

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan metode eksperimental, yaitu penelitian yang menjelaskan adanya hubungan sebab akibat atau pengaruh antar variabel melalui pengujian hipotesa. Metode penelitian dilakukan dengan analisa *Post-test only* atau rancangan penelitian dengan melakukan manipulasi formulasi sediaan, kemudian dilihat karakteristik akhir sediaan yang telah dibuat.

4.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini meliputi,

1. Variabel bebas

Variasi perbandingan HPMC (*hydroxypropyl methylcellulose*) dan Kitosan pada pembuatan *patch* yang terdiri dari perbandingan 2g : 0g; 1g : 1g; dan 0g : 2g

2. Variabel terikat

Karakteristik *patch* fitosom ekstrak tebu (*Saccharum officinarum*) yang terdiri dari organoleptis, ketebalan *patch*, daya lipat, keseragaman bobot, dan hasil uji iritasi *patch*

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juli tahun 2016 di laboratorium di Laboratorium Simplisia dan Ekstraksi Balai Materia Medika Batu untuk kegiatan ekstraksi tebu dan uji kandungan sakarin, serta Laboratorium

Farmasetika Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk kegiatan pembuatan fitosom, pembuatan *patch*, dan evaluasi *patch*.

4.4 Bahan dan Alat

4.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan yaitu toples, kain flannel, kertas saring, neraca analitik (Mettler Toledo), gelas beaker, gelas arloji, labu alas bulat, *rotary evaporator* (IKA RV 10 Basic), *magnetic stirrer* (AREC VELP), sonikator (Sonica), mortir, stamper, plat cetak *patch*, oven (Mettmert UN 55), serta jangka sorong.

4.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu daun dan akar tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) dari perkebunan tebu di Desa Pringgondani, Sidoarjo. Aquades (Hydrobatt), lesitin kedelai (Fischer Scientific), aseton (PT. Insoclay), etanol 80% (PT. Smart Lab), HPMC (Sunneborn Revined e products), kitosan (PT. Biochitosan), asam asetat 1% (PT. Bina Arta), plester *wound dressing* (Hypavix), kertas perkamen, hewan coba kelinci albino jantan galur new zealand (Pasar Splendid, Kota Malang) dengan berat badan 2 kg dan usia $\pm$ 2 bulan.

4.4.3 Rancangan Formula

Tabel 4.4.3 Formulasi Sediaan *Patch*

Bahan	Fungsi	Formula PI	Formula PII	Formula PIII
Fitosom Ekstrak Tebu	Bahan Aktif	5 mL	5 mL	5 mL
HPMC	Polimer Matriks	2 gram	1 gram	-
Kitosan	Polimer Matriks	-	1 gram	2 gram
Etanol 80%	Pelarut HPMC	30 mL	15 mL	-
Asam asetat 1%	Pelarut Kitosan	-	15 mL	30 mL

Ekstrak tebu berpotensi menjadi agen terapi penyakit diabetes mellitus (Ranilla *et al.*, 2008). Penggunaan ekstrak tebu yang dikembangkan dalam sistem penghantar obat dapat meningkatkan permeabilitas ekstrak tebu dalam menembus kulit serta dapat mempertahankan konsentrasi maksimumnya dalam tubuh (Travis *et al.*, 2014). Fitosom dipilih sebagai sistem penghantar obat ekstrak tebu karena sifat fitosom yang kompatibel dengan bahan herbal dan mampu membentuk fitokonstituen bioaktif dari ekstrak tanaman yang mengelilingi dan terikat oleh lipid (Jain *et al.*, 2010). Pemilihan polimer matriks diambil dari klasifikasi polimer natural dan polimer sintesis untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan karakteristik *patch* yang terbentuk dari kedua klasifikasi tersebut. Kitosan dipilih karena merupakan polimer alami dan HPMC atau *hydroxypropylmethylcellulose* dipilih sebagai polimer sintesis. Pemilihan bahan-bahan tersebut mempertimbangkan seringnya bahan dipakai sebagai polimer, relatif mudah didapatkan, dan harganya relatif terjangkau (Phadtare *et al.*, 2014).

