

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

Ezetimibe (Inogent Laboratories), poloxamer 407 (BASF), Avicel PH 101 (Asahi Kasei Chemicals), laktosa monohidrat (Hilmar), asam asetat glasial p.a. (Mallincrodt), natrium asetat p.a (Merk), natrium lauril sulfat (SLS), metanol p.a. (Merk) dan air suling.

4.2 Alat Penelitian

Spektrofotometer UV-Vis (Cary 50 conc), spektrofotometer infra merah (Jasco FT-IR/5300), *Differential Thermal Analysis* (DTA) (Mettler Toledo FP9 TA Cell), difraktometer sinar X (Philips X'pert), alat uji disolusi (Erweka DT-700), timbangan analitik (Mettler Toledo AL 204), *hotplate*, pengayak no. mesh 80 (Retsch Type ATSM), spuit injeksi, *filter holder*, mortir, stamper, dan alat-alat gelas.

4.3 Rancangan Penelitian

Pada penelitian kali ini dilakukan penelitian eksperimental tentang laju disolusi ezetimibe. Perlakuan dibagi menjadi dua kelompok besar yaitu dispersi padat ezetimibe-poloxamer 407 dan dispersi padat ezetimibe yang diadsorpsikan pada Avicel PH 101-laktosa monohidrat. Perlakuan secara lengkap dapat dilihat dalam tabel IV.1. Terdapat dua variabel dalam penelitian ini yaitu variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas berupa jumlah poloxamer 407 dan adsorben yang ditambahkan dalam dispersi padat ezetimibe yang diadsorpsikan pada adsorben avicel PH 101-laktosa monohidrat. Sedangkan variabel tergantung berupa peningkatan laju disolusi dan adanya perbedaan karakterisasi fisik yang ditentukan dengan Difraksi sinar-X, dan *Differential Thermal Analysis* (DTA).

Tabel IV.1 Pembagian Perlakuan Ezetimibe

Bahan	Zat Murni (EZE)	Dispersi Padat (DP)			Dispersi Padat-Adsorben (DPA)		
		I	II	III	I	II	III
Ezetimibe	1	1	1	1	1	1	1
Poloxamer 407	-	1	2	3	1	2	3
Avicel PH 101-Laktosa (1:2)	-	-	-	-	8	7	6

Keterangan :

EZE : Ezetimibe Murni

DP I : Dispersi Padat Ezetimibe-Poloxamer 407 (1:1)

DP II : Dispersi Padat Ezetimibe-Poloxamer 407 (1:2)

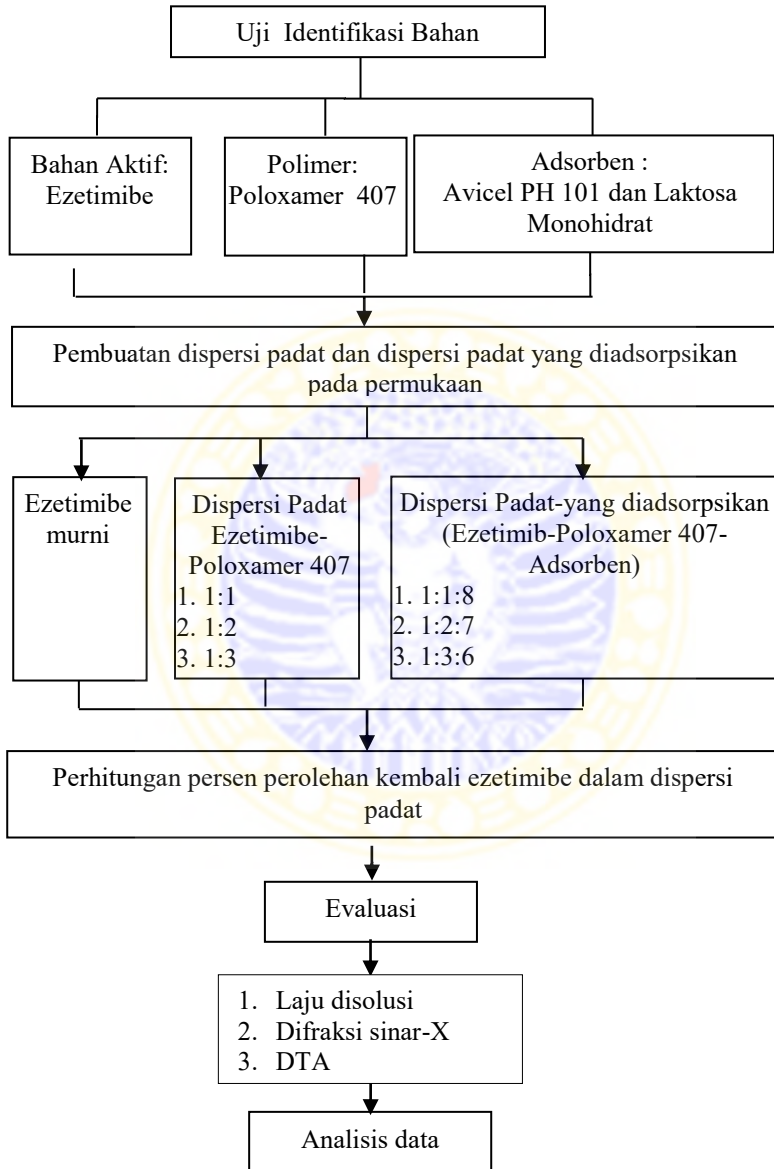
DP III : Dispersi Padat Ezetimibe-Poloxamer 407 (1:3)

