG 8000 dengan pustaka yaitu sekitar dibawah 65°C .

b. Penentuan Spektrum Inframerah

Spektrum inframerah PEG 8000 dibuat dengan metode cakram KBr. Sebanyak $\pm 1\%$ PEG 8000 dalam KBr digerus sampai homogen dalam mortir, kemudian dimasukkan kedalam pengering hampa udara. Selanjutnya dicetak dengan menggunakan penekan hidrolik sampai diperoleh cakram yang transparan. Kemudian cakram dimasukkan kedalam kuvet dan dialiri sinar inframerah yang selanjutnya diamati spektrumnya. Hasil pemeriksaan dibandingkan dengan spektrum inframerah PEG 8000 standar (Watson, 2005).

4.5.2 Pembuatan Dispersi Padat Quercetin-PEG 8000

Menimbang teliti 1 g quercetin. Selanjutnya menimbang PEG 8000 sesuai dengan perbandingan yang telah direncanakan. Leburkan PEG 8000 diatas *hot plate* yang bersuhu $65^{\circ}\text{--}70^{\circ}\text{C}$. Setelah PEG 8000 melebur, masukan quercetin, aduk hingga quercetin terdispersi merata dalam leburan PEG 8000 selama 5 menit. Setelah itu dinginkan campuran tersebut hingga padat dan mengering. Gerus sampai didapat bentuk serbuk kemudian diayak dengan menggunakan ayakan mesh no.50, kemudian disimpan dalam wadah kedap udara.

4.5.3 Pembuatan Campuran Fisik Quercetin-PEG 8000

Menimbang teliti 1 g quercetin yang sebelumnya telah diayak dengan ayakan mesh no.50. Selanjutnya, timbang teliti PEG 8000 sesuai dengan perbandingan yang telah dibuat. PEG 8000 sebelumnya sudah diayak dengan ayakan mesh no.50. Campurkan quercetin dan PEG 8000 yang telah ditimbang sampai homogen selama 4 menit.

4.5.4 Pembuatan Larutan Dapar pH 5

Menimbang asam sitrat 20,1 g dan NaOH 8,0 g. Larutkan asam sitrat dan NaOH ke dalam air hingga 1 L. Adjust pH dapar dengan menggunakan HCl. Ukur pH dapar hingga didapat pH $5,00 \pm 0,05$ menggunakan pH meter.

4.5.5 Pembuatan Kurva Baku Quercetin dalam Media Dapar Asam Sitrat – NaOH pH 5

4.5.5.1 Pembuatan Larutan Baku Induk Quercetin

Larutan baku induk dibuat dengan kadar 400 $\mu\text{g/mL}$. Ditimbang teliti quercetin sejumlah 20,0 mg dan dilarutkan dalam etanol absolut. Selanjutnya, masukan secara kuantitatif kedalam labu ukur 50,0 mL. Tambahkan etanol absolut hingga tepat tanda. Kocok sampai homogen.

4.5.5.2 Pembuatan Larutan Baku Kerja Quercetin

Larutan baku kerja quercetin dibuat dengan konsentrasi 0,4; 4,0; 8,0; 16,0; 20,0; 24,0 $\mu\text{g/mL}$ dengan cara sebagai berikut :

- a. Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 500,0 mL. Kemudian tambahkan larutan dapar sampai batas tanda. Kocok

larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- b. Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 50,0 mL. Kemudian tambahkan larutan dapar sampai batas tanda. Kocok larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- c. Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 25,0 mL. Kemudian tambahkan larutan dapar sampai batas tanda. Kocok larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- d. Dipipet sebanyak 1,0 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 25,0 mL. Kemudian tambahkan larutan dapar sampai batas tanda. Kocok larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 16,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- e. Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 mL. Kemudian tambahkan larutan dapar sampai batas tanda. Kocok larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- f. Dipipet sebanyak 3,0 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 50,0 mL. Kemudian tambahkan larutan dapar sampai batas tanda. Kocok larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 24,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.5.5.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Quercetin

Penentuan panjang gelombang maksimum pada quercetin dilakukan dengan cara pengamatan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Larutan yang diamati absorbansinya adalah larutan kurva baku dengan kadar 8 µg/mL dan 16 µg/mL. Pengamatan absorbansi ini dilakukan pada panjang gelombang 200-500 nm. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang memberikan absorbansi terbesar.