4.5 Definisi Operasional

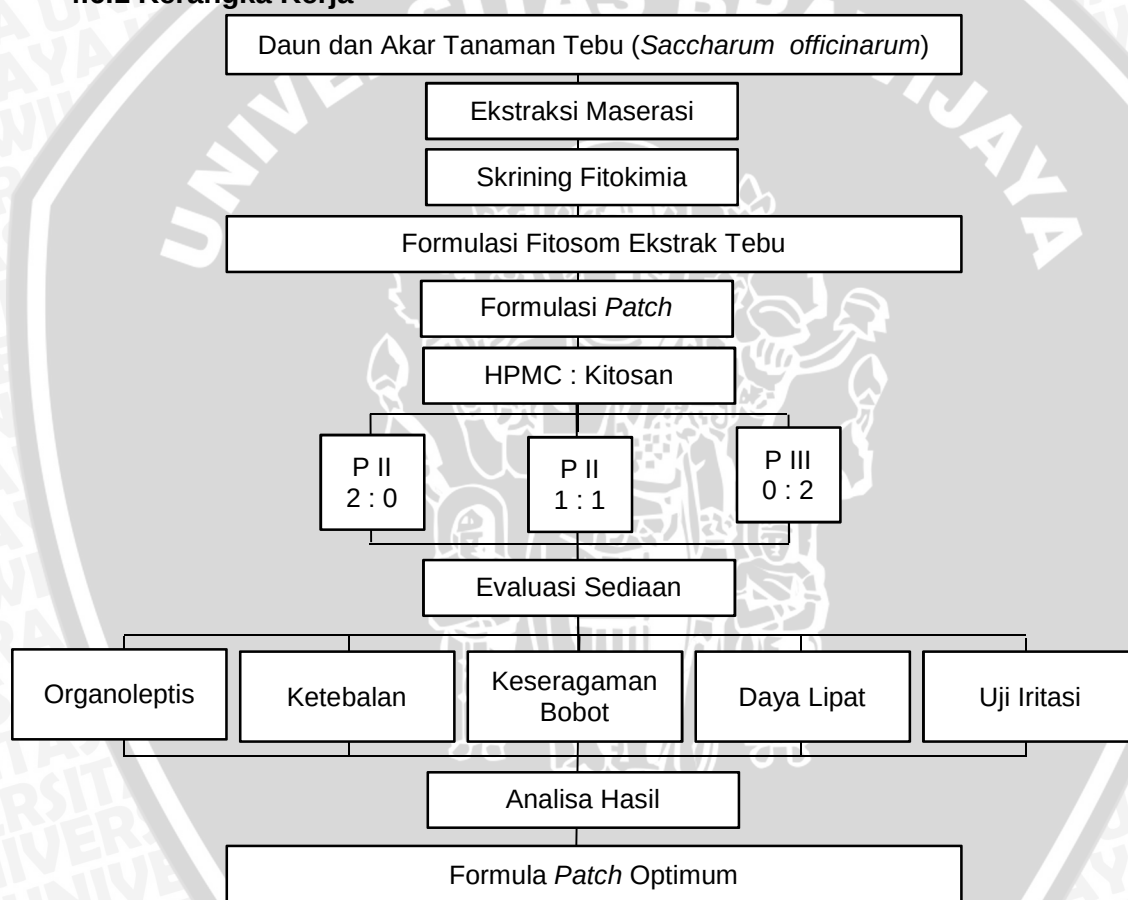
1. Fitosom ekstrak tebu adalah istilah yang berarti formulasi yang mengandung konstituen fitokimia dari ekstrak tanaman tebu yang dikelilingi dan terikat oleh lipid yang berbentuk vesikel.
2. *Patch* adalah istilah untuk sediaan transdermal yang terbuat dari laminasi polimer dimana reservoir obat atau matriks polimer obat terkemas bersama *backing layer* atau lapisan pelindung dari permukaan luar dan *adhesive layer* atau lapisan perekat pada kulit.
3. Polimer Matriks merupakan komponen makromolekul yang terbentuk dari gabungan monomer dan dihubungkan dengan ikatan kovalen atau ikatan

kimia lain yang berfungsi sebagai bahan dasar pembuatan *patch* serta memiliki peran sebagai membran pengontrol pelepasan obat

4. Formulasi *patch* optimum adalah formula *patch* fitosom ekstrak tebu yang memiliki karakteristik sesuai dengan target spesifikasi yang telah ditentukan.

