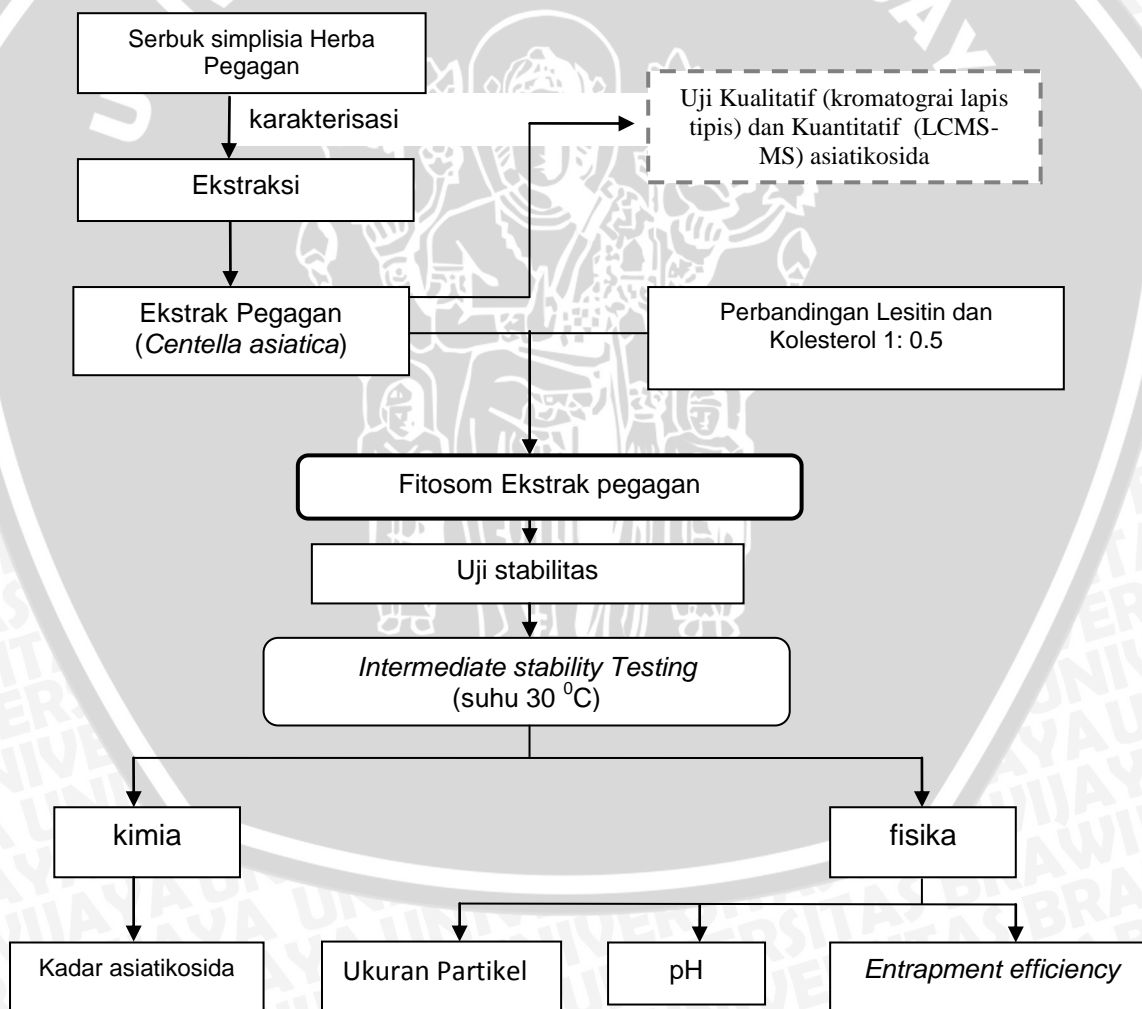


BAB 4

METODE PENELITIAN

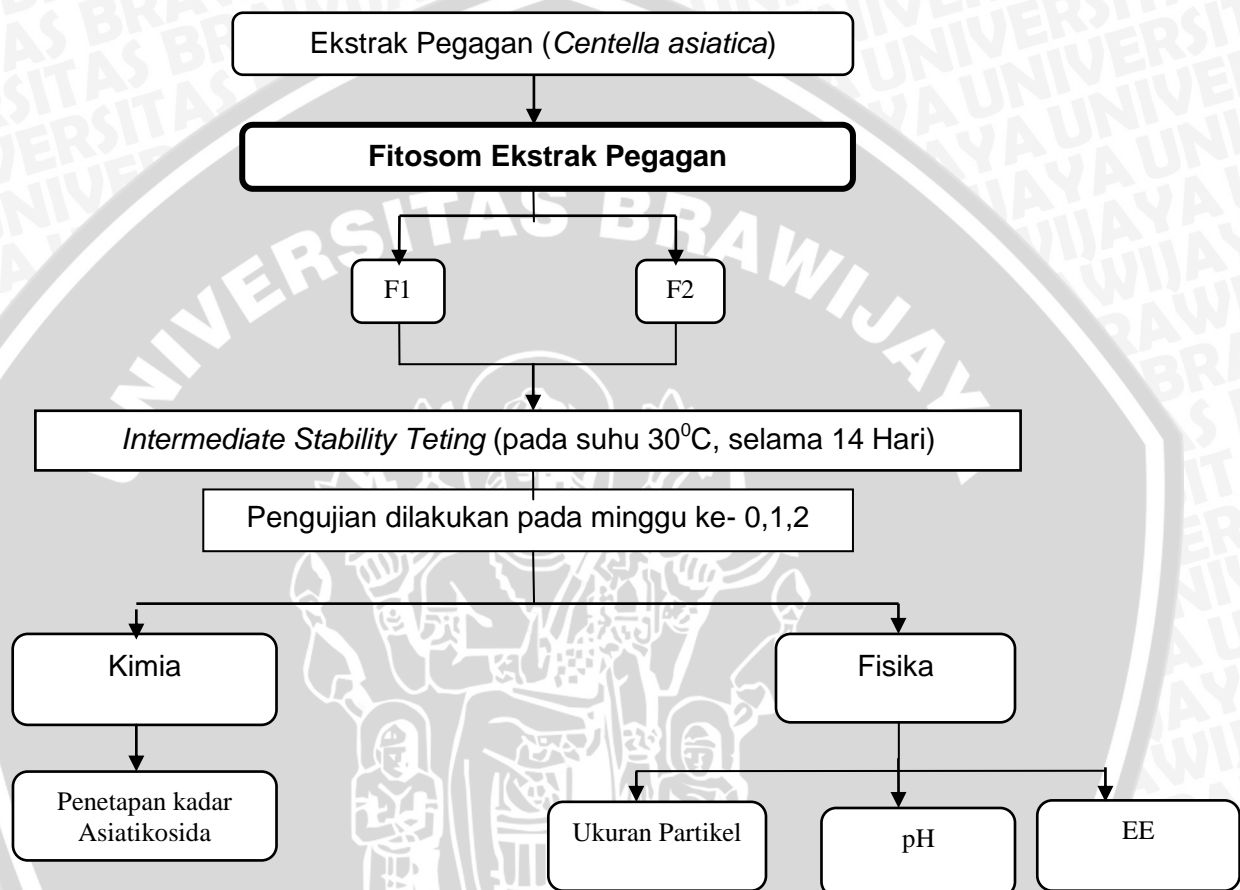
4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan untuk menguji stabilitas fisika dan kimia dari fitosom ekstrak pegagan melalui pendekatan *intermediate stability testing*. Berikut adalah desain penelitian pembuatan fitosom ekstrak pegagan:



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian Pembuatan Fitosom Ekstrak Pegagan

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental di laboratorium secara in vitro dengan rancangan sebagai berikut :



Gambar 4.2. Rancangan Penelitian Uji Stabilitas Fitosom Ekstrak Pegagan

**Keterangan :**

F1 : Fitosom dengan perbandingan lesitin dan kolesterol 1:0 (tanpa penambahan kolesterol)

F2 : Fitosom dengan perbandingan lesitin dan kolesterol 1:0,5

## 4.2 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penambahan kolesterol
- b. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah morfologi dan ukuran partikel, pH, kadar asiatikosida, *Entrapment Efficiency* (EE)

## 4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), di Laboratorium Farmasetika Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang (FKUB), Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi FKUB dan Laboratorium Jurusan teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Penelitian dimulai bulan Januari sampai Mei 2014.

