



**OPTIMASI KONSENTRASI KITOSAN DAN LAMA PENGADUKAN
DALAM PREPARASI *MICROSPHERES* METFORMIN HIDROKLORIDA**

SKRIPSI

Oleh

**Tintia Lintang Pratiwi
NIM 112210101006**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**OPTIMASI KONSENTRASI KITOSAN DAN LAMA PENGADUKAN
DALAM PREPARASI *MICROSPHERES* METFORMIN HIDROKLORIDA**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Pendidikan Strata Satu Fakultas Farmasi
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

Tintia Lintang Pratiwi
NIM 112210101006

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini kupersembahkan untuk:

1. Ibunda Kristina Wiji Utami dan Ayahanda Drs.Suhartono sebagai tanda bakti, hormat dan rasa terima kasih atas segala doa serta jerih payah yang telah dilakukan demi kebahagiaan dan kesuksesan penulis.
2. Adik penulis Niken Dwita Prameswari, terima kasih untuk semangat dan dukungan kepada penulis.
3. Bapak Eka Deddy Irawan, S.Si., M.Sc., Apt. dan Ibu Lusia Oktora R.K.S, S.F., M.Sc., Apt. yang telah berkenan membimbing penulis dan memberikan masukan lainnya hingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
4. Pahlawan tanpa tanda jasa yaitu guru-guruku sejak Taman Kanak-Kanak hingga Perguruan Tinggi yang terhormat.
5. Teman-teman angkatan 2011 yang telah memberikan semangat dan bantuan selama masa perkuliahan.
6. Almamater tercinta, Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

“A person who never made a mistake never tried anything new” (Albert Einstein)

“Dunia bagiku adalah ibarat seorang musafir yang istirahat sejenak di bawah sebuah pohon lalu meneruskan perjalanannya.” (Hr. Muslim)

”Harta yang paling berharga adalah ikhlasnya doa dari kedua orang tua”

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tintia Lintang Pratiwi

NIM : 112210101006

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul : *Optimasi Konsentrasi Kitosan dan Lama Pengadukan dalam Preparasi Microspheres Metformin Hidroklorida* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari ini tidak benar.

Jember, 29 Juni 2015

Yang menyatakan,



Tintia Lintang Pratiwi

NIM 112210101006

SKRIPSI

**OPTIMASI KONSENTRASI KITOSAN DAN LAMA PENGADUKAN
DALAM PREPARASI *MICROSPHERES* METFORMIN HIDROKLORIDA**

Oleh

Tintia Lintang Pratiwi

NIM 112210101006

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Eka Deddy Irawan, S.Si., M.Sc., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Lusia Oktora R. K. S., S. F., M.Sc., Apt

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "*Optimasi Konsentrasi Kitosan dan Lama Pengadukan dalam Preparasi Microspheres Metformin Hidroklorida*" telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada :

Hari : Senin

Tanggal : 29 Juni 2015

Tempat : Laboratorium Farmasetika, Fakultas Farmasi Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,



Eka Deddy Irawan, S.Si., M.Sc., Apt.

NIP. 197503092001121001

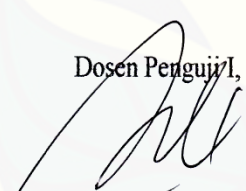
Dosen Pembimbing Anggota,



Lusia Oktora R.K.S, S.F., M.Sc., Apt.

NIP.197910032003122001

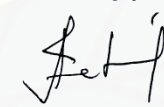
Dosen Penguji I,



Dwi Nurahmanto, S.Farm., M.Sc., Apt.

NIP. 198401242008011001

Dosen Penguji II,



Lidya Ameliana, S.Si., Apt., M.Farm

NIP. 198004052005012005

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Optimasi Konsentrasi Kitosan dan Lama Pengadukan dalam Preparasi Microspheres Metformin Hidroklorida: Tintia Lintang Pratiwi (112210101006); 2015; 84 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Pelepasan obat terkendali pada *gastrointestinal* merupakan salah satu perkembangan terkini dalam sistem penghantaran obat yang dapat ditentukan, diprediksi serta dikendalikan. Salah satu faktor sistem pelepasan obat terkendali adalah bentuk sediaan *multiple unit*. Keuntungan bentuk sediaan ini adalah penyebaran yang lebih merata pada *gastrointestinal* sehingga memberikan absorpsi yang lebih seragam serta mengurangi iritasi yang terjadi.

Microspheres merupakan salah satu teknologi farmasi dalam sistem penghantaran obat terkendali dalam bentuk sediaan *multiple unit*. Manfaat *microspheres* dapat meningkatkan bioavailabilitas suatu bahan aktif, melepaskan bahan aktif dalam jangka waktu yang lama, dan melindungi serta mengontrol pelepasan suatu bahan aktif melalui degradasi permukaan partikel *microspheres*.

Preparasi *microspheres* dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *teknik non aqueous solvent evaporation* menggunakan kitosan sebagai *polimer* dan metformin hidroklorida sebagai bahan aktif. Kitosan bersifat *biocompatible* dan tidak toksik. Metformin hidroklorida merupakan agen antidiabetes tipe 2 dengan kelemahan *bioavailabilitas* sebesar 50-60% dan waktu paruh yang pendek 1,5-4,5 jam.

Tujuan penelitian ini adalah mencapai komposisi terbaik jumlah kitosan, lama pengadukan, dan interaksinya serta untuk mengetahui banyaknya obat yang terjerap dengan metode desain faktorial. Respon dari metode adalah nilai persen

entrapment efficiency. Formula terpilih dengan persen *entrapment efficiency* tertinggi kemudian dilakukan karakterisasi meliputi persen *drug loading*, persen *yield*, analisis FT-IR, dan analisis SEM.

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorik dilakukan dengan menggunakan *four blades propeller* kecepatan pengadukan 800 rpm dan menggunakan spektrofotometer UV-VIS untuk melakukan pengukuran persen *entrapment efficiency*. Nilai persen *entrapment efficiency* yang didapat kemudian diolah menggunakan *software design expert 9.0.4.1* versi *trial* untuk mengetahui pengaruh variabel bebas terhadap respon sehingga akan didapatkan satu formula optimum.

Pengaruh konsentrasi kitosan dan lama pengadukan serta interaksinya terhadap respon persen *entrapment efficiency* dapat diketahui berdasarkan nilai efek faktor. Lama pengadukan memberikan efek negatif pada respon yang artinya semakin lama pengadukan yang dilakukan dapat menurunkan nilai persen *entrapment efficiency*. Sedangkan konsentrasi kitosan dan interaksi antara keduanya memberikan efek positif terhadap respon, sehingga semakin tinggi konsentrasi kitosan yang digunakan akan meningkatkan nilai persen *entrapment efficiency*. Satu formula optimum terpilih pada konsentrasi kitosan sebanyak 2250 mg dan lama pengadukan 2 jam memberikan nilai persen *entrapment efficiency* 81,191%.

Formula optimum terpilih kemudian dilakukan karakterisasi yaitu perhitungan persen *drug loading* dan *yield* didapatkan masing-masing nilai sebesar 22,673% dan 89,601%. Hasil analisis FT-IR menunjukkan tidak adanya interaksi yang terjadi antara kitosan dan metformin hidroklorida dalam *microspheres* ditunjukkan dengan adanya puncak khas metformin hidroklorida yaitu N-H, C-N, dan N-H tekuk. Ukuran partikel *microspheres* dilakukan menggunakan SEM didapatkan nilai sebesar 653,333 μm dengan bentuk hampir sferis, permukaan halus dan berwarna lebih cerah.

PRAKATA

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “*Optimasi Konsentrasi Kitosan dan Lama Pengadukan dalam Preparasi Microspheres Metformin Hidroklorida*”. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Ibunda dan Ayahanda tercinta, Kristina Wiji Utami dan Drs.Suhartono yang telah memberikan cinta kasih dan alunan doa tak terhingga yang selalu mengiringi langkah penulis;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Bapak Eka Deddy Irawan, S. Si., M.Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Lusia Oktora R. K. S., S. F., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota atas kesabaran untuk meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. Bapak Dwi Nurahmanto, S.Farm., M.Sc., Apt selaku Dosen Penguji I dan Ibu Lidya Ameliana, S. Si., Apt., M. Farm selaku Dosen Penguji II yang telah banyak memberikan kritik dan saran untuk kemajuan skripsi ini;
5. Prof. Drs. B Kuswandi, M.Sc., PhD. selaku Dosen Pembimbing Akademik atas arahan dan bimbingan selama menempuh studi;

6. Pahlawan tanpa tanda jasa para Dosen Fakultas Farmasi yang telah memberikan ilmu tiada hingga kepada penulis;
 7. Bu Itus, Mbak Titin, Bu Wayan dan Mbak Hani yang selalu membantu kelancaran proses penelitian penulis;
 8. Adikku terkasih, Niken Dwita Prameswari yang senantiasa memberikan hiburan bagi penulis;
 9. Arif Rahman Alhakimi, “partner super keren” perintis penelitian *microspheres* di Fakultas Farmasi Universitas Jember dengan berjuta ide dan terima kasih atas keseruan dalam kerja samanya;
 10. Sahabat-sahabat dan teman seperjuangan: Nurul Imamah, Galuh Ajeng, Imroatul Mufidah, Indarto Adikusumo, Ichlasul Amalia yang telah melukis warna di persahabatan kita;
 11. Teman seperjuangan di Laboratorium: Lintang Ayu, Defitri, Binta, Astika, Kristine, Anggar, Ditya, Liliana, Okta, Mbak Reni, dan Mbak Sinta yang memberi canda tawa dan meramaikan suasana dalam penelitian penulis;
 12. Keluarga kedua ASMEF atas waktu 3 tahun 10 bulan bersama kalian dengan berbagai pengalaman yang tak terlupakan;
 13. Keluarga Fassenden yang telah memberi pengalaman non akademik;
- Hanya doa dan ucapan terima kasih yang dapat penulis sampaikan atas semua kebaikan dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan pengembangan ilmu teknologi farmasi.

Jember, 29 Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 <i>Microspheres</i>	7
2.1.1 Manfaat <i>Microspheres</i>	7
2.1.2 Preparasi <i>Microspheres</i>	8
2.1.3 Metode <i>Non-aqueous Solvent Evaporation</i>	10

2.1.4 Karakterisasi <i>Microspheres</i>	11
a) <i>Entrapment Efficiency</i> (EE).....	11
b) <i>Drug Loading</i>	12
c) <i>Yield</i>	12
d) Analisis <i>Fourier Transform Infrared</i> (FT-IR).....	12
e) Analisis <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	13
2.2 Metformin Hidroklorida	13
2.3 Kitosan	15
2.4 Desain Faktorial	16
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	18
3.1 Rancangan Penelitian	18
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	18
3.2.1 Alat	18
3.2.2 Bahan.....	18
3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian	19
3.4 Prosedur Penelitian	21
3.4.1 Optimasi Rancangan Formula <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida	21
3.4.2 Pembuatan <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida	22
3.4.3 Penentuan Persen <i>Entrapment Efficiency</i>	23
a) Pembuatan Kurva Baku Metformin Hidroklorida.....	23
(1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	23
(2) Pembuatan Kurva Baku Metformin Hidroklorida dalam <i>Aquadest</i>	23
b) Persen <i>Entrapment Efficiency</i>	24
3.4.4 Penentuam Formula Optimum dengan <i>Software Design</i> <i>Expert</i>	24
3.4.5 Karakteristik <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida.....	24
a) Penentuan Persen <i>Drug Loading</i>	24

b) Penentuan Persen <i>Yield</i>	25
c) Analisis <i>Fourier Transform Infrared</i> (FT-IR).....	25
d) Analisis <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	25
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Hasil Pembuatan <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida- Kitosan	26
4.2 Hasil Penentuan Persen <i>Entrapment Efficiency</i>	27
4.2.1 Pembuatan Kurva Baku Metformin Hidroklorida	27
a) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	27
b) Pembuatan Kurva Baku Metformin Hidroklorida dalam <i>Aquadest</i>	28
4.2.2 Perhitungan Persen <i>Entrapment Efficiency</i>	29
4.3 Analisis Desain Faktorial dan Penentuan Daerah Optimum ...	31
4.4 Karakterisasi <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida-Kitosan	37
4.4.1 Perhitungan <i>Drug Loading</i>	37
4.4.2 Perhitungan <i>Yield</i>	38
4.4.3 Analisis <i>Fourier Transform Infrared</i> (FT-IR).....	39
4.4.4 Analisis <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	42
BAB 5. PENUTUP	45
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	51

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Rancangan Desain Faktorial Untuk Dua Faktor dan Dua <i>Level</i>	21
3.2 Susunan <i>Level</i> Faktor Berdasarkan Desain Faktorial.....	22
3.3 Formula <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida.....	22
3.4 Preparasi <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida.....	23
4.1 Hasil Pengujian Porsen <i>Entrapment Efficiency</i>	31
4.2 Nilai Efek Faktor Konsentrasi Kitosan, Lama Pengadukan, dan Interaksi Keduanya.....	31
4.3 Hasil ANOVA dari Desain Faktorial	34
4.4 Solusi yang Ditawarkan Oleh Desain Faktorial	36
4.5 Hasil Perhitungan Porsen <i>Drug Loading</i>	38
4.6 Hasil Perhitungan Porsen <i>Yield</i>	38
4.7 Hasil Penentuan Ukuran Partikel <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida-Kitosan.....	43

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Morfologi <i>Microspheres</i>	7
2.2 Struktur Metformin Hidroklorida	14
2.3 Struktur Kitosan	15
3.1 Skema Langkah Kerja Peneliti.....	20
4.1 Hasil Pembuatan Empat Formula <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida	27
4.2 Spektra Panjang Gelombang Metformin Hidroklorida dalam <i>Aquadest</i> ...	28
4.3 Kurva Baku Metformin Hidroklorida dalam <i>Aquadest</i>	29
4.4 <i>Contour Plot</i> dari Respon Porsen <i>Entrapment Efficiency</i>	35
4.5 <i>Overlay Plot</i> dari Respon Porsen <i>Entrapment Efficiency</i>	36
4.6 Spektra FT-IR Kitosan	39
4.7 Spektra FT-IR Metformin Hidroklorida	40
4.8 Spektra FT-IR <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida-Kitosan.....	42
4.9 Hasil Morfologi Partikel Menggunakan SEM	43

DAFTAR LAMPIRAN

A. <i>Certificate of Analysis</i>	51
B. Kitosan	52
C. <i>Scanning</i> Panjang Gelombang Metformin Hidroklorida	53
D. Kurva Baku Metformin Hidroklorida dalam <i>Aquadest</i>	57
E. Hasil Perhitungan Persen <i>Entrapment Efficiency</i>	58
F. Contoh Perhitungan Persen <i>Entrapment Efficiency</i>	59
G. Hasil Analisis Desain Faktorial	59
G.1 Kekuatan Faktor dari Desain Faktorial	59
G.2 Hasil Uji ANOVA.....	59
G.3 Perhitungan Efek Faktor dan Interaksi Terhadap Persen <i>Entrapment Efficiency</i>	61
G.4 Constraints	62
H. Hasil Karakterisasi Formula Optimum <i>Microspheres</i> Metformin Hidroklorida	62
H.1 Contoh Perhitungan Persen <i>Drug Loading</i>	62
H.2 Contoh Perhitungan Persen <i>Drug Yield</i>	62
H.3 Hasil Pengukuran Ukuran Partikel <i>Microspheres</i> Menggunakan SEM.....	62
I. Dokumentasi Penelitian	64
I.1 Bahan yang Digunakan dalam Penelitian	64
I.2 Proses Penelitian.....	65

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rute pemberian obat secara peroral lebih disukai dalam pemberian agen terapeutik karena kemudahan dan kenyamanan dalam penggunaan. Bentuk sediaan oral konvensional seperti tablet dan kapsul memberikan konsentrasi obat yang spesifik dalam sirkulasi sistemik tanpa adanya pelepasan yang terkendali sehingga dapat menyebabkan fluktuasi obat dalam plasma (Yadav *and* Jain, 2011). Sistem penghantaran obat oral konvensional mempertahankan konsentrasi obat yang efektif dalam terapi hanya dalam jangka waktu sesaat, terutama pada obat-obat yang diserap di saluran pencernaan memiliki waktu paruh yang pendek sehingga dieliminasi cepat dalam sirkulasi sistemik dan mengakibatkan pemberian obat secara berulang guna meningkatkan konsentrasi dalam darah (Ami *et al.*, 2012, Freiberg *and* Zhu, 2004 *and* Sappidi *et al.*, 2014).

Kondisi *gastrointestinal* juga mempengaruhi sistem penghantaran obat secara oral. Pada keadaan lambung tak terisi makanan terjadi proses pengosongan sedangkan pada saat terisi makanan terjadi gerakan *peristaltic* yang tak beraturan pada bagian *antrum*. Gerakan lambung ini dapat mempengaruhi keberhasilan pelepasan obat pada tempat absorpsi sehingga mengurangi efikasi dari dosis pemberian obat (Ami *et al.*, 2012).

Saat ini dunia farmasi telah mengembangkan suatu sistem penghantaran obat untuk mengatasi masalah-masalah penghantaran obat. Pelepasan obat terkendali pada *gastrointestinal* merupakan salah satu perkembangan terkini dalam sistem penghantaran obat. Pelepasan obat terkendali memberikan pelepasan yang dapat ditentukan, dikendalikan serta diprediksi. Obat yang diberikan melalui rute oral akan disimpan lebih lama dalam *gastrointestinal* dan melepaskan obat secara perlahan.

Pelepasan terkendali ini dapat menjaga konsentrasi obat yang efektif dalam sirkulasi sistemik untuk waktu yang lama. Selain itu sistem pelepasan terkendali dapat meningkatkan durasi waktu paruh obat yang pendek, mengurangi efek samping, mengurangi frekuensi pemberian dosis obat, dan meningkatkan kepatuhan pasien dalam terapi (Ami *et al.*, 2012 and Narang, 2011).

