

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian pengaruh pati kentang (*Solanum tuberosum* L.) termodifikasi *cross-linking* terhadap stabilitas fisika dan kimia sediaan gel natrium diklofenak menggunakan metode *freeze-thaw* dan *real time* ini menggunakan desain penelitian eksperimental. Desain penelitian eksperimental digunakan untuk mencari dampak dari suatu perlakuan tertentu dalam kondisi yang dikendalikan. Satu atau lebih variabel bebas dimanipulasi, karena diberikan perlakuan yang berbeda maka pengaruh manipulasi variabel bebas terhadap variabel tergantung diamati dengan asumsi dampak yang muncul akan berbeda. Dalam penelitian ini manipulasi melalui perlakuan yang dilakukan yaitu penggunaan *gelling agent* pati kentang termodifikasi *cross-linking* dan pati kentang tak termodifikasi dengan beberapa konsentrasi yang berbeda, sedangkan dampak yang akan muncul dalam penelitian ini yaitu stabilitas gel topikal natrium diklofenak. Penyamaan antara kelompok yang akan mendapat perlakuan dengan kelompok yang tidak mendapat perlakuan perlu dilakukan sebagai pembandingan (Jaedun, 2011). Borg dan Gall (1983) mengemukakan bahwa penelitian eksperimental merupakan penelitian yang paling dapat diandalkan keilmiahannya (paling valid) karena dilakukan dengan pengontrolan secara ketat terhadap variabel-variabel pengganggu di luar variabel yang digunakan.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *gelling agent* pati kentang termodifikasi *cross-linking* dan tidak termodifikasi masing-masing dalam 3 macam konsentrasi yaitu 7,5% (dibawah rentang konsentrasi penelitian sebelumnya); 10% (dalam rentang konsentrasi penelitian sebelumnya); dan 12,5% (diatas rentang konsentrasi penelitian sebelumnya).

4.2.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah stabilitas sediaan gel natrium diklofenak berupa hasil uji organoleptik, pH, viskositas, daya sebar, dan kadar.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengamatan terhadap pengaruh pemberian *gelling agent* alami pati kentang modifikasi *cross-linking* dan tidak termodifikasi serta pengujian stabilitas dilakukan di Laboratorium Farmasetika Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, serta Laboratorium Kimia Terpadu Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian dilakukan mulai Mei sampai dengan Agustus 2016.

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain pati kentang (*Solanum tuberosum* L.) (Makmur Sejati), sodium trimetaphosphate (STMP) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), NaOH 1M (Makmur Sejati), HCl 1N (Makmur Sejati), natrium diklofenak (CV. Cipta Anugrah), metil paraben (Panadia

Corporation), isopropil alkohol (Makmur Sejati), propilen glikol (Makmur Sejati), parfum lemon (Makmur Sejati), akuades (Panadia Corporation).

4.4.2 Alat/ Instrumen Penelitian

Alat/ instrumen yang digunakan pada penelitian ini antara lain *beaker glass* (1 L, 500 ml, 400 ml, 250 ml, 100 ml, dan 50 ml), gelas ukur (1 L, 50 ml, dan 10 ml), oven 'Memmert UN 55', pH meter 'Scott Instrument Lab 850' dan 'TOA', gelas pengaduk, *stopwatch*, termometer, pipet tetes, pipet ukur 10 ml, labu ukur (25 ml dan 100 ml), corong gelas, mikropipet (20-200 μ l dan 100-1000 μ l), spektrofotometer UV-Vis 'Shimadzu 1800', viskometer Brookfield (*Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, MA*), *mechanic stirrer*, cawan petri (diameter 50 mm, tinggi 10 mm), kertas perkamen, kalkulator, sonikator, *freezer*, plat kaca transparan, kaca bulat berskala, Spektrofotometer FTIR 'Shimadzu', *vacuumfilter* 'Vacuubrand', timbangan analitik 'Mettler Toledo' dan 'Shimadzu Uni Bloc', dan anak timbangan.