4.5.5.4 Pemeriksaan Pengaruh PEG 8000 terhadap Panjang Gelombang Maksimum Quercetin

Dibuat larutan PEG 8000 dengan kadar 400 µg/mL dengan cara menimbang teliti PEG 8000 sejumlah 20,0 mg dan dilarutkan dalam labu ukur 50,0 mL menggunakan larutan dapar. Ambil 0,5 mL larutan baku induk quercetin 400 µg/mL yang telah dibuat, masukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Kemudian tambahkan 0,5 mL larutan PEG 8000 400 µg/mL. Kemudian tambahkan larutan dapar sampai batas tanda. Kocok larutan hingga homogen. Amati absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada 200-500 nm. Spektrum yang dihasilkan dibandingkan dengan spektrum larutan baku kerja quercetin dengan kadar 8,0 µg/mL.

4.5.5.5 Penentuan Kurva Baku Quercetin

Larutan baku kerja yang telah dibuat diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum quercetin. Selanjutnya dibuat kurva absorbansi terhadap kadar larutan baku kerja. Dari data tersebut dapat diperoleh persamaan kurva baku dan regresi linear kurva tersebut.

4.5.5.6 Pemeriksaan Homogenitas Quercetin

Timbang campuran fisik dan dispersi padat setara dengan berat 20 mg quercetin. Larutkan dengan etanol absolut. Masukkan larutan secara kuantitatif kedalam labu ukur 25,0 mL. Tambahkan etanol absolut sampai tanda batas. Kocok sampai homogen. Selanjutnya, ambil 1,0 mL larutan dan encerkan dengan menggunakan larutan dapar sampai 50 mL. Amati absorbannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum quercetin. Penentuan dilakukan dengan replikasi tiga kali.

4.5.6 Pembuatan Kurva Baku Quercetin dalam Media Air

4.5.6.1 Pembuatan Larutan Baku Induk Quercetin

Larutan baku induk dibuat dengan kadar 200 $\mu\text{g/mL}$. Ditimbang teliti quercetin sejumlah 50,0 mg dan dilarutkan dalam etanol absolut. Selanjutnya, masukan secara kuantitatif kedalam labu ukur 250,0 mL. Tambahkan etanol absolut hingga tepat tanda. Kocok sampai homogen.

4.5.6.2 Pembuatan Larutan Baku Kerja Quercetin dalam Media Air

Larutan baku kerja quercetin dibuat dengan konsentrasi 4,0; 8,0; 10,0; 12,0; 16,0 $\mu\text{g/mL}$ dengan cara sebagai berikut :

- a. Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 25,0 mL. Kemudian tambahkan air suling sampai batas tanda. Kocok larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 4,0 $\mu\text{g/mL}$.
- b. Dipipet sebanyak 1,0 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 25,0 mL. Kemudian

- tambahkan air suling sampai batas tanda. Kocok larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 8,0 $\mu\text{g/mL}$.
- c. Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 mL. Kemudian tambahkan air suling sampai batas tanda. Kocok larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 10,0 $\mu\text{g/mL}$.
 - d. Dipipet sebanyak 3,0 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 50,0 mL. Kemudian tambahkan air suling sampai batas tanda. Kocok larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 12,0 $\mu\text{g/mL}$.
 - e. Dipipet sebanyak 2,0 mL larutan baku induk quercetin, dimasukkan kedalam labu ukur 25,0 mL. Kemudian tambahkan air suling sampai batas tanda. Kocok larutan tersebut hingga homogen dan diperoleh kadar 16,0 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.6.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Quercetin dalam Air

Penentuan panjang gelombang maksimum pada quercetin dilakukan dengan cara pengamatan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Larutan yang diamati absorbannya adalah larutan kurva baku dengan kadar 8 $\mu\text{g/mL}$ dan 12 $\mu\text{g/mL}$. Pengamatan absorbansi ini dilakukan pada panjang gelombang 200-500 nm. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang memberikan absorbansi terbesar.

