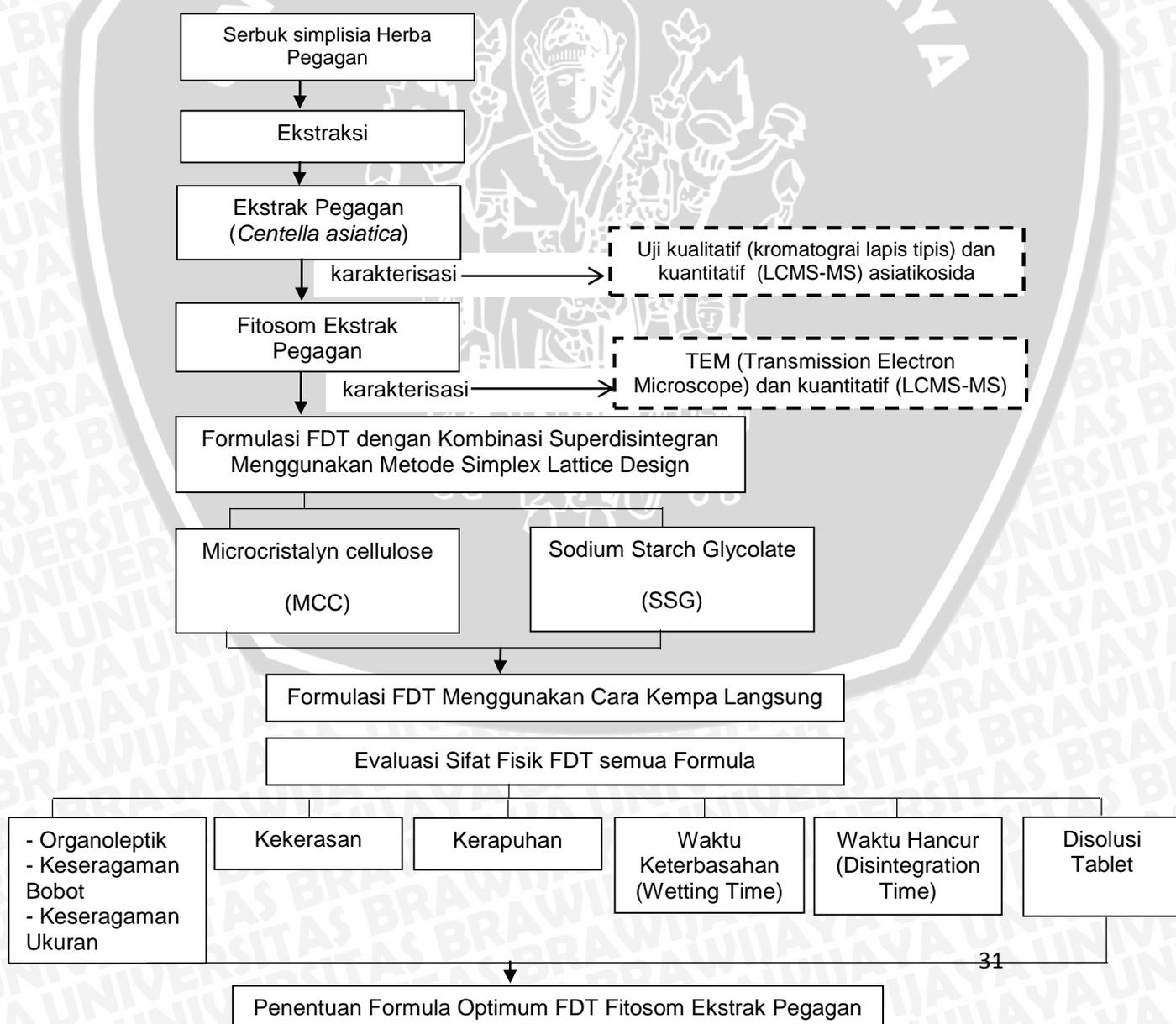


## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan rancang bangun penelitian true experimental secara in vitro dengan metode *Simplex Lattice Design* untuk mendapatkan formula *Fast Disintegrating Tablet* fitosom ekstrak pegagan yang paling optimum.