4.6 Prosedur Kerja

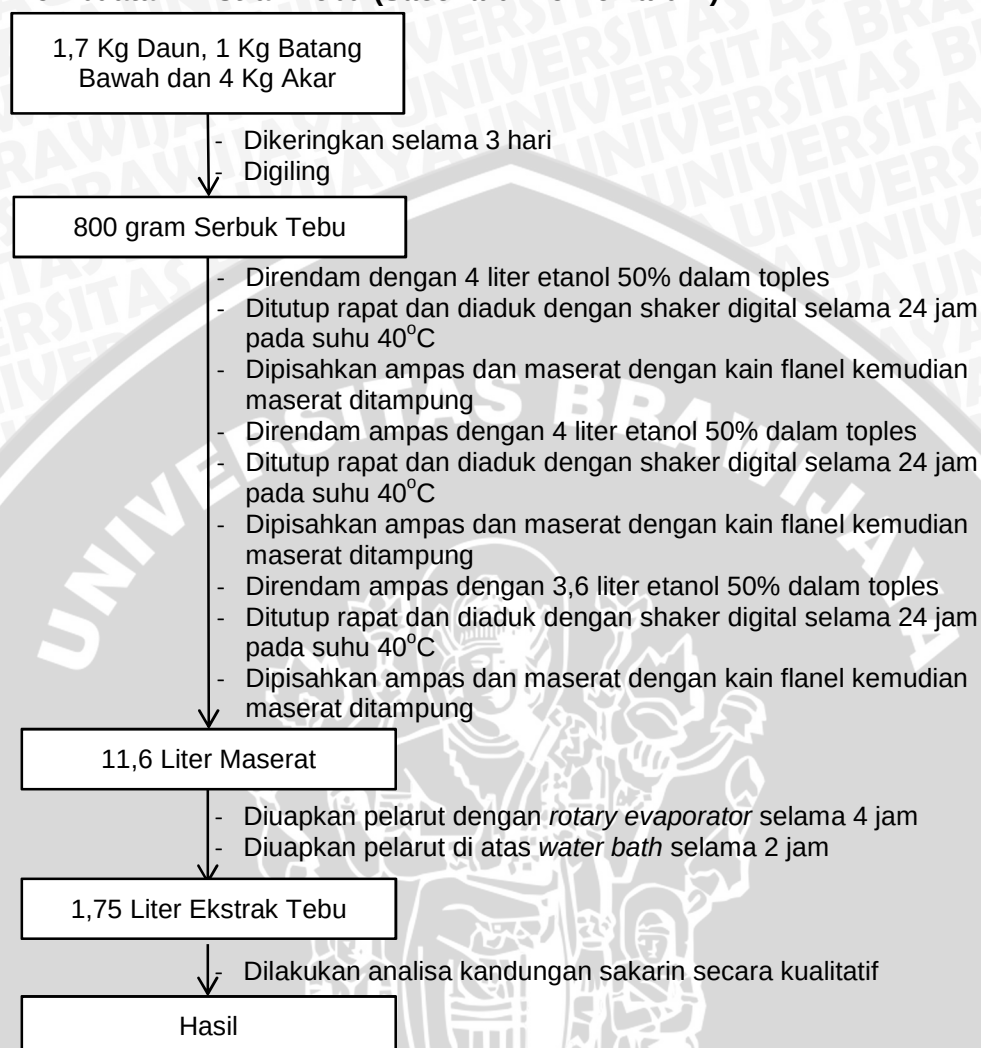
4.6.1 Kerangka Kerja



Gambar 4.6.1 Kerangka Alur Kerja Optimasi Formula *Patch* Fitosom Ekstrak Tebu

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) didapatkan dari perkebunan tebu Desa Pringgondani, Kecamatan Balongbendo, Kabupaten Sidoarjo. Bagian yang digunakan yaitu daun, akar bagian atas (yang berada diatas tanah), dan akar bagian bawah (yang berada dalam tanah). Bagian tanaman tersebut diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 50% dan dilakukan skrining fitokimia untuk memastikan adanya kandungan sakarin dalam ekstrak tersebut. Ekstrak yang telah diskriminasi fitokimia diformulasikan menjadi fitosom ekstrak tebu dan dilanjutkan pada formulasi sediaan *patch*. Sediaan *patch* dibuat dengan 3 formulasi perbandingan polimer matriks HPMC dan Kitosan. Perbandingan polimer matriks terdiri dari PI dengan perbandingan 2g HPMC : 0g Kitosan, PII dengan perbandingan 1g HPMC : 1g Kitosan, dan PIII dengan perbandingan 0g HPMC : 2g Kitosan. Ketiga formulasi tersebut dilakukan evaluasi untuk mengetahui spesifikasi dari masing-masing formulasi. Evaluasi yang dilakukan meliputi organoleptis, ketebalan, keseragaman bobot, daya lipat, dan uji iritasi. Hasil evaluasi dianalisa dan dibandingkan dengan spesifikasi sediaan yang diinginkan sehingga dapat diketahui formula *patch* yang optimum.

4.6.2 Pembuatan Ekstrak Tebu (*Saccharum officinarum*)



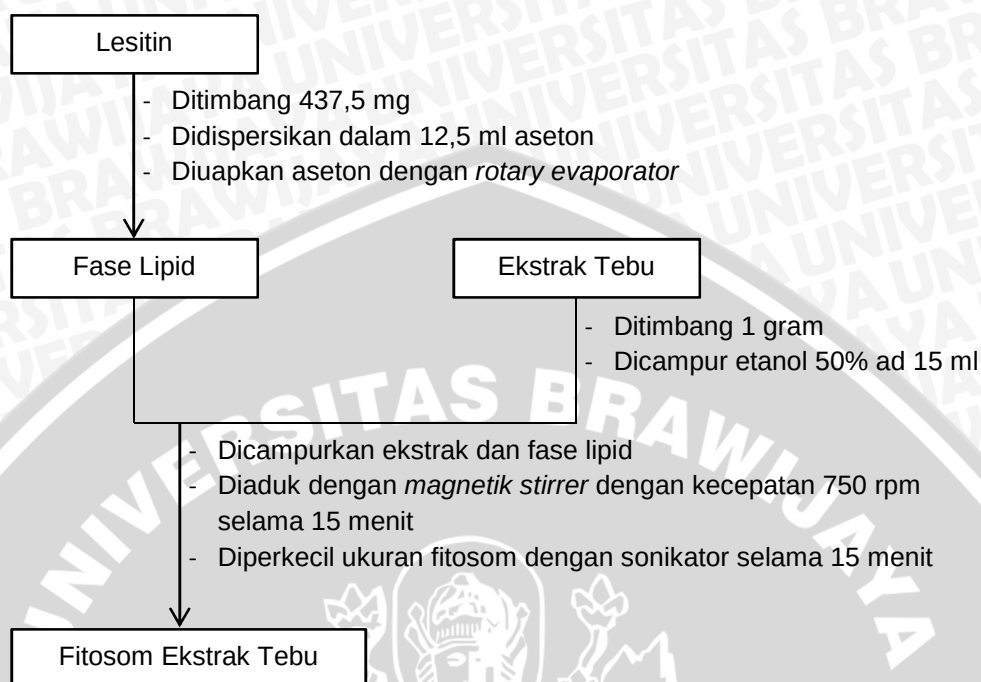
Gambar 4.6.2 Kerangka Alur Kerja Ekstraksi Tanaman Tebu