Salah satu faktor yang mengontrol sistem pelepasan obat terkendali pada *gastrointestinal* adalah bentuk sediaan *single* dan *multiple* unit. Bentuk sediaan *single* unit seperti tablet merupakan bentuk sediaan yang mudah untuk dikembangkan. Sistem penghantaran bentuk sediaan *single* unit hanya terletak pada satu bagian dari *gastrointestinal* sehingga jika terjadi proses pengosongan lambung dapat mengganggu kinerja pelepasan sediaan yang mengurangi efek terapi dan menyebabkan *bioavailabilitas* yang tidak seragam. Selain itu sistem penghantaran hanya pada satu bagian *gastrointestinal* dapat menyebabkan iritasi lokal (Narang, 2011). Bentuk sediaan *multiple* unit menunjukkan profil pelepasan yang lebih dapat diprediksi (Ami *et al.*, 2012). Sistem penghantaran bentuk sediaan *multiple* unit yang tersebar pada *gastrointestinal* dapat menghindari gangguan kinerja pelepasan sediaan karena adanya proses pengosongan lambung sehingga absorpsi menjadi lebih seragam (Narang, 2011). Bentuk sediaan *multiple* unit dapat mengurangi iritasi yang terjadi dan menghindari gangguan absorpsi karena adanya makanan (Patel *et al.*, 2006).

Salah satu bentuk sediaan *multiple* unit adalah *microspheres*. *Microspheres* merupakan salah satu teknologi farmasi dalam sistem penghantaran obat terkendali menggunakan bahan *polimer* yang efisien. Suatu partikel *microspheres* berbentuk padat mengandung bahan aktif yang tersebar di dalamnya memiliki rentang ukuran 1-1000 mikrometer. Umumnya *microspheres* bersifat *biocompatible*, dapat meningkatkan *bioavailabilitas* suatu bahan aktif, dan melepaskan bahan aktif dalam jangka waktu yang lama dengan adanya bahan *polimer* yang mampu melindungi dan mengontrol pelepasan suatu bahan aktif melalui degradasi permukaan partikel *microspheres* (Sappidi *et al.*, 2014, Varde and Pack, 2006, and Vasir *et al.*, 2003).

Preparasi *microspheres* dilakukan menggunakan beberapa teknik diantaranya adalah *solvent evaporation*, *hot melt microencapsulation*, *solvent removal* dan *spray-drying* (Vasir *et al.*, 2003). Preparasi menggunakan teknik *solvent evaporation* merupakan teknik yang paling umum digunakan untuk pembuatan *microspheres*. Teknik ini banyak digunakan oleh peneliti untuk sistem penghantaran obat dan telah lama dikembangkan pada akhir 1970-an menggunakan teknik klasik untuk pengembangan *encapsulasi* berbagai produk farmasi sederhana khususnya protein dan DNA. Teknik *solvent evaporation* merupakan teknik yang mudah karena hanya membutuhkan alat-alat skala laboratorium seperti *beaker glass* dan *stirrer* serta ekonomis (Naik *et al.*, 2012 and Varde and Pack, 2006). Prinsip metode *solvent evaporation* yaitu metode emulsifikasi menggunakan pelarut organik mengandung bahan *polimer* dan bahan aktif obat yang terdispersi pada fase eksternal menggunakan bantuan pengaduk (Wise, 2000).

Teknik *solvent evaporation* untuk pembuatan *microspheres* dilakukan dengan metode *non-aqueous solvent evaporation*, yaitu bahan aktif obat dan bahan *polimer* dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian dilakukan emulsifikasi ke dalam fase eksternal yang bersifat lipofilik. Metode *non-aqueous solvent evaporation* ini tidak menggunakan air sebagai pelarut sehingga cocok untuk mengencapsulasi bahan obat yang bersifat larut air (Herrmann and Bodmeier, 1998 and O'Donnell and McGinity, 1997).

Microspheres yang dipreparasi dengan teknik *non-aqueous solvent evaporation* menggunakan kitosan sebagai *polimer*. Kitosan baik diaplikasikan dalam sediaan farmasi karena bersifat *biocompatible* dan tidak toksik (Semalty, 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Garud (2012) membuktikan bahwa kitosan merupakan polimer yang dapat digunakan untuk sediaan *microspheres* mempunyai waktu pelepasan lebih lama dibanding *hydroxypropyl methylcellulose* (HPMC), etil selulosa, dan *carbopol* yaitu sekitar 80% pada pelarut asam pH 2 selama 15 jam.

Bahan obat yang akan dipreparasi dalam penelitian ini adalah metformin hidroklorida. Metformin hidroklorida digunakan sebagai agen antidiabetes mellitus

tipe 2 yang merupakan golongan biguanida dengan mekanisme kerja meningkatkan sensitifitas insulin yang disekresi pada hepar dan jaringan perifer. Metformin merupakan *first line* terapi diabetes mellitus tipe 2 untuk pasien dengan obesitas dengan keuntungan tidak meningkatkan berat badan (Anonim, 2009). Umumnya dosis metformin hidroklorida yang digunakan sebesar 500 mg untuk pemakaian 2-3 kali sehari atau 850 mg untuk pemakaian sekali atau dua kali sehari dengan *bioavailabilitas* sebesar 50%-60% dan waktu paruh yang pendek yaitu 1,5-4,5 jam pada pemakaian dosis tunggal 500 mg (Pandit *et al.*, 2013). Penggunaan metformin hidroklorida dengan dosis yang besar dan secara berulang memungkinkan terjadinya gangguan pada *gastrointestinal* yang menimbulkan efek samping seperti perut terasa tidak nyaman, mual, dan diare yang terjadi selama penggunaan obat (Anonim, 2009 and Mandal *et al.*, 2007).

Metformin hidroklorida memiliki *bioavailabilitas* yang rendah dan kelarutan yang baik dalam air maka itu digolongkan dalam *Biopharmaceutics Classification* kelas III (Pandit *et al.*, 2013). *Bioavailabilitas* dan waktu paruh metformin hidroklorida yang rendah ini menjadi hambatan dalam penggunaannya sebagai agen terapi. *Microspheres* dengan metode *non-aqueous solvent evaporation* merupakan sistem penghantaran obat terkendali yang dapat meningkatkan *bioavailabilitas* metformin hidroklorida melalui mekanisme pengendalian pelepasan obat secara perlahan yang disebabkan oleh erosi matriks terhidrasi (Semalty, 2014 and Yadav and Jain, 2011). Selain itu sistem penghantaran metformin hidroklorida yang terkendali dapat meminimalkan efek samping pada *gastrointestinal* (Dipiro *et al.*, 2008).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Garud (2012), preparasi *microspheres* menggunakan metode *non-aqueous solvent evaporation* menggunakan bantuan pengaduk menghasilkan jumlah *microspheres* dan ukuran partikel yang berbeda pada penggunaan komposisi metformin hidroklorida dan kitosan yang berbeda. Selain itu juga terdapat perbedaan pada persen *entrapment efficiency*, persen *drug loading* dan persen *yield*. Sutar (2012) menjelaskan bahwa seiring

meningkatnya konsentrasi polimer kitosan yang digunakan juga akan meningkatkan ukuran partikel *microspheres* metformin hidroklorida karena terdapat peningkatan viskositas dari pelarut yang mengandung *polimer* sehingga berpengaruh pada ukuran droplet dan jumlah *microspheres* metformin hidroklorida yang dihasilkan. Penelitian yang dilakukan oleh Rathod (2012) menunjukkan perbedaan lamanya pengadukan dalam preparasi *microspheres* dapat mempengaruhi persen *entrapment efficiency* dan ukuran partikel. Semakin lama waktu pengadukan menunjukkan penurunan terhadap persen *entrapment efficiency* dan ukuran partikel (Rathod *et al.*, 2012). Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka perlu dilakukan optimasi konsentrasi kitosan dan lama pengadukan dalam preparasi *microspheres* dengan metode *non-aqueous solvent evaporation* menggunakan bantuan pengaduk guna mendapatkan karakteristik *microspheres* metformin hidroklorida yang optimum.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi kitosan dan lama pengadukan serta interaksinya terhadap persen *entrapment efficiency microspheres* metformin hidroklorida yang dipreparasi dengan metode *non-aqueous solvent evaporation*?
2. Berapa konsentrasi kitosan dan lama pengadukan yang menghasilkan *microspheres* metformin hidroklorida dengan persen *entrapment efficiency* tertinggi?
3. Bagaimana karakteristik kompleks formula optimum *microspheres* metformin hidroklorida yang dihasilkan dengan menggunakan FT-IR?
4. Bagaimana karakteristik (persen *drug loading*, persen *yield*, dan ukuran partikel) formula optimum *microspheres* metformin hidroklorida yang dihasilkan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut :

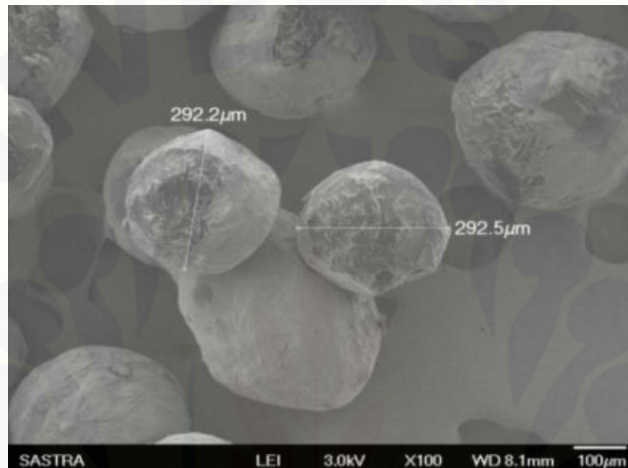
1. Mengetahui pengaruh konsentrasi kitosan dan lama pengadukan serta interaksinya terhadap persen *entrapment efficiency microspheres* metformin hidroklorida yang dipreparasi dengan *non-aqueous solvent evaporation*.
2. Mengetahui konsentrasi kitosan dan lama pengadukan yang menghasilkan *microspheres* metformin hidroklorida dengan persen *entrapment efficiency* tertinggi.
3. Mengetahui karakteristik kompleks formula optimum *microspheres* metformin hidroklorida yang dihasilkan dengan menggunakan FT-IR.
4. Mengetahui karakteristik (persen *drug loading*, persen *yield*, dan ukuran partikel) formula optimum *microspheres* metformin hidroklorida yang dihasilkan.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai informasi ilmiah untuk pengembangan formulasi *microspheres* sebagai sistem penghantaran obat terkendali yang potensial.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Microspheres*



Gambar 2.1 Morfologi *Microspheres* (Ghodake *et al.*, 2010)

Microspheres merupakan partikel yang terdiri dari polimer dan terdapat partikel obat yang terdispersi pada tingkat *molecular* atau *macroscopic*. Rentang ukuran yang dimiliki *microspheres* yaitu 1-1000 mikrometer (Hire and Derle, 2014). Struktur *microspheres* dibuat dari satu atau lebih polimer, lilin, atau bahan pelindung lain bersifat *biodegradable* yang dapat larut dengan partikel bahan aktif yang akan didispersikan (Sappidi *et al.*, 2014). Tujuan utama *microspheres* adalah memperluas dan mengontrol pelepasan molekul aktif dengan partikel yang melapisi (Naik *et al.*, 2012).

2.1.1 Manfaat *Microspheres*

Manfaat *microspheres* sebagai sistem penghantaran obat memiliki ukuran yang kecil dan karakteristik pembawa yang efisien. Kelebihan *microspheres* sebagai

sistem penghantaran obat adalah : a) memfasilitasi penghantaran yang akurat dari obat meskipun dalam jumlah kecil, b) mengurangi konsentrasi obat yang tinggi dalam target spesifik atau jaringan di dalam tubuh, c) mudah diberikan melalui injeksi atau inhalasi, d) pelepasan zat aktif pada tempat yang spesifik di dalam tubuh sebagai sasaran pengobatan, e) memberikan proteksi untuk obat yang tidak stabil sebelum dan sesudah diberikan di dalam tubuh sebelum terdapat pada target aksi di dalam tubuh, f) memberikan kemampuan untuk mengontrol aksi obat secara *in vivo*, profil farmakokinetik, distribusi jaringan dan interaksi seluler dari obat, dan g) memungkinkan pelepasan terkontrol seperti contohnya hormon steroid (Hire and Derle, 2014 and Varde and Pack, 2006).

Microspheres dipreparasi untuk banyak sediaan, misalnya sediaan *ocular*, oral, dan nasal. Bentuk sediaan *microspheres* dapat disesuaikan pada jaringan mukosa seperti pada mata, rongga hidung, dan saluran pencernaan yang digunakan sebagai tujuan terapi (Vasir *et al.*, 2003). *Microspheres* pada sediaan *ocular* memberikan ikatan obat yang optimal pada jaringan mata dan memperlama waktu tinggal obat sehingga meningkatkan *bioavailabilitas* sediaan dan pengurangan frekuensi pemberian obat dibanding pada sediaan tetes mata pada umumnya (Vasir *et al.*, 2003 and Zimmer and Kreuter, 1995). Beberapa tipe *microspheres* yang digunakan untuk sediaan nasal mampu meningkatkan waktu tinggal yang lama pada rongga hidung khususnya pada lapisan subepitel sebagai tempat absorpsi yang efisien sehingga dapat meningkatkan waktu tinggal yang lama pada rongga hidung (Vasir *et al.*, 2003). Sediaan *microspheres* untuk sediaan oral mampu melindungi bahan obat dengan polimer yang *biodegradable* dan mengontrol pelepasan bahan obat melalui degradasi permukaan partikel *microspheres* (Sappidi *et al.*, 2014).

2.1.2 Preparasi *Microspheres*

Penggabungan sediaan obat dengan polimer dapat dilakukan dengan metode enkapsulasi *microspheres*. Pemilihan teknik preparasi *microspheres* pada sistem

penghantaran obat terkendali bergantung pada sifat polimer dan bahan aktif yang digunakan (Wise, 2000).

Preparasi *microspheres* dapat dilakukan dengan banyak teknik seperti a) *emulsion solvent evaporation technique*, b) *hot melt microencapsulation*, c) *solvent removal*, dan d) *spray drying technique* (Vasir *et al.*, 2003). *Microspheres* paling banyak dipreparasi menggunakan teknik *solvent evaporation*. Teknik ini paling banyak digunakan oleh peneliti untuk sistem penghantaran obat dan telah lama dikembangkan pada akhir 1970-an. Teknik ini mudah untuk diaplikasikan karena menggunakan alat-alat laboratorium yang umum seperti *beaker glass* dan pengaduk serta ekonomis (Naik *et al.*, 2012 and Varde and Pack, 2006). Pada teknik ini, polimer dilarutkan dalam pelarut yang sesuai dan obat didispersikan atau dilarutkan ke dalam larutan yang mengandung polimer kemudian larutan yang dihasilkan atau hasil dispersi dilakukan emulsifikasi pada fase *aqueous* untuk membentuk droplet *microspheres*. Evaporasi pelarut yang terjadi membentuk *microspheres* yang padat kemudian dilakukan penyaringan dan pengeringan (O'Donnell and McGinity, 1997).

Teknik *solvent evaporation* terdapat dua metode emulsifikasi, yaitu *single emulsion solvent evaporation* dan *multiple emulsion solvent evaporation*. *Single emulsion* merupakan teknik emulsifikasi yang dibagi menjadi emulsifikasi minyak dalam air (*oil in water*) dan emulsifikasi minyak dalam minyak (*oil in oil*). Sedangkan *multiple emulsion* merupakan emulsifikasi air dalam minyak dalam air (*water in oil in water*) (Wise, 2000).

Teknik *single emulsion oil in water emulsification* umumnya menggunakan air sebagai pelarut. Teknik ini digunakan untuk bahan obat dan polimer yang bersifat hidrofobik dan larut dalam pelarut organik yang tidak larut air. Pada metode ini polimer dilarutkan dalam pelarut organik, kemudian bahan obat dilarutkan pada campuran pelarut dan polimer, hasil dari fase minyak diemulsifikasikan pada larutan *aqueous* yang mengandung emulsifier. Teknik *oil in water emulsification* memiliki efisiensi encapsulasi yang rendah untuk bahan larut air. Sedangkan teknik *single emulsion oil in oil emulsification* digunakan untuk mengenkapsulasi bahan obat yang

larut air kemudian diemulsifikasikan ke dalam fase lipofilik dengan menggunakan *light mineral oil* pada umumnya (Wise, 2000 and Naik *et al.*, 2012). Teknik *single emulsion oil in oil* sering disebut sebagai *non aqueous solvent evaporation* karena ketiadaan penggunaan air dalam pelarut yang digunakan. Teknik *non-aqueous solvent evaporation* merupakan teknik yang disukai karena dapat digunakan untuk mengencapsulasi bahan obat yang larut air dan menghasilkan *entrapment efficiency* hampir 100% serta ukuran *microspheres* yang sesuai antara 100–200 μm (Herrmann and Bodmeier, 1998 and O'Donnell and McGinity, 1997).

2.1.3 Metode *non-aqueous Solvent Evaporation*

Teknik *non-aqueous solvent evaporation* merupakan proses pengembangan encapsulasi untuk obat yang memiliki kelarutan yang baik dalam air (Herrmann and Bodmeier, 1998). Bahan obat dan *polimer* dalam teknik ini dilarutkan dalam suatu pelarut yang bersifat polar seperti *acetonitrile* (Naik *et al.*, 2012), *acetone* (Patel *et al.*, 2006), atau kombinasi *acetonitrile* dan *methanol* (Herrmann and Bodmeier, 1998) dengan berbagai kombinasi yang digunakan. Setelah pencampuran bahan obat dan polimer dalam pelarut polar, kemudian dilakukan emulsifikasi ke dalam fase eksternal yang bersifat lipofilik seperti *light liquid paraffin* (Pandit *et al.*, 2013), *mineral oil*, *cotton seed oil* (Herrmann and Bodmeier, 1998) atau *triglyceride* (Naik *et al.*, 2012). Penggunaan span sebagai surfaktan dapat ditambahkan seperti pada preparasi yang dilakukan oleh Pandit (2013) dan Rathod (2012). Penelitian yang dilakukan oleh Garud (2012) dan Dubey (2012) penggunaan span tidak diperlukan sehingga preparasi *microspheres* cukup diemulsifikasikan pada fase minyak (*paraffin liquid*).

