

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pusat Teknologi Farmasi dan Medika Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi di kawasan Puspitek Serpong, Tangerang. Waktu pelaksanaannya adalah dari bulan Februari hingga Juni 2008.

A. ALAT

Timbangan analitik (Precisa 92 SM-202 A), pengaduk magnetik (Heidolph MR 3001 K, Jerman), mikropipet 2-20 μ l (BIO RAD, Amerika), mikropipet 100-1000 μ l (BIO-RAD, Amerika), pipet tips 20,1000 μ l, penyaring gelas (Wheaton), SEM (Hitachi TM-1000 Tabletop Microscope, Amerika), mikroskop optik (Olympus CX31RTSF, Amerika), pH meter (Orion 410 A Thermoelectron Corporation, Inggris), alat pengukur distribusi ukuran partikel (Partica Laser Scattering LA 950V2 Horiba, Jepang), alat pengukur kadar lembab (Precisa HA60), UV-Vis ELISA reader (μ Quant MQX200 Biotek, Amerika), shaker (Heidolph Unimax 1010, Jerman), sentrifugal (Hitachi CRG series), pompa vakum (Welch, Amerika), dan alat-alat gelas.

B. BAHAN

Insulin (Lantus® Aventis, Jerman), natrium alginat (Sigma, Amerika), kitosan (Sigma, Amerika), paraffin cair (Brataco chemika), Span 80 (MP Biomedicals, Amerika), kalsium karbonat (Ajax Finechem UNIVAR, Amerika), natrium hidroksida (Merck, Jerman), asam klorida (Schalau), kalium klorida (Merck, Jerman), natrium asetat (Merck, Jerman), asam asetat glasial (Schalau), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), etanol destilat, bovin serum albumin (Sigma, Amerika), indikator universal (Merck, Jerman), dan aquadest.

C. CARA KERJA

1. Pembuatan larutan buffer fosfat pH 6,8 (18)

Kalium dihidrogen fosfat ditimbang dengan seksama lebih kurang 6,8 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 250,0 mL dan dilarutkan dalam air bebas karbondioksida hingga garis batas sambil dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan kalium dihidrogen fosfat 0,2 M. Natrium hidroksida ditimbang dengan seksama lebih kurang 2,0 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 250,0 mL dan dilarutkan dalam air bebas karbondioksida hingga garis batas sambil dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan natrium hidroksida 0,2 M. Larutan kalium dihidrogen fosfat

0,2 M dimasukkan dalam beaker glass yang telah dikalibrasi 1,0 L dan dicek pH-nya dengan menggunakan alat pH meter, kemudian ditambahkan dengan larutan natrium hidroksida 0,2 M lebih kurang 20 mL. Kemudian ditambah dengan air bebas karbondioksida mendekati 1,0 L. Larutan ditambahkan tetes demi tetes natrium hidroksida sampai diperoleh pH 6,8. Diperoleh larutan buffer fosfat pH 6,8.

2. Pembuatan larutan natrium alginat 2%, 3%, 4%, dan 5%

Natrium alginat ditimbang dengan seksama masing-masing lebih kurang 2,0 g; 3,0 g; 4,0 g dan 5,0 g, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam beaker glass yang sudah dikalibrasi 100 mL. Natrium alginat kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat pH 6,8 sampai garis batas dan dilakukan pengadukan sampai natrium alginat larut. Diperoleh larutan natrium alginat 2%, 3%, 4%, dan 5%.

3. Pembuatan larutan buffer asetat pH 4,5 (18)

Natrium asetat ditimbang dengan seksama lebih kurang 54,0 g, kemudian dimasukan ke dalam beaker glass yang sudah dikalibrasi 500 mL dan dilarutkan dalam air bebas karbondioksida hingga garis batas sambil diaduk hingga homogen. Larutan natrium asetat dicek pH-nya dengan menggunakan alat pH meter, kemudian ditambahkan dengan asam asetat

glasial tetes demi tetes hingga diperoleh pH 4,5. Kemudian volume dicukupkan mendekati 1,0 L dengan air bebas karbondioksida, dan tambahkan lagi asam asetat glasial tetes demi tetes hingga diperoleh pH 4,5. Diperoleh larutan buffer asam asetat pH 4,5.