Pembuatan ekstrak tebu dengan metode maserasi dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. 1,7 kg daun, 1 kg batang bawah dan 4 kg akar dikeringkan selama 3 hari dengan panas matahari.
2. Digiling dan didapatkan 800 gram serbuk tebu.
3. Direndam dengan 4 liter etanol 50% dalam toples.
4. Ditutup rapat dan diaduk dengan shaker digital selama 24 jam pada suhu 40°C.

5. Dipisahkan ampas dan maserat dengan kain flanel kemudian maserat ditampung.
6. Direndam ampas dengan 4 liter etanol 50% dalam toples.
7. Ditutup rapat dan diaduk dengan shaker digital selama 24 jam pada suhu 40°C.
8. Dipisahkan ampas dan maserat dengan kain flanel kemudian maserat ditampung.
9. Direndam ampas dengan 3,6 liter etanol 50% dalam toples.
10. Ditutup rapat dan diaduk dengan shaker digital selama 24 jam pada suhu 40°C.
11. Dipisahkan ampas dan maserat dengan kain flanel kemudian maserat ditampung.
12. Ditampung seluruh maserat yang telah dipisahkan dari ampasnya dan didapatkan 11,6 liter maserat.
13. Diuapkan pelarut dengan rotary evaporator selama 4 jam.
14. Diuapkan pelarut di atas water bath selama 2 jam.
15. Dilakukan analisa kandungan sakarin secara kualitatif.

4.6.3 Pembuatan Fitosom Ekstrak Tebu



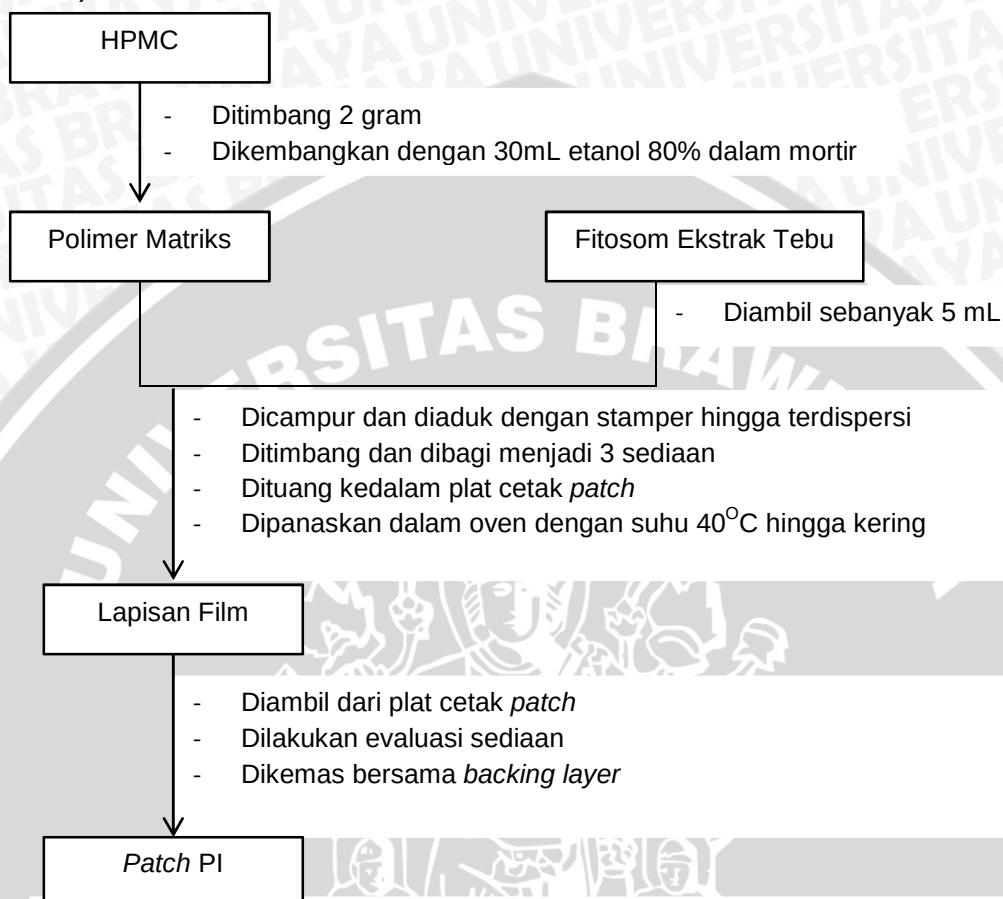
Gambar 4.6.3 Kerangka Alur Kerja Pembuatan Fitosom Ekstrak Tebu