## 4.4 Bahan dan Alat

### 4.4.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Simplisia herba pegagan (*Centella asiatica*), etanol 70%, aquades, aquabidestilata, aqua bebas CO<sub>2</sub>, standard asiatikosida, lempeng KLT, kertas saring, lesitin, kolesterol, kloroform, metanol, asam asetat glasial, anisaldehyd asam sulfat, aquades, asam format, asetonitril, filter PTFE, kain saring.

### 4.4.2 Alat Penelitian

Toples kaca, timbangan analitik, over head stirer, magnetig stirer, *rotary evaporator*, *vacum drying*, oven, *Scaning Electron Microscopy* (SEM), *Liquid*

Chromatography Mass Spectrometry (LCMS), pH meter, sonikator, chamber, lampu uv, pipa kapiler.

#### **4.5 Defnisi Operasional**

##### **4.5.1 Fitosom**

Fitosom merupakan fitokonstituen larut air yang dilapisi oleh molekul lipid yang kompatibel serta membentuk kompleks (Raju *et al*, 2011)

##### **4.5.2 Intermediate Stability Testing**

*Intermediate stability testing* merupakan suatu uji stabilita yang dilakukan pada suhu  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{ RH} \pm 5\%$ , dilakukan selama 6 bulan. Namun pada penelitian ini hanya dilakukan pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  tanpa intervensi kelembaban, dan hanya dilakukan dalam kurun waktu 14 hari (SADC, 2009).

##### **4.5.3 Entrapment Efficiency (EE)**

Kemampuan suatu molekul menjadi terperangkap dalam suatu bahan penjerat. Dalam hal ini yaitu kekuatan cangkang dalam menjerap fitokonstituen asiaticosida dalam ekstrak pegagan (Lin He, 2012).

##### **4.5.4 Karakterisasi**

Karakterisasi adalah suatu proses untuk mengetahui sifat dari suatu senyawa (Laouini, 2012).

##### **4.5.5 Fitosom yang Stabil**

Fitosom yang stabil pada peneltian ini adalah fitosom yang mampu mempertahankan bentuk ukuran, pH, *entrapment efficiency*, serta kadar asiaticosida yang terkandung didalam fitosom ekstrak pegagan selama penyimpanan (Yadav, 2011).

#### 4.6 Prosedur Kerja

Didalam pembuatan pembuatan fitosom ekstrak pegagan terdapat beberapa prosedur yang harus dilakukan terlebih dahulu mulai dari pembuatan ekstrak pegagan, uji kualitatif dan kuantitatif ekstrak pegagan. Dimana uji tersebut dilakukan untuk memastikan bahwa didalam ekstrak pegagan yang dihasilkan mengandung asiatikosida. Setelah didapatkan ekstrak yang memenuhi spesifikasi maka dilanjutkan dengan pembuatan fitosom ekstrak pegagan.

##### 4.6.1 Pembuatan Ekstrak Pegagan

Proses maserasi dilakukan dengan perbandingan antara ekstrak dan pelarut adalah 1:5, jadi setiap 400 gram serbuk kering Herba Pegagan dilarutkan sebanyak 2 Liter etanol 70% dalam maserator. Perendaman dilakukan selama 24 jam disertai dengan pengadukan diawal perendaman selama 30 menit menggunakan *overhead stirrer* (500 rpm). Kemudian dilakukan pengulangan atau remaserasi sebanyak 4 kali. Stelah 24 jam ekstrak yang direndam disaring menggunakan kain sehingga didapatkan maserat. Maserat yang masih mengandung pelarut etanol 70%, diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C dengan kecepatan 70 rpm. Untuk mendapatkan ekstrak kental dilakukan penguapan air dengan menggunakan *vacum drying* suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental dengan kandungan air minimum yang ditandai dengan berat ekstrak menjadi konstan. (George *et al.*, 2009; Pramono dan Ajiastuti, 2004).