4. Optimasi pembuatan mikrokapsul alginat kosong sebagai uji pendahuluan (5,17)

Mikrokapsul disiapkan dengan menggunakan metode emulsifikasi/gelasi internal. Larutan natrium alginat 2%, 3%, 4%, dan 5% dalam buffer fosfat pH 6,8 sebanyak 40 mL masing-masing ditambahkan serbuk kalsium karbonat sebanyak 2 gram, sebagai sumber ion kalsium pada pembuatan mikrokapsul dan campuran dihomogenkan selama 10 menit. Setelah homogen, campuran didispersikan dalam paraffin cair 60 mL yang mengandung 1% Span 80, diaduk pada kecepatan 600 rpm selama 10 menit. Selanjutnya 20 mL minyak paraffin mengandung asam asetat glasial 12 mL (untuk melarutkan kalsium karbonat) ditambahkan ke dalam emulsi air dalam minyak dan pengadukan dilanjutkan sampai kalsium karbonat larut, kurang lebih selama 15 menit. Kemudian dilakukan pengukuran pH menggunakan indikator universal. Mikrokapsul yang terbentuk dan terdispersi pada emulsi diperoleh kembali dari fase minyak menggunakan buffer asetat pH 4,5 sebanyak 200 mL sebagai cairan pencuci dengan pengadukan 200 rpm selama 10 menit. Diperoleh endapan mikrokapsul pada fase air. Fase minyak

didekantasi dan fase air yang masih mengandung fase minyak dipisahkan menggunakan corong pisah. Proses pencucian dilakukan sampai mikrokapsul tidak mengandung minyak. Kemudian mikrokapsul disaring menggunakan alat penyaring Buchner. Selanjutnya, mikrokapsul dicuci menggunakan 50 mL alkohol destilat, dan dilakukan evaluasi mikrokapsul.

5. Pembuatan mikrokapsul alginat berisi BSA sebagai model protein pengganti insulin

Mikrokapsul disiapkan dengan menggunakan metode emulsifikasi/gelasi internal. Larutan natrium alginat 2%, 3%, 4%, dan 5% dalam buffer fosfat pH 6,8 sebanyak 40 mL masing-masing ditambahkan serbuk BSA sebanyak 10,0 mg. Kemudian dihomogenkan selama 10 menit. Campuran ditambahkan serbuk kalsium karbonat sebanyak 2 gram dan campuran dihomogenkan selama 10 menit. Setelah homogen, campuran didispersikan dalam paraffin cair 60 mL yang mengandung 1% Span 80, diaduk pada kecepatan 600 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, 20 mL minyak parafin mengandung asam asetat glasial 12 mL ditambahkan ke dalam emulsi air dalam minyak dan pengadukan dilanjutkan sampai kalsium karbonat pada emulsi larut, kurang lebih selama 15 menit. Kemudian, dilakukan pengukuran pH menggunakan indikator universal. Mikrokapsul diperoleh kembali dari fase minyak menggunakan buffer asetat pH 4,5 sebanyak 200 mL sebagai cairan pencuci dengan pengadukan 200 rpm

selama 10 menit. Proses pencucian dilakukan sampai mikrokapsul tidak mengandung minyak. Kemudian mikrokapsul disaring menggunakan penyaring Buchner. Mikrokapsul dicuci menggunakan 50 mL alkohol destilat, dan dilakukan evaluasi mikrokapsul.