Pembuatan fitosom ekstrak tebu dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang lesitin 437,5 mg.
2. Didispersikan dalam 12,5 ml aseton.
3. Diuapkan aseton dengan *rotary evaporator*.
4. Ditimbang 1 gram ekstrak tebu.
5. Ditambahkan etanol 50% ad 15 ml.
6. Dicampurkan ekstrak dan fase lipid.
7. Diaduk dengan magnetik stirrer dengan kecepatan 750 rpm selama 15 menit.
8. Diperkecil ukuran fitosom dengan sonikator selama 15 menit.

4.6.4 Pembuatan *Patch*

A) Formula PI

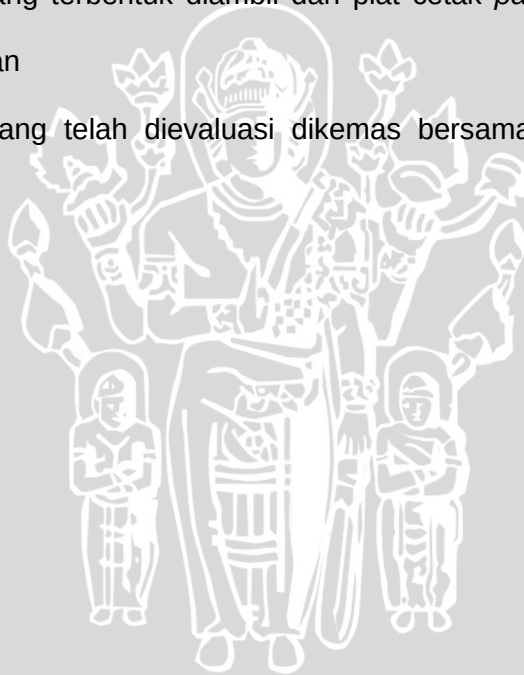


Gambar 4.6.4.A Kerangka Alur Kerja Pembuatan *Patch* Formula PI

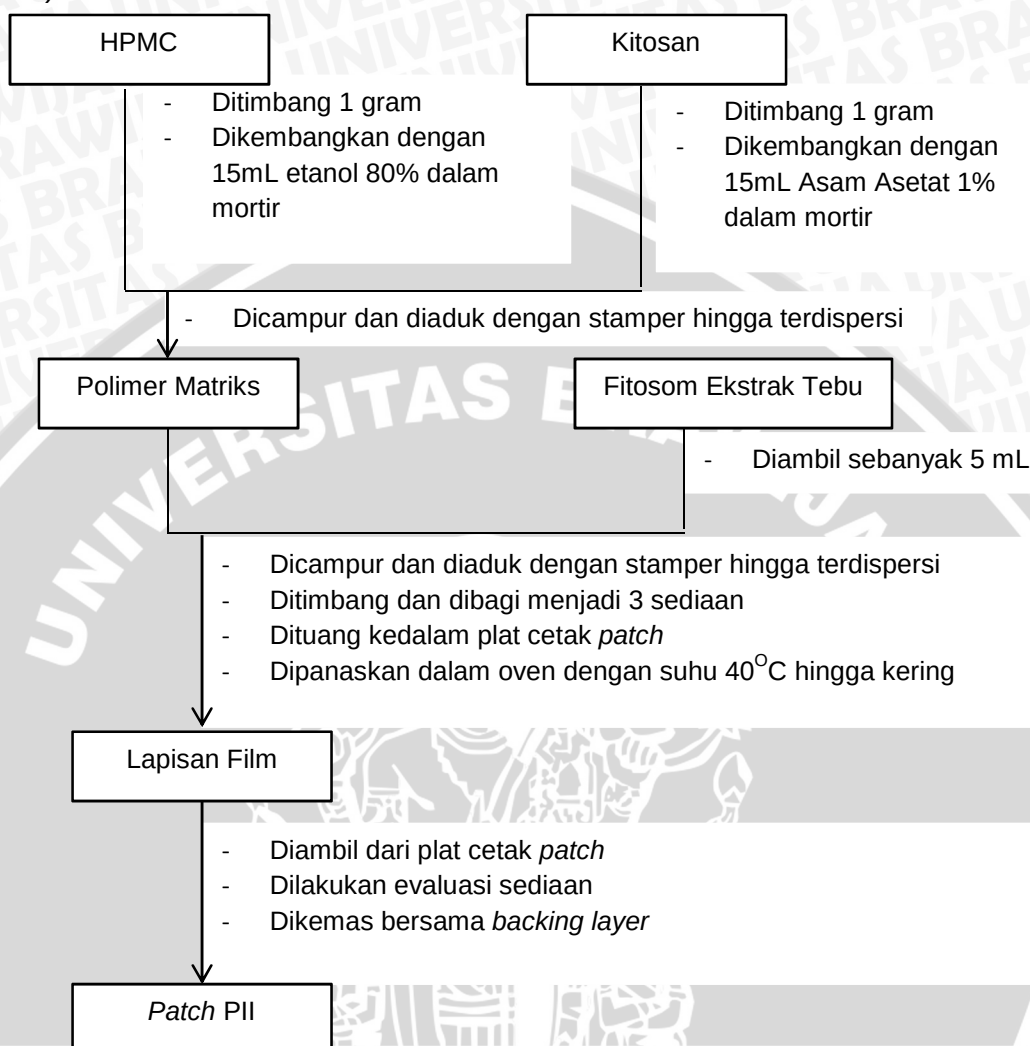
Pembuatan *patch* formula PI dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang HPMC 2 gram.
2. Disiapkan etanol 80% sebanyak 30mL dan dimasukkan dalam mortir.
3. HPMC dimasukkan kedalam mortir dengan cara ditaburkan diatas etanol 80% dan ditunggu hingga mengembang.
4. HPMC yang telah mengembang diaduk dengan stamper hingga merata dan terbentuk polimer matriks