4.5 Daftar Istilah/ Operasional

- Konsentrasi optimum adalah konsentrasi yang dapat meningkatkan stabilitas hasil yang diperoleh sesuai dengan parameter yang ditetapkan pada interpretasi hasil pengujian gel natrium diklofenak (lihat tabel 4.1)
- Stabilitas sediaan gel natrium diklofenak adalah stabilitas fisika dan kimia zat aktif natrium diklofenak dalam sediaan gel
- Modifikasi *cross-linking* merupakan modifikasi dengan cara mengganti gugus -OH dengan gugus eter, gugus ester, atau gugus fosfat

- d. Stabilitas fisika merupakan kemampuan suatu produk mempertahankan sifat fisika awal, termasuk penampilan maupun homogenitas sediaan yang dinyatakan dalam spesifikasi pada tabel 4.1
- e. Stabilitas kimia merupakan kemampuan zat aktif mempertahankan keutuhan secara kimiawi sesuai batas yang dinyatakan dalam spesifikasi pada tabel 4.1

4.6 Spesifikasi Gel Natrium Diklofenak

Spesifikasi sediaan ditentukan untuk melihat apakah sistem telah mencapai parameter yang ditentukan seperti pada tabel:

Tabel 4.1 Spesifikasi gel natrium diklofenak

Evaluasi	Spesifikasi	Pustaka
Organoleptik	Tidak terjadi perubahan karakteristik Bentuk: gel Warna: bening Bau: aroma lemon	Anief, 1997
pH	4-8	Buhler, 1998
Viskositas	2.000-4.000 mPaS	Garg dkk., 2002
Daya sebar	5-7 cm	Garg dkk., 2002
Kadar natrium diklofenak	Tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 110% dari jumlah yang ditetapkan	Naveed dan Qamar, 2014

4.7 Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data

4.7.1 Proses Pembuatan Pati Kentang Modifikasi *Cross-linking*

4.7.1.1 Modifikasi Pati Kentang

Pati dimodifikasi *cross-linking* mengikuti prosedur Kerr dan Cleveland (1959), STMP 6 gram dilarutkan dalam 300 ml akuades yang mengandung 15 gram sodium sulfat. pH larutan diadjust antara 6 dan 11 dengan menambahkan NaOH 1M. Pati 300 gram dilarutkan, kemudian pH dispersi diadjust kembali antara 6 dan 11 dengan larutan NaOH 1M. Campuran diaduk selama 1 jam pada

40°C menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 800 rpm. Setelah didinginkan dalam suhu ruang, campuran didispersikan dalam 350 ml akuades, dan pH dispersi dicatat. Pati didispersi dalam 600 ml akuades, selanjutnya diadjust pH 6,5 dengan larutan HCl 1N, dan setelah tiga kali pencucian (3 X 600 ml), hasilnya dikeringkan pada 45°C selama 6 jam.

4.7.1.2 Evaluasi Substitusi Gugus Fosfat Spektotometer FTIR

Tujuan :

Uji spektrofotometer FTIR dilakukan untuk mengetahui adanya substitusi gugus fosfat yang didapat dari perlakuan *cross-linking* pati kentang (*Solanum tuberosum* L.).

Metode :

Uji spektrofotometri FTIR dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) 'Shimadzu' Fakultas MIPA Universitas Brawijaya dengan membandingkan spektrum sebelum dan sesudah dilakukan modifikasi *cross-linking* pati kentang (*Solanum tuberosum* L.).

Interpretasi Hasil :

Adanya penambahan puncak gelombang atau peningkatan intensitas pada puncak gelombang 870-840 cm^{-1} (Destainville, dkk., 2003).