#### **4.6.2 Uji Kualitatif Asiatikosida pada Ekstrak Pegagan**

Uji kualitatif dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dimana pada uji ini digunakan standard pembanding yaitu standrad asiatikosida sehingga Rf yang nanti dihasilkan akan dibandingkan. Prosedur uji kualitatif yang dilakukan meliputi preparasi sampel, preparasi fase gerak, dan penotolona sampel hingga evaluasi hasil (Reniza, 2003).

##### **4.6.2.1 Preparasi Sampel**

1. Ditimbang ekstrak kental Herba Pegagan sebanyak 30 mg
2. Dilarutkan dalam 3 ml metanol
3. Ekstrak siap diuji KLT

##### **4.6.2.2 Preparasi Fase Gerak**

1. Disiapkan Kloroform:asam aasetat glisial:metanol:air (60:32:12:8), kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditutup.
2. Kertas saring yang berukuran 2x10 cm dimasukkan dalam *chamber* dan ditutup.
3. Kertas saring dibiarkan sampai terbasahi sempurna (jenuh).
4. Fase gerak siap digunakan untuk uji KLT.

##### **4.6.2.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

1. Larutan sampel ditotolkan pada plat KLT berukuran 2x10 cm sebanyak 0,5  $\mu$ L (5 total)
2. Larutan standart di ditotolkan pada plat KLT berukuran 2x10 cm sebanyak 0,5  $\mu$ L (5 total), bersebelahan dengan larutan sampel.
3. Plat KLT dimasukkan dalam *chamber* dan ditutup.
4. Fase gerak dibiarkan naik sampai 1 cm dari tanda batas atas.
5. Plat KLT diambil dari *chamber* dan dikering-anginkan.

6. Disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat
7. Dipanaskan pada hot plate ( $110^{\circ}\text{C}$ ) selama 7-10 menit
8. Diamati pada sinar UV dengan panjang gelombang 365 nm
9. Diamati perubahan warnanya  $\rightarrow$  positif asiaticosida  $\rightarrow$  merah-ungu
10. Noda yang terbentuk dihitung nilai Rf nya, nilai Rf asiaticosida  $\rightarrow$  Rf = 0,2 – 0.35.

#### **4.6.3 Uji Kuantitatif Asiaticosida pada Ekstrak Pegagan**

Uji kuantitatif asiaticosida pada fitosom dilakukan dengan menggunakan LC-MS. Dimana dalam penentuan kadar asiaticosida ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu pembuatan kurva baku untuk mendapatkan persamaan kurva baku yang akan digunakan dalam perhitungan kadar. Kemudian dilakukan penginjekan sampel hingga didapatkan *peak area* yang menggambarkan konsentrasi asiaticosida dalam ekstrak pegagan.

##### **4.6.3.1 Pembuatan Kurva Baku**

###### **4.6.3.1.1 Pembuatan Larutan Baku Induk 100 ppm**

1. Menimbang larutan standar asiaticosida 1 mg, dimasukkan dalam labu ukur 10 ml
2. Menambahkan Metanol sebanyak 5 ml dalam labu ukur 100 ml
3. Campuran no.1 dan 2 dikocok untuk melarutkan campuran tersebut
4. Ditambahkan metanol dalam labu ukur 10 ml sampai tanda batas

###### **4.6.3.1.2 Pembuatan larutan baku kerja (konsentrasi 4000 ppb, 2000 ppb, 1000 ppb, 800 ppb, 750 ppb, 600 ppb, 500 ppb, 400)**

1. Larutan baku kerja 4000 ppb  
Dipipet 0.2 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas

2. Larutan baku kerja 2000 ppb  
Dipipet 0.1 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml,  
kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas
3. Larutan baku kerja 1000 ppb  
Dipipet 0,05 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml,  
kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas
4. Larutan baku kerja 800 ppb  
Dipipet 0.04 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml,  
kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas
5. Larutan baku kerja 750 ppb  
Dipipet 0.0375 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml,  
kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas
6. Larutan baku kerja 600 ppb  
Dipipet 0.03 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml,  
kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas
7. Larutan baku kerja 500 ppb  
Dipipet 0.025 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml,  
kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas
8. Larutan baku kerja 400 ppb  
Dipipet 0.02 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml,  
kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas

#### 4.6.3.1.3 Linieritas (Pembuatan kurva Baku)

1. Larutan baku kerja 5 ppm, 4 ppm, 3, ppm, 2 ppm, 1 ppm)
2. Masing-masing konsentrasi larutan standar ditentukan sebanyak 5 kali pengulangan sehingga diperoleh persamaan garis dengan  $R^2 > 0.996$ .



#### 4.6.3.2 Preparasi sampel

1. 0,05 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 5 ml metanol
2. Larutan yang terbentuk disaring menggunakan syringe filter 0,2  $\mu\text{m}$  *polytetrafluorocethylene* (PTFE)
3. Diperoleh filtrat untuk analisis LC – MS

#### 4.6.4 Pembuatan Fitosom

Pada penelitian ini formula fitosom yang akan dibuat ada dua macam yaitu formula 1 dan 2. Formula 1 dibuat dengan bahan ekstrak pegagan, etanol 70%, lesitin, dan aqua bebas CO<sub>2</sub>. Berikut merupakan metode pembuatan formula 1 dan formula 2 :

##### 1. Metode pembuatan formula 1

Metode pembuatan formula 1 dilakukan dengan melarutkan Ekstrak kedalam etanol 70% dengan perbandingan 1:1, kemudian dilakukan pencampuran dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. dilanjutkan dengan penambahan Lesitin (fosfatidilkolin) dengan perbandingan 1:1 terhadap Ekstrak. Dilakukan pencampuran dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 1500-2000 rpm pada suhu 40°C selama  $\pm$  4 jam. Untuk membentuk lapisan tipis dan menghilangkan pelarutnya, dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator*. Setelah itu dihidrasi menggunakan Aqua bebas CO<sub>2</sub> dan dilakukan pengadukan menggunakan *magnetig stirrer* selama  $\pm$  5 jam, sehingga membentuk kompleks fitosomal. Untuk memperkecil ukuran partikel, dapat dilakukan dengan metode sonikasi (Kareparamban, 2012).

## 2. Metode pembuatan formula 2

Dibuat dengan bahan ekstrak pegagan, etanol 70%, lesitin, kolesterol dan aqua bebas CO<sub>2</sub> dengan perbandingan 1:1:1:0.5:2.5. Metode pembuatan formula 2 adalah ekstrak dilarutkan kedalam etanol 70% dan dipanaskan pada suhu 40 °C, pada saat bersamaan kolesterol dilarutkan pada lesitin pada suhu 40 °C. Setelah kolesterol larut dalam lesitin kemudian dimasukkan kedalam campuran ekstrak dan etanol dengan tetap dilakukan pengadukan dengan menggunakan *overhead stirrer*. Setelah tercampur kemudian pencampuran dilanjutkan dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 1500-2000 rpm dengan suhu 40 °C selama ± 4 jam. Untuk membentuk lapisan tipis dan menghilangkan pelarutnya, dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator*. Setelah itu dihidrasi dan dilakukan pengadukan menggunakan *magnetig stirrer* (1700 rpm, ± 5 jam) sehingga membentuk kompleks fitosomal dan untuk memperkecil ukuran partikel, dilakukan dengan metode sonikasi (Kareparamban, 2012)

### 4.6.5 Evaluasi dan Karakterisasi

Evaluasi dan karakterisasi yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi morfologi dna ukuran partikel, pH, *entrapment efficiency*, kadar asiatikosida dalam fitosom.