DPA I : Dispersi Padat Ezetimibe-Poloxamer 407-Adsorben (1:1:8)

DPA II : Dispersi Padat Ezetimibe-Poloxamer 407-Adsorben (1:2:7)

DPA III : Dispersi Padat Ezetimibe-Poloxamer 407-Adsorben (1:3:6)

4.4 Kerangka Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Rancangan Penelitian

4.5 Prosedur Kerja Penelitian

4.5.1 Identifikasi Bahan Baku Penelitian

4.5.1.1 Identifikasi Ezetimibe

4.5.1.1.1 Analisis Spektrofotometri Inframerah

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

4.5.1.1.2 Analisis Termal Dengan DTA (*Differential Thermal Analysis*)

Titik lebur ezetimibe diamati dengan menggunakan DTA, yaitu dengan menimbang ezetimibe 3-5 mg dalam krus aluminium. Krus aluminium dimasukkan dalam alat DTA. Alat diatur dengan kecepatan pemanasan $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ dan pengamatan dilakukan pada rentang suhu 30-300 $^{\circ}\text{C}$. Pemeriksaan ini dimaksudkan untuk membandingkan titik lebur ezetimibe dengan pustaka yaitu sebesar 163-166 $^{\circ}\text{C}$ (Lestari, *et al.*, 2011).

4.5.1.2 Identifikasi Poloxamer 407

4.5.1.2.1 Analisis Spektrofotometri Inframerah

Spektrum inframerah poloxamer 407 dibuat dengan metode cakram KBr seperti pada prosedur 4.3.3.1.1

4.5.1.2.2 Analisis Termal Dengan DTA (*Differential Thermal Analysis*)

Pemeriksaan titik lebur poloxamer 407 dengan menggunakan DTA dilakukan seperti pada prosedur 4.3.3.1.2. Pemeriksaan dilakukan pada

rentang suhu 30-300°C, dimaksudkan untuk membandingkan titik lebur poloxamer 407 dengan pustaka yaitu 52-57 °C (Rowe, *et al.*, 2009).

4.5.1.3 Identifikasi Avicel PH 101

4.5.1.3.1 Analisis Spektrofotometri Inframerah

Spektrum inframerah Avicel PH 101 dibuat dengan metode cakram KBr seperti pada prosedur 4.3.3.1.1

4.5.1.3.2 Analisis Termal Dengan DTA (*Differential Thermal Analysis*)

Pemeriksaan titik lebur Avicel PH 101 dengan menggunakan DTA dilakukan seperti pada prosedur 4.3.3.1.2. Pemeriksaan dilakukan pada rentang suhu 30-300 °C, dimaksudkan untuk membandingkan titik lebur poloxamer 407 dengan pustaka yaitu hangus pada 260-270 °C (Rowe, *et al.*, 2009).