4.7.2 Proses Pembuatan Gel

4.7.2.1 Desain Formula

Tabel 4.2 Desain formula gel natrium diklofenak

Bahan	Fungsi	Konsentrasi dalam Formula (%)					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
Natrium diklofenak	Zat aktif	1	1	1	1	1	1
Pati kentang tidak termodifikasi	<i>Gelling agent</i>	7,5	10	12,5	-	-	-
Pati kentang termodifikasi	<i>Gelling agent</i>	-	-	-	7,5	10	12,5
Metil paraben	Pengawet	1	1	1	1	1	1
Isopropil alkohol	Pelarut	2	2	2	2	2	2
Propilen glikol	Pelarut	5	5	5	5	5	5
Parfum lemon	Pewangi	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
Akuades	Pembawa	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

4.7.2.2 Rasionalisasi Formula

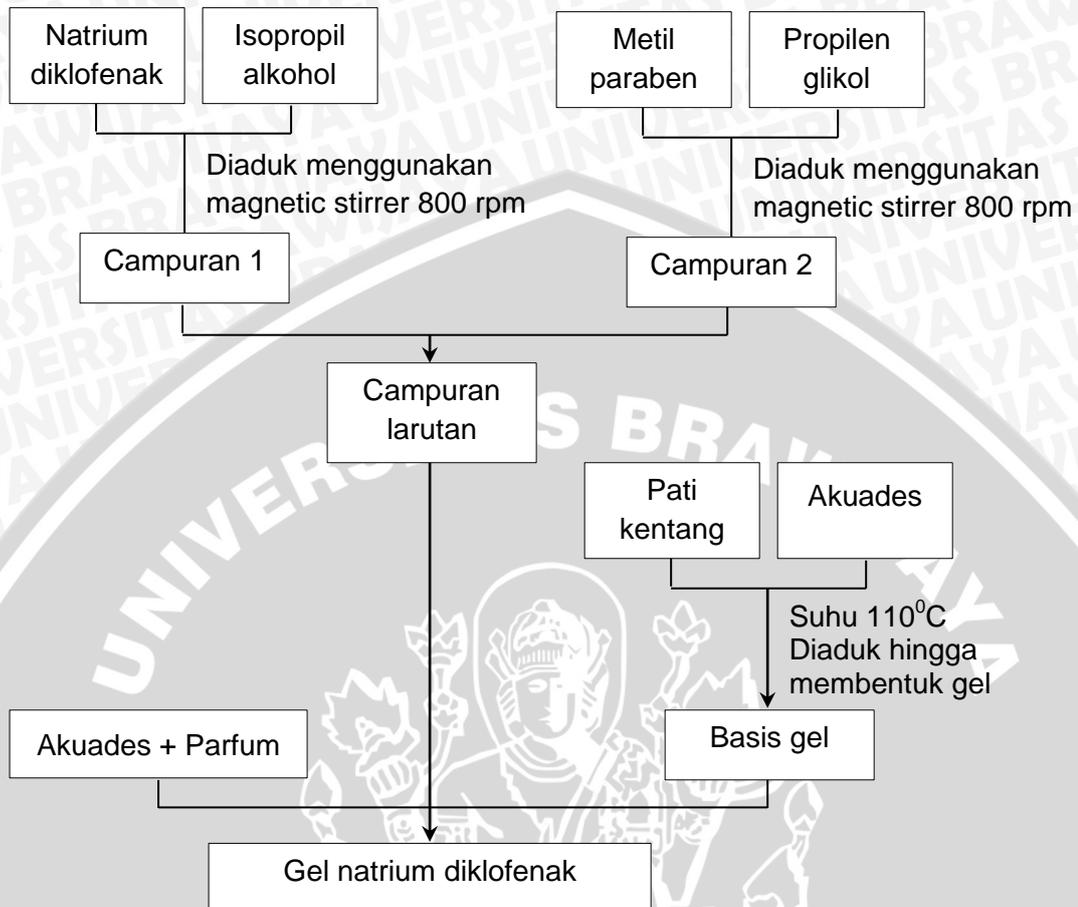
Formula yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari zat aktif berupa natrium diklofenak, *gelling agent* berupa pati kentang termodifikasi dan tidak termodifikasi, pengawet berupa metil paraben, pelarut berupa isopropil alkohol dan propilen glikol, serta parfum dan akuades.