## Gambar 4.1 Rancangan Penelitian Pembuatan Fitosom Ekstrak Pegagan

### 4.2 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar superdisintegran
- b. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kekerasan, kerapuhan, waktu keterbasahan, waktu hancur, waktu disolusi tablet

### 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 Juli 2014.

### 4.4 Alat dan Bahan

#### 4.4.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Simplisia herba pegagan (*Centella asiatica*), etanol 70%, Aquades, lesitin, kloroform, metanol, asam asetat glasial, anisaldehyd asam sulfat, aquades, asam format, asetonitril, microcrystalline cellulose, sodium starch glycolate, laktosa anhidrat, talk, amilum, magnesium stearat, HCl 0,1 N.

#### 4.4.2 Alat Penelitian

Toples kaca, timbangan analitik, over head stirer, magnetig stirer, lempeng KLT, rotary evaporator, vacuum drying, oven, Transmission Electron Microscopy (TEM), Liquid Chromatography Mass Spectra-Mass Spectra (LCMS-MS), kain flannel, pH meter, neraca analitik, jangka sorong, hardness tester, friability tester, cawan petri.

## **4.5 Definisi Operasional**

### **4.5.1 Fitosom**

Fitosom merupakan teknologi yang menggabungkan fitokonstituen larut air ke dalam fosfolipid untuk menghasilkan molekul kompleks yang larut dalam lipid (Kareparamban *et al*, 2012)

### **4.5.2 Fast Disintegrating Tablet**

Bentuk sediaan solid, yang mengandung bahan aktif yang terdisintegrasi dengan cepat ketika diletakkan di mulut tanpa melalui proses pengunyahan (Gupta *et al*, 2012).

### **4.5.3 Optimasi**

Metode untuk memudahkan dalam penyusunan dan interpretasi data secara matematis.

### **4.5.4 Superdisintegrasi**

Senyawa disintegrasi yang termasuk dalam formulasi tablet untuk membantu memecahkan massa padat yang kompak dengan cepat ketika dimasukkan ke dalam lingkungan berair (Mangal *et al*, 2012).

### **4.5.5 Kekerasan Tablet**

Kekuatan tablet untuk mempertahankan bentuknya terhadap guncangan mekanik

### **4.5.6 Kerapuhan Tablet**

Kemampuan tablet dalam menahan guncangan tanpa hancur selama proses pembuatan, pengemasan, pengiriman, dan penggunaan oleh konsumen.

### **4.5.7 Waktu Keterbasahan Tablet**

Waktu yang dibutuhkan air untuk terserap kedalam tablet.

### **4.5.8 Waktu Disintegrasi Tablet**

Waktu yang diperlukan tablet untuk pecah atau hancur menjadi partikel-partikel dengan kehalusan tertentu.

#### 4.5.9 Disolusi Tablet

Kadar pelarutan obat dari bentuk sediaan menjadi bentuk terlarut.

### 4.6 Prosedur Pembuatan

#### 4.6.1 Pembuatan Ekstrak Pegagan

Pembuatan ekstrak dilakukan menggunakan metode maserasi. Proses maserasi dilakukan dengan menimbang 1 kg serbuk herba pegagan dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan 5 L etanol 70%, diaduk selama 30 menit selanjutnya dilakukan perendaman selama 24 jam. Ekstrak yang direndam disaring menggunakan kain flanel sehingga didapatkan maserat. Kemudian dilakukan remaserasi sebanyak 4 kali menggunakan pelarut etanol 70%. Semua maserat dikumpulkan menjadi satu. Maserat yang masih mengandung pelarut etanol 70%, diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C. 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. (Harwoko *et al.*, 2014; Pramono dan Ajiastuti, 2004).

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

Uji kualitatif dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Eluen sebagai fase gerak menggunakan perbandingan pelarut kloroform:asam asetat glacial:metanol:air (60:32:12:8). Plat KLT disemprot menggunakan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehyd 0.5 ml, asam asetat glacial 10 ml, metanol 85 ml, dan asam sulfur 5 ml) selanjutnya dipanaskan pada suhu

110°C hingga bercak warna nampak. Plat KLT dengan bercak warna diamati pada UV-365 nm (Zukarnaen, 2014; Sulistiyani, 2014; Wagner, 1996)

#### 4.6.2.1 Preparasi Sampel dan Larutan Standard

Ditimbang ekstrak kental herba pegagan sebanyak 30 mg dan dilarutkan dalam 3 ml etanol. Ditimbang larutan standard sebanyak 1 mg dan dilarutkan dalam 1 ml metanol. Larutan ekstrak dan larutan standard ditotolkan pada plat KLT menggunakan pipa kapiler.