Proses emulsifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan bantuan pengaduk seperti *three-blades propeller* pada suhu ruang. Beberapa preparasi dapat dilakukan dengan kecepatan pengadukan dan lama pengadukan yang bervariasi. Penelitian yang dilakukan oleh Patel (2006), proses emulsifikasi menggunakan bantuan *propeller*

dilakukan pada kecepatan 1200 rpm selama 2 jam, Garud (2012) melakukan proses emulsifikasi dengan variasi kecepatan 600, 1200, dan 1800 selama waktu 4 jam, Pandit (2013) menggunakan kecepatan 1500 rpm selama 3 jam, sedangkan penelitian oleh Rathod (2012) melakukan variasi kecepatan 400, 600, dan 800 rpm selama 2 jam.

Setelah proses emulsifikasi, tahap selanjutnya adalah pengumpulan *microspheres* yang dilakukan dengan cara filtrasi. Filtrasi yang dilakukan menggunakan *membrane filter Whatman paper no 1* (Garud and Garud, 2012). Selama proses filtrasi, *microspheres* yang terbentuk dilakukan pencucian berulang kali untuk menghilangkan fase minyak pada tahap emulsifikasi menggunakan pelarut organik seperti *petroleum ether* suhu 40°C- 60°C (Dubey *et al.*, 2012, Garud and Garud, 2012, Patel *et al.*, 2006 and Yadav and Jain, 2011) atau *n-hexana* (Rathod *et al.*, 2012). *Microspheres* yang terkumpul dikeringkan pada suhu ruang dan kemudian disimpan pada desikator (Patel *et al.*, 2006).

2.1.4 Karakterisasi *Microspheres*

Karakterisasi merupakan hal yang penting untuk mengevaluasi *microspheres* seperti nilai *entrapment efficiency*, *drug entrapment*, *drug loading*, dan *yield* (Sabitha *et al.*, 2010). Karakterisasi memberikan informasi tentang sifat-sifat fisika maupun kimia dari *microspheres*. Karakteristik dari suatu *microspheres* dapat digunakan untuk pengembangan formulasi, memperkirakan kinerja secara in-vivo dan untuk mengatasi masalah dalam preparasi *microspheres*. Berikut adalah beberapa karakteristik dari *microspheres* yang dipreparasi dengan teknik *non-aqueous solvent evaporation*, yaitu :

a) *Entrapment Efficiency (EE)*

Entrapment efficiency merupakan salah satu pertimbangan yang penting dalam penentuan sistem penghantaran obat. *Entrapment efficiency* merupakan

karakterisasi *microspheres* yang digunakan untuk menunjukkan seberapa besar jumlah obat yang terperangkap di dalam partikel *microspheres*. Dalam menentukan persen *entrapment efficiency* digunakan metode spektrofotometri untuk menentukan obat yang terkandung di dalam *microspheres* (Patel *et al.*, 2006).

$$\text{Entrapment efficiency}(\%) = \frac{\text{konsentrasi obat sebenarnya}}{\text{konsentrasi obat teoritis}} \times 100\% \dots (1)$$

b) *Drug Loading*

Drug loading merupakan suatu karakterisasi *microspheres* yang menunjukkan seberapa efisien formula yang digunakan. Perhitungan persen *drug loading* didapat dari rasio berat bahan aktif sebenarnya dalam *microspheres* dengan berat *microspheres* sebenarnya setelah proses pengeringan dikali 100 persen (Choudhury and Kar, 2009).

$$\text{Drug Loading} (\%) = \frac{\% \text{ EE} \times \text{berat bahan aktif sebenarnya}}{\text{berat } \textit{microspheres} \text{ yang didapat}} \times 100\% \dots \dots (2)$$

c) *Yield*

Yield dihitung untuk mengetahui seberapa efisien metode yang digunakan untuk mendapatkan jumlah *microspheres* yang maksimal, sehingga membantu menentukan metode pembuatan *microspheres* yang tepat (Sappidi *et al.*, 2014). Untuk menghitung persen *yield* yang didapatkan dilakukan dari rasio jumlah *microspheres* yang dihasilkan dari preparasi dan jumlah total substansi obat dan polimer (Garud and Garud, 2012).

$$\text{Yield} (\%) = \frac{\text{berat } \textit{microspheres} \text{ yang didapat}}{\text{total berat obat dan polimer teoritis}} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

d) Analisis *Fourier Transform Infrared* (FT-IR)

FTIR merupakan suatu metode spektroskopi IR yang digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya interaksi yang terjadi antara obat dan polimer pada

formula *microspheres* (Sutar *et al.*, 2012). Spektrofotometer infrared (IR) dapat mengidentifikasi kandungan gugus kompleks dalam senyawa tetapi tidak dapat menentukan unsur-unsur penyusunnya (Kencana, 2009).

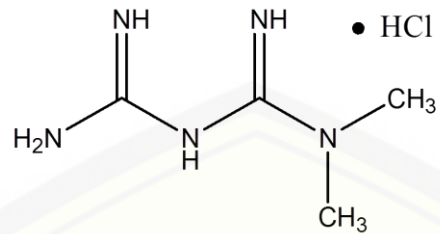
Pada spektroskopi IR, radiasi IR dilewatkan pada sampel. Sebagian dari radiasi IR diserap oleh sampel dan sebagian lainnya diteruskan. Jika frekuensi dari suatu vibrasi sama dengan frekuensi adisi IR yang langsung menuju molekul, molekul akan menyerap radiasi tersebut. Spektrum yang dihasilkan menggambarkan absorpsi dan transmisi molekular membentuk sidik jari molekular suatu sampel (Kencana, 2009).

e) Analisis *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Ukuran partikel dan morfologi suatu *microspheres* dapat dilakukan dengan menggunakan SEM. Ukuran partikel akan berpengaruh terhadap rasio antara luas permukaan dengan volume partikel suatu *microspheres* sehingga mempengaruhi pelepasan obat. Permukaan partikel yang lebih kecil akan menurunkan laju erosi dari polimer yang tidak permeabel terhadap air. Ukuran partikel yang kecil lebih cepat untuk menjadi partikel yang lebih keras karena jarak yang lebih pendek untuk pelarut keluar dari droplet partikel sehingga distribusinya menjadi lebih seragam. Ukuran *microspheres* dapat berpengaruh langsung pada peningkatan degradasi atau laju erosi dan distribusi obat yang tidak seragam (Varde *and* Pack, 2004).

2.2 Metformin Hidroklorida

Metformin Hidroklorida ($C_4H_{11}N_5HCl$) memiliki berat molekul 165,6 g/mol, berupa kristal putih atau hampir putih, larut air, sedikit larut dalam alkohol, dan praktis tidak larut dalam aseton dan diklorometana (Sweetman, 2009). Struktur metformin hidroklorida dapat dilihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur Metformin Hidroklorida

Metformin hidroklorida merupakan disubstitusi biguanida (*N*-1,1-*dimethylbiguanide*) dan strukturnya berhubungan dengan phenformin (*phenethylbiguanide*). Metformin hidroklorida memiliki aktivitas utama dalam penurunan kadar glukosa darah melalui penekanan pada pengeluaran glukosa dalam darah. Kemampuan mereduksi *glucogenesis* metformin HCl adalah 0,6 mg/kg per menit, dan 75% mengurangi pengeluaran glukosa oleh hepar. Metformin hidroklorida meningkatkan sensitivitas sekresi insulin dan mereduksi sekresi *glucagon* yang menstimulasi *gluconeogenesis* (Setter *et al.*, 2003).

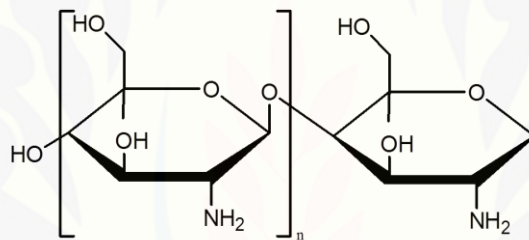
Aksi dari metformin yaitu dapat memperbaiki transport glukosa sehingga memperbaiki pengeluaran glukosa non oksidasi dan mensintesis *glycogen*. Beberapa aksi tersebut dapat meningkatkan stimulasi insulin untuk merangsang penyerapan glukosa. Penggunaan metformin selama 3 bulan dapat meningkatkan stimulasi insulin sampai 29% yang tercatat pada pasien diabetes mellitus tipe 2, sehingga berefek pada penurunan konsentrasi glukosa dalam darah dan juga meningkatkan metabolisme non oksidatif dari glukosa termasuk pembentukan glikogen, mengkonversi glukosa menjadi laktat. Aktivitas instrinsik dari sel membran insulin sensitive terhadap *transporter* glukosa GLUT-1 dan GLUT-4 dapat ditingkatkan dengan metformin (Setter *et al.*, 2003).

Bioavailabilitas metformin pada penggunaan oral adalah 50-60%. Dan absorpsi pada *gastrointestinal* terjadi umumnya pada intestinal bagian atas. Konsentrasi puncak plasma terjadi setelah 1,5-4,5 jam. Penggunaan metformin bersama makanan

telah dilaporkan dapat menurunkan laju dan lama absorpsi dari metformin (Pandit *et al.*, 2013 and Setter *et al.*, 2003).

2.3 Kitosan

Kitosan (2-amino-2-deoxy-(1,4)- β -D-glucopyranan) merupakan polimer karbohidrat (polisakarida) yang dihasilkan dari deasetilasi kitin yang terdapat pada cangkang hewan *crustacea*, serangga dan beberapa jamur. Kitosan mempunyai struktur kristal yang keras melalui ikatan hydrogen inter dan intra molekulnya dan memiliki berat molekul 10.000-1.000.000 Da (Rowe *et al.*, 2009). Rumus struktur kitosan dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur Kitosan

Kitosan tidak larut dalam pH alkali dan netral namun garam kitosan dapat larut dalam air. Kelarutannya bergantung pada tingkat deasetilasi dan pH larutan dimana nilai deasetilasi kitosan untuk sediaan farmasi adalah antara 70-95%. Kitosan dengan derajat deasetilasi rendah (<40%) larut dalam larutan hingga pH 9,0 dan kitosan dengan derajat deasetilasi tinggi (>85%) larut dalam larutan hingga pH 6,5. Kitosan memiliki bentuk serbuk atau serpihan berwarna putih atau putih kecoklatan dan tidak berbau. Kitosan merupakan polimer yang tidak toksik, tidak mengiritasi, *biocompatibel* dan *biodegradable* (Hejazi and Amiji, 2003).

Kitosan mempunyai ruang internal yang dipreparasi dengan *deacidification* ketika penambahan media asam (pH 1,2) dan netral (*deionized distilled water*)

memiliki kemampuan mengapung dan memberikan laju pelepasan yang terkontrol dari suatu bahan obat (Hejazi *and* Amiji, 2003).

Selain itu *microspheres* kitosan dilaporkan memiliki waktu tinggal di lambung lebih lama karena mempunyai kemampuan dapat menembus *epithelial barrier* sehingga dapat menempel pada sel epitel *gastrointestinal* (Hejazi *and* Amiji, 2003 *and* Hes *et al.*, 1999).

2.4 Desain Faktorial

Desain faktorial merupakan aplikasi persamaan regresi untuk memberikan model hubungan antara *variable* respon dengan satu atau lebih. Desain faktorial digunakan dalam suatu percobaan untuk menentukan secara simulasi efek dari beberapa faktor atau kondisi yang berbeda dan interaksinya (Bolton *and* Bon, 2004).

Desain faktorial mengandung beberapa pengertian faktor, *level*, efek, dan respon. Faktor merupakan setiap besaran yang mempengaruhi respon. *Level* merupakan nilai atau tetapan untuk faktor. Efek adalah perubahan respon yang disebabkan variasi tingkat faktor. Efek utama adalah efek rata-rata semua tingkat dari faktor. Interaksi adalah rata-rata respon pada aras tinggi dikurangi rata-rata respon pada aras rendah. Respon merupakan sifat atau hasil yang diamati diukur secara kuantitatif (Bolton *and* Bon, 2004).

Desain faktorial dua *level* berarti ada dua faktor yang masing-masing diuji pada dua *level* yang berbeda yaitu *level* rendah dan *level* tinggi (A dan B). Suatu percobaan dapat dirancang dengan desain faktorial untuk mengetahui faktor dominan yang berpengaruh secara signifikan terhadap suatu respon (Voight, 1995).

Persamaan umum dari desain faktorial dua faktor adalah sebagai berikut :

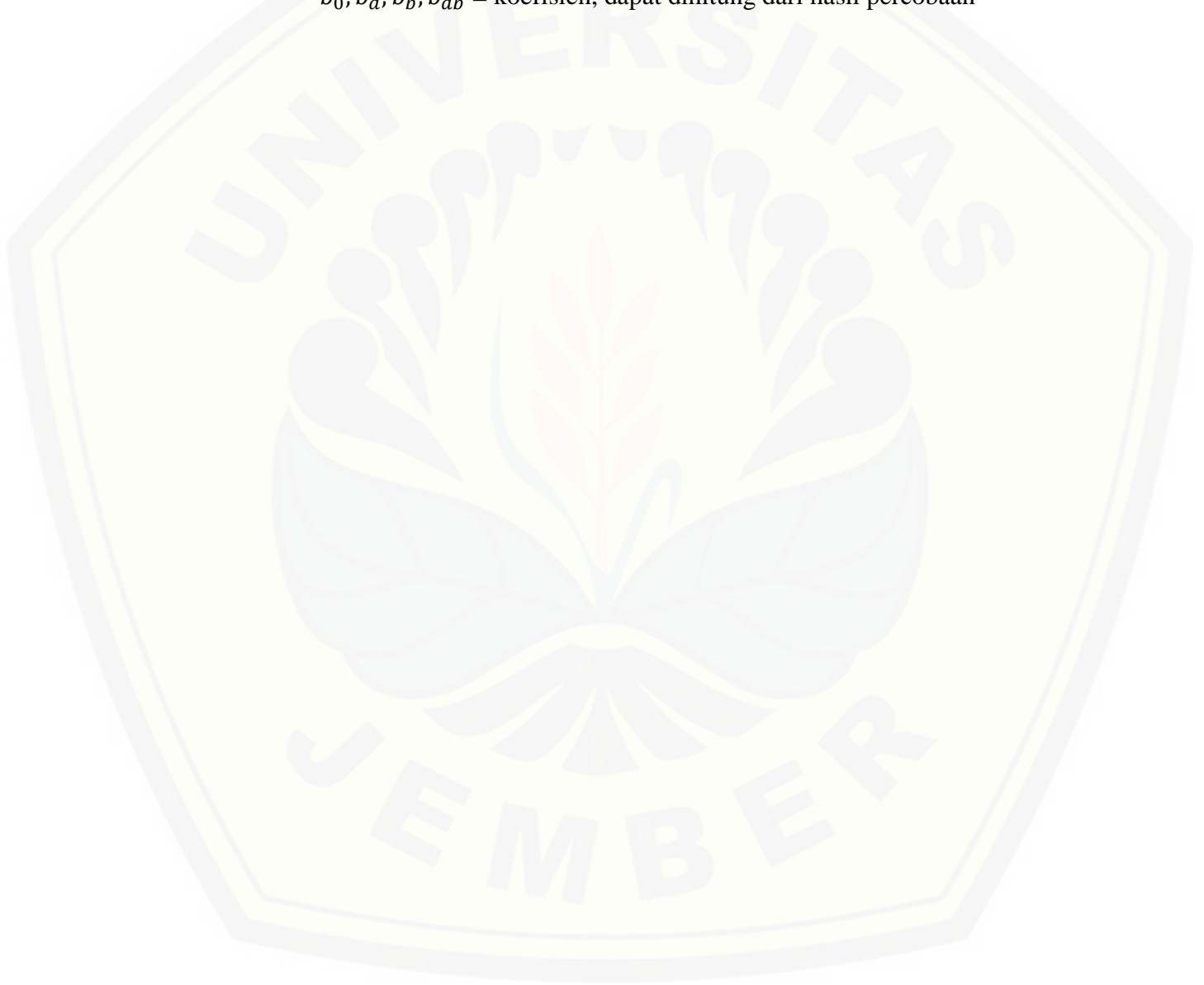
$$Y = b_0 + b_a X_A + b_b X_B + b_{ab} X_A X_B \dots \dots \dots (4)$$

Y = respon hasil atau sifat yang diamati

X_A = *level* bagian A

X_B = *level* bagian B

b_0, b_a, b_b, b_{ab} = koefisien, dapat dihitung dari hasil percobaan



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik. Tahapan penelitian meliputi : (1) Optimasi rancangan formula dengan konsentrasi polimer dan lama pengadukan sebagai variabel bebas menggunakan desain faktorial; (2) Pengukuran persen *entapment efficiency*; (3) Penentuan formula optimum dengan *Design Expert versi trial 9.0.4.1*; dan (4) Karakterisasi formula terpilih.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