4.5.1.4 Identifikasi Laktosa Monohidrat

4.5.1.4.1 Analisis Spektrofotometri Inframerah

Spektrum inframerah laktosa monohidrat dibuat dengan metode cakram KBr seperti pada prosedur 4.3.3.1.1

4.5.1.4.2 Analisis Termal Dengan DTA (*Differential Thermal Analysis*)

Pemeriksaan titik lebur laktosa monohidrat dengan menggunakan DTA dilakukan seperti pada prosedur 4.3.3.1.2. Pemeriksaan dilakukan pada rentang suhu 30-300 °C, dimaksudkan untuk membandingkan titik lebur poloxamer 407 dengan pustaka yaitu 201-202°C (Rowe, *et al.*, 2009).

4.5.2 Pembuatan Kurva Baku Ezetimibe

4.5.2.1 Pembuatan Larutan SLS 0,45 % dalam Buffer Asetat 0,05 M pH 4,5

Pembuatan larutan SLS 0,45 % dalam buffer asetat 0,05 M pH 4,5 dilakukan dengan menimbang SLS sebanyak 4,50 g dan 4,10 g kemudian melarutkannya dalam aquades ad 950,0 ml, atur pH hingga 4,5 dengan penambahan asam asetat glasial, kemudian tambahkan aquadest ad 1000,0 ml.

4.5.2.2 Pembuatan Larutan Baku Induk Ezetimibe

Membuat larutan baku induk ezetimibe dengan kadar 1000 µg/ml. Larutan baku tersebut dibuat dengan menimbang teliti sebanyak 50,0 mg ezetimibe dan dilarutkan dalam metanol ad 50,0 ml. Kemudian memipet 5,0 ml larutan tersebut dan ditambah larutan SLS 0,45 % dalam buffer asetat 0,05 M Ph 4,5 ad 100,0 ml, sehingga didapat baku induk ezetimibe dengan kadar 50µg/ml.

4.5.2.3 Pembuatan Larutan Baku Kerja Ezetimibe

Larutan baku kerja Ezetimibe dibuat dengan konsentrasi ; 2,5; 5; 10; 15; 20 dan 25 µg/ml dengan cara sebagai berikut :

1. Dipipet sebanyak 0,5 ml larutan baku induk dimasukkan labu ukur 10,0 ml kemudian ditambah SLS 0,45 % dalam buffer asetat 0,05 M pH 4,5 ad 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 2,5 µg/ml.
2. Dipipet sebanyak 1,0 ml larutan baku induk dimasukkan labu ukur 10,0 ml kemudian ditambah larutan SLS 0,45 % dalam buffer asetat 0,05 M pH 4,5 ad 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 5 µg/ml

3. Dipipet sebanyak 2,0 ml larutan baku induk dimasukkan labu ukur 10,0 ml kemudian ditambah larutan SLS 0,45 % dalam buffer asetat 0,05 M pH 4,5 ad 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$
4. Dipipet sebanyak 3,0 ml larutan baku induk dimasukkan labu ukur 10,0 ml kemudian ditambah larutan SLS 0,45 % dalam buffer asetat 0,05 M pH 4,5 ad 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 15 $\mu\text{g/ml}$
5. Dipipet sebanyak 4,0 ml larutan baku induk dimasukkan labu ukur 10,0 ml kemudian ditambah larutan SLS 0,45 % dalam buffer asetat 0,05 M pH 4,5 ad 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$
6. Dipipet sebanyak 5,0 ml larutan baku induk dimasukkan labu ukur 10,0 ml kemudian ditambah larutan SLS 0,45 % dalam buffer asetat 0,05 M pH 4,5 ad 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$.

4.5.2.4 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Ezetimibe

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan menggunakan larutan baku kerja ezetimibe 10 $\mu\text{g/ml}$ dan 20 $\mu\text{g/ml}$ yang diamati absorbannya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang memberikan absorbansi terbesar. Panjang gelombang maksimum ezetimibe menurut literature adalah 232 nm (Parmar *et al.*, 2011).

4.5.2.5 Pemeriksaan Pengaruh Bahan Tambahan terhadap Spektrum Ezetimibe

Dibuat larutan poloxamer 407 dengan kadar 300 mg/L. Kemudian larutan poloxamer 407 dipipet sebanyak 2,0 ml. Selanjutnya larutan baku ezetimibe dengan kadar 50 mg/L dipipet sebanyak 4,0 ml dan ditambahkan ke dalam labu ukur 10,0 ml media disolusi (SLS 0,45 % dalam dapar asetat 0,05 M pH 4,5) sampai garis tanda. Sehingga diperoleh larutan campuran ezetimibe dengan kadar 20,0 ppm dan poloxamer 407 dengan kadar 60 ppm sesuai dengan perbandingan 1:3. Kemudian larutan tersebut diamati absorbannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Spektrum yang dihasilkan dibandingkan dengan spektrum larutan baku kerja ezetimibe 20,0 ppm.

