

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan dan Alat

4.1.1 Bahan

Fraaksi diterpen lakton (FDTL) Sambiloto dari herba *Andrographis paniculata* Ness (Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga); Kitosan *pharmaceutical grade low* (Biotech Surindo); Sodium tripolifosfat pentabasic *practical grade* (Nacalai Tesque); Asam asetat *pro analisis*; Etanol *pro analisis*; Aquades.

4.1.2 Alat

Spray Dryer (SD-basic Lab Plant UK Ltd. Type SD B09060019); Neraca analitik (Ohaus); Spektrofotometer inframerah (Jasco FT-IR 5300); *Diferential Thermal Apparatus* (Mettler Toledo FP-65 DTA P-900 Thermal); Difraktor X'Pert Phillips; *Digital viscosimeter* (Brookfield Viscosimeter DV-II); *Dissolution Tester* (Erweka DT-700); Alat-alat gelas; Ultrasonic ELMA LC-60/H; *Magnetic stirrer* (DRAGONLAB MS-Pro); *Thermoline Hot Plate* (Thermoline Cimarec 3); pH meter (Mettler Toledo Seven Easy); HPLC (Agilent 1100 series); *Scanning Electron microscopy* (Inspect S50 Tipe FP 2017/12).

4.2 Metode Penelitian

4.2.1 Pemeriksaan Bahan Baku

4.2.1.1 Identifikasi Kitosan

1. Pemeriksaan organoleptis

Pemeriksaan organoleptis kitosan dilakukan dengan cara memeriksa bentuk, warna, rasa, dan bau. Hasil yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan pustaka.

2. Pemeriksaan titik lebur

Ditentukan menggunakan alat *Differential Thermal Apparatus* (DTA). Pemeriksaan titik lebur kitosan dilakukan pada suhu 50°C-300°C dengan kecepatan kenaikan suhu 10°C per menit. Hasil termogram yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka.

3. Pemeriksaan dengan spektrofotometer infra merah

Spektrum inframerah ditentukan menggunakan spektroskopi FTIR (Jasco FT-IR 5300) dengan metode cakram KBr. Kitosan digerus sampai halus dan homogen. Kemudian dimasukkan ke dalam pengering hampa udara dan dicetak dengan penekan hidrolis hingga terbentuk pelet yang transparan. Pelet diletakkan pada alat pemegang yang sesuai dalam spektrofotometer dan dilakukan perekaman terhadap spektra infra merah. Sampel diamati pada panjang gelombang 4000-400 cm^{-1} . Hasil pemeriksaan dibandingkan dengan spektrum infra merah kitosan pembanding

4. Pemeriksaan dengan difraksi sinar X
Difraktogram sinar X ditentukan menggunakan alat difraktor X'Pert Phillips dilakukan pada suhu ruangan dengan kondisi pengukuran sumber sinar X $K\alpha$, target logam Cu, filter Ni, voltase 40 kV, arus 30 mA pada rentang 2θ 5-40°. Hasil difraktogram yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka.
5. Pemeriksaan viskositas.
Pemeriksaan viskositas kitosan dilakukan dengan alat *Digital viscosimeter* (Brookfield Viscosimeter DV-II). Hasil pemeriksaan dibandingkan dengan viskositas kitosan pada pustaka atau disetarakan dengan sertifikat analisis dari bahan.