5. Disiapkan fitosom ekstrak tebu sebanyak 5 mL dan dicampurkan kedalam polimer matriks
6. Campuran fitosom ekstrak tebu dan polimer matriks diaduk dengan stamper hingga terdispersi dengan baik dan ditimbang bobotnya
7. Campuran fitosom ekstrak tebu dan polimer matriks dibagi menjadi 3 sediaan dan dituang kedalam plat cetak *patch*
8. Campuran fitosom ekstrak tebu dan polimer matriks dikeringkan dengan cara dimasukkan oven dengan suhu 40°C hingga kering
9. Lapisan film yang terbentuk diambil dari plat cetak *patch* dan dilakukan evaluasi sediaan
10. Lapisan film yang telah dievaluasi dikemas bersama dengan backing layer



B) Formula PII



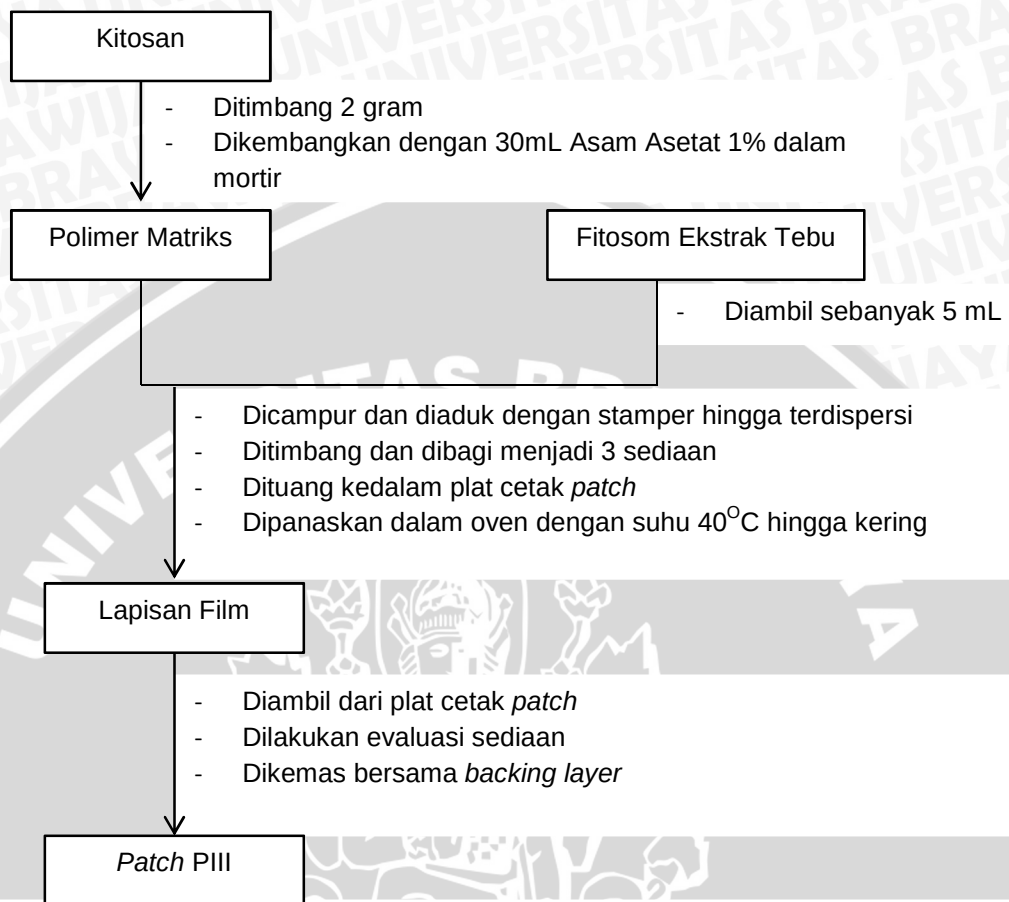
Gambar 4.6.4.B Kerangka Alur Kerja Pembuatan Patch Formula PII