Pati kentang memiliki ketahanan yang baik terhadap suhu tinggi, serta secara morfologi, rheologi, dan tekstur menghasilkan gel yang baik dan stabil dibandingkan dengan jenis pati yang lainnya sehingga potensial digunakan dalam industri farmasi sebagai *thickener*, *gelling agent*, *adhesive*, dan *bulking agent* (Herceg dkk., 2010). Metil paraben banyak digunakan sebagai pengawet antimikroba di berbagai bidang, diantaranya dalam sediaan kosmetika, produk makanan dan sediaan farmasetika. Metil paraben digunakan sebagai pengawet pada penelitian ini dikarenakan formula berbasis gel yang merupakan sediaan

banyak mengandung air. Metil paraben dapat digunakan tunggal ataupun kombinasi dengan paraben lain atau agen anti mikroba lain. Konsentrasi metil paraben yang dapat digunakan untuk sediaan topikal yaitu 0,02-0,3%. Isopropil alkohol digunakan sebagai pelarut zat aktif nartium diklofenak. Isopropil alkohol umumnya digunakan dalam bidang kosmetika dan farmasetika sebagai pelarut pada formulasi sediaan topikal (Rowe dkk., 2009). Penggunaan propilen glikol sebagai kosolven pada natrium diklofenak yang dicampurkan dalam gel memiliki kelarutan yang lebih baik dan menghasilkan gel yang homogen (Purwanti dkk., 2013). Konsentrasi propilen glikol untuk sediaan topikal sebagai pelarut atau kosolven yang disarankan adalah 5-80% (Rowe dkk., 2009).

4.7.2.3 Pembuatan Gel Natrium Diklofenak

Pembuatan gel natrium diklofenak menggunakan pati kentang sebagai *gelling agent* ini mengikuti prosedur Baviskar dkk. (2013), natrium diklofenak dilarutkan menggunakan isopropil alkohol dan diaduk dalam *beaker glass*. Dalam *beaker glass* lain dilarutkan metil paraben menggunakan propilen glikol hingga larut sempurna. Selanjutnya larutan nartium diklofenak dicampurkan dengan larutan metil paraben. Tahap berikutnya yaitu pembuatan basis gel dengan cara mencampurkan pati kentang sebagai *gelling agent* dalam sejumlah akuades pada *beaker glass*. Campuran dipanaskan pada suhu 110⁰C tanpa dilakukan proses pengadukan hingga pati kentang mengalami gelatinisasi (berbentuk bukan seperti serbuk lagi). Selanjutnya barulah pati kentang dapat diaduk hingga berbentuk gel. Selanjutnya campuran larutan pertama ditambahkan ke dalam basis gel yang telah terbentuk dan ditambahkan akuades hingga mencapai berat gel yang diinginkan.



Gambar 4.1 Skema pembuatan gel natrium diklofenak

4.7.3 Uji Stabilitas *Freeze-thaw*

Gel yang mengandung pati ditutup rapat lalu dibekukan (suhu 4⁰C) selama 20 jam, dan kemudian dicairkan pada suhu ruang selama 4 jam (terhitung 1 siklus). Kemudian dibekukan selama 20 jam kembali dan dicairkan selama 4 jam. Hal ini dilakukan hingga lima siklus (Lee dkk., 2002).

4.7.4 Uji Stabilitas *Real Time*

Pengujian dilakukan sesuai dengan *guideline* ICH Q1A, sediaan disimpan selama minimal 12 bulan dimana kondisi penyimpanan 25⁰C ± 2⁰C dan RH 60% ± 5% atau 30⁰C ± 2⁰C dan RH 65% ± 5%. Akan tetapi dikarenakan keterbatasan waktu penelitian pengujian dilakukan selama 1 bulan saja pada suhu ruang.

4.7.5 Uji Stabilitas Fisika Gel

4.7.5.1 Uji Organoleptik

Tujuan

Uji organoleptik dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan cara melakukan pengamatan terhadap bentuk, warna, bau, tekstur, dan konsistensi dari sediaan yang telah dibuat (Anief, 1997).