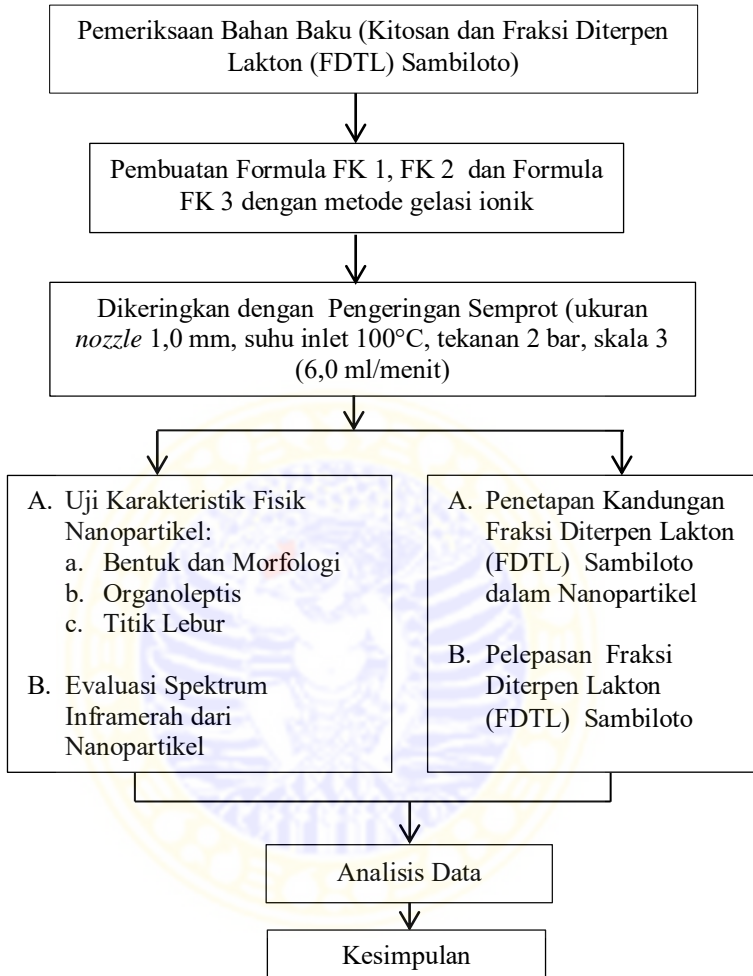
4.2.1.2 Identifikasi Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto

1. Pemeriksaan organoleptis
Pemeriksaan organoleptis dilakukan terhadap bentuk, warna, rasa dan bau kemudian dibandingkan dengan pustaka.
2. Pemeriksaan titik lebur fraksi diterpen lakton
Penentuan titik lebur dilakukan dengan alat *Differential Thermal Apparatus* (DTA). Pemeriksaan titik lebur dilakukan pada suhu 160-240 °C dengan kecepatan kenaikan suhu $\pm 5^\circ\text{C}$ per menit. Hasil termogram yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka.
3. Pemeriksaan dengan spektrofotometer infra merah
Spektrum inframerah ditentukan menggunakan spektroskopi FTIR (Jasco FT-IR 5300) dengan metode

cakram KBr. Fraksi diterpen laktone digerus sampai halus dan homogen. Kemudian dimasukkan ke dalam pengering hampa udara dan dicetak dengan penekan hidrolik hingga terbentuk cakram yang transparan. Hasil pemeriksaan dibandingkan dengan spektrum infra merah fraksi diterpen laktone pembanding.

4. Pemeriksaan dengan difraksi sinar X

Difraktogram sinar X ditentukan menggunakan alat difraktor X'Pert Phillips dilakukan pada temperature ruangan dengan kondisi pengukuran sumber sinar X $K\alpha$, target logam Cu, filter Ni, voltase 40 kV, arus 40 mA pada rentang 2θ 5-40°. Hasil difraktogram yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka.



Gambar 4.1 Skema Kerja Penelitian

Keterangan:

FK 1 = Nanopartikel FDTL sambiloto-kitosan dengan konsentrasi kitosan 0,08%

FK 2 = Nanopartikel FDTL sambiloto-kitosan dengan konsentrasi kitosan 0,1%

FK 3 = Nanopartikel FDTL sambiloto-kitosan dengan kitosan konsentrasi 0,12%

4.2.2 Rancangan Penelitian

Nanopartikel dibuat dengan metode gelas ionik dan dikeringkan dengan proses pengeringan semprot dengan jumlah kitosan yang berbeda.

Tabel IV.1 Rancangan Formula Nanopartikel Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto-Kitosan.