4.5.2.6 Pembuatan Kurva Baku Ezetimibe

Larutan ezetimibe yang telah dibuat dengan konsentrasi 2,5; 5; 10; 15; 20 dan 25 $\mu\text{g/ml}$ diamati absorbannya pada panjang gelombang maksimum ezetimibe. Kemudian dari hasil pengamatan dibuat kurva baku (konsentrasi vs absorban) dan persamaan regresi

4.5.3 Pembuatan Dispersi Padat Ezetimibe-Poloxamer 407

Pembuatan dispersi padat ezetimibe-poloxamer 407 dilakukan dengan metode peleburan, yaitu dengan menimbang teliti sejumlah bahan setara dengan perbandingan 1:1; 1:2; 1:3. Poloxamer 407 dilelehkan di *hot plate* pada suhu 60 °C kemudian ezetimibe didispersikan di lelehan tersebut dengan pengadukan konstan. Kemudian campuran ezetimibe-poloxamer 407 tersebut didinginkan segera dalam *ice bath*. Massa digerus dalam mortir, kemudian diayak dengan mesh no.80 dan disimpan dalam esikator sampai analisis selanjutnya.

4.5.4 Pembuatan Dispersi Padat Ezetimibe-Poloxamer 407 yang diadsorbsikan pada Avicel PH 101-Laktosa Monohidrat

Pembuatan dispersi padat ezetimibe-poloxamer 407 yang diadsorpsikan pada Avicel PH 101-Laktosa monohidrat dilakukan dengan metode peleburan, yaitu dengan menimbang teliti sejumlah bahan setara dengan perbandingan 1:1:8; 1:2:7; 1:3:6. Poloxamer 407 dilelehkan di *hot plate* pada suhu 60 °C kemudian ezetimibe didispersikan di lelehan tersebut dengan pengadukan konstan. Kemudian Avicel PH 101 dan Laktosa monohidrat ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Lalu campuran ezetimibe tersebut didinginkan segera dalam *ice bath*. Massa digerus dalam mortir, kemudian diayak dengan mesh no.80 kemudian disimpan dalam esikator sampai analisis selanjutnya.

4.5.5 Pemeriksaan Perolehan Kembali Kadar Ezetimibe

Pada masing-masing kelompok dispersi padat adsorpsi permukaan dan dispersi padat diambil sampel setara dengan 10 mg ezetimibe, kemudian dilarutkan dalam metanol ad 50,0 ml. Larutan tersebut dipipet 0,5 ml dan diencerkan dengan media disolusi (SLS 0,45% dalam buffer asetat 0.05M pH 4,5) sampai 50,0 ml. Absorban sampel diamati dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ezetimibe.

4.5.6 Penentuan Laju Disolusi Ezetimibe

Pada masing-masing kelompok dispersi padat adsorpsi permukaan dan dispersi padat ditimbang setara dengan 10 mg ezetimibe. Uji disolusi dilakukan dengan menggunakan pengaduk bentuk dayung (*paddle*) dengan kecepatan 50 rpm dan dilakukan replikasi tiga kali. Media disolusi yang digunakan adalah larutan 0,45% SLS dalam dapar asetat 0,05 M pH 4,5

sebanyak 500 ml. prosedur uji disolusinya adalah sebagai berikut : (Parmar *et al.*, 2011)

Bejana disolusi diisi dengan 500 ml larutan 0,45% SLS dalam buffer asetat 0,05 M pH 4,5 dan thermostat diatur pada suhu $37 \pm 0,5$ °C, setelah suhu media disolusi sampai $37 \pm 0,5$ °C sampel yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam bejana disolusi dan pengaduk diputar dengan kecepatan 50 rpm. Cuplikan sampel diambil sebanyak 5,0 ml setiap interval waktu 5, 10, 15, 20, 30 dan 45 menit kemudian disaring dengan kertas saring 0,45 μ m. Pada setiap pengambilan cuplikan sampel dilakukan penggantian media disolusi 0,45 % SLS dalam buffer asetat 0,05 M pH 4,5 sejumlah volume sampel yang diambil (5,0 ml). Setelah itu, masing-masing cuplikan sampel diamati absorbannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ezetimibe. Kadar ezetimibe yang terlarut tiap interval waktu dapat diperoleh dengan memasukkan data absorbansi sampel ke persamaan kurva baku yang telah dibuat.

