

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Riset berlangsung selama enam bulan, dimulai dari bulan Februari hingga Juli 2023. Riset ini dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati Program Studi Kimia, FPMIPA UPI untuk proses preparasi hingga pelaksanaan penelitian. Proses *freeze dry* ekstrak *M. pruriens* dilakukan di Swiss German University, Tangerang, Jawa Barat dan Universitas Garut, Kab. Garut, Jawa Barat. Proses *spray dry* produk NLC-CP-LA-Mp dilakukan di lab uji Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian (TPHP) Universitas Gadjah Mada. Sementara uji karakterisasi PSA, SEM, dan TEM dilakukan di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi Institut Teknologi Bandung (PPNN ITB). Untuk pengujian karakterisasi menggunakan FTIR dan UV/Vis dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, pH meter, *magnetic stirrer*, *hot plate*, *rotary evaporator*, *vacuum filtrate*, corong buchner, pipet tetes, batang pengaduk, spatula, neraca analitik, gelas kimia, gelas ukur 1000 mL, labu ukur 25 dan 10 mL, termometer, dan alat gelas lainnya, set alat *freeze dry*, dan ultrasonikator UCD-250, Adapun alat instrumen yang digunakan untuk karakterisasi yakni spektrofotometri FTIR, SEM (*Scanning Electron Microscope*), TEM (*Transmission Electron Microscope*), *Spray dry*, UV/Vis, *Nano Particle Analyzer* Horiba SZ-100, dan instrument HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kacang *M. pruriens*. Material lain yang digunakan meliputi setil palmitat (teknis), asam linoleat (PA, Pro-analis Sigma-aldrich), aqua demineralisasi, asam sitrat, etanol teknis 96%, tween 80, katung dialisis, kertas saring, tabung sentrifugasi, botol vial, *plastic wrap*.

3.3 Tahapan Penelitian

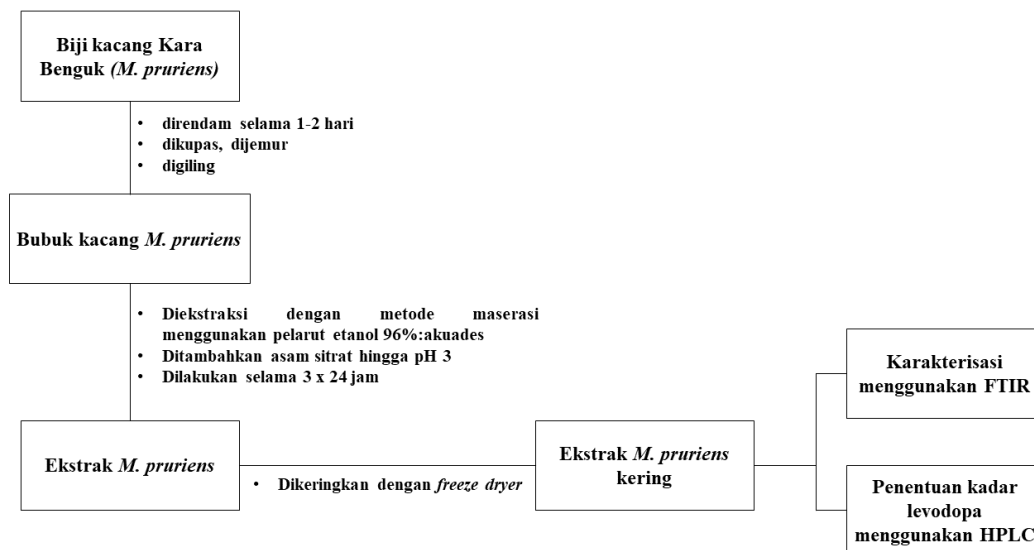
Penelitian ini melewati 2 tahapan utama, yakni tahap pra-nanoformulasi dan tahap nanoformulasi. Bagan alur kerja tahapan penelitian ditampilkan dalam Gambar 3.1 dan 3.2.