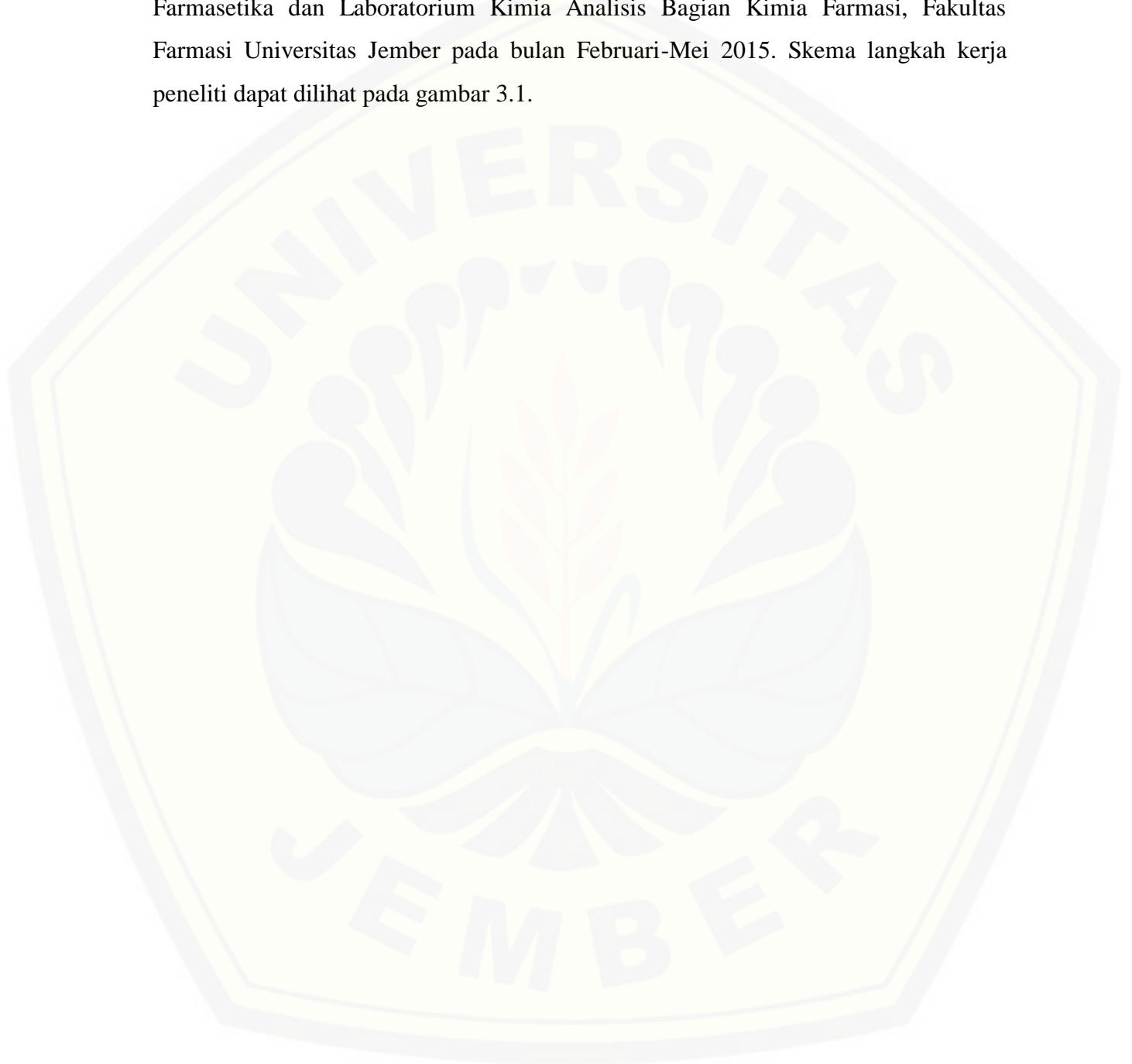
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *four blades propeller* (IKA Labortechnik, Germany), FTIR spektrofotometer (Genesys 10s), Spektrofotometer UV-VIS (Genesys 10S, Thermo Scientific, USA), *stop watch*, neraca analitik (AdventurerTM Ohaus, USA), Oven (Mettler, Germany), alat-alat gelas, dan program perangkat lunak (*software*) *design expert versi trial 9.0.4.1*.

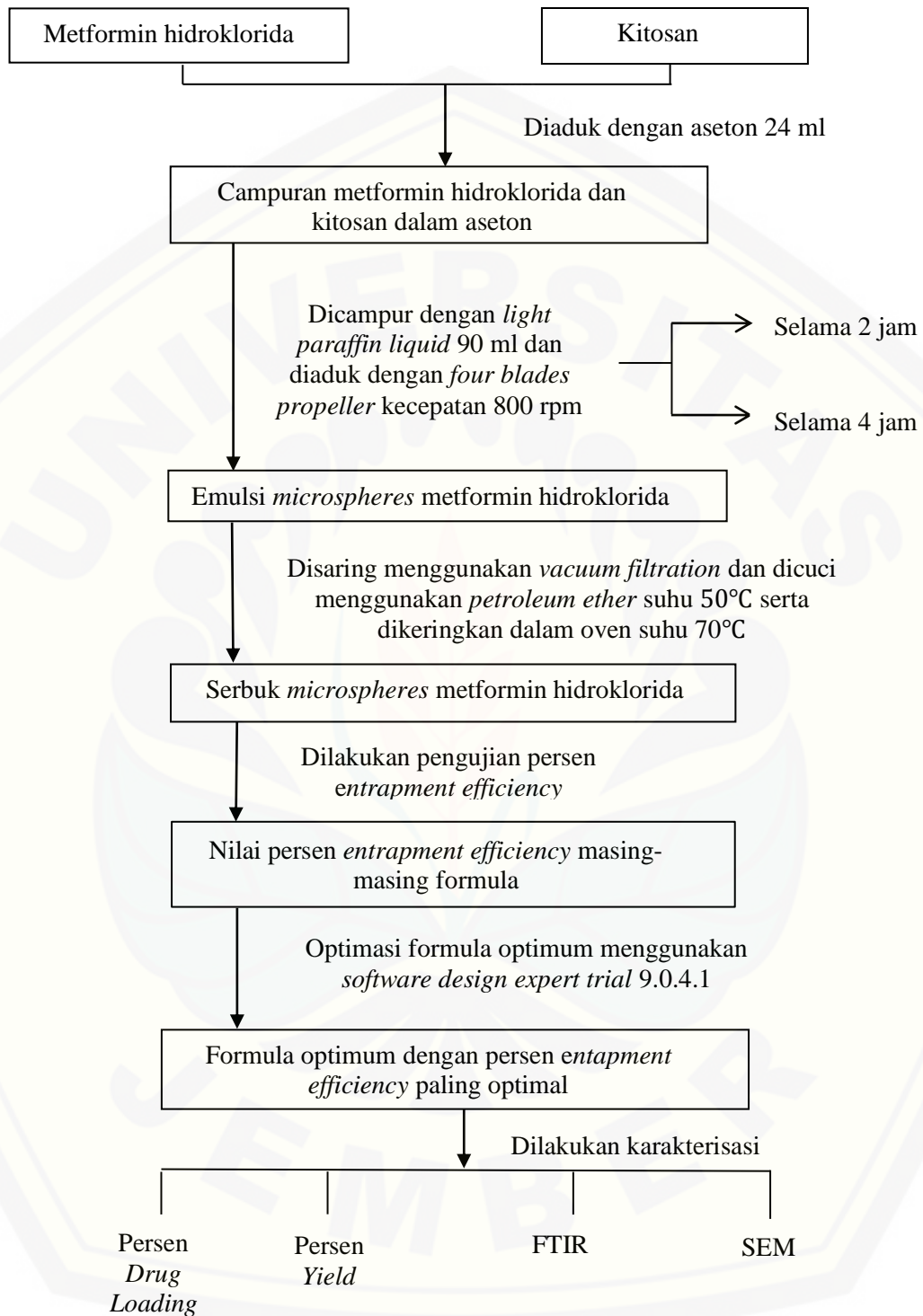
3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Metformin hidroklorida (Hildose, RRC), kitosan (Biotech Surindo), aseton (PT. Smart Lab., Indonesia), *light paraffin liquid* (PT. Bratachem, Indonesia), *petroleum ether* (PT. Bratachem, Indonesia), aquademineralisata.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Bagian Farmasetika dan Laboratorium Kimia Analisis Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Jember pada bulan Februari-Mei 2015. Skema langkah kerja peneliti dapat dilihat pada gambar 3.1.





Gambar 3.1 Skema langkah kerja penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Optimasi Rancangan Formula *Microspheres* Metformin Hidroklorida

Pada penelitian ini dibuat 4 macam rancangan formula *microspheres* metformin hidroklorida. Tiap formula terdiri atas metformin hidroklorida dan kitosan. Perbedaan dari masing-masing formula adalah perbandingan konsentrasi kitosan dan perlakuan mengenai lama pengadukan *four blades propeller* dalam pembentukan *microspheres* metformin hidroklorida.

Penelitian ini menggunakan metode desain faktorial dua *level* dua faktor dengan variabel bebas (faktor) dan variabel terikat (respon) sebagai berikut :

- a. Variabel bebas : Konsentrasi kitosan dan lama pengadukan *four blades propeller*
- b. Variabel terkontrol : Kecepatan pengadukan
- c. Variabel terikat : Persen *entrapment efficiency*

Desain faktorial dua *level* dua faktor terdiri atas masing-masing faktor yang diuji pada dua *level*, yaitu *level* maksimum dengan notasi (+1) dan *level* minimum dengan notasi (-1). Tujuannya adalah untuk mengetahui konsentrasi kitosan dan lama pengadukan yang optimum untuk mendapatkan karakteristik *microspheres* yang optimum. Berikut adalah tabel 3.1 rancangan desain faktorial untuk dua faktor dan dua *level* :

Tabel 3.1 Rancangan desain faktorial untuk dua faktor dan dua *level*

Formula	Faktor A (konsentrasi kitosan)	Faktor B (Lama Pengadukan)	Interaksi A dan B
(1)	-1	-1	+1
A	+1	-1	-1
B	-1	+1	-1
AB	+1	+1	+1

Susunan *level* rendah dan *level* tinggi untuk masing-masing faktor dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Susunan *level* faktor berdasarkan desain faktorial

Faktor	<i>Level</i> rendah (-1)	<i>Level</i> tinggi (+1)
Konsentrasi kitosan	750 mg	2250 mg
Lama pengadukan	2 jam	4 jam

Adapun susunan formula *microspheres* metformin hidroklorida yang akan diteliti dapat dilihat pada tabel 3.3.

Tabel 3.3 Formula *Microspheres* Metformin Hidroklorida

Bahan	Jumlah	Fungsi Bahan
Metformin HCl	750 mg	Bahan aktif
Kitosan	750 mg / 2250 mg	Bahan polimer
<i>Acetone</i>	24 ml	Fase internal
<i>Light Paraffin liquid</i>	90 ml	Fase eksternal
<i>Petroleum ether</i>	30 ml	Bahan pencuci

3.4.2 Pembuatan *Microspheres* Metformin Hidroklorida (Garud and Garud, 2012)

Microspheres metformin hidroklorida sebagai obat antidiabetes tipe 2 dipreparasi menggunakan teknik *non-aqueous solvent evaporation*. Bahan aktif metformin hidroklorida sebanyak 750 mg dan kitosan dengan variasi konsentrasi 750 mg dan 2250 mg dicampur dengan aseton sebanyak 24 ml. Campuran metformin hidroklorida-kitosan dalam aseton dimasukkan ke dalam larutan *light paraffin liquid* sebanyak 90 ml kemudian dilakukan pengadukan menggunakan *four blades propeller* dengan kecepatan 800 rpm pada suhu ruang. Larutan diaduk selama waktu yang berbeda. Pada formula (1) konsentrasi kitosan yang digunakan sebesar 750 mg kemudian campuran metformin hidroklorida dan kitosan dalam *light paraffin liquid* diaduk dengan kecepatan 800 rpm selama 2 jam, formula (A) konsentrasi kitosan yang digunakan sebesar 2250 mg kemudian dilakukan pengadukan selama 2 jam, formula (B) konsentrasi kitosan yang digunakan sebesar 750 mg dilakukan pengadukan selama 4 jam, dan formula (AB) konsentrasi kitosan yang digunakan sebesar 2250 mg kemudian dilakukan pengadukan selama 4 jam. Preparasi *microspheres* secara ringkas dapat dilihat pada tabel 3.4. Kemudian emulsi *microspheres* yang terbentuk disaring dengan menggunakan *vacuum filtration*

dilengkapi kertas saring *Whatman* no 1. *Microspheres* yang terbentuk dicuci secara berulang menggunakan *petroleum ether* dengan suhu 50°C untuk menghilangkan fase minyak pada *microspheres*. Serbuk *microspheres* yang didapat dikeringkan dalam *oven* suhu 70°C sampai didapatkan berat *microspheres* yang konstan. Preparasi *microspheres* metformin hidroklorida dapat dilihat pada tabel 3.4.

Tabel 3.4 Preparasi *Microspheres* Metformin Hidroklorida

Formula	Metformin HCl (mg)	Kitosan (mg)	Acetone (ml)	Light paraffin liquid (ml)	Pengadukan kecepatan 800 rpm
(1)	750	750	24	90	2 jam
(A)	750	2250	24	90	2 jam
(B)	750	750	24	90	4 jam
(AB)	750	2250	24	90	4 jam

3.4.3 Penentuan Persen *Entrapment Efficiency*

a) Pembuatan Kurva Baku Metformin Hidroklorida

(1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan baku induk dibuat dari 10 mg metformin hidroklorida dilarutkan dalam 100 ml aquades (100 ppm), dikocok hingga larut. Larutan baku induk dilakukan pengenceran untuk dibuat larutan dengan konsentrasi tertentu sebagai standar baku. Penentuan panjang gelombang dengan cara *scanning* larutan standar baku konsentrasi tertentu pada panjang gelombang 200-400 nm dan ditentukan panjang gelombang maksimum.

(2) Pembuatan Kurva Baku Metformin Hidroklorida dalam *Aquadest*

Larutan baku standar dibuat dari larutan baku induk 100 ppm. Larutan baku induk 100 ppm digunakan untuk pengenceran baku standar 4, 6, 8, 10, 12 ppm. Masing-masing larutan standar ditentukan absorbansinya dengan spektrofotometri UV pada panjang gelombang maksimum kemudian dibuat kurva baku dari hasil pengukuran tersebut.

b) Persen *Entrapment Efficiency* (Pandit *et al.*, 2013)

Sejumlah *microspheres* yang setara dengan 50 mg metformin hidroklorida dibilas menggunakan *aquadest* untuk menghilangkan obat bebas. *Microspheres* kemudian ditambahkan *aquadest* ad 100 ml lalu digerus pada mortar dan disaring. Filtrat dianalisis menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang maksimum. Perhitungan persen *entrapment efficiency* dilakukan menggunakan persamaan (1).

3.4.4 Penentuan Formula Optimum dengan *Software Design Expert*

Analisis data untuk memperoleh formula optimum dilakukan menggunakan metode desain faktorial. Dari data hasil pengujian persen *entrapment efficiency microspheres* metformin hidroklorida didapatkan harga untuk masing-masing respon untuk melengkapi persamaan (4), sehingga didapatkan persamaan umum hubungan antara faktor dan respon (persen *entrapment efficiency*).

Berdasarkan rumus $Y = b_0 + b_a X_A + b_b X_B + b_{ab} X_A X_B$ dapat dihitung harga koefisien b_0, b_a, b_b, b_{ab} . Dari hasil perhitungan menggunakan rumus ini, dapat dibuat *countour plot* dengan menggunakan *software design expert 9.0.4.1 versi trial*. Pembuatan *contour plot* meliputi nilai persen *entapment efficiency*, sehingga dapat diketahui efek faktor terhadap respon serta efek interaksi faktor terhadap respon.

Dari *contour plot* tersebut dapat diketahui komposisi optimum kombinasi konsentrasi kitosan dan lama pengadukan terhadap persen *entrapment efficiency microspheres*. Formula yang dipilih adalah formula yang menghasilkan respon (persen *entapment efficiency*) tertinggi maka hal ini menunjukkan keberhasilan preparasi suatu sistem penghantaran obat terkendali.

3.4.5 Karakteristik *Microspheres* Metformin Hidroklorida

a) Penentuan Persen *Drug Loading* (Garud and Garud, 2012)

Drug loading menunjukkan seberapa efisien formula yang digunakan dalam preparasi. Penentuan *drug loading* didapat dari rasio berat metformin yang

sebenarnya dalam preparasi yang didapat dari perkalian antara persen EE dan berat metformin teoritis dengan berat *microspheres* yang sebenarnya setelah pengeringan. Perhitungan persen *drug loading* dapat dilakukan menggunakan persamaan (2).

b) Penentuan Persen *Yield* (Garud and Garud, 2012)

Presentase *yield* dihitung untuk mengetahui seberapa efisien metode yang digunakan sehingga membantu menentukan metode pembuatan *microspheres* yang tepat. Untuk menghitung persen *yield* yang didapatkan dilakukan dari rasio jumlah *microspheres* yang dihasilkan dari preparasi dan jumlah total substansi obat dan polimer. Perhitungan persen *yield* dapat dilakukan menggunakan persamaan (3).