Metode

Uji organoleptik dilakukan dengan cara melakukan pengamatan terhadap bentuk, warna, bau, tekstur, dan konsistensi dari sediaan yang telah dibuat (Anief, 1997).

Interpretasi hasil

Hasil pengamatan uji organoleptik yang baik yaitu karakteristik bentuk, warna, bau, tekstur, dan konsistensi sediaan gel stabil selama periode penyimpanan.

4.7.5.2 Uji pH

Tujuan

Uji pH dilakukan untuk melihat tingkat keasaman sediaan gel untuk menjamin sediaan gel tidak menyebabkan iritasi pada kulit (Tranggono dan Latifah, 2007).

Metode

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Elektrode dicuci dan dibilas menggunakan akuades lalu dikeringkan. Elektrode dimasukkan ke dalam larutan, dicatat pHnya.

Interpretasi Hasil

pH untuk sediaan gel stabil dalam rentang 4-8 (Buhler, 1998).

4.7.5.3 Uji Viskositas

Tujuan

Uji viskositas dilakukan untuk mengetahui pengaruh modifikasi *cross-linking* yang menurut referensi dapat meningkatkan daya lekat. Selain itu juga untuk mengetahui adanya perubahan viskositas sediaan selama penyimpanan karena viskositas dapat berpengaruh terhadap kemampuan menyebar dan melekatnya gel pada permukaan kulit.

Metode

Uji viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer *Brookfield ISO 9001:2000 Certified*. Sebelumnya ditentukan dulu nomor spindle yang akan digunakan. Kemudian *spindle* dipasang pada alat viskometer. Selanjutnya dilakukan kalibrasi alat dan ditentukan berapa rpm kecepatan yang akan digunakan. Sampel yang akan dihitung viskositasnya sebesar 200 gram. Pada saat pengukuran ditunggu sekitar 10-20 detik untuk mendapatkan hasil yang tetap (Garg dkk., 2002).

Interpretasi Hasil

Angka yang ditunjukkan oleh jarum viskometer nantinya dikali dengan faktor untuk mengetahui hasil viskositas yang didapatkan. Nilai faktor ditentukan berdasarkan nomor *spindle* dan kecepatan yang digunakan. Nilai viskositas sediaan gel yang baik yaitu 2.000-4.000 mPas (Garg dkk., 2002).

4.7.5.4 Uji Daya Sebar

Tujuan

Uji daya sebar dilakukan untuk menjamin pemerataan gel saat diaplikasikan pada kulit yang dilakukan segera setelah gel dibuat (Garg dkk., 2002).

Metode

Gel ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian diletakkan ditengah kaca bulat berskala. Di atas gel diletakkan kaca bulat lain atau bahan transparan lain dan pemberat sehingga berat kaca bulat dan pemberat 150 gram, didiamkan 1 menit, kemudian dicatat diameter penyebarannya (Garg dkk., 2002).

Interpretasi Hasil

Daya sebar gel yang baik antara 5-7 cm (Garg dkk., 2002).

4.7.6 Uji Stabilitas Kimia Gel

4.7.6.1 Uji Kadar

Tujuan

Uji kadar dilakukan untuk mengetahui seberapa banyak natrium diklofenak yang terkandung dalam gel natrium diklofenak untuk mengetahui bagaimana daya ikat gel terhadap zat aktif.

Metode

Kadar natrium diklofenak dalam sampel diukur dengan menggunakan metode spektrofotometer UV dengan tahap sebagai berikut:

1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan mengikuti prosedur Amalia, dkk. (2011). Ditimbang 1 mg natrium diklofenak dan dimasukkan dalam labu takar 100 ml kemudian ditambahkan akuades sampai batas tanda. Selanjutnya diukur absorbansi larutan pada rentang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum natrium diklofenak yang mungkin diperoleh adalah sekitar 279,8 nm.