#### 4.6.5.1 Morfologi dan Ukuran Partikel

##### 4.6.5.1.1 Tujuan

Untuk mengetahui morfologi dan ukuran partikel fitosom ekstrak pegagan selama proses penyimpanan

##### 4.6.5.1.2 Prosedur Evaluasi

Berikut merupakan prosedur evaluasi ukuran partikel dengan SEM

(Adianingsih, 2010) :

1. Disiapkan sampel fitosom ekstrak pegagan
2. Sampel ditetaskan pada *cover glass* yang telah ditempel tpaee carbon dan kertas saring
3. Sampel yang sudah ada pada *cover glass* ditempatkan pada plat khusus
4. jika sampel kurang konduktif maka dilakukan pelapisan sampel dengan logam yang menghantarkan arus listrik
5. sampel dianalisis dengan *Scaning Electron Microspcopy* (SEM)

#### **4.6.5.1.3 Spesifikasi Evaluasi**

Ukuran partikel  $\leq 100$  nm

#### **4.6.5.2 Pengujian pH**

##### **4.6.5.2.1 Tujuan**

Untuk menentukan dan mengamati pH dari fitosom ekstrak pegagan yang dihasilkan dari masing-masing formula selama awal pengamatan dan selama penyimpanana.

##### **4.6.5.2.2 Prosedur Evaluasi**

Siapkan sampel fitosom ekstrak pegagan. Kemudian siapkan alat uji pH atau pH meter. Uji fitosom ekstrak pegagan dengan pH meter.

##### **4.6.5.2.3 Spesifikasi Evaluasi**

pH yang didapatkan sebesar 4-5

### **4.6.5.3 Penetapan Kadar**

#### **4.6.5.3.1 Tujuan**

Untuk menentukan kadar asiatikosida dalam fitosom ekstrak pegagan pada awal peamatan dan selama penyimpanan

#### **4.6.5.3.2 Prosedur Evaluasi**

1. 0,221 gram fitosom formula 1 (F1) dan 0,265 gram fitosom formula 2 (F2), masing-masing dilarutkan kedalam 5 ml metanol
2. Difortex hingga tercampur homogen
3. Larutan yang terbentuk disaring menggunakan syringe filter 0,2  $\mu\text{m}$  *polytetrafluorocethylene* (PTFE)
4. Larutan diencerkan dengan faktor pengenceran 200  $\mu\text{l}$  dilarutkan dalam 1000  $\mu\text{l}$  metanol
5. Kemudian diambil 20  $\mu\text{l}$  untuk diinjekan kedalam LC-MS

#### **4.6.5.3.3 Spesifikasi Evaluasi**

Kadar yang diperoleh mendekati atau sama dengan kadar asiatikosida pada ekstrak pegagan yang dihasilkan.

### **4.6.5.4 Entrapment Efficiency (EE)**

#### **4.6.5.4.1 Tujuan**

Untuk mengetahui EE dari fitosom ekstrak pegagan selama penyimpanan yang mengindikasikan kekuatan cangkang fitosom

#### **4.6.5.4.2 Prosedur Evaluasi**

Penjerapan ditentukan dengan melakukan pemisahan dengan menggunakan teknik sentrifugasi. 0,215 gram fitosom formula 1 (F1) dan 0,265

gram fitosom formula 2 (F2) diambil secara presisi kemudian masing-masing ditambahkan 5 ml metanol kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan dicek kadarnya menggunakan LC-MS (Lin He *et al*, 2012). Kemudian dihitung efisiensi pejeratannya menggunakan rumus.

$$EE = \frac{b-a}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

a : jumlah asiaticosida pada supernatan

b : jumlah total asiaticosida pada phytosome (saat penentuan kadar asiaticosida dalam fitosom)

#### 4.6.5.4.3 Spesifikasi Evaluasi

Entrapment Efficiency yang dihasilkan antara 80-100%

#### 4.7 Analisis Data

Analisa data dilakukan dengan uji statistik menggunakan menggunakan program SPSS 20,0 dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Untuk mengetahui perbedaan sifat fisika kimia antara formula 1 dan formula 2 dilakukan uji t-test yang sebelumnya dilakukan uji normalitas data. Untuk mengetahui perbedaan sifat fisika kimia selama penyimpanan pada masing-masing formula Langkah-langkah uji hipotesis komparatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji One-way ANOVA, Post hoc test. (Sugiyono, 2011).