Pada perhitungan persen *yield*, *microspheres* yang didapat dikeringkan dahulu pada *oven* dengan suhu 70°C hingga didapat berat konstan *microspheres* yang sebenarnya.

c) Analisis *Fourier Transform Infrared* (FT-IR) (Yadav and Jain, 2011)

Analisis gugus fungsi menggunakan alat spektrofotometri FT-IR dilakukan untuk mengetahui adanya perubahan gugus fungsi metformin hidroklorida dengan kitosan setelah proses emulsifikasi. Untuk melakukan analisis dengan FT-IR, sampel *microspheres*, metformin hidroklorida dan kitosan masing masing diletakkan pada *template*. Pemeriksaan gugus fungsi dilakukan pada bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} .

d) Analisis *Scanning Electron Microscope* (SEM) (Sabitha et al., 2010)

Ukuran, bentuk dan morfologi permukaan *microspheres* dapat dilihat menggunakan *scanning electron microscopy* (SEM). Sejumlah *microspheres* disebarkan pada bagian *glass stub* dan ditempatkan di *scanning electron microscopy chamber*, lalu dilakukan scanning dengan tegangan 20Kv dan tekanan chamber 0,1 mmHg dengan pembesaran 800 kali.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Pembuatan *Microspheres* Metformin Hidroklorida-Kitosan

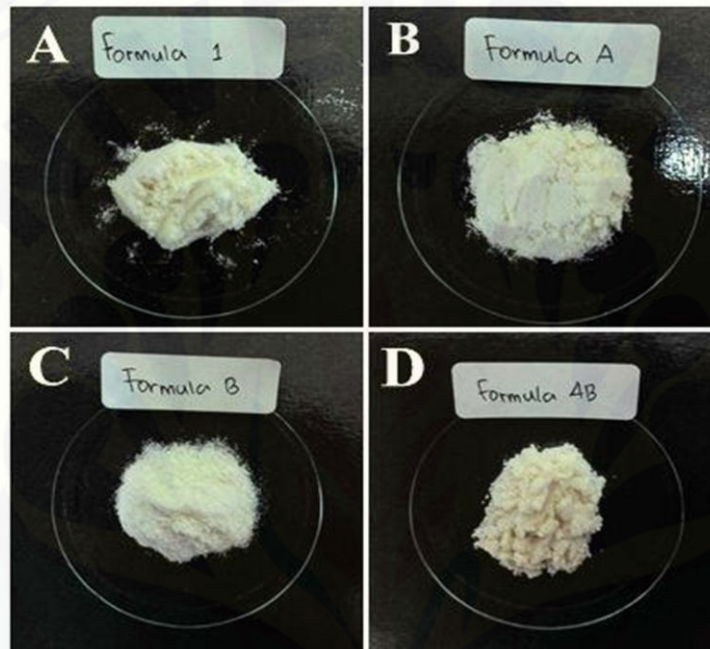
Tahap pertama pada penelitian ini yaitu pembuatan empat formula *microspheres* metformin hidroklorida-kitosan dengan desain faktorial menggunakan dua faktor dua *level*. Faktor terpilih dimasukkan ke dalam rumus umum desain faktorial yaitu 2^n dengan n sebagai banyaknya faktor sehingga didapat empat formula yaitu F(1), F(A), F(B), F(AB). Faktor yang diteliti dan jumlah replikasi yang digunakan dimasukkan dalam *software design expert 9.0.4.1* versi *trial*.

Microspheres metformin hidroklorida-kitosan dipreparasi dengan menggunakan metode *non-aqueous solvent evaporation* menggunakan bantuan *four blades propeller*. Variabel yang dioptimasi adalah konsentrasi kitosan dan lama pengadukan *four blades propeller*, sedangkan respon yang diamati adalah persen *entrapment efficiency*. *Entrapment efficiency* dipilih sebagai respon dalam desain faktorial karena *microspheres* sebagai teknologi pembawa obat harus memiliki kandungan obat yang optimum sehingga berpengaruh pada ketersediaan hayati obat ketika dalam tubuh.

Preparasi *microspheres* metformin hidroklorida-kitosan dilakukan menggunakan metode *non-aqueous solvent evaporation* yaitu bahan aktif obat dan bahan *polimer* dilarutkan dalam pelarut organik kemudian dilakukan emulsifikasi ke dalam fase eksternal yang bersifat lipofilik. Mekanisme terbentuknya *microspheres* adalah terjadinya evaporasi pelarut organik secara perlahan pada fase eksternal lipofilik sehingga konsentrasi droplet emulsi akan menurun membentuk partikel yang kecil. Bantuan pengadukan akan membantu terjadinya evaporasi pelarut organik dari

fase eksternal lipofilik (Herrmann *and* Bodmeier, 1998; Naik *et al.*, 2012 *and* O'Donnell *and* McGinity, 1997).

Hasil pembuatan *microspheres* menunjukkan bentuk yang hampir sama yaitu serbuk halus dengan warna putih sedikit kekuningan. Hasil lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil pembuatan empat formula *microspheres* metformin hidroklorida-kitosan: (A) konsentrasi kitosan 750 mg pengadukan 2 jam; (B) konsentrasi kitosan 2250 mg pengadukan 2 jam; (C) konsentrasi kitosan 750 mg pengadukan 4 jam; (D) konsentrasi kitosan 2250 mg pengadukan 4 jam.

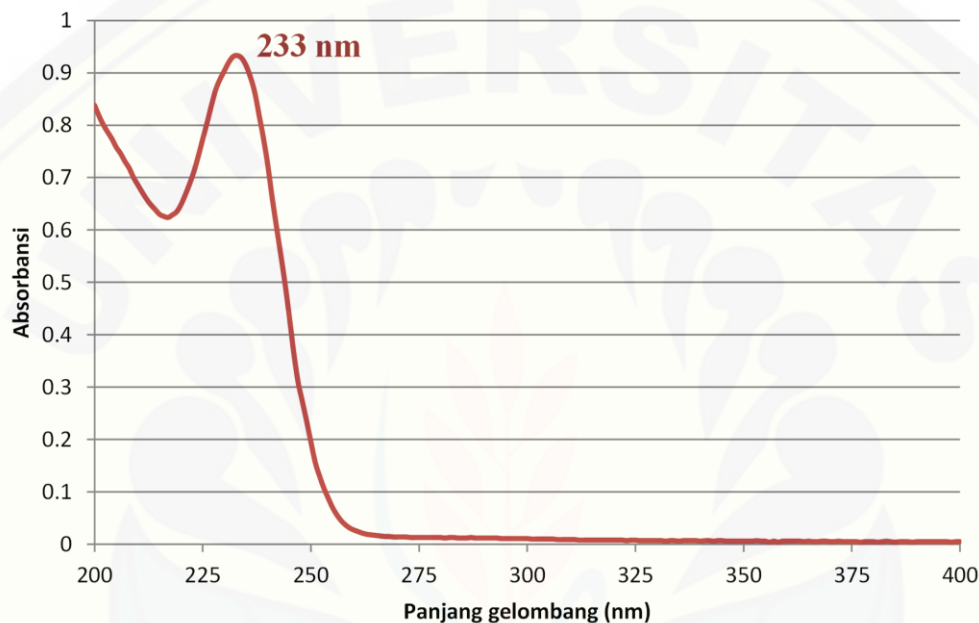
4.2 Hasil Penentuan Persen *Entrapment Efficiency*

4.2.1 Pembuatan Kurva Baku Metformin Hidroklorida

1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan mengukur serapan standar metformin hidroklorida konsentrasi 8 ppm dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 200-400 nm. Hasil pengukuran serapan metformin hidroklorida dalam *aquadest* menunjukkan adanya puncak yang memiliki absorbansi tertinggi yaitu

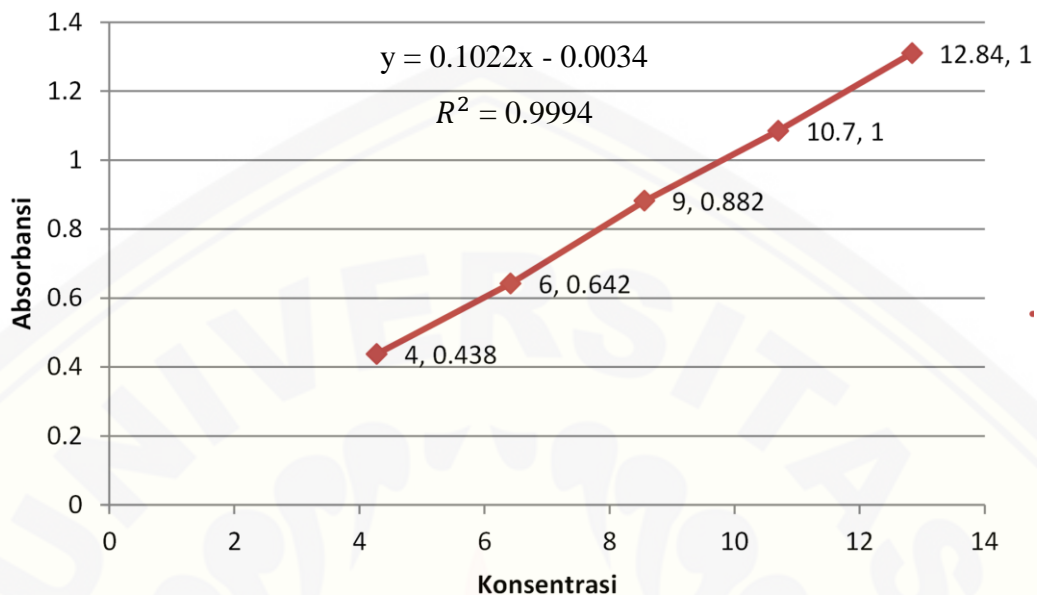
0,933 pada panjang gelombang 233 nm. Hal ini diperkuat dengan penelitian Pandit (2013) bahwa metformin hidroklorida memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 233 nm dengan menggunakan pelarut *aquadest*. Spektra pengukuran serapan metformin hidroklorida dalam *aquadest* dapat dilihat pada gambar 4.2 serta hasil selengkapnya dapat dilihat pada lampiran B.



Gambar 4.2 Spektra panjang gelombang metformin hidroklorida dalam *aquadest*

2) Pembuatan Kurva Baku Metformin Hidroklorida dalam *Aquadest*

Kurva baku metformin hidroklorida dibuat dengan mengukur serapan dari 5 larutan standar dengan kadar berbeda yang diperoleh dari pengenceran larutan induk 100 ppm. Masing-masing kadar ditentukan serapannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 233 nm. Diperoleh persamaan garis regresi linier dari kurva baku metformin hidroklorida dalam *aquadest* yaitu $y = 0,102x - 0,0034$ dengan $r = 0,999$. Kurva baku metformin hidroklorida dalam *aquadest* dapat dilihat dalam gambar 4.3.



Gambar 4.3 Kurva Baku metformin hidroklorida dalam *aquadest*

4.2.2 Perhitungan Persen *Entrapment Efficiency*

Penentuan formula optimum dilakukan menggunakan desain faktorial dengan dua faktor dan persen *entrapment efficiency* dipilih sebagai respon. Nilai persen *entrapment efficiency* masing-masing formula ditentukan menggunakan spektrofotometer UV sebanyak tiga kali replikasi sehingga didapat nilai persen *entrapment efficiency* dari 12 formula. Penentuan persen *entrapment efficiency microspheres* metformin hidroklorida dilakukan dengan membilas *microspheres* untuk menghilangkan metformin hidroklorida yang tidak terjerap dalam *microspheres* dengan bantuan *aquadest* kemudian mengukur jumlah metformin hidroklorida yang terjerap didalam *microspheres*. Metformin hidroklorida yang terjerap dapat dilihat dari serapan yang terukur dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum 233 nm dengan bantuan kurva standar.

Keberhasilan suatu preparasi *microspheres* bergantung pada penjerapan bahan aktif dalam suatu partikel *microspheres* atau disebut dengan nilai *entrapment*

efficiency. *Entrapment efficiency* yang dihasilkan tinggi maka jumlah obat yang terperap dalam partikel *microspheres* juga tinggi sehingga jumlah obat yang akan dilepaskan dalam tubuh juga besar dan dapat mencapai efek terapi yang diinginkan (O'Donnell and McGinity, 1997).

Nilai persen *entrapment efficiency microspheres* metformin hidroklorida dapat dilihat pada tabel 4.1. Pada formula 1 didapatkan nilai *entrapment efficiency* sebesar 70,600% dengan penggunaan kitosan pada *level* rendah yaitu 750 mg dan lama pengadukan pada *level* rendah selama 2 jam. Formula A dengan penggunaan kitosan pada *level* tinggi yaitu 2250 mg dan lama pengadukan *level* rendah selama 2 jam sehingga didapatkan nilai *entrapment efficiency* yang tinggi sebesar 81,191%. Formula B menggunakan kitosan *level* rendah yaitu 750 mg dengan lama pengadukan *level* tinggi yaitu 4 jam sehingga didapatkan nilai *entrapment efficiency* lebih rendah dibanding formula 1, A, dan AB sebesar 42,191%. Formula AB menggunakan kitosan *level* tinggi yaitu 2250 mg dan lama pengadukan *level* tinggi yaitu 4 jam menghasilkan nilai *entrapment efficiency* yang lebih rendah dibanding formula 1 dan A sebesar 66,241%. Formula yang memiliki persen *entrapment efficiency* paling tinggi adalah formula A, yaitu 81,191%.

Tabel 4.1 Hasil pengujian persen *entrapment efficiency*

No	Formula	Replikasi	Notasi Desain Faktorial			Persen <i>Entrapment Efficiency</i>	Rata-rata persen <i>Entrapment Efficiency</i> ±SD
			X_A	X_B	$X_A X_B$		
1	(1)	1	-1	-1	+1	71,724 %	70,600 ± 1,401 %
		2				71,057 %	
		3				69,018 %	
2	(A)	1	+1	-1	-1	81,066 %	81,191 ± 0,543 %
		2				80,722 %	
		3				81,786 %	
3	(B)	1	-1	+1	-1	46,150 %	42,191 ± 3,448 %
		2				40,048 %	
		3				40,317 %	
4	(AB)	1	+1	+1	+1	70,133 %	66,241 ± 4,338 %
		2				67,026 %	
		3				61,564 %	

4.3 Analisis Desain Faktorial dan Penentuan Daerah Optimum

Nilai persen *entrapment efficiency* yang diperoleh dimasukkan ke dalam *software design expert 9.0.4.1* versi *trial* dan digunakan untuk mendapatkan daerah optimum yang diinginkan. Daerah optimum diasumsikan sebagai daerah yang dapat memenuhi kriteria respon dan rentang *level* faktor dari analisis.

Berdasarkan hasil pengolahan data tersebut, diperoleh efek konsentrasi kitosan dan lama pengadukan *four blades propeller* serta interaksi keduanya yang dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Nilai efek faktor konsentrasi kitosan, lama pengadukan, dan interaksi keduanya

Efek Faktor	% <i>Entrapment Efficiency</i>
Konsentrasi Kitosan	17,33
Lama Pengadukan	-21,69
Interaksi	6,74

Berdasarkan data di atas, konsentrasi kitosan memberikan efek positif pada respon persen *entrapment efficiency*. Hal ini berarti semakin besar jumlah kitosan yang digunakan maka persen *entrapment efficiency* dari *microspheres metformin*

hidroklorida akan meningkat. Sebaliknya, lama pengadukan akan memberikan efek negatif yang berarti bahwa semakin lama pengadukan akan menyebabkan persen *entrapment efficiency microspheres* metformin hidroklorida akan menurun. Interaksi antara keduanya bernilai positif, namun besar efek interaksi antara keduanya memiliki pengaruh yang lebih kecil dibanding penggunaan kitosan terhadap persen *entrapment efficiency*.

Jumlah polimer kitosan yang digunakan dapat mempengaruhi nilai persen *entrapment efficiency* yang dihasilkan. Peningkatan jumlah polimer akan meningkatkan nilai persen *entrapment efficiency* karena jika jumlah polimer yang digunakan dalam preparasi tinggi maka akan meningkatkan kemampuan polimer melingkupi bahan aktif sehingga melindungi molekul bahan aktif yang akan berdifusi ke dalam fase eksternal. Hal ini akan meningkatkan jumlah obat yang terperap dalam partikel *microspheres* (Maji *et al.*, 2012, Premaletha *et al.*, 2012, and Ramachandran and Nandhakumar, 2011). Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Premaletha *et al.*, (2012) dalam preparasi *microspheres* antigen hepatitis B dengan polimer kitosan bahwa peningkatan jumlah kitosan yang digunakan meningkatkan nilai persen *entrapment efficiency*. Peningkatan jumlah polimer yang digunakan juga akan meningkatkan viskositas larutan sehingga akan berpengaruh pada ukuran partikel *microspheres* (Ramachandran and Nandhakumar, 2011 and Rathod *et al.*, 2012).

Lama pengadukan mempengaruhi nilai persen *entrapment efficiency* yang dihasilkan. Pengadukan yang terlalu singkat menyebabkan reaksi belum terjadi secara sempurna sehingga *microspheres* belum sepenuhnya terbentuk dan bahan aktif belum terperap sempurna dalam *microspheres*. Pengadukan yang dilakukan terlalu lama dapat menyebabkan penurunan terhadap persen *entrapment efficiency* dan ukuran partikel. Ukuran partikel akan menjadi lebih kecil sehingga obat yang terperap dalam *microspheres* hanya dalam jumlah yang kecil (Rathod *et al.*, 2012).

Hasil analisis data respon persen *entrapment efficiency* menggunakan *software design expert 9.0.4.1* versi *trial* menghasilkan persamaan umum desain

faktorial hubungan antara faktor dan respon yang sesuai dengan persamaan umum $Y = b_0 + b_a X_A + b_b X_B + b_{ab} X_A X_b$ sebagai berikut :

Final Equation in Terms of Coded Factors :

$$\text{Persen Entrapment Efficiency} = +65.05 + 8.67*A - 10.84*B + 3.37*AB \dots \dots \dots (5)$$

Final Equation in Terms of Actual Factors :

$$\text{Persen Entrapment Efficiency} = +100.47067 - 1.92400E-003*\text{Konsentrasi Kitosan} - 17.58342*\text{Lama Pengadukan} + 4.49256E-003*\text{Konsentrasi Kitosan} * \text{Lama Pengadukan} \dots \dots \dots (6)$$

Persamaan umum di atas digunakan untuk mencari nilai respon menggunakan faktor jumlah kitosan dan lama pengadukan yang diinginkan. Persamaan *coded factors* digunakan dalam bentuk notasi *level*, sedangkan persamaan *actual factors* digunakan dalam jumlah yang sebenarnya.

