

BAB III
METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan secara eksperimental laboratoris.

B. WAKTU DAN TEMPAT

Penelitian dilakukan di Laboratorium FKIK UMY dengan menyesuaikan jadwal sesuai tabel berikut ini:

Tabel 1. Jadwal Kegiatan Penelitian

JADWAL KEGIATAN		BULAN KE-					TEMPAT	
		1	2	3	4	5		
1. Tahap Persiapan								
a.	Persiapan Simplisia (Kulit Buah Delima)	√						
b.	Determinasi Tanaman	√					Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.	
c.	Persiapan bahan formulasi	√						
2. Tahap Penelitian								
a.	Ekstraksi	√						
b.	Formulasi Patch Mukoadhesif	√	√	√			Laboratorium FKIK UMY	
c.	Evaluasi Karakteristik Dan Stabilitas Fisik		√	√			Laboratorium FKIK UMY	
3. Tahap Penyelesaian								
a.	Analisis dan Pengolahan Data			√	√	√	Laboratorium FKIK UMY	
b.	Penyusunan Laporan Akhir					√	Laboratorium FKIK UMY	
c.	Pengumpulan Laporan Akhir					√	Laboratorium FKIK UMY	

C. VARIABEL PENELITIAN

1. Formulasi patch mukoadhesif

a. Variabel pengaruh

Variasi komposisi kadar zat aktif (ekstrak kulit buah delima), HPMC, PVP dan *chitosan* yang digunakan dalam memformulasikan patch mukoadhesif

b. Variabel terpengaruh

Karakteristik fisik patch mukoadhesif, yaitu : keseragaman bobot, keseragaman dimensi, % *swelling*, *weight loss*, pH permukaan, uji waktu lekat dan *folding endurance test*

c. Variabel terkendali

pH buffer asetat sebagai pelarut *chitosan*, yaitu pH 4

d. Variabel tak terkendali

- (1) Waktu yang dibutuhkan HPMC, PVP, dan *chitosan* untuk mengembang (*swelling*) secara maksimal di dalam pelarut
- (2) Lama, waktu, kecepatan dan suhu pengadukan
- (3) Kecepatan patch untuk mengering, meliputi kelembaban, suhu, tekanan udara, dan tempat penyimpanan patch
- (4) Suhu ruangan

2. Karakteristik Dan Stabilitas Fisik Patch

a. Variabel pengaruh

Formula (variasi komposisi) patch mukoadhesif

b. Variabel terpengaruh

Karakteristik dan kestabilan fisik patch mukoadhesif yaitu keseragaman bobot, keseragaman dimensi, % *swelling*, *weight loss*, pH permukaan, uji waktu lekat, dan *folding endurance test*

c. Variabel terkendali

Dimensi (diameter patch 0,5 cm), suhu uji % *sweeling* dan *weight loss*, waktu yang dibutuhkan patch untuk mendapatkan % *swelling*, *weight loss*, waktu pengamatan stabilitas patch

d. Variabel tak terkendali

Data pengamatan uji karakteristik dan stabilitas fisik patch

D. DEFINISI OPERASIONAL

1. Variasi komposisi adalah perbandingan antara konsentrasi zat aktif (ekstrak kulit buah delima) dengan jumlah HPMC, PVP dan *chitosan* yang digunakan dalam formulasi.
2. Buffer asetat pH 4 adalah campuran dari basa kuat (NaOH) dengan asam lemah (asam asetat) yang pHnya dibuat menjadi 4.
3. Bobot patch adalah hasil yang didapat dari penimbangan patch.
4. Dimensi patch adalah ukuran ketebalan setiap lembar patch yang dihasilkan dan diukur dengan alat mikrometer scrub.
5. Keseragaman bobot merupakan representasi dari keseragaman 20 lembar patch dalam satu formula.

7. Persen *swelling* adalah kemampuan patch untuk mengembang dalam cairan fisiologis NaCl 0,9% sebanyak 1 ml selama waktu 1 menit.
8. *Weight loss* adalah besarnya kehilangan berat patch selama diinkubasi dalam cairan fisiologis NaCl 0,9% suhu 37⁰C selama waktu 30 dan 60 menit.
9. pH permukaan patch adalah tingkat keasaman patch yang diukur dengan menggunakan pH meter.
10. Waktu lekat merupakan durasi waktu patch untuk menempel di mukosa usus tikus dibawah kondisi pengujian yang dijalankan.
11. *Folding endurance* adalah ketahanan patch untuk mempertahankan patch agar tidak pecah setelah dilakukan lipatan lebih dari 250 lipatan di tempat yang sama.

E. ALAT DAN BAHAN

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan berupa pipet ukur, pipet tetes, blender (Sogo hx t26N), saringan (Corong Buchner), sarung tangan, masker, kamera digital, timbangan analitik, alat-alat gelas (Iwaki pyrex[®]) yang lazim digunakan (gelas beker, gelas ukur, labu takar, cawan petri, spatula, dan gelas arloji), *vacum rotary evaporator* (Ika HB10 Digital), cawan petri, batang pengaduk, kompor listrik, freezer, kertas label, kertas saring, aluminium foil, mikrometer scrub (Herma), cetakan patch, stirer magnetic (Cimarec), water bath (Memmert) dan pH meter (Mettler Toledo).