Pembuatan *patch* formula PII dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang HPMC 1 gram.
2. Disiapkan etanol 80% sebanyak 15 mL dan dimasukkan dalam mortir₁.
3. HPMC dimasukkan kedalam mortir₁ dengan cara ditaburkan diatas etanol 80% dan ditunggu hingga mengembang.
4. Ditimbang Kitosan 1 gram

5. Disiapkan asam asetat 1% sebanyak 15 mL dan dimasukkan dalam mortir₂
6. Kitosan dimasukkan kedalam mortir₂ dengan cara ditaburkan diatas asam asetat 1% dan tunggu hingga mengembang.
7. HPMC yang telah mengembang diaduk dengan stamper hingga merata dan terbentuk polimer matriks.
8. Kitosan yang telah mengembang diaduk dengan stamper hingga merata dan terbentuk polimer matriks.
9. Polimer matriks HPMC dan Kitosan dicampur hingga terdispersi dengan baik
10. Disiapkan fitosom ekstrak tebu sebanyak 5 mL dan dicampurkan kedalam polimer matriks
11. Campuran fitosom ekstrak tebu dan polimer matriks diaduk dengan stamper hingga terdispersi dengan baik dan ditimbang bobotnya
12. Campuran fitosom ekstrak tebu dan polimer matriks dibagi menjadi 3 sediaan dan dituang kedalam plat cetak *patch*
13. Campuran fitosom ekstrak tebu dan polimer matriks dikeringkan dengan cara dimasukkan oven dengan suhu 40°C hingga kering
14. Lapisan film yang terbentuk diambil dari plat cetak *patch* dan dilakukan evaluasi sediaan
15. Lapisan film yang telah dievaluasi dikemas bersama dengan backing layer

C) Formula PIII



Gambar 4.6.4.C Kerangka Alur Kerja Pembuatan Patch Formula PIII

Pembuatan *patch* formula PI dalam penelitian ini dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang HPMC 2 gram.
2. Disiapkan etanol 80% sebanyak 30mL dan dimasukkan dalam mortir.
3. HPMC dimasukkan kedalam mortir dengan cara ditaburkan diatas etanol 80% dan ditunggu hingga mengembang.
4. HPMC yang telah mengembang diaduk dengan stamper hingga merata dan terbentuk polimer matriks
5. Disiapkan fitosom ekstrak tebu sebanyak 5 mL dan dicampurkan kedalam polimer matriks

6. Campuran fitosom ekstrak tebu dan polimer matriks diaduk dengan stamper hingga terdispersi dengan baik dan ditimbang bobotnya
7. Campuran fitosom ekstrak tebu dan polimer matriks dibagi menjadi 3 sediaan dan dituang kedalam plat cetak *patch*
8. Campuran fitosom ekstrak tebu dan polimer matriks dikeringkan dengan cara dimasukkan oven dengan suhu 40°C hingga kering
9. Lapisan film yang terbentuk diambil dari plat cetak *patch* dan dilakukan evaluasi sediaan
10. Lapisan film yang telah dievaluasi dikemas bersama dengan backing layer

4.6.5 Evaluasi Sediaan *Patch*

A) Organoleptik

Tujuan

Mengetahui karakteristik fisik *patch* yang meliputi bau, warna, dan tekstur *patch*

Metode

Pengamatan secara makroskopis terhadap fisik *patch* yang dibuat, meliputi pengamatan warna *patch*, bau *patch*, dan tekstur permukaan *patch* (Balasubramanian et al., 2012).

Interpretasi Hasil

Spesifikasi hasil yang diharapkan yaitu *patch* berwarna coklat sesuai dengan warna fitosom ekstrak tebu, berbau khas ekstrak tebu, dan memiliki tekstur yang halus dan lembut.

B) Ketebalan

Tujuan

Mengetahui tingkat ketebalan lapisan *patch* yang dihasilkan

Metode

Ketebalan masing-masing *patch* diukur dengan jangka sorong dan kemudian dihitung rata-rata ketebalannya (Chatterjee *et al.*, 2014).

Interpretasi Hasil

Standar deviasi dari rata-rata ketebalan yang didapatkan rendah (Chatterjee *et al.*, 2014).