6. Pembuatan larutan asam klorida pH 1,2 (18)

Kalium klorida ditimbang dengan seksama lebih kurang 3,7 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 250,0 mL dan dilarutkan dalam air bebas karbondioksida hingga garis batas sambil dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan kalium klorida 0,2 M. Asam klorida pekat dilakukan pengenceran sampai diperoleh larutan asam klorida 0,2 M. Larutan kalium klorida 0,2 M dimasukkan dalam beaker glass yang telah dikalibrasi 1,0 L dan dicek pH-nya dengan menggunakan alat pH meter, kemudian ditambahkan dengan asam klorida 0,2 M lebih kurang 83 mL. Kemudian ditambah dengan air bebas karbondioksida mendekati 1,0 L. Larutan ditambahkan tetes demi tetes asam klorida 0,2 M sampai diperoleh pH 1,2. Diperoleh larutan asam klorida pH 1,2.

7. Penetapan panjang gelombang maksimum bovin serum albumin

Bovin serum albumin ditimbang dengan seksama lebih kurang 8,0 mg dalam tabung mikro, kemudian dilarutkan dalam larutan asam klorida pH

1,2 dan buffer fosfat pH 6,8 masing-masing sampai 1,0 mL. Diperoleh larutan dengan konsentrasi 8000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kemudian dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum dengan pengkalibrasian panjang gelombang antara 200-300 nm menggunakan UV-Vis ELISA reader. Volume yang digunakan sebesar 150 μL . Kemudian ditentukan panjang gelombang maksimum bovin serum albumin dalam larutan asam klorida pH 1,2 dan buffer fosfat pH 6,8.

8. Pembuatan kurva kalibrasi bovin serum albumin dalam larutan asam klorida pH 1,2

Bovin serum albumin ditimbang dengan sekama lebih kurang 8,0 mg dalam tabung mikro, kemudian dilarutkan dalam larutan asam klorida pH 1,2 sampai 1,0 mL. Diperoleh larutan dengan konsentrasi 8000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kemudian dilakukan pengenceran untuk memperoleh konsentrasi lebih kurang 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kemudian serapan diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan UV-Vis ELISA reader. Selanjutnya diperoleh persamaan regresi linier dan koefisien korelasinya.

9. Pembuatan kurva kalibrasi bovin serum albumin dalam larutan buffer fosfat pH 6,8

Bovin serum albumin ditimbang dengan seksama lebih kurang 8,0 mg dalam tabung mikro, kemudian dilarutkan dalam buffer fosfat pH 6,8 sampai 1,0 mL. Diperoleh larutan dengan konsentrasi 8000 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian dilakukan pengenceran untuk memperoleh konsentrasi lebih kurang 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian serapan diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan UV-Vis ELISA reader. Selanjutnya diperoleh persamaan regresi linier dan koefisien korelasinya.

10. Pembuatan larutan asam asetat pH 4,0

Larutan asam asetat glasial dicek pH-nya dengan menggunakan alat pH meter, kemudian ditambahkan dengan aquadest hingga diperoleh pH 4,0.

11. Pembuatan larutan kitosan

Kitosan ditimbang dengan seksama masing-masing lebih kurang 0,4 g; 0,6 g; dan 0,8 g, kemudian masing-masing dimasukkan kedalam beaker glass yang sudah dikalibrasi 200 mL. Kitosan kemudian dilarutkan dengan larutan asam asetat pH 4,0 sampai garis batas dan dilakukan

pengadukan sampai kitosan larut. Diperoleh larutan kitosan 0,2%; 0,3%; dan 0,4%.

12. Penyalutan mikrokapsul alginat kosong menggunakan kitosan sebagai uji pendahuluan

Mikrokapsul alginat kosong yang memberikan hasil optimal pada evaluasi berdasarkan parameter fisik, ditambahkan ke dalam campuran larutan kitosan 0,2%, 0,3%, 0,4% dalam larutan asam asetat encer pH 4,0 sebanyak 200 mL dan dilakukan pengadukan pada 600 rpm selama 30 menit. Mikrokapsul disaring menggunakan penyaring Buchner, dan dicuci menggunakan 50 mL alkohol destilat. Kemudian dilakukan evaluasi mikrokapsul.