3.3.1 Tahap Pra-nanoformulasi

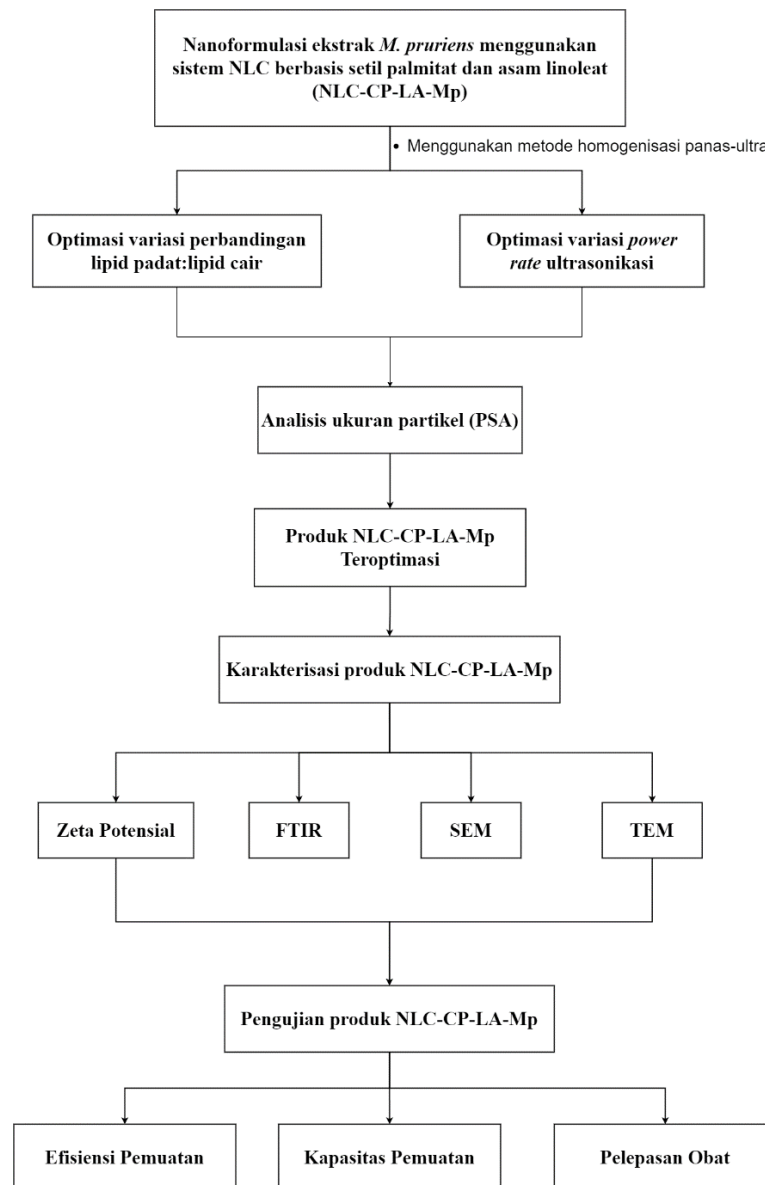
Pada tahap ini dilakukan rangkaian pekerjaan yang meliputi ekstraksi *M. pruriens*, karakterisasi ekstrak *M. pruriens* menggunakan FTIR, serta penentuan kadar levodopa dalam ekstrak *M. pruriens* menggunakan HPLC.

3.3.2 Tahap Nanoformulasi

Pada tahapan ini dilakukan rangkaian pekerjaan yang meliputi nanoformulasi NLC ekstrak *M. pruriens* berbasis setil palmitat dan asam linoleat dengan beberapa optimasi meliputi optimasi perbandingan lipid dengan batasan rasio lipid padat dan lipid cair 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; dan 4:6 dan optimasi *power rate* ultrasonikasi dengan batasan 15%; 30%; 45%; 60%; dan 75%. Melakukan karakterisasi produk NLC-CP-LA-Mp menggunakan FTIR, PSA, SEM, TEM, menentukan efisiensi pemuatan dan kapasitas pemuatan dari produk nanoformulasi menggunakan UV/Vis, serta menentukan persentase pelepasan obat dari produk nanoformulasi menggunakan metode *dialysis bag*.



Gambar 3.1 Alur kerja tahap pra-nanoformulasi.



Gambar 3.2 Alur kerja tahapan nanoformulasi.

3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian ini melewati 2 tahapan utama, yakni tahap pra-nanoformulasi dan tahap nanoformulasi.

3.4.1 Tahap Pra-nanoformulasi

Pada tahapan ini dilakukan rangkaian pekerjaan yang meliputi ekstraksi *M. pruriens*, pengujian karakterisasi ekstrak *M. pruriens* menggunakan FTIR, penentuan kadar levodopa ekstrak *M. pruriens* menggunakan HPLC.