2. Preparasi Larutan Standar

Preparasi larutan standar dilakukan dengan menyiapkan larutan stok natrium diklofenak pada akuades dalam tabung volumetric yang kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 7,5, 10, 15, 20 dan 25 ppm, selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV pada λ maksimum (275,8 nm) untuk pengukuran natrium diklofenak.

3. Preparasi Sampel

Diencerkan sejumlah gel dengan kandungan natrium diklofenak setara dengan 5 mg dalam akuades sebanyak 10 ml. Larutan kemudian disonifikasi selama 5 menit dan diencerkan hingga diperoleh konsentrasi larutan 50 ppm. Selanjutnya larutan diencerkan hingga diperoleh larutan konsentrasi 10 ppm dengan mengambil 5 ml larutan 50 ppm hingga 25 ml dengan penambahan akuades. Larutan diukur pada λ maksimum menggunakan spektrofotometer UV. Data hasil absorbansi kemudian digunakan untuk mengetahui kadar natrium diklofenak tersisa dalam gel menggunakan persamaan kurva baku.

Hasil

Natrium diklofenak dikatakan stabil jika kadarnya tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 110% dari jumlah yang ditetapkan (Naveed dan Qamar, 2014).

4.8 Analisis Statistik

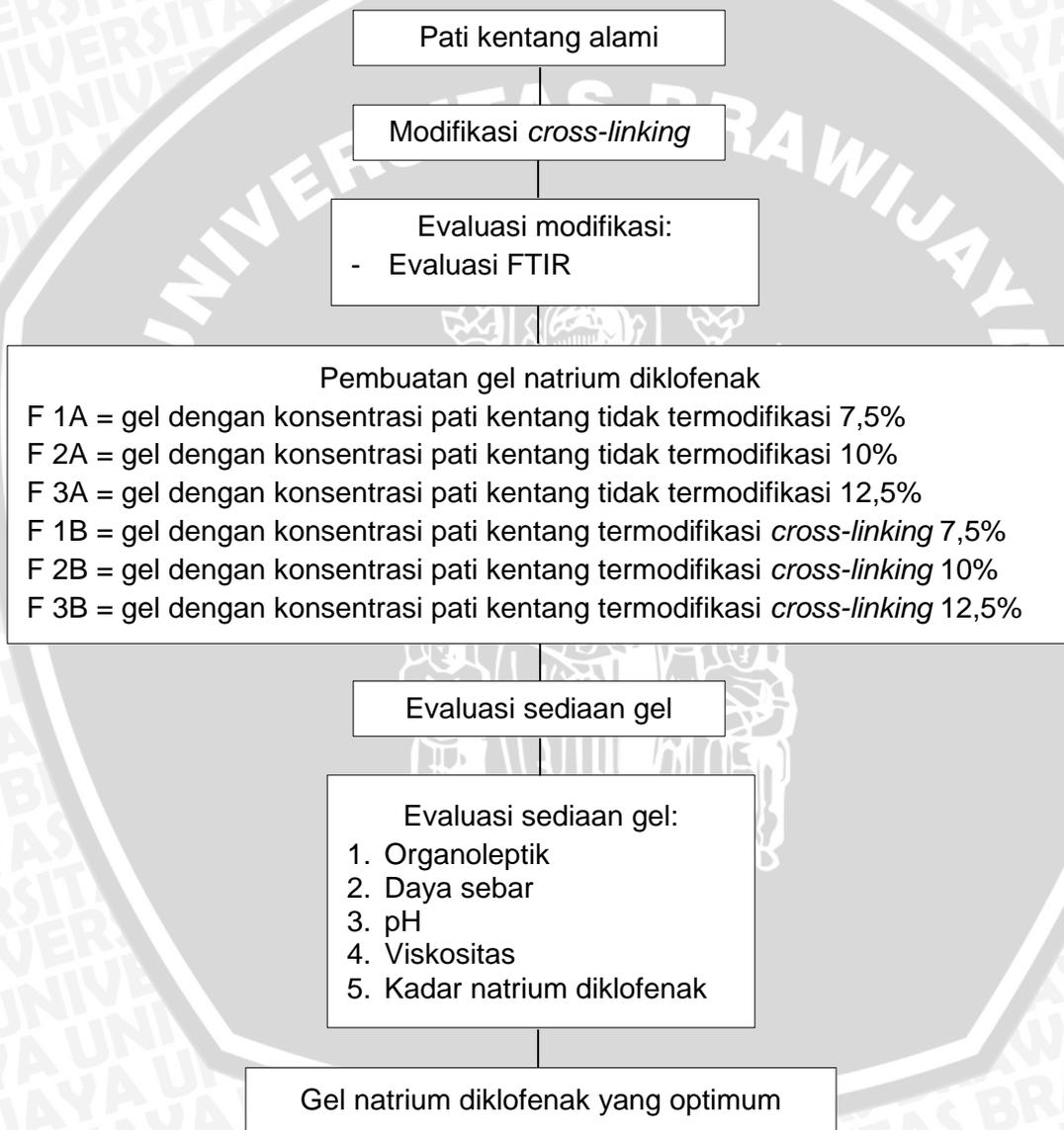
Data hasil uji stabilitas fisik berupa uji pH, viskositas, daya sebar, dan kadar yang diperoleh dianalisis uji statistik parametrik yaitu *Independent T Test* dan *Paired T Test* menggunakan SPSS 14.0. Analisis data *Independent T Test* dilakukan untuk membandingkan 2 kelompok independen yang tidak berhubungan sehingga dapat diketahui apakah ada perbedaan signifikan dari