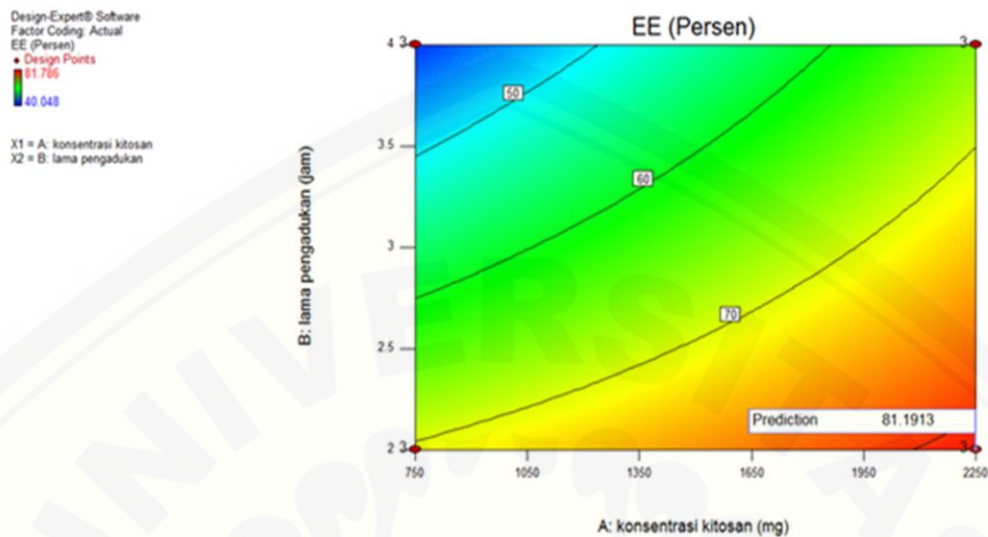
Desain faktorial juga dapat memberikan nilai signifikansi efek dari masing-masing faktor dan interaksinya terhadap respon persen *entrapment efficiency* yang dapat dilihat pada tabel ANOVA. Analisis varian menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan dan lama pengadukan mempunyai nilai $p < 0,05$ yang mengindikasikan bahwa faktor tersebut memberikan efek signifikan terhadap respon persen *entrapment efficiency*. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan konsentrasi kitosan dan lama pengadukan dapat mempengaruhi nilai persen *entrapment efficiency* secara signifikan. Hasil uji ANOVA menggunakan *software design expert 9.0.4.1* versi *trial* dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil ANOVA dari desain faktorial

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F Value</i>	<i>p-value Prob > F</i>	
<i>Model</i>	2448.53	3	816.18	98.96	< 0.0001	Significant
A-konsentrasi kitosan	901.04	1	901.04	109.25	< 0.0001	
B-lama pengadukan	1411.26	1	1411.26	171.16	< 0.0001	
AB	136.24	1	136.24	16.52	0.0036	
Pure Error	65.98	8	8.25			
<i>Cor Total</i>	2514.51	11				

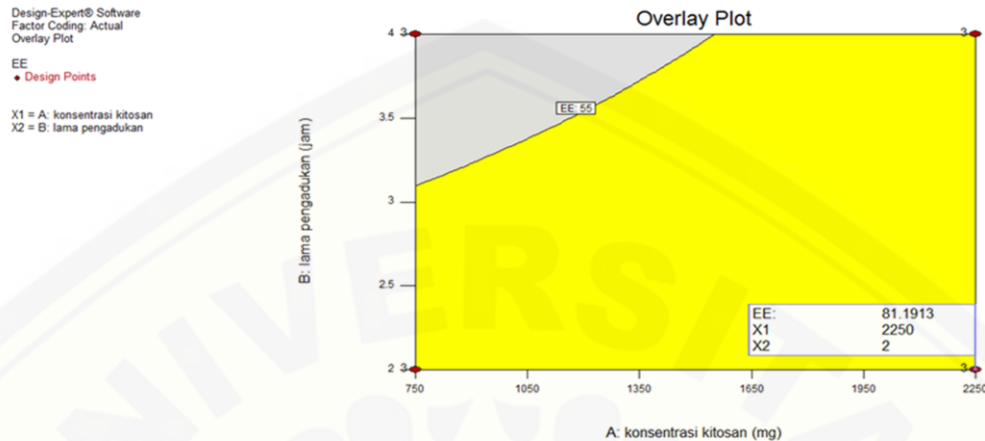
Gambar grafik juga dapat dihasilkan menggunakan *design expert 9.0.4.1* versi *trial* untuk menggambar *contour plot* dan *overlay plot*. Gambar grafik *contour plot* terhadap respon diwakili oleh beberapa warna. Gradien warna menunjukkan signifikansi efek terhadap respon yang diinginkan. Gradien warna ini dimulai dari warna biru gelap sampai warna merah.

Contour plot menggambarkan efek konsentrasi kitosan dan lama pengadukan terhadap persen *entrapment efficiency*. Daerah yang berwarna biru menunjukkan nilai persen *entrapment efficiency* terendah sedangkan daerah yang berwarna merah menunjukkan nilai persen *entrapment efficiency* tertinggi. Berdasarkan gambar 4.4, pada sumbu x terlihat bahwa semakin banyak jumlah kitosan yang digunakan dan semakin rendah lama pengadukan yang digunakan dalam preparasi maka akan meningkatkan nilai persen *entrapment efficiency*. Berbeda dengan sumbu y semakin besar lama pengadukan yang digunakan dan semakin rendah jumlah kitosan yang digunakan dalam preparasi akan menurunkan nilai persen *entrapment efficiency*. Grafik *contour plot* dari *microspheres* metformin hidroklorida-kitosan dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 *Contour plot* dari respon persen *entrapment efficiency*

Penentuan daerah optimum dilakukan dengan melihat *overlay plot* yang dihasilkan. Daerah optimum merupakan daerah yang memenuhi kriteria respon dan ditunjukkan oleh warna kuning. Daerah tersebut menunjukkan nilai konsentrasi kitosan dan lama pengadukan yang dapat memenuhi kriteria respon *entrapment efficiency*. Pada *overlay plot* dapat dibuat *flag* disembarang titik yang akan menampilkan jumlah kitosan dan lama pengadukan beserta respon yang dihasilkan pada titik tersebut. Grafik *overlay plot* dari *microspheres* metformin hidroklorida dapat dilihat pada gambar 4.5.



Gambar 4.5 *Overlay plot* dari respon persen *entrapment efficiency*

Penentuan satu formula optimum ditentukan berdasarkan prediksi persen *entrapment efficiency* yang paling tinggi dengan *desirability* mendekati satu. Kriteria konsentrasi kitosan dan lama pengadukan yang menjadi faktor diatur pada rentang *level* rendah sampai *level* tinggi, sedangkan respon persen *entrapment efficiency* diatur pada tingkat maksimum. Hal ini agar solusi yang ditawarkan memberikan prediksi persen *entrapment efficiency* yang paling tinggi. Hasil komputasi menunjukkan terdapat 7 solusi untuk mengoptimalkan kedua faktor berdasarkan nilai *desirability*. Solusi yang ditawarkan dapat dilihat pada tabel 4.4.

Tabel 4.4 Solusi yang ditawarkan oleh desain faktorial

umber	konsentrasi kitosan	lama pengadukan	EE	Desirability	
1	2250.000	2.000	81.191	0.986	Selected
2	2239.548	2.000	81.117	0.984	
3	2210.325	2.000	80.911	0.979	
4	2249.999	2.045	80.857	0.978	
5	2250.000	2.095	80.480	0.969	
6	2131.832	2.000	80.357	0.966	
7	2111.289	2.000	80.212	0.962	

Formula optimum yang dipilih berdasarkan solusi yang ditawarkan oleh desain faktorial yang memiliki nilai *desirability* paling tinggi yaitu 0,986 dan *entrapment efficiency* paling tinggi yaitu 81,191% dengan konsentrasi kitosan 2250 mg (*level* tinggi) dan lama pengadukan 2 jam (*level* rendah).

4.4 Karakterisasi *Microspheres* Metformin Hidroklorida-Kitosan Optimum

Satu formula optimum terpilih yang didapat dari *software design expert 9.0.4.1* versi *trial* dilakukan karakterisasi yang meliputi penentuan persen *drug loading*, persen *yield*, analisis FTIR, dan analisis SEM. Selain itu, dilakukan verifikasi terhadap persen *entrapment efficiency* dari satu formula optimum tersebut untuk menentukan apakah persen *entrapment efficiency* hasil percobaan sama dengan persen *entrapment efficiency* prediksi. Berdasarkan *software design expert 9.0.4.1* versi *trial* persen *entrapment efficiency* prediksi adalah sebesar 81,191%. Hasil verifikasi persen *entrapment efficiency* dari satu formula optimum didapat nilai sebesar $81,243\% \pm 0,752$. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa formula optimum terpilih memiliki persen *entrapment efficiency* mendekati nilai yang diprediksi.

4.4.1 Perhitungan *Drug loading*

Drug loading merupakan suatu karakterisasi *microspheres* yang menunjukkan seberapa efisien formula yang digunakan. Persen *drug loading* didapatkan dari nilai persen *entrapment efficiency* dikalikan dengan berat *microspheres* yang ditimbang dibagi dengan berat *microspheres*. Nilai persen *drug loading* pada formula optimum didapatkan sebesar $22,673\% \pm 0,523$ dan untuk hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil perhitungan persen *drug loading*

Formula	Replikasi	% <i>Entrapment efficiency</i>	% <i>Drug Loading</i>	Rata-rata % <i>Drug Loading</i> ± SD
(A)	1	81,830 %	23,211 %	22,673 % ±
	2	81,504 %	22,643 %	0,523
	3	80,396 %	22,166 %	

Faktor yang mempengaruhi nilai persen *drug loading* adalah tipe dari polimer dan viskositas dari larutan (Cetin *et al.*, 2013). Penelitian yang dilakukan oleh Bansode *et al.*, (2012) menunjukkan bahwa peningkatan jumlah polimer yang digunakan dapat meningkatkan nilai persen *entrapment efficiency* dan *yield* namun dapat menurunkan nilai persen *drug loading*.

4.4.2 Perhitungan *Yield*

Yield menunjukkan seberapa efisien metode yang digunakan untuk mendapatkan jumlah *microspheres* yang maksimal, sehingga membantu menentukan metode pembuatan *microspheres* yang tepat (Sappidi *et al.*, 2014). *Yield* didapatkan dari berat *microspheres* setelah pengeringan. *Yield* pada formula optimum yang didapatkan adalah sebesar 89,602% ± 1,314. Hasil perhitungan *yield* selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.6.

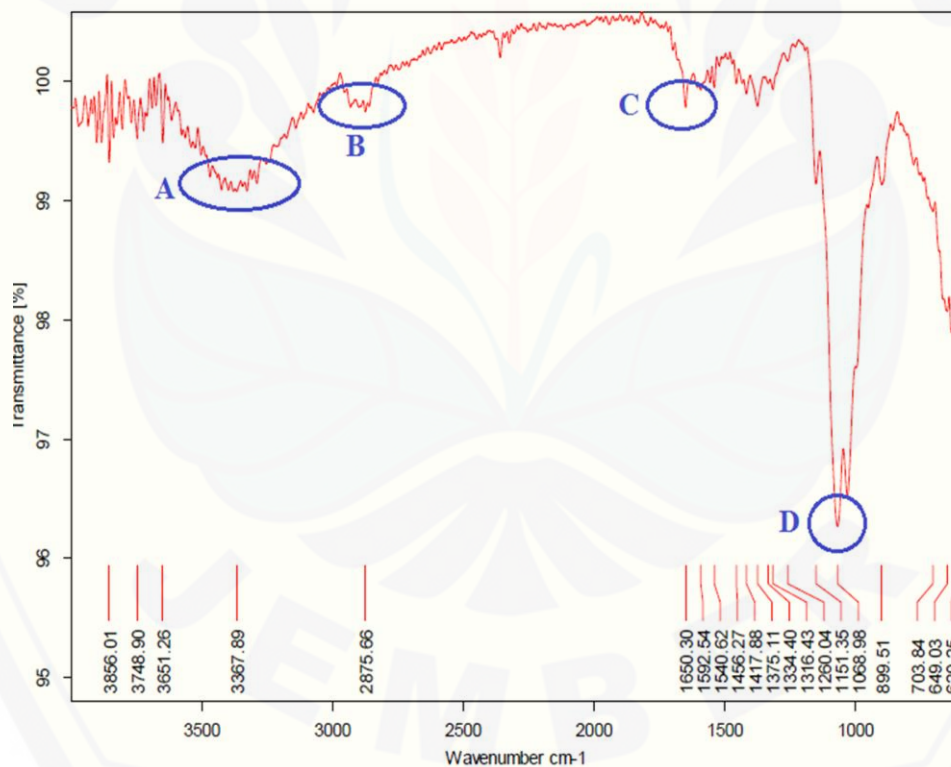
Tabel 4.6 Hasil perhitungan persen *yield*

Formula	Replikasi	Berat <i>microspheres</i> didapat	Berat <i>microspheres</i> teoritis	Persen <i>yield</i>	Rata-rata persen <i>yield</i> ± SD
(A)	1	2,6441 gram	3,0000 gram	88,137 %	89,602
	2	2,7000 gram	3,0001 gram	89,997 %	% ±
	3	2,7202 gram	3,0000 gram	90,673 %	1,314

Hal ini menunjukkan bahwa jumlah *microspheres* dengan metode *non aqueous solvent evaporation* menghasilkan jumlah *microspheres* yang maksimal hampir mendekati 100%.

4.4.3 Analisis *Fourier Transform Infrared* (FT-IR)

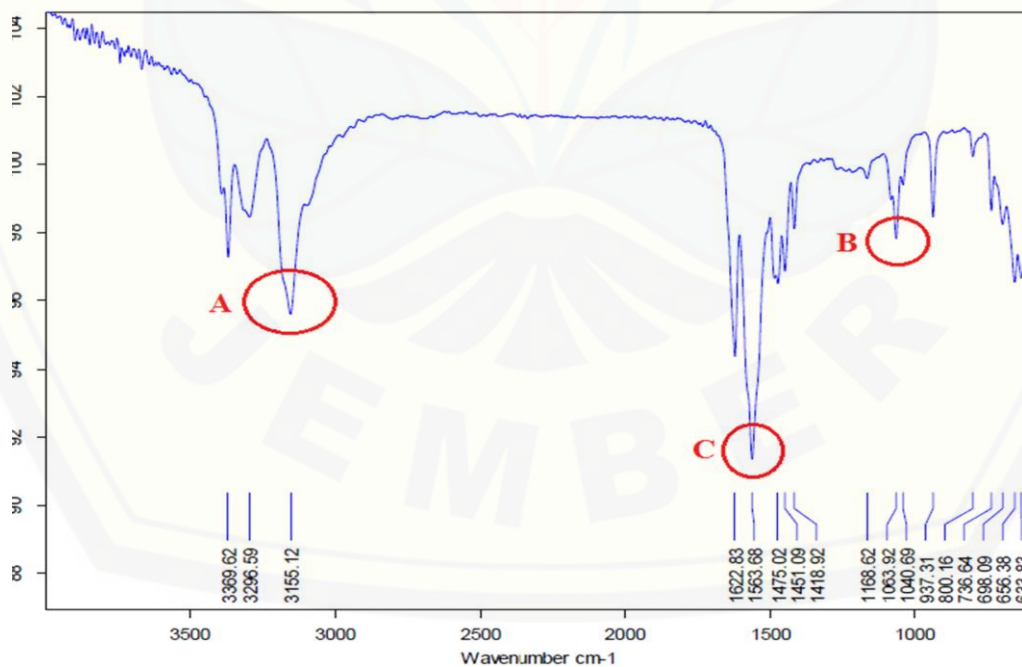
Studi kompatibilitas antara obat dan polimer ditentukan dengan menggunakan studi FT-IR untuk mengetahui apakah terdapat kemungkinan interaksi antara obat dan polimer dalam formulasi. Spektra FT-IR dari metformin hidroklorida dan kitosan diukur pada panjang gelombang 4000-500 cm^{-1} . Hasil FT-IR dari kitosan murni dapat dilihat pada gambar 4.6.



Gambar 4.6 Spektra FT-IR kitosan

Berdasarkan spektra kitosan pada gambar 4.6, pada bagian A terlihat adanya serapan pada bilangan gelombang 3367 cm^{-1} yang menandakan adanya gugus O-H dari kitosan. Gugus hidroksi memiliki daerah bilangan gelombang antara $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$. Selain itu, juga terdapat serapan pada bilangan gelombang 2875 cm^{-1} yang menandakan adanya gugus C-H pada daerah bilangan gelombang $3000\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$ yang ditunjukkan pada bagian B. Bilangan gelombang 1650 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus N-H yang ditunjukkan oleh bagian C. Bilangan gelombang 1068 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C-O yang ditunjukkan oleh bagian D. Hal ini sesuai dengan analisis spektra kitosan yang dilakukan oleh Kumari *and* Rani (2011).

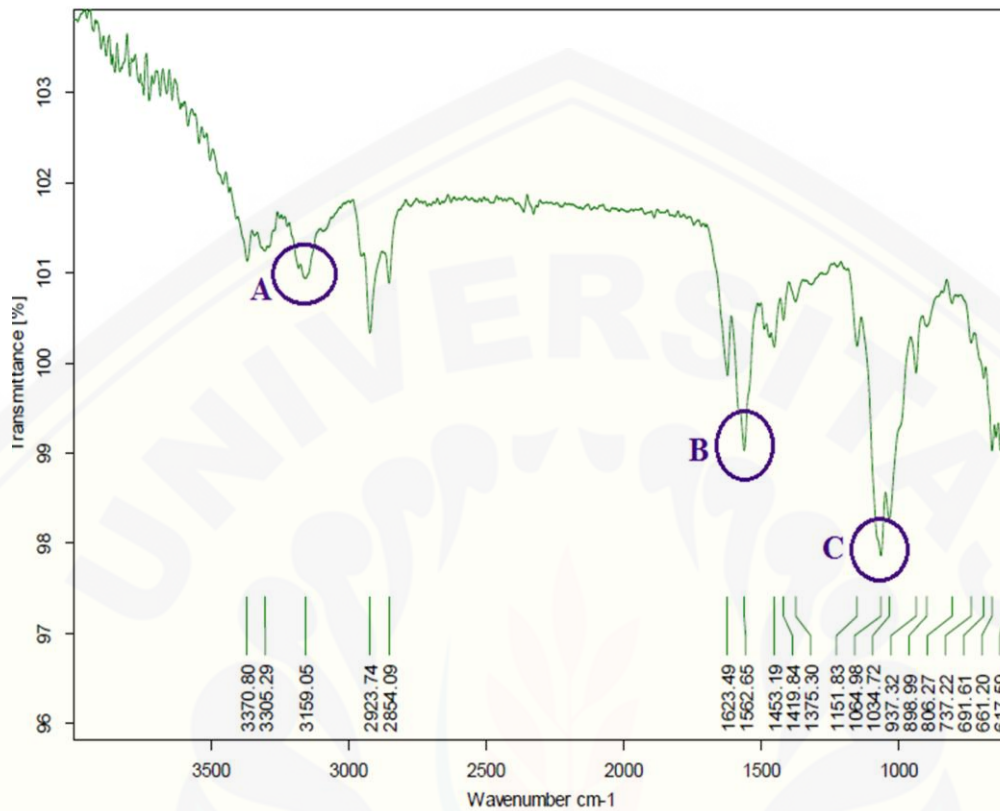
Selain mengenai serapan spesifik kitosan, serapan spesifik pada metformin hidroklorida juga perlu diketahui untuk menentukan apakah muncul gugus spesifik atau terjadi pergeseran bilangan gelombang pada spektra FT-IR *microspheres* metformin hidroklorida. Hasil FT-IR metformin hidroklorida dapat dilihat pada gambar 4.7.