Nama Bahan	Fungsi	FK 1	FK 2	FK 3
FDTL Sambiloto	Bahan Obat	40 mg	40 mg	40 mg
Kitosan	Polimer	80 mg	100 mg	120 mg
TPP	Penyambung Silang	64 mg	80 mg	96 mg

Keterangan:

FK 1 = Nanopartikel FDTL sambiloto-kitosan dengan konsentrasi kitosan 0,08%

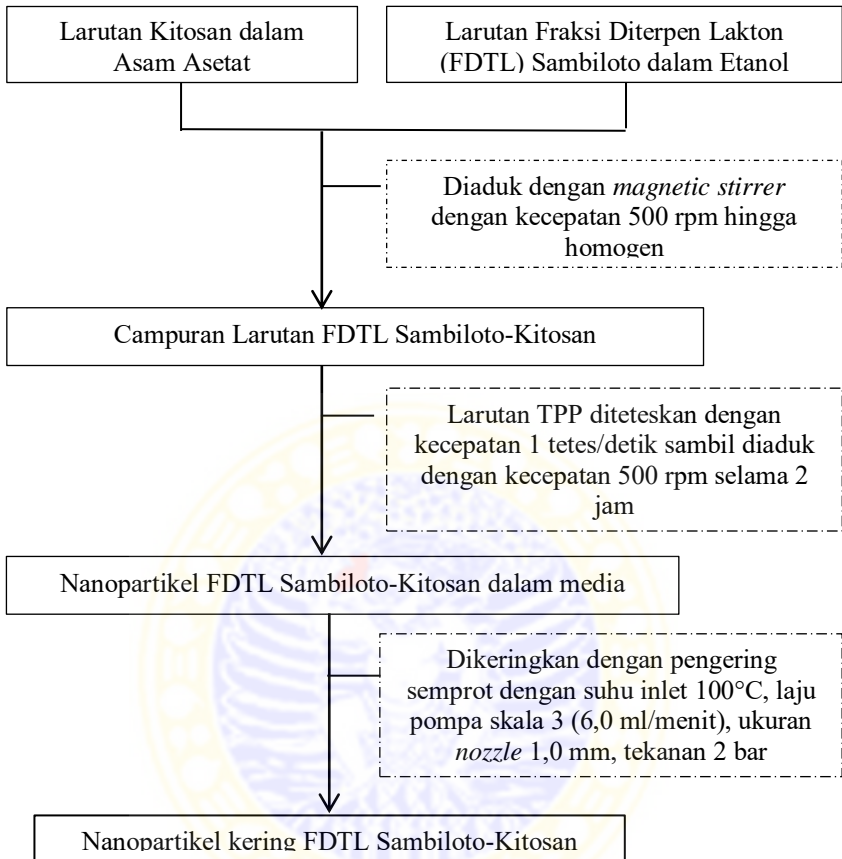
FK 2 = Nanopartikel FDTL sambiloto-kitosan dengan konsentrasi kitosan 0,1%

FK 3 = Nanopartikel FDTL sambiloto-kitosan dengan kitosan konsentrasi 0,12%

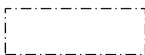
4.2.3 Pembuatan Nanopartikel Fraksi Diterpen Lakton (FDTL) Sambiloto-Kitosan

1. Kitosan ditimbang sesuai dengan formula pada tabel 4.1, didispersikan secara merata masing-masing ke dalam 100 ml asam asetat kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 500 rpm sampai larut.
2. FDTL sambiloto ditimbang sebanyak 40 mg, kemudian dilarutkan dalam 5 ml etanol, diaduk sampai larut.
3. Larutan kitosan dituangkan ke dalam larutan FDTL sambiloto, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 500 rpm.

4. TPP ditimbang sesuai dengan formula pada tabel 4.1, kemudian dilarutkan ke dalam aquadest 80 ml aquadest dan diaduk hingga homogen.
5. Larutan TPP yang terbentuk diteteskan ke dalam larutan FDTL sambiloto-kitosan (untuk masing-masing formula) sambil terus diaduk dengan kecepatan 500 rpm menggunakan *magnetic stirrer* hingga TPP habis, selanjutnya diaduk selama 2 jam.
6. Nanopartikel yang terbentuk dikeringkan menggunakan pengering semprot. Dilakukan pengaturan instrument pengering semprot meliputi: ukuran *nozzle* 1,0 mm, suhu inlet 100°C, tekanan 2 bar, skala 3 (6,0 ml/menit).
7. Nanopartikel tanpa FDTL sambiloto juga dibuat dengan formula dan metode pembuatan yang sama yaitu FK₀1, FK₀2, dan FK₀3.