C) Daya Lipat

Tujuan

Mengetahui tingkat ketahanan *patch* terhadap adanya lipatan saat pemakaian *patch*

Metode

Uji pelipatan ditentukan dengan berulang kali melipat *patch* di tempat yang sama sampai *patch* tersebut patah. Pelipatan *patch* dilakukan maksimal sebanyak 300 kali (Bindu *et al.*, 2010).

Interpretasi Hasil

Jumlah dari berapa kali *patch* bisa dilipat di tempat yang sama tanpa berhenti merupakan nilai dari ketahanan lipat *patch*. Spesifikasi yang diharapkan yaitu *patch* masih dalam kondisi baik walaupun telah dilipat lebih dari 200 kali (Chatterjee *et al.*, 2014)

D) Uji Keseragaman Bobot

Tujuan

Mengetahui tingkat keseragaman dari berat *patch* yang telah dihasilkan.

Metode

Pengujian terhadap keragaman bobot *patch* dilakukan dengan menimbang seluruh *patch* dari setiap batch kemudian dihitung massa rata-ratanya dan dihitung simpangan bakunya (Yoganda & Rakesh, 2012).

Interpretasi Hasil

Standar deviasi dari rata-rata ketebalan yang didapatkan rendah (Chatterjee *et al.*, 2014).

E) Uji Iritasi

Tujuan

Mengetahui ada tidaknya potensi terjadi iritasi saat pemakaian *patch*

Metode

Patch diaplikasikan pada area 6 cm² dari kulit dan ditutupi dengan kasa. *Patch* pertama dibuang setelah 3 menit. Jika tidak ada reaksi serius yang teramati, *patch* kedua diteruskan dan dibuang setelah 1 jam. Jika tidak ada reaksi yang teramati, paparan diperpanjang sampai 4 jam. *Patch* ketiga dibuang dan respon yang terjadi dinilai pada 60 menit, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam (OECD, 2002).

Interpretasi Hasil

Hasil pengamatan dibuat menjadi tabel tingkat iritasi dan oedem dengan skala 0 sampai 4. Spesifikasi yang diharapkan yaitu *patch* tidak menimbulkan iritasi dan oedem dengan indeks iritasi 0 (OECD, 2002).

4.7 Analisa Data

4.7.1 Analisa Deskripsi

Penelitian ini menggunakan evaluasi organoleptis dan pengujian iritasi *patch* yang hasilnya diinterpretasikan dengan pengamatan secara langsung atau menggunakan analisa deskripsi. Analisa deskripsi dilakukan dengan membandingkan hasil penelitian dan spesifikasi yang telah dibuat.

4.7.2 Analisa Statistik

Penelitian ini menggunakan evaluasi daya lipat *patch*, keseragaman bobot *patch*, serta ketebalan *patch* yang merupakan data numerik. Hasil data numerik dianalisa secara statistik dengan program SPSS 20. Uji statistik yang dilakukan meliputi:

A) Uji Normalitas

Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui apakah distribusi sebuah data mengikuti atau mendekati distribusi normal. Metode yang digunakan adalah *Shapiro Wilk* test. Signifikansi dari tes ini adalah :

$P > 0,05$ = Distribusi data normal.

$P < 0,05$ = Distribusi data tidak normal.

Jika $P > 0,05$ yaitu distribusi data normal, maka tes yang dilakukan yaitu parametrik, jika $P < 0,05$ yaitu data distribusinya tidak normal maka yang dilakukan adalah tes non parametrik (Sen, 2013).

B) Uji Homogenitas

Tes yang umum digunakan terhadap homogenitas data yang digunakan adalah Levene's test. Tes ini dapat menunjukkan homogenitas dari kelompok yang diambil datanya. Jika hasil yang didapatkan adalah data homogen maka dapat dilakukan uji parametrik (Plichta, 2009)

C) Uji One Way ANOVA

Analisis data dilakukan menggunakan uji *One Way Anova* karena jenis data yang akan diolah berasal dari tiga kelompok formula, dimana metode *One Way Anova* digunakan untuk membandingkan rata-rata data yang lebih dari 2 kelompok. Jika pengujian *One Way Anova* tidak dapat dilakukan karena tidak memenuhi syarat pengujian parametrik, maka dapat dilakukan transformasi data. Jika hasil transformasi data tidak memenuhi syarat uji parametrik, maka dilakukan pengujian non parametrik dengan metode Kruskal Wallis sebagai alternatif pengujian. Jika nilai $P < 0,05$, maka terdapat setidaknya 1 data kelompok yang berbeda dari kelompok lain. Analisa dapat dilanjutkan pada pengujian *Post Hoc* dengan *Tukey's Multiple Range Test* (Riyanto, 2010).

D) Uji *Multiple Range Tukey*

Pengujian *Multiple Range Tukey* dilakukan untuk menentukan data mana yang paling signifikan setelah dilakukan tes anova. Jika hasil tes Anova adalah $P > 0,05$ maka H_0 ditolak yang berarti tidak ada perbedaan antara populasi. Jika $P < 0,05$ maka H_1 ditolak yang berarti terdapat perbedaan signifikan antar rata-rata kelompok (Field, 2009).