Gambar 4.7 Spektra FT-IR metformin hidroklorida

Spektra FT-IR metformin hidroklorida (gambar 4.7) menunjukkan adanya puncak khas pada bilangan gelombang 3155 cm^{-1} yang menandakan adanya gugus N-H yaitu amina primer yang ditunjukkan pada bagian A. Pada bilangan gelombang 1063 cm^{-1} yang menandakan adanya gugus C-N yang ditunjukkan pada bagian B. Bilangan gelombang 1563 cm^{-1} yang menandakan adanya gugus N-H tekuk dari amina primer ditunjukkan pada bagian C. Hal ini sesuai dengan spektra metformin hidroklorida yang ditunjukkan oleh Maji *et al.* (2012).

Hasil analisis spektra FT-IR *microspheres* metformin hidroklorida-kitosan (Gambar 4.8) menunjukkan adanya puncak yang sama pada metformin hidroklorida yaitu N-H, C-N, dan N-H tekuk pada bilangan gelombang 3159 cm^{-1} , 1064 cm^{-1} , dan 1562 cm^{-1} (Maji *et al.*, 2012). Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada interaksi yang terbentuk pada kompleks *microspheres* metformin hidroklorida antara obat dan polimer sehingga tidak mengganggu gugus farmakofor dari metformin hidroklorida. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Maji *et al.* (2012) menyebutkan bahwa *microspheres* metformin hidroklorida dengan metode *non aqueous solvent evaporation* menunjukkan tidak adanya interaksi yang terbentuk antara obat dan polimer yang digunakan. Hasil analisis spektra *microspheres* metformin hidroklorida-kitosan dapat dilihat pada gambar 4.8.



Gambar 4.8 Spektra FT-IR *microspheres* metformin hidroklorida-kitosan

4.4.4. Analisis *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Ukuran partikel sangat berpengaruh pada bioavailabilitas obat secara *in vivo*. dalam hati, jantung, paru-paru, dan sumsum tulang belakang sehingga memiliki waktu tinggal yang lama dalam sirkulasi darah (Tyaboonchai, 2003).

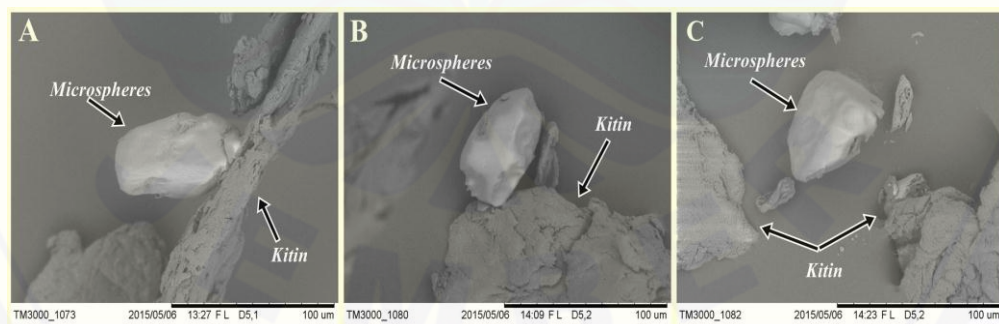
Penentuan ukuran partikel dan morfologi *microspheres* metformin hidroklorida-kitosan dilakukan dengan menggunakan *scanning electron microscopy* (SEM) dengan tegangan 20 kV dan tekanan *chamber* 0,1 mmHg perbesaran 800 kali. Untuk mengukur ukuran partikel dilakukan dengan mengambil 50 partikel secara acak dan ditentukan ukuran partikel *microspheres* (Sabitha *et al.*, 2010). Hasil pengukuran ukuran partikel ditunjukkan pada tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil penentuan ukuran partikel *microspheres* metformin hidroklorida-kitosan

Formula	Replikasi	Ukuran partikel (μm)	Rata-rata ukuran partikel \pm SD (μm)
(A)	1	650	$653,333 \pm 3,055$
	2	654	
	3	656	

Microspheres metformin hidroklorida-kitosan memiliki ukuran sebesar $653,333 \mu\text{m}$. Nilai ini memenuhi persyaratan rentang *microspheres* yaitu antara 1-1000 μm . Ukuran partikel yang terbentuk dipengaruhi oleh banyaknya kitosan yang digunakan. Semakin besar konsentrasi kitosan yang digunakan akan memperbesar ukuran partikel *microspheres* yang terbentuk. Pada formula optimum yang terpilih, jumlah kitosan yang digunakan adalah pada *level* tinggi yaitu 2250 mg sehingga ukuran *microspheres* yang terbentuk besar.

Selain untuk mengukur ukuran partikel, *scanning electron microscopy* (SEM) juga dapat mengidentifikasi permukaan dan bentuk *microspheres* yang ditampilkan melalui sebuah gambar. Morfologi *microspheres* dapat dilihat pada gambar 4.9.



Gambar 4.9 Hasil morfologi partikel menggunakan SEM: (A) *microspheres* formula A pada replikasi 1; (B) *microspheres* formula A pada replikasi 2; (C) *microspheres* formula A pada replikasi 3

Berdasarkan hasil pengamatan diperoleh bentuk hampir sferis dengan permukaan halus dan berwarna lebih cerah. Pada gambar juga terdapat patikel lain yang teridentifikasi yaitu kitin yang berasal dari polimer kitosan. Kitosan berasal dari deasetilasi kitin yang didapatkan dari cangkang hewan *crustacea* seperti kepiting, udang, atau lobster (Sinha *et al.*, 2004). Kitin masih memungkinkan terdapat pada kitosan karena proses deasetilasi kitosan berkisar 80-85% (Kumari *and* Rani, 2011).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan dan lama pengadukan menggunakan bantuan *four blades propeller* terbukti memiliki efek yang cukup besar terhadap persen *entrapment efficiency microspheres* metformin hidroklorida yang dihasilkan. Kombinasi optimum antara konsentrasi kitosan dan lama pengadukan *four blades propeller* untuk memperoleh nilai persen *entrapment efficiency* yang maksimum yaitu 81,191% masing-masing adalah 2250 mg dan 2 jam. Keberhasilan metode pembuatan *microspheres* yaitu *non aqueous solvent evaporation* terlihat dari hasil karakterisasi *microspheres* yang memenuhi spesifikasi *microspheres* yang baik yaitu efisiensi penyerapan sebesar 81,243% dengan *drug loading* yang dihasilkan sebesar 22,673% dan *yield* sebesar 89,602%. Kisaran ukuran yang didapatkan sebesar 653,333 μm . Analisis FT-IR *microspheres* metformin hidroklorida menunjukkan bahwa tidak adanya interaksi yang terjadi antara metformin hidroklorida dengan kitosan dalam kompleks *microspheres* yang ditunjukkan dengan adanya 3 serapan khas dari metformin hidroklorida.

Hal tersebut menunjukkan bahwa formula optimum mampu memberikan hasil penyerapan yang optimum sehingga dapat digunakan sebagai salah satu alternatif formulasi metformin hidroklorida (Semalty, 2014).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan :

1. Konsentrasi kitosan memiliki pengaruh meningkatkan persen *entrapment efficiency*, sedangkan lama pengadukan memiliki pengaruh menurunkan persen *entrapment efficiency*. Interaksi antara kedua faktor tersebut memiliki efek meingkatkan persen *entrapment efficiency*.
2. Kombinasi optimum antara konsentrasi kitosan dan lama pengadukan untuk memperoleh persen *entrapment efficiency* tertinggi adalah 2250 mg dan 2 jam.
3. Karakteristik kompleks pada formula optimum *microspheres* metformin hidroklorida-kitosan ditunjukkan dengan tidak adanya interaksi yang terjadi dan muncul serapan khas dari metformin hidroklorida.
4. *Microspheres* metformin hidroklorida-kitosan yang terbentuk memiliki persen *drug loading* sebesar 22,673%, persen *yield* sebesar 89,602%, dan ukuran partikel sebesar 653,333 mikrometer.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan :

1. Perlu dilakukan uji disolusi dan uji bioavailabilitas untuk mengetahui profil pelepasan, profil bioavailabilitas *microspheres* metformin hidroklorida.
2. Perlu dilakukan uji stabilitas untuk menjamin mutu sediaan *microspheres*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ami, M., Hejal, P., & Yogi, P. (2012). Advancements in Controlled Release Gastroretentive Drug Delivery System : A Review. *J. Drug Deliv. Therap.*, 2(3), 12–21.
- Anonim. (2009). *British National Formulary 58*. London: BMJ Group and RPS.
- Bansode, S. D., Kasture, V. S., Pawar, S. S., & Kasture, S. B. (2012). Formulation and Evaluation of Telmisartan Microspheres by Emulsion Solvent Evaporation Technique. *J. App. Pharm. Sci.*, 2(10), 113–116. doi:10.7324/JAPS.2012.21022
- Bolton, S., & Bon, C. (2004). *Pharmaceutical Statistics Practical and Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker.
- Cetin, M., Atila, A., Sahin, S., & Vural, I. (2013). Preparation and Characterization of Metformin. *Pharm. Develop. Tech.*, 18(June 2011), 570–576. doi:10.3109/10837450.2011.604783
- Choudhury, P. K., & Kar, M. (2009). Controlled Release Metformin Hydrochloride Microspheres of Ethyl Cellulose Prepared by Different Methods and Study on The Polymer Affected Parameters. *J. Microenc.*, 26(1), 46–53. doi:10.1080/02652040802130503
- Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., & Posey, L. M. (2008). *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*.
- Dubey, M., Kesharwani, P., Tiwari, A., Chandel, R., Raja, K., & Sivakumar, T. (2012). Formulation and Evaluation of Floating Microsphere Containing Anti Diabetic Drug. *Int. J. Pharm. Chem. Sci.*, 1(3), 1387–1396.
- Freiberg, S., & Zhu, X. X. (2004). Polymer Microspheres for Controlled Drug Release. *Int. J. Pharm.*, 282(1-2), 1–18. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.04.013
- Garud, N., & Garud, A. (2012). Preparation and In-vitro Evaluation of Metformin Microspheres Using Non-Aqueous Solvent. *Topic. J. Pharm. Res. August*, 11(May), 577–583.

- Ghodake, J. D., Vidhate, J. S., Shinde, D. A., & Kadam, A. N. (2010). Formulation and Evaluation of Floating Microspheres Containing Anti-diabetic (Metformin Hydrochloride) Drug, *2*(1), 378–384.
- Hejazi, R., & Amiji, M. (2003). Chitosan-Based Gastrointestinal Delivery Systems. *J. Contr. Rel.*, *89*, 151–165.
- Herrmann, J., & Bodmeier, R. (1998). Biodegradable, Somatostatin Acetate Containing Microspheres Prepared by Various Aqueous and Non-Aqueous Solvent Evaporation Methods. *Europ. J. Pharm. Biopharm.: Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, *45*(1), 75–82. doi:10.1016/S0939-6411(97)00125-2
- Hes, P., Davis, S. S., & Illum, L. (1999). Sustained Release Chitosan Microspheres Prepared by Novel Spray Drying Methods. *J. Microenc.*, *16*(3), 343–355.
- Hire, & Derle. (2014). Microsphere as Drug Carrier: A Review. *Int. J. Adv. Res.*, *2*(3), 901–913.
- Kencana A. (2009). Perlakuan Sonikasi Terhadap Kitosan: Viskositas dan Bobot Molekul Kitosan. Skripsi. Bogor Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Kumari, K., & Rani, U. (2011). Controlled Release of Metformin Hydrochloride Through Crosslinked Blends of Chitosan-Starch. *Adv. App. Sci. Res.*, *2*(2), 48–54.
- Maji, R., Ray, S., Das, B., & Nayak, A. K. (2012). HCl by Emulsification-Solvent Evaporation Technique : Effect of Formulation Variables. *Int. Schol. Res. Net.*, *2012*. doi:10.5402/2012/801827
- Mandal, U., Gowda, V., Ghosh, A., Selvan, S., Solomon, S., & Kumar, T. (2007). Formulation and Optimization of Sustained Release Matrix Tablet of Metformin HCl 500 mg Using Response Surface Methodology. *The Pharm. Soc. Japan*, *127*(8), 1281–1290.
- Naik, J. B., Lokhande, A. B., Mishra, S., & Kulkarni, R. D. (2012). Development of Sustained Release Micro/Nano Particles Using Different Solvent Emulsification Techniques : A Review. *Int. J. Pharma and Bio Scie.*, *3*(4), 573–590.
- Narang, N. (2011). An Updated Review On : Floating Drug Delivery System (FDDS). *Int. J. App. Pharm.*, *3*(1), 7.

- O'Donnell, P. B., & McGinity, J. W. (1997). Preparation of Microspheres by The Solvent Evaporation Technique. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 28(1), 25–42. doi:10.1016/S0169-409X(97)00049-5
- Pandit, V., Pai, R. S., Yadav, V., Devi, K., Surekha, B. B., Inamdar, M. N., & Suresh, S. (2013). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of Floating Microspheres of Metformin Hydrochloride. *Drug Develop. Ind. Pharm.*, 39(1), 117–27. doi:10.3109/03639045.2012.662503
- Patel, A., Ray, S., & Thakur, R. A. M. S. (2006). Invitro Evaluation and Optimization of Controlled Release Floating Drug Delivery System Of Metformin Hydrochloride. *Daru*, 14(2), 57–64.
- Premaletha, K., Licy, C. D., Jose, S., Saraladevi, A., Shirwaikar, A., & Shirwaikar, A. (2012). Formulation , Characterization and Optimization of Hepatitis B Surface Antigen (Hbsag) -Loaded Chitosan Microspheres for Oral Delivery. *Pharm. Develop. Tech.*, 17(April 2010), 251–258. doi:10.3109/10837450.2010.535824
- Ramachandran, S., & Nandhakumar, S. (2011). Formulation and Characterization of Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Biodegradable Microspheres Loaded with Famotidine. *Trop. J. Pharm. Res.*, 10(September 2010), 309–316. doi:10.4314/tjpr.v10i3.13
- Rathod, U. C., Patel, A. K., & Shah, D. A. (2012). Statistical Evaluation and Optimization of Influence of Stirring Speed and Polymer Concentration on Hollow Microspheres of Diltiazem HCl. *Schol. Res. Lib.*, 4(3), 972–978.
- Rowe, R.C., Patel, A. K., & Quinn, M.E. eds., (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipient ed., London: Pharm. Press. AMer. Pharm. Ass.
- S, S., Sutar, Sambrekar, Patil, & Kudalagi. (2012). Formulation and Evaluation Of Metformin Hydrochloride Loaded Chitosan Microspheres. *J. Pharm. Sci. Innov.*, 1(April), 12–16.
- Sabitha, P., Ratna, J. V., & Reddy, K. R. (2010). Design And Evaluation Of Controlled Release Chitosan-Calcium Alginate Microcapsules Of Anti Tubercular Drugs For Oral Use. *Int. J. Chemt. Res.*, 2(1), 88–98.
- Sappidi, S., Thadkala, K., Kota, J., & Aukunuru, J. (2014). Preparation and Characterization of Ethyl Cellulose Microspheres Encapsulating Metformin Hydrochloride and Glipizide. *Schol. Res. Lib.*, 6(4), 213–226.

- Semalty, A. (2014). Preparation and Evaluation of Chitosan Microsphere of Metformin Hydrochloride and to Study the Effect of Drug to Polymer Ratio. *Int. J. Pharm. Chem. Sci.*, 3(2), 316–320.
- Setter, S. M., Iltz, J. L., Thams, J., & Campbell, R. K. (2003). Metformin Hydrochloride in The Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Review With a Focus on Dual Therapy. *Clinic. Therap.*, 25(12), 2991–3026. doi:10.1016/S0149-2918(03)90089-0
- Sinha, V. R., Singla, a K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., & Dhawan, S. (2004). Chitosan Microspheres as A Potential Carrier for Drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 274(1-2), 1–33. doi:10.1016/j.ijpharm.2003.12.026
- Sweetman, S. C. (2009). *Martindale Thirty-sixth edition*. USA: Pharmaceutical Press.
- Tiyaboonchai, W. (2003). Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Nares. Univ. J.*, 11(3):51-66.
- Varde, N. K., & Pack, D. W. (2006). Microspheres for Controlled Release Drug Delivery. *Ashley Public.*, 35–51.
- Vasir, J. K., Tambwekar, K., & Garg, S. (2003). Bioadhesive Microspheres as A Controlled Drug Delivery System. *Int. J. Pharm.*, 255(1-2), 13–32. doi:10.1016/S0378-5173(03)00087-5.
- Voight, R. (1995). *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta: Gajdah Mada University Press.
- Wise, D.L. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, New York : Marcel Dekker, Inc.
- Yadav, A., & Jain, D. K. (2011). Formulation and Evaluation of Gastroretentive Floating Microballoons of Anti diabetic drug. *Asian J. Pharm. Life Sci.*, 1(2), 101–112.
- Yadav, N., Mohite, D. D., Pawar, K. R., Pawar, U.R., Bhise, S. B., & Sande, T. A. (2011). Synthesis and Characterization of Sustained Release Atenolo Microspheres by Solvent Evaporation Technique. *J. Pharm. Sci. Tech.*, 3(2), 559-562.