Keterangan:



= Proses yang dilakukan



= Hasil pembuatan

Gambar 4.2 Alur kerja pembuatan nanopartikel fraksi diterpen lakton-kitosan dengan metode pengering semprot

4.2.4 Evaluasi Nanopartikel Fraksi Diterpen Lakton (FDTL) Sambiloto-Kitosan

4.2.4.1 Evluasi morfologi nanopartikel kering

Evaluasi dilakukan terhadap kitosan dan partikel kitosan (FK 1- FK 3). Sampel diletakkan di atas holder yang telah dilapisi carbon, selanjutnya holder diletakkan di dalam *sputter cooter* untuk dilapisi dengan *gold palladium* selama \pm 120 detik. Morfologi partikel diamati dengan *scanning electron microscopy* (SEM) FEI Inspect s50 pada beberapa perbesaran dan dilakukan pengukuran terhadap beberapa partikel.

4.2.4.2 Evaluasi spektroskopi FT-IR

Evaluasi spektrum inframerah ini dilakukan untuk mengetahui adanya interaksi yang terjadi antara bahan obat fraksi diterpen lakton sambiloto dengan kitosan-TPP. Uji spektrofotometri inframerah dengan metode cakram KBr dilakukan dengan cara :

1. Sampel dari masing-masing perlakuan ditimbang 2 mg
2. Ditambah serbuk KBr sebanyak 300 mg.
3. Campuran tersebut digerus sampai halus dan homogen kemudian di masukkan kedalam alat pembuat cakram KBr kemudian ditekan dengan penekan hidrolis hingga terbentuk cakram yang transparan.
4. Cakram diletakkan dalam sampel holder dan sampel diamati dengan panjang gelombang $4000-400\text{ cm}^{-1}$ kemudian direkam menggunakan spektrofotometer FTIR.

5. Hasil pemeriksaan dibandingkan dengan spektrum fraksi diterpen lakton dan kitosan.

4.2.4.3 Evaluasi *Different Thermal Apparatus* (DTA)

Penentuan titik lebur dilakukan dengan alat *Different Thermal Apparatus* (DTA). Diambil ± 5 mg nanopartikel kitosan, kemudian dimasukkan ke dalam *crucible pan* tertutup. Pemeriksaan titik lebur dilakukan pada suhu 50° - 300°C dengan kecepatan kenaikan suhu $\pm 5^{\circ}\text{C}$ per menit. Termogram yang terbaca diamati.

4.2.4.4 Evaluasi difraksi sinar X

Evaluasi difraktogram sinar X ini dilakukan untuk mengetahui struktur sistem nanopartikel fraksi diterpen lakton sambiloto-kitosan. Ditentukan menggunakan alat difraktor X'Pert Phillips dilakukan pada suhu ruangan dengan kondisi pengukuran sumber sinar X $K\alpha$, target logam Cu, filter Ni, voltase 40 kV, arus 40 mA pada rentang 2θ 5 - 40° . Pemeriksaan dilakukan dengan cara sampel diletakkan pada *sample holder* dan diratakan untuk mencegah orientasi partikel selama penyiapan sampel.

4.2.4.5 Penetapan kandungan Fraksi Diterpen Lakton (FDTL) Sambiloto dalam nanopartikel

Penetapan kandungan fraksi diterpen lakton sambiloto dalam nanopartikel dilakukan dengan menggunakan HPLC (Agilent 1100 series). Langkah pertama dilakukan preparasi sampel, serbuk nanopartikel fraksi diterpen lakton sambiloto-kitosan sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 2 ml metanol p.a, selanjutnya ditambah pelarut sampai 10 ml. Kemudian disaring dengan membran filter 0,2 μm . Larutan dianalisis kadarnya dengan HPLC Agilent 1100 dengan fase gerak methanol : dapar fosfat pH 3 50:50 pada panjang gelombang 228 nm. Kadar fraksi diterpen lakton sambiloto dalam nanopartikel dihitung dengan membandingkan luas area fraksi andrografolid. Penetapan kadar dilakukan sebanyak tiga kali. Dari hasil penetapan kadar fraksi diterpen lakton sambiloto dapat dihitung efisiensi penjerapan fraksi diterpen lakton sambiloto dalam nanopartikel (Aryani, 2005).

