

## **BAB IV**

### **PROSEDUR KERJA**

#### **4.1. Pemeriksaan Bahan Baku GMP**

GMP diperiksa pemerian, titik lebur dan identifikasinya sesuai dengan yang tertera pada monografi bahan di Farmakope Amerika Edisi 30. Hasil pemeriksaan dibandingkan dengan sertifikat analisis.

#### **4.2. Pemeriksaan Karakteristik Fisik**

GMP dan AST sebelum kokristalisasi ditentukan karakteristik fisiknya dengan pengamatan analisis termal dengan DSC, analisis kristalografi dengan PXRD dan analisis gugus fungsi dengan FT-IR.

#### **4.3. Pembuatan Diagram Fasa Sistem Biner GMP-AST**

Campuran biner GMP-AST dibuat dengan menimbang bahan sesuai dengan komposisi masing-masing komponen pada tabel berikut:

**Tabel IV.1** Komposisi Campuran Biner GMP dan AST



Masing-masing campuran dimasukkan ke dalam *microtube* (Eppendorf) dan ditandai dengan kode yang sesuai. Campuran dihomogenkan dengan *vortex mixer* selama 5 menit. Kemudian sampel dikarakterisasi dengan DSC, hasilnya dikonstruksikan dalam bentuk diagram fase sistem biner GMP-AST (Darusman, 2014).

#### **4.4. Skrining Bahan Pelarut**

Sejumlah GMP dan AST diambil menggunakan spatula, kemudian dilarutkan pada masing-masing kandidat pelarut, seperti metanol, aseton dan etanol. Lalu dibandingkan dari masing-masing pelarut tersebut mana yang dapat melarutkan GMP dan AST secara sempurna. Pelarut yang dapat melarutkan GMP dan AST secara sempurna akan digunakan pada penelitian ini.

#### **4.5. Skrining Pembentukan Kokristal GMP-AST dengan Berbagai Teknik**

##### **4.5.1. Teknik Pelarutan (*Solvent Evaporation Tehnique/SE*)**

Sejumlah GMP dan AST ditimbang dengan perbandingan molar 1:1 (490,62 mg dan 192,12 mg), kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan dilarutkan dalam 300 mL aseton. Lalu diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 30 menit pada suhu 50°C hingga melarut sempurna. Larutan diuapkan pada suhu kamar hingga pelarut habis selama  $\pm 2$  minggu. Padatan yang dihasilkan nantinya akan dikarakterisasi (Hickey *et al*, 2007).

#### **4.5.2. Teknik Penggilingan Padat Kering (*Neat/Dry Grinding Tehnique/NG*)**

Sejumlah GMP dan AST ditimbang dengan perbandingan molar 1:1 (490,62 mg dan 192,12 mg). Kemudian, digiling secara manual dengan mortar dan alu selama 30 menit (Trask & Jones, 2005).

#### **4.5.3. Teknik Penggilingan Padat Dengan Penambahan Sejumlah Kecil Pelarut (*Solvent Drop Grinding Tehnique/SDG*)**

Ditimbang GMP dan AST dengan perbandingan molar 1:1 (490,62 mg dan 192,12 mg). Kemudian digiling secara manual dengan mortar dan alu selama 30 menit, sambil ditetesi sejumlah kecil pelarut aseton (15 tetes) (Trask & Jones, 2005).

### **4.6. Karakterisasi Sifat Fisikokimia dan Kristalografi Kokristal GMP-AST**

#### **4.6.1. Difraksi Sinar-X (*Powder X-Ray Diffractometer*)**

Sebanyak 100-200 mg sampel pada *sample holder* diletakkan di ruang sampel difraktometer sinar-X. Analisis dilakukan pada rentang sudut difraksi 2 $\theta$  5-65° menggunakan radiasi Cu K $\alpha$  ( $K\alpha_1 = 1,54060$  nm,  $K\alpha_2 = 1,54439$  nm) pada 40 kV dan 35 mA (Darusman, 2014).

#### **4.6.2. Analisis Termal (*Differential Scanning Calorimetry*)**

Sebanyak 5-20 mg sampel diletakkan pada *crucible* alumina instrumen DSC. Analisis termal dilakukan pada rentang temperatur 30-300°C dengan laju pemanasan 10°C per menit (Darusman, 2014).

#### **4.6.3. Analisis Gugus Fungsi (Spektrofotometer FT-IR)**

Dispersi sekitar 1% sampel serbuk dalam kalium bromida (KBr) dibuat dengan mencampur massa dengan KBr membentuk pelet KBr. Spektrum infra merah diperoleh dengan alat spektrofotometer infra merah pada bilangan gelombang 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  (Darusman, 2014).

#### **4.7. Evaluasi Kinerja Kokristalisasi**

##### **4.7.1. Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 7,4**

50 mL larutan kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,2 M dicampur dengan natrium hidroksida (NaOH) 0,2 M sebanyak 39,1 mL. Kemudian, keduanya dicampurkan dan ditambahkan aquades hingga 200 mL. Larutan tersebut diukur pH-nya menggunakan pH meter sampai pH 7,4 (Depkes RI, 1979).

##### **4.7.2. Pembuatan Larutan Induk GMP**

GMP ditimbang secara seksama sejumlah 10 mg, dimasukkan dalam labu takar 100 mL, ditambahkan 10 mL metanol, diaduk dengan *vortex mixer* selama 15 menit hingga larut sempurna, kemudian ditambahkan larutan dapar fosfat pH 7,4 hingga batas tanda (Darusman, 2014).

##### **4.7.3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum GMP**

Larutan induk GMP diencerkan secara tepat sehingga diperoleh konsentrasi GMP 10  $\mu\text{g/mL}$ , kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV pada rentang panjang gelombang 200-300 nm. Panjang gelombang maksimum GMP dicatat (Darusman, 2014).

#### **4.7.4. Pembuatan Kurva Kalibrasi GMP**

Kurva kalibrasi GMP dibuat dari satu seri 4, 6, 8, 10, 12 dan 14  $\mu\text{g/mL}$  dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4. Masing-masing konsentrasi diukur pada panjang gelombang 228 nm (Darusman, 2014).

#### **4.7.5. Uji Kelarutan**

GMP murni dan kokristal GMP-AST (1:1) hasil perlakuan NG, SDG dan SE masing-masing ditimbang berlebih (5 mg dan 6,958 mg), kemudian dimasukkan dalam vial kaca yang berisi dapar fosfat pH 7,4 sebanyak 10 mL. Sampel diaduk dalam pengaduk orbital dengan temperatur konstan  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$  pada kecepatan 50 putaran per menit. Pengadukan dilakukan selama 24 jam hingga tercapai kesetimbangan. Sampel larutan disaring dengan kertas saring Whatman, kemudian filtrat yang didapat diukur serapannya dengan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 228 nm (Darusman, 2014).

#### **4.7.6. Uji Disolusi**

10 mg GMP murni dan GMP-AST (1:1) hasil perlakuan NG, SDG dan SE ditimbang setara dengan 10 mg GMP murni (13,916 mg), ditetapkan dengan metode II USP (tipe alat dayung), kecepatan pengadukan 50 putaran per menit, medium disolusi larutan dapar fosfat pH 7,4 sebanyak 900 mL dengan temperatur  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Larutan diambil pada interval waktu 2, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50 dan 60 menit sebanyak 10 mL, dengan temperatur yang sama. Larutan sampel disaring menggunakan kertas saring Whatman, kemudian filtrat yang didapat diukur serapannya pada spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 228 nm (Darusman, 2014).