4.5.6.4 Penentuan Kurva Baku Quercetin dalam Air

Larutan baku kerja yang telah dibuat diamati absorbannya pada panjang gelombang maksimum quercetin. Selanjutnya dibuat kurva

absorban terhadap kadar larutan baku kerja. Dari data tersebut dapat diperoleh persamaan kurva baku dan regresi linear kurva tersebut.

4.5.7 Uji Kelarutan

4.5.7.1 Penentuan Waktu Kelarutan Jenuh Quercetin

Ditimbang quercetin sejumlah 20,0 mg. Kemudian tambahkan larutan dapar sebagai media sejumlah 40 mL. Lakukan pengadukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan tertentu dalam suhu konstan $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Dilakukan pengambilan cuplikan quercetin 3 mL pada menit ke 30; 60; 90; 120; 180 dan seterusnya hingga diperoleh kadar konstan. Sebelum diambil, diamkan terlebih dahulu selama 10 menit. Kemudian saring dengan membran filter 0,45 μm . Amati absorbannya dan tentukan kadar quercetin melalui spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Lakukan penentuan waktu kelarutan jenuh quercetin dengan replikasi tiga kali.

4.5.7.2 Uji Kelarutan Dispersi Padat dan Campuran Fisik Quercetin – PEG 8000

Ditimbang dengan teliti dispersi padat dan campuran fisik (setara dengan quercetin 20 mg). Masukkan kedalam bejana yang berisi 40 mL larutan dapar pH 5. Lakukan pengadukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan tertentu dalam suhu konstan ($30 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Diambil cuplikan larutan pada waktu jenuh sejumlah 5 mL. Sebelum pengambilan cuplikan, diamkan bejana tersebut selama 10 menit. Selanjutnya, saring larutan dengan *filter holder* yang dilengkapi dengan membran filter 0.45 μm . Tentukan kadar larutan tersebut menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum quercetin. Hitung kadar quercetin melalui kurva baku yang

telah dibuat. Penentuan kelarutan dispersi padat dilakukan replikasi tiga kali pada semua perbandingan yang telah dibuat.

4.5.8 Uji Disolusi

Pengujian disolusi dilakukan pada zat tunggal quercetin, campuran fisik quercetin-PEG 8000 dan dispersi padat quercetin-PEG 8000. Uji disolusi dilakukan dengan menggunakan alat uji disolusi (Erweka DT 700) dengan pengaduk keranjang (*basket*). Kecepatan pengadukannya adalah 100 rpm dengan media air dengan penambahan surfaktan SLS 1%. Suhu konstan yang digunakan adalah $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Prosedur pengujian disolusi adalah sebagai berikut: pertama-tama timbang sampel (setara dengan quercetin 5 mg). Sampel dimasukan kedalam keranjang dan dimasukan kedalam bejana yang telah berisi media yang telah diatur suhu konstannya. Selanjutnya, pengaduk diputar sesuai kecepatan yang diinginkan. Ambil cuplikan larutan sebanyak 5 mL setiap interval menit ke 5; 10; 15; 20; 25; dan 30 menggunakan spuit injeksi. Larutan tersebut disaring dengan menggunakan *filter holder* yang dilengkapi dengan membran filter $0.45 \mu\text{m}$. Pada setiap pengambilan cairan sampel, dilakukan penggantian media disolusi sejumlah 5 mL larutan dapar yang dimasukan. Selanjutnya, tentukan kadar larutan tersebut menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum quercetin. Hitung kadar quercetin melalui kurva baku yang telah dibuat. Penentuan laju disolusi dilakukan replikasi tiga kali. Dari uji disolusi akan didapatkan prosentase terlarut quercetin yang nantinya dapat dihitung ED_{30} dan slope dari quercetin, dispersi padat dan campuran fisik.