Zimmer, A., & Kreuter, J. (1995). Microspheres and Nanoparticles Used in Ocular Delivery Systems. *Advan. Drug Deliv. Rev.*, 16(1), 61–73. doi:10.1016/0169-409X(95)00017-2



LAMPIRAN

A. Certificate Of Analysis

HILDOSE		
SHIVAM CHAMBERS, 106/108, 1 ST FLOOR, S.V. ROAD, GOREGAON (WEST), MUMBAI-400062 • TEL NOS.91-22-26764099 / 26764172 / 73 • FAX NO. 91-22-26764054		
DATE :- 08/07/2013	ISO:9001-2008 CERTIFIED	E/Q/02 ISSUE NO.:- 01
CERTIFICATE OF ANALYSIS		
ITEM : METFORMIN HCL BP (PARTICLE SIZE :- 100 MESH) ✓ MFG. DT. : JUNE 2013 EXP. DT. : MAY 2018 ✓ BATCH QTY. : 950 KGS. BATCH NO. : H 0427 06 13-14 ✓		
Test	Specifications	Results
Description	White or almost white crystals.	White crystals
Solubility	Freely soluble in water, slightly soluble in alcohol, practically insoluble in acetone and in methylene chloride	Freely soluble in water, slightly soluble in alcohol, practically insoluble in acetone and in methylene chloride ✓
Identification	A. MP:- 222°C to 226°C B. IR- complies with Metformin Hydrochloride RS C. TLC- The principal spot in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position, color and size to the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution. D. A Pink color develops E. Chloride:- It gives reaction of chlorides	MP:- 223.9°C ✓ Complies with Metformin Hydrochloride RS The principal spot in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position, color and size to the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution. A Pink color develops Chloride:- It gives reaction of chlorides
Appearance of solution	Solution S is clear and colorless.	Solution S is clear and colorless.
Related substances by HPLC	Impurity- A NMT 0.02% Any other impurity NMT 0.1% Total impurity NMT 0.3%	0.006% 0.053% 0.087%
Heavy metals	NMT 10 ppm	< 10 ppm
Sulphated Ash	NMT 0.1% w/w	0.03%
Loss on drying	NMT 0.5% w/w	0.24% ✓
Assay	Metformin Hydrochloride contains not less than 98.5% & not more than 101% of C ₄ H ₁₁ N ₅ .HCL, calculated with reference to the dried substance	Metformin Hydrochloride contains 99.93% of C ₄ H ₁₁ N ₅ .HCL, calculated with reference to the dried substance ✓
Particle size	NLT 95% passing through 100 mesh sieve	98.33% passing through 100 mesh sieve
NOTE : THE ABOVE PRODUCT IS CONFORMING TO THE SPECIFIED LIMITS MENTIONED ABOVE.		
PREPARED BY :-		CHECKED BY :-
		

B. Kitosan

CHITOSAN – PHARMACEUTICAL GRADE	
Items	Specifications
Colour	: White
Degree of Deacetylation (%)	: 90.2
Viscosity (cps)	: 119.5
Moisture content (%)	: ≤ 8
Ash content (%)	: 0.72
PH	: 7-8
Insolubles	: <1%
Protein content	: <0.2%
Total plate count	: <1000 cfu/g
Yeast and Mold	: <40 cfu/g
Pathogenic bacteria	: Absent
Arsenic (As)	: <0.1 mg/kg
Lead (Pb)	: <0.3 mg/kg
Mercury (Hg)	: <0.1 mg/kg
Particle size	: Fine powder
Source	: Crab shell

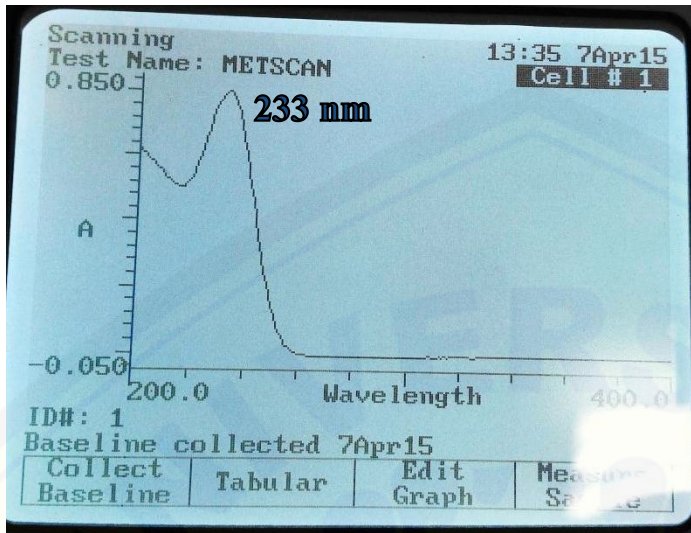
C. Scanning Panjang Gelombang Metformin Hidroklorida

Panjang gelombang	Absorbansi	Panjang gelombang	Absorbansi
200	0,838	225	0,774
201	0,818	226	0,805
202	0,801	227	0,838
203	0,787	228	0,868
204	0,774	229	0,888
205	0,758	230	0,904
206	0,746	231	0,920
207	0,731	232	0,931
208	0,718	233	0,933
209	0,700	234	0,928
210	0,686	235	0,914
211	0,672	236	0,892
212	0,659	237	0,863
213	0,648	238	0,820
214	0,639	239	0,776
215	0,630	240	0,725
216	0,626	241	0,664
217	0,624	242	0,608
218	0,629	243	0,554
219	0,635	244	0,498
220	0,649	245	0,435
221	0,668	246	0,367
222	0,689	247	0,311
223	0,713	248	0,273
224	0,742	249	0,235

Panjang gelombang	Absorbansi	Panjang gelombang	Absorbansi
250	0,195	276	0,013
251	0,156	278	0,013
252	0,130	279	0,013
253	0,107	280	0,013
254	0,088	281	0,012
255	0,070	282	0,013
256	0,056	283	0,013
257	0,045	284	0,012
258	0,037	285	0,012
259	0,031	286	0,012
260	0,027	287	0,013
261	0,024	288	0,012
262	0,021	289	0,012
263	0,019	290	0,012
264	0,018	291	0,012
265	0,017	292	0,012
266	0,016	293	0,012
267	0,015	294	0,011
268	0,015	295	0,011
269	0,014	296	0,011
270	0,014	297	0,011
271	0,014	298	0,011
272	0,014	299	0,011
273	0,013	300	0,011
274	0,013	301	0,010
275	0,013	302	0,010

Panjang gelombang	Absorbansi	Panjang gelombang	Absorbansi
303	0,010	329	0,007
304	0,010	330	0,007
305	0,010	331	0,007
306	0,010	332	0,006
307	0,009	333	0,007
308	0,009	334	0,007
309	0,009	335	0,006
310	0,009	336	0,007
311	0,009	337	0,007
312	0,008	338	0,007
313	0,008	339	0,007
314	0,008	340	0,006
315	0,008	341	0,007
316	0,008	342	0,007
317	0,008	343	0,006
318	0,008	344	0,007
319	0,008	345	0,007
320	0,008	346	0,006
321	0,008	347	0,006
322	0,008	348	0,006
323	0,007	349	0,006
324	0,008	350	0,006
325	0,008	351	0,006
326	0,007	352	0,006
327	0,007	353	0,007
328	0,007	354	0,006

Panjang gelombang	Absorbansi	Panjang gelombang	Absorbansi
355	0,006	381	0,004
356	0,004	382	0,005
357	0,006	383	0,006
358	0,004	384	0,005
359	0,006	385	0,004
360	0,006	386	0,005
361	0,006	387	0,005
362	0,006	388	0,005
363	0,006	389	0,004
364	0,005	390	0,005
365	0,006	391	0,005
366	0,005	392	0,005
367	0,005	393	0,005
368	0,006	394	0,005
369	0,006	395	0,005
370	0,005	396	0,005
371	0,005	397	0,005
372	0,006	398	0,004
373	0,005	399	0,005
374	0,005	400	0,005
375	0,005		
376	0,005		
377	0,004		
378	0,005		
379	0,005		
380	0,005		

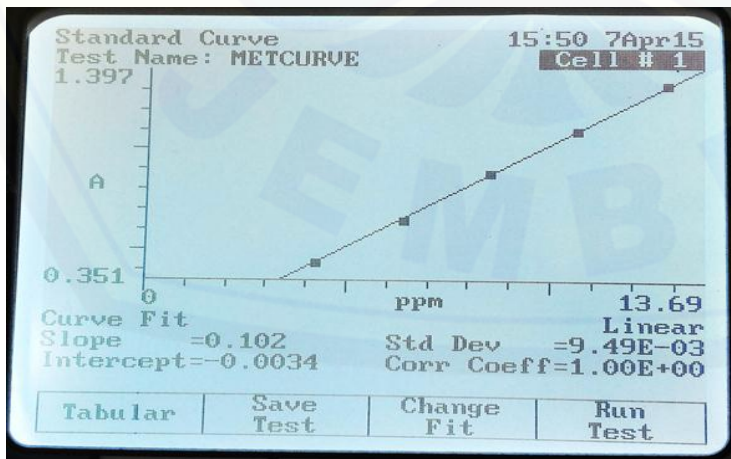


D. Kurva Baku Metformin Hidroklorida dalam Aquadest

Konsentrasi standar (ppm)	Absorbansi
4,280	0,438
6,420	0,642
8,560	0,882
10,70	1,085
12,84	1,310

Nilai a= - 0,0034, b= 0,102 dan r= 0,999

Persamaan Regresi Kurva Baku : $y = 0,102x - 0,0034$



E. Hasil Perhitungan Persen *Entrapment Efficiency*

Formula	Replikasi	Serapan	Kadar (ppm)	Persen <i>Entrapment efficiency</i>	Rata-rata \pm SD
(A)	1	0,698	6,863	81,830 %	81,243
	2	0,676	6,648	81,504 %	% \pm
	3	0,663	6,521	80,396 %	0,752

F. Contoh Perhitungan Persen *Entrapment Efficiency*

- Diketahui : Kadar yang didapatkan = 5,621

Berat microspheres yang didapatkan = 2,6744 gram

- Menimbang microspheres setara dengan 50 mg metformin hidroklorida

$$\frac{\text{berat metformin HCl yang ditimbang}}{0,05 \text{ gram}} = \frac{\text{berat microspheres yang didapatkan}}{x}$$

$$\frac{0,7501 \text{ gram}}{0,05 \text{ gram}} = \frac{2,6744 \text{ gram}}{x}$$

$$X = 0,1783 \text{ gram}$$

- Menimbang : 0,1786 gram

$$\frac{0,7501 \text{ gram}}{x} = \frac{2,6744 \text{ gram}}{0,1786 \text{ gram}}$$

$$X = 0,050092678 \text{ gram}$$

$$= 500,9267473 \text{ ppm (kadar dalam labu 100ml)}$$

- Kadar yang terdapat dalam labu 25 ml

$$\frac{0,4 \text{ ml}}{25 \text{ ml}} \times 500,9267473 = 8,0148285697 \text{ ppm}$$

- % *Entrapment efficiency*

$$\frac{5,621}{8,0148285697} \times 100 \% = 70,133 \%$$

G. Hasil Analisis Desain Faktorial

G.1 Kekuatan Faktor dari Desain Faktorial

Power is reported at a 5.0% alpha level to detect the specified signal/noise ratio.

Recommended power is at least 80%.

EE	Persen	
Signal (delta) = 20.00	Noise (sigma) = 5.00	Signal/Noise (delta/sigma) = 4.00
A	B	
99.9 %	99.9 %	

G.2 Hasil Uji ANOVA

Response 1 %EE

ANOVA for selected factorial model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2448.53	3	816.18	98.96	< 0.0001	signif icant
<i>A-konsentrasi kitosan</i>	<i>901.04</i>	<i>1</i>	<i>901.04</i>	<i>109.25</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>B-lama pengadukan</i>	<i>1411.26</i>	<i>1</i>	<i>1411.26</i>	<i>171.11</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>AB</i>	<i>136.24</i>	<i>1</i>	<i>136.24</i>	<i>16.52</i>	<i>0.0036</i>	
Pure Error	65.98	8	8.25			
Cor Total	2514.51	11				

The Model F-value of 98.96 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that an F-value this large could occur due to noise. Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, AB are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Std. Dev.	2.87	R-Squared	0.9738
Mean	65.05	Adj R-Squared	0.9639
C.V. %	4.41	Pred R-Squared	0.9410
PRESS	148.45	Adeq Precision	23.533

The "Pred R-Squared" of 0.9410 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.9639; i.e. the difference is less than 0.2. "Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 23.533 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

	Coefficient		Standard	95% CI	95% CI	
Factor	Estimate	df	Error	Low	High	VIF
Intercept	65.05	1	0.83	63.14	66.96	
A- konsentrasi kitosan	8.67	1	0.83	6.75	10.58	1.00
B-lama pengadukan	-10.84	1	0.83	-12.76	-8.93	1.00
AB	3.37	1	0.83	1.46	5.28	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 & \text{EE} = \\
 & +65.05 \\
 & +8.67 * A \\
 & -10.84 * B \\
 & +3.37 * AB
 \end{aligned}$$

The equation in terms of coded factors can be used to make predictions about the response for given levels of each factor. By default, the high levels of the factors are coded as +1 and the low levels of the factors are coded as -1. The coded equation is useful for identifying the relative impact of the factors by comparing the factor coefficients.

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 & \text{EE} = \\
 & +100.47067 \\
 & -1.92400\text{E-}003 \quad * \text{ konsentrasi kitosan} \\
 & \quad -17.58342 \quad * \text{ lama pengadukan} \\
 & +4.49256\text{E-}003 \quad * \text{ konsentrasi kitosan} * \text{ lama pengadukan}
 \end{aligned}$$

The equation in terms of actual factors can be used to make predictions about the response for given levels of each factor. Here, the levels should be specified in the original units for each factor. This equation should not be used to determine the relative impact of each factor because the coefficients are scaled to accommodate the units of each factor and the intercept is not at the center of the design space. Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

G.3 Perhitungan Efek Faktor dan Interaksinya Terhadap Persen *Entrapment Efficiency*

$$\text{Efek faktor A} = \frac{81,191+66,241}{2} - \frac{70,600+42,191}{2} = 17,321$$

$$\text{Efek faktor B} = \frac{42,191+66,241}{2} - \frac{70,600+81,191}{2} = -21,680$$

$$\text{Efek faktor C} = \frac{70,600+66,241}{2} - \frac{81,191+42,191}{2} = 6,730$$

G.4 Constraints

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
A:konsentrasi kitosan	is in range	750	2250	1	1	3
B:lama pengadukan	is in range	2	4	1	1	3
EE	maximize	40.048	81.786	1	1	3

H. Hasil Karakterisasi Formula Optimum *Microspheres* Metformin

Hidroklorida

H.1 Contoh Perhitungan Persen *Drug Loading*

- Diketahui : Persen *entrapment efficiency* = 81,830 %
Berat metformin HCl = 0,7500 gram
Berat *microspheres* = 2,6441 gram
- Persen *drug loading* = $\frac{81,830\% \times 0,7500}{2,6411} = 23,211\%$

H.2 Contoh Perhitungan Persen *Yield*

- Diketahui : Berat *microspheres* didapat = 2,6441 gram
Berat *microspheres* teoritis = 3,0000 gram
- Persen *yield* = $\frac{2,6441 \text{ gram}}{3,0000 \text{ gram}} \times 100\% = 88,137\%$

H.3 Hasil Pengukuran Ukuran Partikel *Microspheres* Menggunakan SEM

Replikasi 1 (μm)	Replikasi 2 (μm)	Replikasi 3 (μm)
550	800	600
500	800	700
800	750	500
700	850	600
750	600	650
500	500	650
600	600	750

500	650	800
500	750	750
700	650	650
650	700	500
500	600	650
700	500	750
650	750	800
750	750	600
800	500	500
750	600	700
600	750	500
550	600	600
650	800	500
700	650	700
750	600	600
700	500	650
500	550	650
500	600	750
650	700	750
750	500	700
700	600	600
650	600	700
800	700	650
800	750	650
750	650	500
650	750	550
500	700	500
700	650	800
500	550	600
700	550	650
650	600	600
650	650	750
800	750	750
750	600	650
500	750	750
500	650	700
500	750	600
750	650	650

750	600	750
800	500	600
500	700	700
550	650	750
800	750	800
Rata-rata: 650	Rata-rata: 654	Rata-rata: 656

I. Dokumentasi Penelitian

I.1 Bahan yang Digunakan dalam Penelitian



Metformin Hidroklorida dan kitosan yang digunakan



Paraffin liquid dan petroleum ether yang digunakan



Aseton yang digunakan

I.2 Proses Penelitian yang Dilakukan



Emulsi metformin HCl-kitosan dalam
paraffin liquid



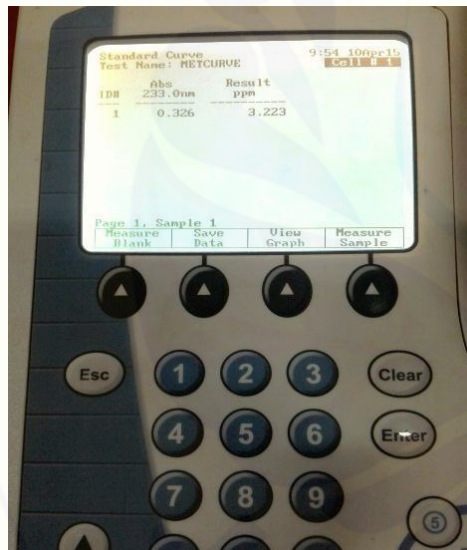
Proses pengadukan dengan *four*
blades propeller



Proses penyaringan *microspheres* dengan *vacuum filtration*



Proses pengeringan serbuk *microspheres* dengan oven



Pengujian *entrapment efficiency* menggunakan spektrofotometer UV-VIS



Pengujian ukuran dan morfologi *microspheres* dengan SEM



Analisis spektrofotometer inframerah (FT-IR)