Nyoman Ayu Kristinawati, 2023

NANOFORMULASI EKSTRAK KARA BENGUK (*Mucuna pruriens*) MENGGUNAKAN NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER BERBASIS SETIL PALMITAT DAN ASAM LINOLEAT SEBAGAI KANDIDAT OBAT PARKINSON
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

a. Ekstraksi Biji Kacang *M. pruriens*

Biji kacang *M. pruriens* di preparasi dengan memisahkan kulit dan daging biji kacang *M. pruriens*. Polong *M. pruriens* direndam dalam air sekitar 1 hingga 2 hari agar lebih mudah dalam memisahkan kulit dan biji-nya. Setelah dipisahkan, biji kacang *M. pruriens* dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian digiling hingga menjadi serbuk. Serbuk biji kacang *M. pruriens* diekstraksi dengan metode maserasi seperti yang dijelaskan oleh Sardjono *et al.* (2018). Secara singkat serbuk di maserasi menggunakan pelarut etanol 96%:akuades dengan perbandingan volume 1:1 dan ditambahkan asam sitrat hingga mencapai pH 3. Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam dan setiap hari dilakukan pergantian pelarut. Setelah proses maserasi selesai, maserat dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga mendapatkan ekstrak yang lebih pekat. Selanjutnya, ekstrak pekat dikeringkan menggunakan *freeze dryer* hingga didapatkan ekstrak *Mucuna pruriens* kering.

b. Karakterisasi Ekstrak *M. pruriens*

Karakterisasi ini dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa fitokimia pada ekstrak *M. pruriens*. Ekstrak *M. pruriens* dikarakterisasi menggunakan FTIR pada panjang gelombang 4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1} .

c. Penentuan Kadar Levodopa dalam Ekstrak *M. pruriens*

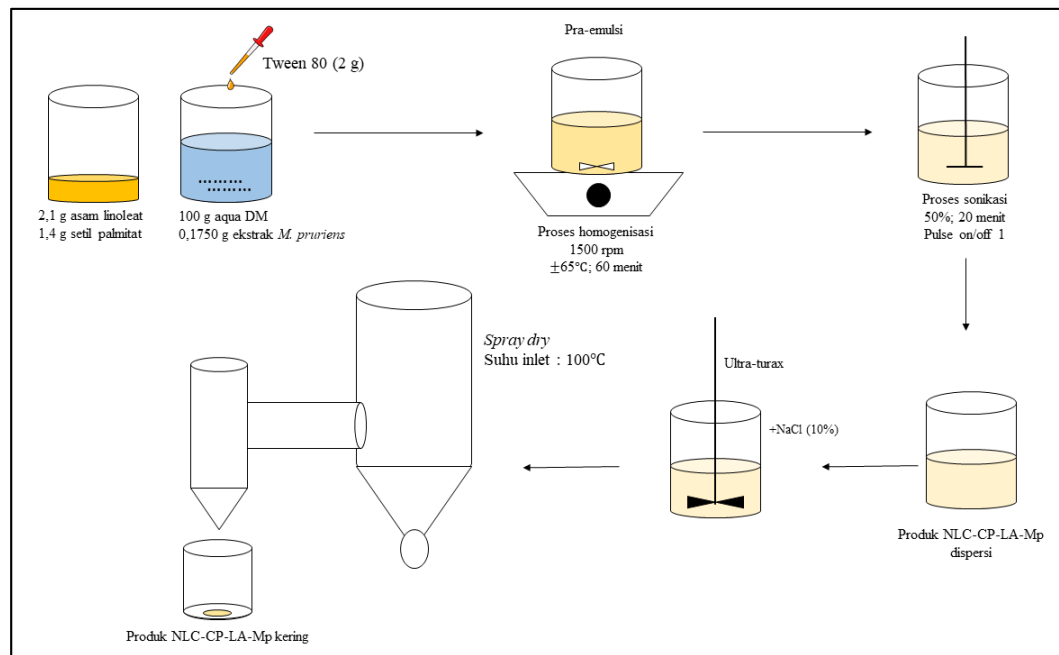
Penentuan kadar levodopa dalam ekstrak *M. pruriens* dilakukan dengan metode HPLC. Dalam analisis ini, digunakan kolom fase terbalik kromosil C18 dengan ukuran 250 x 4,6 mm. Fase gerak yang digunakan terdiri dari campuran air, metanol, dan asam fosfat dengan perbandingan 97 ml:20 ml:1 ml, dengan laju alir sebesar 1 ml/menit. Untuk persiapan deret standar, levodopa murni dengan konsentrasi 12,5 mg dilarutkan dalam 25 ml fase gerak untuk menghasilkan larutan baku primer dengan konsentrasi 500 ppm. Larutan baku ini kemudian digunakan untuk membuat rangkaian deret standar dengan konsentrasi 25, 50, 75, 100, 125, dan 150 ppm. Ekstrak *M. pruriens* yang akan dianalisis ditimbang sebanyak 12,5 mg dan dilarutkan dalam 10 mL fase gerak, kemudian dihomogenkan menggunakan sonikator dan diencerkan dalam labu ukur 25 mL. Penentuan kadar levodopa dari ekstrak *M. pruriens* dihitung berdasarkan kurva standar larutan levodopa yang telah dibuat sebelumnya.