13. Penyalutan mikrokapsul alginat berisi BSA menggunakan kitosan

Mikrokapsul berisi BSA yang memberikan hasil optimal pada evaluasi, ditambahkan ke dalam campuran larutan kitosan 0,2%, 0,3%, 0,4% dalam larutan asam asetat encer pH 4,0 sebanyak 200 mL dan dilakukan pengadukan pada 600 rpm selama 30 menit. Mikrokapsul disaring menggunakan penyaring Buchner, dan dicuci menggunakan 50 mL alkohol destilat. Kemudian dilakukan evaluasi mikrokapsul secara fisik dan kimia.

14. Pembuatan mikrokapsul alginat berisi insulin menggunakan metode emulsifikasi

Larutan natrium alginat dan kitosan yang memberikan hasil optimal pada evaluasi mikrokapsul berisi BSA digunakan dalam pembuatan mikrokapsul insulin dengan metode emulsifikasi. Larutan natrium alginat optimal dalam buffer fosfat pH 6,8 sebanyak 40 mL ditambahkan larutan insulin masing-masing sebanyak 46,88; 93,75; 187,5 IU menggunakan mikropipet. Kemudian dihomogenkan selama 10 menit. Serbuk kalsium karbonat ditambahkan sebanyak 2 gram dan campuran dihomogenkan selama 10 menit. Setelah homogen, campuran didispersikan dalam paraffin cair 60 mL yang mengandung 1% Span 80, diaduk pada kecepatan 600 rpm selama 10 menit. Selanjutnya 20 mL minyak parafin mengandung asam asetat glasial 12 mL ditambahkan ke dalam emulsi air dalam minyak dan pengadukan dilanjutkan sampai kalsium karbonat larut, kurang lebih selama 15 menit. Pengukuran pH dilakukan menggunakan indikator universal. Mikrokapsul diperoleh kembali dari fase minyak menggunakan buffer asetat pH 4,5 sebanyak 200 mL sebagai cairan pencuci dengan pengadukan 200 rpm selama 10 menit. Proses pencucian dilakukan sampai mikrokapsul tidak mengandung minyak. Kemudian mikrokapsul disaring menggunakan penyaring Buchner, dan dicuci menggunakan 50 mL alkohol destilat, dan dilakukan evaluasi mikrokapsul.

15. Penyalutan mikrokapsul alginat berisi insulin menggunakan kitosan

Mikrokapsul yang diperoleh ditambahkan ke dalam campuran larutan kitosan yang memberikan hasil optimal pada evaluasi mikrokapsul berisi BSA dalam larutan asam asetat encer pH 4 sebanyak 200 mL dan dilakukan pengadukan pada 600 rpm selama 30 menit. Mikrokapsul disaring menggunakan penyaring Buchner, dan dicuci menggunakan 50 mL alkohol destilat. Kemudian dilakukan evaluasi mikrokapsul.

16. Penetapan panjang gelombang maksimum insulin

Larutan insulin dipipet lebih kurang 75 IU dalam tabung mikro, kemudian dilarutkan dalam larutan asam klorida pH 1,2 dan buffer fosfat pH 6,8 masing-masing sampai 1,0 mL. Diperoleh larutan dengan konsentrasi 2730 $\mu\text{g/mL}$. Tiap 1 mL larutan insulin mengandung 3,64 mg insulin atau 100 IU. Kemudian dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum dengan pengkalibrasian panjang gelombang antara 200-300 nm menggunakan UV-Vis ELISA reader. Volume yang digunakan sebesar 150 μL . Panjang gelombang maksimum insulin ditentukan dalam larutan asam klorida pH 1,2 dan buffer fosfat pH 6,8.

17. Pembuatan kurva kalibrasi insulin dalam larutan asam klorida pH 1,2

Insulin dipipet lebih kurang 2 IU dalam tabung mikro, kemudian ditambahkan larutan asam klorida pH 1,2 sampai 0,5 mL. Diperoleh larutan dengan konsentrasi 145,6 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian dilakukan pengenceran untuk memperoleh konsentrasi lebih kurang 72,8; 36,4; 18,2; 9,1; 4,55 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian serapan diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan UV-Vis ELISA reader. Selanjutnya diperoleh persamaan regresi linier dan koefisien korelasinya.