kedua kelompok data tersebut dengan syarat data harus terdistribusi secara normal dan homogen (Cochran dan Cox, 1957). Dalam analisis *Independent T Test* dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan data hasil dari kedua kelompok data dengan *gelling agent* pati kentang tidak termodifikasi dan pati kentang termodifikasi *cross-linking*, yang dilihat dari parameter pH, viskositas, daya sebar, dan kadar dalam gel. Hipotesis ditegakkan dengan H_0 dan H_1 . H_0 diterima jika nilai signifikansi yang diperoleh $> 0,01$ sedangkan H_0 ditolak jika nilai signifikansi yang diperoleh $\leq 0,01$. H_0 penelitian ini adalah tidak ada perbedaan bermakna dari nilai parameter antara penggunaan *gelling agent* pati kentang tidak termodifikasi dan pati kentang termodifikasi *cross-linking* sedangkan H_1 adalah ada perbedaan bermakna dari nilai parameter antara penggunaan *gelling agent* pati kentang tidak termodifikasi dan pati kentang termodifikasi *cross-linking*.

Sedangkan untuk analisis *Paired T Test* dilakukan untuk membandingkan dua kelompok dimana kedua kelompok data dapat dipasangkan karena berasal dari satu sampel yang sama namun diambil dalam kondisi yang berbeda. Misalkan sampel pengamatan untuk sebelum dan sesudah perlakuan atau perbandingan hasil dua metode pengukuran yang berbeda dengan syarat data terdistribusi secara normal (Shier, 2004). Dalam analisis *Paired T Test* dilakukan untuk mengetahui adanya perubahan data dari dua hasil pengukuran yang berbeda. Formula diamati sebelum dan sesudah dikenai perlakuan uji stabilitas yang dilihat dari parameter pH, viskositas, daya sebar, dan kadar dalam gel. Hipotesis ditegakkan dengan H_0 dan H_1 . H_0 diterima jika nilai signifikansi yang diperoleh $> 0,01$ sedangkan H_0 ditolak jika nilai nilai signifikansi yang diperoleh $\leq 0,01$. H_0 penelitian ini adalah tidak ada perbedaan nilai parameter yang diukur

sebelum dan sesudah perlakuan uji stabilitas sedangkan H1 adalah ada perubahan nilai parameter yang diukur sebelum dan sesudah perlakuan uji stabilitas.

4.9 Skema Kerja Penelitian



Gambar 4.2 Skema kerja penelitian