2. Bahan Penelitian

Kulit buah delima (*Punica granatum* L) yang diperoleh dari Sabila Farm; kebun buah naga dan delima, Jl. Kaliurang Km 18,5 Pakem, Sleman, Yogyakarta, etanol 70%, etanol 90%, PVP K-30 (*pharm grade*), HPMC (*pharm grade*), Gliserin (*pharm grade*), Tween 80 (*pharm grade*), NaOH (*pharm grade*), dan asam asetat (*pharm grade*) yang diperoleh dari Bratachem, *Pappermint oil (food grade)* diperoleh dari toko Paten Jaya, aquadest (general lab), NaCl (*pharm grade* dari PT. Widrata Bakti) dan *Chitosan (medical grade)* diperoleh dari Biotech Surindo, Cirebon-Indonesia (lampiran 2).

F. PROSEDUR PENELITIAN

1. Determinasi Tanaman

Determinasi buah delima dilakukan di laboratorium biologi farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

2. Ekstraksi Kulit Buah Delima (*Punica granatum* L.)

Pembuatan ekstrak ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam serbuk simplisia buah delima dalam etanol 70% selama 5 hari dengan pengadukan 1 kali per hari, kemudian disaring, ampas dan filtrat dipisahkan. Filtrat jernih yang diperoleh diuapkan dengan *vacum rotary evaporator*, dilanjutkan dengan penguapan diatas waterbath suhu 100⁰C.

3. Formulasi Patch Mukoadesif

Formulasi sediaan patch mukoadesif menggunakan ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum* L) dan simplisia sediaan sediaan di

digunakan HPMC, PVP dan *chitosan*. Bahan tambahan lainnya adalah tween 80 sebagai emulgator/surfaktan, gliserin sebagai *plasticizer*, dan *pappermint oil* sebagai penambah rasa. Metode yang digunakan dalam pembuatan formulasi ini adalah metode *solvent casting*. *Chitosan* terlebih dahulu dilarutkan kedalam buffer asetat pH 4, dan ekstrak kental kulit buah delima dilarutkan dengan menggunakan aquades. Pada cawan yang berbeda, HPMC dilarutkan menggunakan etanol 96% secukupnya, setelah larut ditambahkan PVP, campur hingga homogen, kemudian ditambah larutan ekstrak kulit buah delima dan larutan *chitosan* diaduk sampai homogen dan membentuk musilago. Setelah homogen, campuran tersebut ditambah dengan gliserin, tween, dan *pappermint oil*. Selanjutnya, semua bahan dicampur menjadi satu hingga homogen. Bahan yang sudah homogen dituangkan diatas cawan petri dan dikeringkan sampai terbentuk film. Setelah terbentuk film, dibuat lapisan atas patch yang berbahan HPMC : PVP (3:1) yang juga dilakukan dengan metode *solvent casting*. Kemudian dibiarkan sampai kering. Secara lengkap rancangan formulasi sediaan patch dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Rancangan Formula Patch Mukoadhesif Dari Ekstrak Kulit Delima (*Punica granatum L.*)

Formula	Ekstrak Kulit Buah Delima (%b/v)	HPMC (% b/v)	PVP (% b/v)	Chitosan (% b/v)	Tween 80 (% v/v)	Gliserin (% v/v)	Pappermint oil (% v/v)
Formula 1	5	28	28	14	2,8	19,4	2,8
Formula 2	10	26	26	13	2,8	19,4	2,8
Formula 3	5	35	23,2	11,8	2,8	19,4	2,8
Formula 4	10	32,5	21,6	10,9	2,8	19,4	2,8
Formula 5	5	38,2	19	12,8	2,8	19,4	2,8
Formula 6	10	35,4	17,8	11,8	2,8	19,4	2,8

4. Uji Karakteristik Fisik Patch

Uji karakteristik fisik patch dilakukan dengan cara pengujian keseragaman bobot, keseragaman dimensi, % *swelling*, *weight loss*, pH permukaan patch, uji waktu lekat, dan *folding endurance test*. Dari hasil uji tersebut, nantinya akan dievaluasi satu patch terbaik yang selanjutnya akan diuji stabilitas fisiknya selama 7 hari.

a. Uji Keseragaman Bobot

Tiap patch dicetak dengan diameter 0,5 cm menggunakan cetakan patch sebanyak 20 lembar, dan ditimbang satu per satu menggunakan timbangan analitik. Kemudian keseragaman bobot ditentukan sebagai representasi dari keseragaman kadar obat dan keseragaman dosis yang dimuat dalam tiap lembar patch. Referensi metode uji mengacu pada metode uji keseragaman bobot tablet (Depkes RI, 1979) yaitu patch dinyatakan seragam jika 20 patch ditimbang satu persatu tidak boleh lebih dari 2 patch yang masing-masing bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih besar dari harga 15 - 30% untuk bobot rata-rata 25 mg atau kurang.