18. Pembuatan kurva kalibrasi insulin dalam larutan buffer fosfat pH 6,8

Insulin dipipet lebih kurang 2 IU dalam tabung mikro, kemudian ditambahkan buffer fosfat pH 6,8 sampai 0,5 mL. Diperoleh larutan dengan konsentrasi 145,6 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian dilakukan pengenceran untuk memperoleh konsentrasi lebih kurang 72,8; 36,4; 18,2; 9,1; 4,55 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian serapan diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan UV-Vis ELISA reader. Selanjutnya diperoleh persamaan regresi linier dan koefisien korelasinya.

19. Evaluasi mikrokapsul (15, 16, 17)

a. Pemeriksaan morfologi mikrokapsul.

Pemeriksaan morfologi mikrokapsul diamati dengan menggunakan *scanning electron microscopy*.

b. Pengukuran partikel.

Pengukuran partikel dievaluasi dengan menggunakan *particle size analyzer*.

c. Berat mikrokapsul yang diperoleh.

Berat mikrokapsul yang diperoleh ditimbang menggunakan timbangan analitik.

d. Penetapan kadar air.

Mikrokapsul diukur kadar airnya menggunakan alat pengukur kadar lembab (*moisture balance*).

e. Penentuan kandungan zat inti (8).

Dalam menghitung efisiensi mikro kapsul, Mikro kapsul ditimbang sebanyak 100,0 mg, kemudian ditambahkan larutan asam klorida pH 1,2 sebanyak 10,0 mL. Pengadukan dilakukan pada 100 rpm selama 2 jam. Kemudian, larutan dipisahkan dengan mikro kapsul. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu 25°C selama 10 menit dan serapannya diukur. Mikro kapsul ditambahkan larutan buffer fosfat pH 6,8 sebanyak 10,0 mL, kemudian diaduk pada 100 rpm selama 1 jam. Kemudian larutan ditambahkan NaOH 0,2 M sebanyak 1,0 mL sampai pH diatas 7. Selanjutnya, tambahkan etanol sebanyak 11,0 mL. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm pada 25°C selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran serapan larutan. Jumlah kadar zat inti dalam mikro kapsul berdasarkan serapan pada larutan asam klorida dan buffer fosfat kemudian ditambahkan dan dihitung sebagai total kadar zat inti dalam mikro kapsul.

f. Penentuan persentase BSA dan insulin yang tersalut.

Dari penentuan kandungan obat dalam mikro kapsul yang diperoleh dapat dihitung persentase zat aktif yang tersalut dengan menggunakan rumus:

$$F_p = \frac{F_m}{F_t} \times 100\%$$

dimana F_p = persentase zat tersalut.

F_m = Fraksi zat aktif dalam mikrokapsul.

F_t = Fraksi teoritis zat aktif dalam mikrokapsul.

g. Uji pelepasan *in vitro*.

Pada evaluasi ini ditentukan profil pelepasan *in vitro* dari mikrokapsul insulin dengan menggunakan medium asam klorida pH 1,2 sebagai simulasi pH lambung dan buffer fosfat pH 6,8 sebagai simulasi pH usus pada suhu $37 \pm 0,5$ °C, dengan kecepatan putaran pengaduk 100 rpm. Pengambilan sampel dilakukan pada 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6; dan 8 jam. Kadar sampel diukur menggunakan UV-Vis ELISA reader. Profil pelepasan *in vitro* bahan inti dievaluasi menggunakan rumus:

$$dC / dt = k (C_s - C)$$

dimana dC = Perubahan konsentrasi suatu fungsi obat.

k = Konstanta kecepatan disolusi.

C_s = Konstanta jenuh larutan.

C = Konstanta larutan pada waktu tertentu.