#### 4.6.2.2 Preparasi Fase Gerak

Disiapkan kloroform:asam asetat glasial:metanol:air (60:32:12:8), kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditutup. Kertas saring berukuran 2x10 cm dimasukkan dalam *chamber* dan ditutup tujuannya adalah untuk menjenuhkan *chamber*. Setelah terbasahi sempurna kertas saring diangkat dan fase gerak siap untuk digunakan uji kromatografi lapis tipis.

#### 4.6.2.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis

Larutan sampel ditotolkan pada plat kromatografi lapis tipis berukuran 2x10 cm sebanyak 0,5  $\mu$ L (5 total). Larutan standard ditotolkan pada plat KLT berukuran 2x10 cm sebanyak 0,5  $\mu$ L (5 total), bersebelahan dengan larutan sampe. Selanjutnya plat KLT dimasukkan dalam *chamber* dan ditutup hingga fase gerak naik sampai tanda batas atas. Plat KLT diambil dari *chamber* dan dikering-anginkan. Setelah kering plat KLT disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat dan dipanaskan pada hot plate (110°C) selama 7-10 menit hingga nampak noda berwarna ungu. Noda diamati pada sinar UV dengan panjang gelombang 365 nm, dan dihitung nilai Rf nya, Rf asiaticosida = 0,2 – 0,35.

### 4.6.3 Uji Kuantitatif

Uji kuantitatif dilakukan menggunakan metode LC-MS. Dalam penentuan kadar asiatikosida 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 asiatikosida dalam ekstrak pegagan (Zulkarnaen, 2014).

#### 4.6.3.1 Pembuatan Kurva Baku

Pembuatan larutan baku induk 100 ppm dilakukan dengan cara ditimbang larutan standar asiatikosida sebanyak 1 mg lalu dimasukkan dalam baku ukur 10 ml. Metanol sebanyak 5 ml ditambahkan kedalam labu ukur 100 ml. Campuran tersebut dikocok untuk hingga larut dan homogen. Metanol ditambahkan dalam labu ukur 10 ml sampai tanda batas.

Pembuatan larutan baku kerja dibuat dengan berbagai konsentrasi. Untuk membuat larutan baku kerja konsentrasi 4000 ppb. Larutan baku induk 100 ppm dipipet 0,2 ml lalu dimasukkan kedalam labu ukur 5 ml, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas. Untuk membuat larutan baku kerja 2000 ppb, larutan baku induk 100 ppm dipipet 0,1 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas. Pembuatan larutan baku kerja 1000 ppb dilakukan dengan cara larutan baku induk 100 ppm dipipet 0,05 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas. Pembuatan larutan baku kerja 800 ppb dengan cara dipipet 0,04 ml ke dalam labu ukur 5 ml, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas. Pembuatan larutan baku kerja 750 ppb dilakukan dengan cara dipipet 0,0375 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml, kemudian ditambahkan

metanol hingga tanda batas. Pembuatan larutan baku kerja 600 ppb dilakukan dengan cara dipipet 0,03 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas. Pembuatan larutan baku kerja 500 ppb dilakukan dengan cara dipipet 0,025 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas. Pembuatan larutan baku kerja 400 ppb dilakukan dengan cara dipipet 0,02 ml larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 ml, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas

Untuk membuat kurva linieritas, larutan baku kerja (5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm) di ukur konsentrasinya dengan pengulangan sebanyak 5 kali hingga diperoleh persamaan garis  $R^2 > 0.996$ . Preparasi sampel pada pembuatan kurva baku dilakukan dengan cara 0,05 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 5 ml metanol. Larutan yang terbentuk tersebut disaring menggunakan *syringe* filter 0,2  $\mu\text{m}$  *polytetrafluorcethylene* (PTFE). Filtrat yang diperoleh digunakan untuk analisis LCMS-MS.

#### 4.6.4 Pembuatan Fitosom

Ekstrak dilarutkan ke dalam etanol 70% dengan perbandingan 1:1, kemudian dilakukan pencampuran menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Dilanjutkan dengan penambahan Lesitin (fosfatidilkolin) dengan perbandingan 1:1 terhadap ekstrak. Dilakukan pencampuran 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 sehingga membentuk kompleks fitosomal (Kareparamban, 2012).