b. Uji Keseragaman Dimensi

Tiap patch dicetak sebanyak 10 lembar selanjutnya tebal dan dimensi patch diukur menggunakan mikrometer scrup. Patch dinyatakan seragam dimensinya jika CVnya tidak lebih dari 10% dari dimensi rata-rata (Hadi, 2010).

c. **Swelling Test (% swelling)**

Patch yang sudah dicetak ditimbang sebagai berat kering (*dry weight* atau W_d). Gelas arloji dikondisikan agar suhunya 37°C dengan cara diinkubasi dengan air hangat di dalam beaker gelas, dan dicek suhunya dengan menggunakan termometer. Patch dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi 1,0 mL NaCl fisiologis pada suhu 37°C selama 1 menit. Setelah 1 menit, patch diambil dan dibilas menggunakan akuades, kemudian diletakkan di atas kertas saring untuk menghilangkan air yang menempel pada patch. Selanjutnya, patch ditimbang sebagai berat basah (*wet weight* atau W_w) dan dilakukan replikasi 3 kali. Besarnya % *swelling* dapat dihitung menggunakan persamaan (1).

d. **Weight Loss Test (Weight Loss)**

Berat kering patch pada saat $t=0$ ditimbang, kemudian patch diinkubasi di dalam NaCl fisiologis suhu 37°C dengan interval waktu 30 sampai 60 menit. Setelah itu, patch dikeringkan pada suhu kamar sesuai waktu patch kering pada saat formulasi dan ditimbang sebagai berat kering dengan $t=n$, selanjutnya dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Besarnya *weight loss* dihitung menggunakan persamaan (2).

e. **Uji pH Permukaan**

Patch dibiarkan mengembang selama 1 jam dalam cawan petri yang berisi aquades sebanyak 1 mL. Permukaan patch diukur pHnya dengan menggunakan pH meter.

f. Uji Waktu Lekat

Usus tikus segar (bagian usus halus) dibedah dan dibersihkan dengan menggunakan alat bedah, selanjutnya usus tikus dililitkan pada gelas beker ukuran 100 mL, yang diikat tali pada sisi kiri dan kanannya. Patch ditempel di usus tikus yang sudah dilekatkan di gelas beaker. Gelas beker dimasukan ke dalam wadah yang berisi cairan fisiologi (NaCl 0,9%), dan diputar dengan menggunakan *magnetic stirer* pada suhu 35⁰C dan kecepatan 4 - 6 rpm, selanjutnya diamati waktu berapa lama patch masih bertahan melekat pada mukosa usus. Penggunaan *magnetic stirer* suhu 35⁰C dengan kecepatan 4 - 6 rpm merupakan representasi dari kondisi temperatur dan pergerakan mekanik di dalam rongga mulut, contohnya mengunyah ataupun berbicara.

g. *Folding Endurance Test*

Untuk mengetahui *folding endurance*, patch dilipat pada tempat yang sama. Jika lebih dari 250 lipatan di tempat yang sama patch tidak rusak atau pecah, berarti patch memiliki *folding endurance* yang baik (Baviskar dan Jain, 2009).

5. Uji Stabilitas Fisik Patch

Uji stabilitas fisik patch dilakukan dengan memilih satu formula patch yang memiliki karakteristik fisik terbaik, selanjutnya diuji stabilitas fisiknya

selama 7 hari dengan parameter pengujian yang sama pada kondisi ini.

G. ANALISA DATA

Analisis data dilakukan secara kuantitatif dengan metode statistik parametrik dan non parametrik yaitu uji analisis SPSS. Statistik parametrik yang digunakan yaitu *one way ANOVA*, *Repeated ANOVA* dan *Paired sample T Test*. *One way ANOVA* dan *Repeated ANOVA* digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel berbeda dan sama secara signifikan atau tidak dengan tingkat signifikansi 95%. Data disajikan sebagai $\text{mean} \pm \text{standar deviasi}$. *Paired sample T Test* digunakan untuk menguji rata-rata dua sampel yang berpasangan (sama). Sebelum menggunakan hasil analisis ini sebagai alat pengambil keputusan, harus diuji terlebih dahulu mengenai validitas hasil analisisnya. Untuk dapat mengetahui validitasnya, maka harus di uji terlebih dahulu asumsi yang mendasari *one way ANOVA*, *Repeated ANOVA* dan *Paired sample T Test*, yaitu: populasi terdistribusi normal, sampel diambil secara acak dari masing-masing populasi, serta variansi semua populasi sama (*homogeneity of variance*). Apabila salah satu asumsi tersebut tidak dipenuhi maka uji *one way ANOVA* tidak dapat digunakan sebagai alat pengambil keputusan yang valid sehingga harus menggunakan metode statistik