4.5.9 Analisis Data

4.5.9.1 Uji Kelarutan

Pada uji kelarutan, dihitung kadar quercetin yang terlarut pada waktu jenuh melalui kurva baku yang telah dibuat sebelumnya. Uji kelarutan dilakukan selama waktu kelarutan jenuh quercetin tunggal. Nantinya, akan dibandingkan dengan campuran fisik quercetin-PEG 8000 dan dispersi padat quercetin-PEG 8000.

4.5.9.2 Uji Disolusi

Pada uji disolusi akan didapatkan profil disolusi dari quercetin tunggal, campuran fisik quercetin-PEG 8000 dan dispersi padat quercetin-PEG 8000. Nantinya akan dibandingkan profil disolusi dari zat-zat tersebut. Pada uji disolusi dilakukan pengenceran 5 mL pada setiap pengambilan cuplikan, maka untuk menghitung kadar quercetin pada sampel digunakan faktor koreksi dalam persamaan Wuster.

$$C_n = C_n + \frac{a}{b} \sum_{i=1}^{n-1} C_s \dots \dots \dots (3)$$

Profil laju disolusi merupakan kurva yang menggambarkan jumlah senyawa yang terlarut terhadap waktu. Menghitung harga *slope* untuk mengetahui laju disolusi quercetin antar perlakuan dengan persamaan regresi antara waktu (t) dengan % terlarut.

Menghitung harga Efisiensi Diolusi 30 (ED₃₀), parameter yang digunakan untuk membandingkan prosentase terlarut dalam 30 menit disolusi antar perlakuan

$$ED(\%) = \frac{\text{luas daerah dibawah kurva}}{\text{luas segi empat}} \times 100\% \dots \dots \dots (4)$$

4.5.9.3 Analisis Statistika

a. Perhitungan Kelarutan

Untuk mengetahui waktu jenuh quercetin dilakukan uji statistika T-Test berpasangan pada kadar setiap waktu pengukuran. Bila harga $p > 0,05$ maka kadar tidak berbeda makna atau konstan. Selanjutnya untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang bermakna pada kelarutan quercetin, campuran fisik dan dispersi padat dilakukan uji statistika ANOVA *one way*.

Bila terdapat perbedaan kelarutan yang bermakna, dilanjutkan dengan uji HSD (*Honestly Significant Difference*) menurut Tukey dengan $\alpha = 0.05$ untuk mengetahui letak perbedaannya. Jika hasil rata-rata kelarutan antara perlakuan memiliki selisih yang lebih besar dibanding hasil perhitungan HSD, maka terdapat perbedaan kelarutan yang bermakna antar perlakuan tersebut.

b. Perhitungan Laju disolusi

Perhitungan untuk membandingkan laju disolusinya dapat dilakukan dengan menghitung nilai ED_{30} dan *slope*. Data kemudian dianalisis secara statistik dengan ANOVA (*Analysis of Variance*). Untuk menunjukkan adanya kebermaknaan perbedaan antar kelompok perlakuan dengan derajat kepercayaan 0.95 ($\alpha = 0.05$), dengan membandingkan harga F hitung dengan F tabel. Bila harga F hitung lebih besar daripada F tabel, maka terdapat perbedaan ED dan *slope* yang bermakna, minimal satu pasang data.

Bila terdapat perbedaan ED dan *slope* yang bermakna, dilanjutkan dengan uji HSD (*Honestly Significant Difference*)

menurut Tukey dengan $\alpha=0.05$ untuk mengetahui letak perbedaanya.

$$HSD = q_{a,k,N-k} \sqrt{MSE/n} \dots \dots \dots (5)$$

Keterangan :

q : Diperoleh dari tabel F

a : Derajat kepercayaan

k : Jumlah perlakuan

N : Jumlah pengamatan total

n : Jumlah pengulangan

MSE : Kuadrat rata-rata kesalahan

Jika hasil rata-rata ED dan *slope* antara perlakuan memiliki selisih yang lebih besar dibanding hasil perhitungan HSD, maka terdapat perbedaan ED dan *slope* yang bermakna antar perlakuan tersebut.