#### 4.6.5 Formulasi Fast Disintegrating Tablet

Pada penelitian ini dipergunakan 3 formula FDT fitosom ekstrak pegagan dengan menggunakan kombinasi superdisintegran. Adapun 3 formula FDT fitosom ekstrak pegagan dengan kombinasi superdisintegran disajikan pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.1 Formula FDT Fitosom Ekstrak Pegagan**

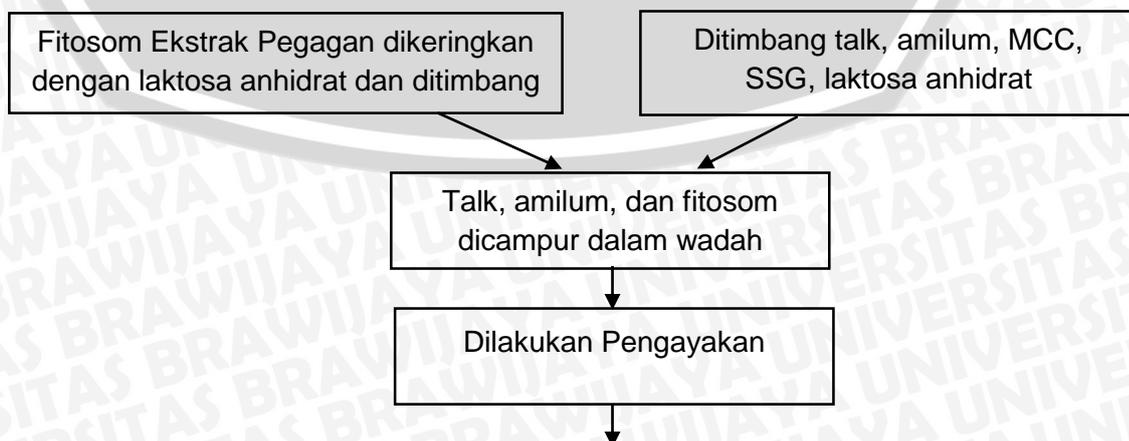
Bahan	MCC dan SSG FI		
	A	B	C
Fitosom	X	X	x
Amilum	10%	10%	10%
Talk	5%	5%	5%
Magnesium Stearat	0,25%	0,25%	0,25%
MCC	5%	2,5%	0%
SSG	0%	2%	4%
Lactose Anhidrat	Add 100%	Add 100%	Add 100%

Keterangan :

MCC : *Microcrystalline cellulose*

SSG : *Sodium starch glycolate*

#### 4.6.6 Pembuatan FDT Fitosom Ekstrak Pegagan





**Gambar 4.2 Rancangan Pembuatan FDT Fitosom Ekstrak Pegagan**

#### **4.6.7 Evaluasi Sifat Fisik FDT Fitosom Ekstrak Pegagan**

##### **4.6.7.1 Uji Organoleptik Tablet**

Diambil 10 tablet yang dihasilkan lalu diamati secara visual yang meliputi bentuk tablet, homogenitas warna, tekstur permukaan cacat atau tidak, dan penampilan fisik bebas dari bintik-bintik atau tidak (Khan *et al.*, 2011).

Interpretasi hasil

Bentuk : - Memiliki bentuk yang bulat  
 - Permukaan bawah tablet yang rata

Warna : Homogen

Tekstur Permukaan : Halus, tidak cacat

Penampilan Fisik : Bebas dari bintik-bintik atau noda

(Khan *et al.*, 2011)

#### 4.6.7.2 Uji Keseragaman Bobot Tablet

Ditimbang 20 tablet, lalu dihitung bobot rata-rata tiap tablet. Jika ditimbang satu persatu, tidak boleh lebih dari 2 tablet yang masing-masing bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih besar dari harga yang ditetapkan kolom A, dan tidak satu tablet pun yang bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih dari harga yang ditetapkan kolom B. Jika tidak mencukupi 20 tablet dapat digunakan 10 tablet tidak satu tabletpun yang bobotnya menyimpang lebih besar dari bobot rata-rata yang ditetapkan kolom A dan tidak satu tabletpun yang bobotnya menyimpang lebih besar dari bobot rata-rata yang ditetapkan kolom B (Tabel 4.2) (Depkes RI, 1979).