Untuk mendapatkan kadar yang sebenarnya dengan memperhitungkan pengenceran 5,0 ml media disolusi dalam setiap pengambilan cuplikan atau sampel, maka digunakan faktor koreksi dalam persamaan Wuster (Wuster and Taylor, 1965) sebagai berikut :

$$C_n = C'n + \frac{a}{b} \sum_{s=1}^{n-1} C_s \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan :

- C_n : kadar sebenarnya setelah koreksi (mg/ml)
- C'n : kadar yang terukur oleh spektrofotometer (mg/ml)
- C_s : kadar terbaca dari sampel sebelumnya
- a : volume sampel yang diambil (ml)
- b : volume media (ml)

4.5.7 Evaluasi Profil Disolusi

1. Pembuatan profil laju disolusi yang merupakan kurva yang menggambarkan jumlah senyawa yang terlarut terhadap waktu.
2. Menghitung slope, untuk mengetahui laju disolusi ezetimibe antar perlakuan. Harga slope untuk disolusi dapat dihitung melalui persamaan Hixson-Crowell tentang hukum akar kubus dengan membuat persamaan regresi $M_0^{1/3} - M^{1/3}$ versus waktu (menit).
3. Menghitung harga efisiensi disolusi (ED), parameter yang digunakan untuk membandingkan laju disolusi ezetimibe antar perlakuan kelompok pada menit ke-45.

$$ED (\%) = \frac{\text{luas daerah di bawah kurva}}{\text{luas segiempat}} \times 100\% \dots \dots (2)$$

4.5.8 Analisis Statistik

Harga ED dianalisis secara statistik dengan menggunakan metode anova satu arah (one way) pada $\alpha = 0,05$ sehingga dapat diketahui ada tidaknya perbedaan efisiensi disolusi ezetimibe yang bermakna antar perlakuan pada menit tertentu. Jika nilai F hitung lebih besar dari F tabel maka terdapat perbedaan efisiensi disolusi yang bermakna. Bila ada perbedaan efisiensi disolusi, maka dilanjutkan HSD (*Honestly Significant Difference*) menurut Tukey :

$$HSD = q_{a,k,N-k} \sqrt{\frac{MSE}{n}} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan :

- q : diperoleh dari table F
- a : derajat kepercayaan
- k : jumlah perlakuan
- N : jumlah pengamatan total
- N : jumlah pengulangan
- MSE : kuadrat rata-rata kesalahan

Jika perbedaan rata-rata efisiensi disolusi antar dua perlakuan lebih besar dari hasil perhitungan harga HSD, maka terdapat perbedaan efisiensi disolusi yang bermakna antara dua perlakuan tersebut.

4.5.9 Karakterisasi Sampel

4.5.9.1 Analisis Difraksi Sinar X

Analisis difraksi sinar-X dispersi padat adsorpsi permukaan dibandingkan dengan dispersi padat dan ezetimibe murni. Preparasi sampel dengan cara memasukkan sampel ke dalam holder kaca sampai penuh dan permukaan diratakan dengan lempeng kaca. Sampel pada holder kaca diletakkan kedalam alat difraktometer sinar-X, kemudian diamati dengan rentang sudut 2θ dari 5° sampai 50° .

4.5.9.2 Analisis Termal dengan DTA (*Differential Thermal Analysis*)

Analisis termal dispersi padat adsorpsi permukaan ezetimibe-poloxamer dengan menggunakan DTA dibandingkan dengan campuran fisik ezetimibe-poloxamer 407 dan zat murni ezetimibe. Preparasi sampel dengan cara menimbang masing-masing sampel (3-5 mg) dalam krus aluminium. Krus aluminium dimasukkan dalam alat DTA. Alat diatur dengan kecepatan $10^\circ\text{C}/\text{menit}$ dan pengamatan dilakukan dalam rentang suhu $30\text{-}300^\circ\text{C}$.