4.2.4.6 Penentuan efisiensi Penjerapan Fraksi Diterpen Lakton (FDTL) Sambiloto

Nilai efisiensi penjerapan fraksi diterpen lakton dapat dihitung dari data hasil penetapan kandungan fraksi diterpen lakton dalam nanopartikel dengan menggunakan rumus (Mahajan *et al.*, 2009).

$$\text{Efisiensi penjerapan obat} = \frac{M_{\text{actual}}}{M_{\text{theoretical}}} \times 100\% \quad (\text{IV.1})$$

Keterangan:

M_{actual} = jumlah bahan obat yang terkandung dalam sistem nanopartikel
 $M_{\text{theoretical}}$ = jumlah bahan obat yang ditambahkan dalam proses pembuatan

4.2.4.7 Penentuan uji pelepasan fraksi diterpen lakton (FDTL) sambiloto

Uji pelepasan dilakukan untuk mengetahui profil dan kecepatan pelepasan FDTL dari nanopartikel FDTL-Kitosan dan membandingkannya dengan substansi FDTL. Uji dilakukan dengan menginkubasi sejumlah partikel setara dengan 1 mg FDTL dalam 25 mL media 0,1% SLS dan diletakkan pada *waterbath shaker* yang diatur pada suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ dan kecepatan skala 1 (110 rpm). Cuplikan sampel diambil sebanyak 0,5 mL setiap interval waktu tertentu (15, 30, 45, 60, 120, 180, dan 360 menit) lalu disaring dengan kertas saring milipore 0,45 μm . Pada setiap pengambilan cuplikan sampel, dilakukan penggantian media dengan volume yang sama. Analisis kadar sampel dilakukan terhadap substansi FDTL sebagai kontrol. Untuk mendapatkan kadar sebenarnya dengan memperhitungkan pengenceran dari media dalam setiap pengambilan cuplikan sampel, maka digunakan faktor koreksi dalam persamaan (Wuster *and* Taylor, 1965), yaitu :

$$C_n = C'_n + \frac{a}{b} \sum_{s=1}^{N-1} C_s \quad (\text{IV.2})$$

Keterangan :

C_n = konsentrasi sebenarnya setelah koreksi (mg/L)

C'_n = konsentrasi yang terukur (mg/L)

C_s = konsentrasi yang terukur dari sampel sebelumnya (mg/L)

a = volume sampel yang diambil (ml)

b = volume media disolusi (ml)

4.2.4.8 Penentuan laju pelepasan fraksi diterpen lakton (FDTL) sambiloto

Laju pelepasan FDTL sambiloto dari nanopartikel FDTL sambiloto-kitosan disajikan dari data profil pelepasan FDTL sambiloto pada nanopartikel FDTL sambiloto-kitosan dengan pembuatan persamaan garis regresi $y = bx + a$, dengan akar waktu sebagai absis dan kadar pelepasan sebagai ordinat. Besar laju pelepasan FDTL sambiloto ditunjukkan dengan nilai b (*slope*).

4.2.4.9 Penentuan analisis statistik

Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari efisiensi penjerapan dan laju pelepasan fraksi diterpen lakton sambiloto dari nanopartikel fraksi diterpen lakton sambiloto-kitosan dilakukan analisis statistik dengan metode uji *Analysis of Variance* (ANOVA).

Rancangan ini dapat digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna antar formula dengan membandingkan harga F hitung terhadap F tabel dengan derajat kepercayaan (α) = 0,05. Jika dari analisis diperoleh hasil F hitung lebih besar dari F tabel, maka terdapat perbedaan bermakna antar formula.

Perhitungan dilanjutkan dengan uji HSD (*Honestly Significant Difference Test*) untuk mengetahui formula mana saja yang berbeda. Adanya perbedaan bermakna antara dua formula dipenuhi bila harga selisih rata-rata dua formula lebih besar daripada hasil perhitungan harga HSD (Daniel, 2005).

$$\text{HSD} = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{\text{MSE}}{n}} \quad (\text{IV.3})$$

(4.3)

Keterangan :

- $q_{\alpha, k, N-k}$ = harga q tabel pada (α , k, N-k)
 α = derajat kepercayaan ($\alpha = 0,05$)
k = banyaknya kelompok (numerator)
N-k = derajat bebas *within groups* (denominator)
MSE = MSE pada uji anova CRD
N = pengamatan dalam tiap kelompok