**Tabel 4.2 Syarat Keseragaman Bobot Tablet (Depkes RI, 1979)**

Bobot rata-rata	Penyimpangan bobot rata-rata dalam %	
	A	B
25 mg atau kurang	15%	30%
26 mg sampai dengan 150 mg	10%	20%
151 mg sampai dengan 300 mg	7,5%	15%
Lebih dari 300 mg	5%	10%

#### 4.6.7.3 Uji Keseragaman Ukuran

Diukur diameter dan tebal pada 20 tablet dengan menggunakan jangka sorong. Hasil pengukuran dicatat dan kemudian dihitung rata-ratanya. Interpretasi



hasil keseragaman ukuran adalah diameter *fast disintegrating tablet* fitosom ekstrak pegagan tidak lebih dari 3 kali dan tidak lebih dari 1 1/3 tebal tablet (Depkes RI,1979).

#### 4.6.7.4 Uji Kekerasan Tablet

Uji kekerasan *fast disintegrating tablet* fitosom ekstrak pegagan dilakukan dengan menggunakan alat *hardness tester*. Sebanyak 10 tablet diukur kekerasannya dengan cara memberi beban pada tablet. Saat tablet pecah, pada alat akan terbaca beban atau gaya maksimum yang dapat diterima oleh tablet. Tablet yang baik dinyatakan mempunyai kekerasan antara 4-10 Kp. Kekerasan tablet kurang dari 4 kP masih dapat diterima dengan syarat kerapuhannya tidak melebihi batas yang diterapkan. Kekerasan tablet lebih besar dari 10 kP masih dapat diterima, jika masih memenuhi persyaratan waktu hancur dan disolusi dipersyaratkan (Allen *et al.*, 2011). Kekerasan tablet FDT dibuat lebih rendah dari tablet konvensional biasa, yaitu 1-3 Kp (Izza *et al.*, 2009).

#### 4. 6.7.5 Uji Kerapuhan Tablet

Sebanyak 20 tablet dari masing-masing formula ditimbang dengan seksama ( $W_0$ ). Sebelum ditimbang, permukaan tablet dibersihkan dengan kuas secara hati-hati dari serbuk atau kotoran yang menempel. Setelah itu tablet dimasukkan ke dalam friabilator dan menjalankan alat (25 rpm sebanyak 100 kali putaran selama 4 menit). Setelah selesai, tablet dikeluarkan dan membersihkan serbuk pada permukaan tablet dengan kuas secara hati-hati. Selanjutnya ditimbang kembali ( $W$ ). Dihitung presentasi kehilangan bobot sebelum dan sesudah perlakuan (% friabilitas) (Allen *et al.*, 2011). Rumus % friabilitas adalah

$$\% \text{ Friabilitas} = \frac{(W_0 - W_t) \times 100}{W_0}$$

*Fast disintegrating tablet* fitosom ekstrak pegagan dianggap baik bila kerapuhan tidak lebih dari 1% (Shah *et al.*, 2014).

#### 4.6.7.6 Uji Waktu Keterbasahan (*Wetting Time*)

Tablet ditempatkan dalam cawan petri dengan diameter 5 cm. Lalu ditambahkan aquades sebanyak 6 ml. Kemudian dicatat waktu untuk keterbasahannya dan dilakukan tiga kali uji. Jika suatu tablet memiliki waktu keterbasahan yang rendah maka tablet tersebut akan lebih sulit untuk terdisintegrasi (Shah *et al.*, 2014).

#### 4.6.7.7 Uji Waktu Hancur (*Disintegrating Time*)

Dimasukkan 1 tablet pada masing-masing keranjang pada tabung. Gunakan aquades bersuhu  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  sebanyak 1000 ml, lalu jalankan alat (Fu *et al.*, 2004). Angkat keranjang dan amati semua tablet dan tablet harus hancur sempurna. Bila 1 tablet atau 2 tablet tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 tablet lainnya, tidak kurang dari 16 tablet dari 18 tablet yang diuji harus hancur sempurna. *Fast disintegrating tablet* fitosom ekstrak pegagan dinyatakan hancur sempurna bila : a. Tidak ada sisa yang tertinggal pada tabung atau, b. Bila ada sisa, hanya terdiri dari massa yang lunak yang tidak mempunyai inti yang jelas atau massa berbusa tanpa inti padat yang memberikan rintangan bila diaduk dengan pengaduk kaca. Kecuali dinyatakan lain, waktu hancur tablet tidak lebih dari 15 menit (Depkes RI, 1995). Tablet FDT harus hancur dalam waktu kurang dari tiga menit (Fu *et al.*, 2004).

#### 4.6.7.8 Uji Disolusi

Dimasukkan sejumlah volume media disolusi yaitu 900 ml HCl 0,1 N ke dalam wadah. Pasang alat tipe 2 USP (tipe dayung), biarkan media disolusi hingga suhu  $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ . Kemudian angkat termometer. Masukkan 1 tablet ke dalam alat,

hilangkan gelembung udara dari permukaan sediaan yang diuji dan segera jalankan alat pada laju kecepatan sebesar 50 rpm. Dalam interval waktu 45 menit, ambil cuplikan sebanyak 10 ml (Depkes RI, 1995). Serapan dari larutan uji ditetapkan kadarnya dengan spektrofotometer UV.

#### 4.6.8 Analisis Data

##### 4.6.8.1 Penentuan Profil Sifat-Sifat Campuran

Formula yang optimum didapatkan menggunakan metode *Simplex Lattice Design*. Metode ini memerlukan tiga formula untuk dapat menggambarkan hubungan antara respon dan komponen. FDT yang optimum masing-masing formula diuji sifat fisiknya yang meliputi kekerasan, kerapuhan, waktu keterbasahan, waktu hancur, dan waktu disolusi. Bentuk persamaan SLD adalah (Bolton, 1997) :

$$Y = a(A) + b(B) + ab(A)(B)$$

Keterangan :

Y = Respon (hasil uji tiap sifat fisik)

A = Komponen bahan A (*Microcrystalline Cellulose*)

B = Komponen bahan B (*Sodium Starch Glycolate*)

a = Koefisien bahan A

b = Koefisien bahan B

(A)(B) = Besarnya komponen A (*Microcrystalline Cellulose*) dan komponen B (*Sodium Starch Glycolate*) dengan jumlah (A)+(B)=1

Koefisien a ditentukan dari perbedaan yang menggunakan 100% *Microcrystalline Cellulose*, koefisien b menggunakan 100% *Sodium Starch Glycolate*, dan untuk koefisien ab menggunakan 50% *Microcrystalline Cellulose* dan 50% *Sodium Starch Glycolate*. Sehingga akan diperoleh 3 persamaan SLD.

Masing-masing persamaan dapat digunakan untuk memprediksi profil sifat fisik formula dengan berbagai macam perbandingan kadar superdisintegran yang digunakan.

#### 4.6.8.2 Penentuan Formula Optimum FDT Fitosom Ekstrak Pegagan

Setelah mendapat profil masing-masing sifat fisik FDT maka dicari respon total yang merupakan penjumlahan dari respon-respon sifat fisik tablet. Tujuan mencari respon total adalah untuk mendapatkan formula yang optimum. Penentuan respon total ini berdasarkan pada persamaan yang terdapat di dalam literatur. Respon total dihitung dengan rumus (Bolton, 1997) :

$$R_{\text{total}} = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$R_{1,2,3}$  adalah respon dari masing-masing sifat fisik tablet

Masing-masing respon diberi bobot, jumlah bobot total = 1. Pada penelitian ini menggunakan 5 respon yang dianggap sebagai parameter utama. Mengingat satuan dari masing-masing respon tidak sama, maka distandarisasi penilaian respon dengan rumus sebagai berikut (Bolton, 1997) :

$$N = \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}}$$

Keterangan :

X = Respon yang didapat dari percobaan

$X_{\min}$  = Respon minimal yang diinginkan

$X_{\max}$  = Respon maksimal yang diinginkan

N = Nilai standarisasi respon

R dihitung dengan mengalikan N dengan bobot yang telah ditentukan

Perhitungan respon totalnya menjadi :

$R_{\text{total}} = (\text{bobot} \times N \text{ kekerasan}) + (\text{bobot} \times N \text{ kerapuhan}) + (\text{bobot} \times N \text{ waktu}$   
 $\text{keterbasahan}) + (\text{bobot} \times N \text{ waktu hancur}) + (\text{bobot} \times N \text{ waktu disolusi})$

Formula optimum terpilih ditentukan dengan melihat harga total respon yang tertinggi