3.4.2 Tahap Nanoformulasi

Pada tahapan ini dilakukan rangkaian pekerjaan yang meliputi optimasi formulasi nanoformulasi NLC ekstrak *M. pruriens* berbasis setil palmitat dan asam linoleat dengan optimasi perbandingan lipid padat dan lipid cair (8:2; 7:3; 6:4; 5:5; dan 4:6) dan optimasi *power rate* ultrasonikasi (15%, 30%, 45%, 60%, dan 75%), melakukan karakterisasi produk NLC-CP-LA-Mp menggunakan instrumen FTIR, PSA, SEM, TEM serta penentuan efisiensi pemuatan dan kapasitas pemuatan obat dari produk nanoformulasi menggunakan UV/Vis, dan persentase pelepasan obat dari produk nanoformulasi dengan metode *dialysis bag*.

a. Tahap Pembuatan NLC-CP-LA-Mp

Pembuatan *Nanostructured Lipid Carrier Mucuna pruriens* berbasis setil palmitat dan asam linoleat (NLC-CP-LA-Mp) dilakukan dengan metode homogenisasi panas dan ultrasonikasi seperti yang dijelaskan oleh Alhalimi *et al.* (2022) dengan modifikasi. Fase lipid disiapkan dari setil palmitat dan asam linoleat (3,5% dari massa total), sedangkan fase air disiapkan dari tween 80 (2% dari massa total) dan air demineralisasi (hingga 100 mL). Kedua fase dipanaskan pada suhu 65°C sambil diaduk. Ekstrak *M. pruriens* (5% dari total lipid) ditambahkan ke dalam fase air dan diaduk selama 10 menit atau hingga semua ekstrak telah tercampur. Fase air yang berisi bahan aktif atau ekstrak *M. pruriens* kemudian tambahkan ke dalam fase lipid secara *drop wise* atau melalui dinding gelas dan dihomogenisasi di atas *hot plate* pada kecepatan 1500 rpm selama 60 menit dengan bantuan *stirrer bar*. Homogenisasi dilakukan dengan menjaga campuran berada pada suhu 65°C. Selanjutnya dilakukan ultrasonikasi menggunakan ultrasonikator UCD-250 dengan *pulse on/off* 1 detik selama 20 menit dan energi amplitudo 50% untuk menghasilkan produk nanoformulasi NLC. Produk NLC-CP-LA-Mp berupa dispersi didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang sebelum dilakukan tahap pengeringan, karakterisasi dan pengujian selanjutnya. Skema pembuatan produk NLC-CP-LA-Mp ditunjukkan pada Gambar 3.3 sebagai berikut.



Gambar 3.3 Skema pembuatan produk NLC-CP-LA-Mp.

b. Optimasi Produk NLC-CP-LA-Mp.

Tahap optimasi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan komposisi produk NLC-CP-LA-Mp yang paling baik dari segi ukuran terkecil dan homogenitas terbaik dari hasil PDI (Indeks polidispersitas). Pada Tabel 3.1 menunjukkan optimasi perbandingan lipid dalam formulasi NLC-CP-LA-Mp.

Tabel 3.1 Optimasi variasi perbandingan lipid pada formulasi NLC-CP-LA-Mp.

Formula	Komponen					
	Ekstrak <i>M. pruriens</i> (g)	Setil palmitat (CP) (%)	Asam linoleat (LA) (%)	Tween 80 (g)	Waktu ultrasonikasi (menit)	Power rate ultrasonikasi (%)
1.1	0,1	8	2	2	20	50
1.2	0,1	7	3	2	20	50
1.3	0,1	6	4	2	20	50
1.4	0,1	5	5	2	20	50
1.5	0,1	4	6	2	20	50

Optimasi juga dilakukan pada amplitudo ultrasonikasi, formulasi yang digunakan merupakan hasil terbaik dari optimasi perbandingan lipid. Optimasi amplitudo ditunjukkan pada Tabel 3.2 berikut.

Nyoman Ayu Kristinawati, 2023

NANOFORMULASI EKSTRAK KARA BENGUK (*Mucuna pruriens*) MENGGUNAKAN NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER BERBASIS SETIL PALMITAT DAN ASAM LINOLEAT SEBAGAI KANDIDAT OBAT PARKINSON
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Tabel 3.2 Optimasi variasi *power rate* ultrasonikasi pada formulasi NLC-CP-LA-Mp.

Formula	Komponen					
	Ekstrak <i>M. pruriens</i> (g)	Setil palmitat (CP) (%)	Asam linoleat (LA) (%)	Tween 80 (g)	Waktu ultrasonikasi (menit)	<i>Power rate</i> ultrasonikasi (%)
2.1	0,1	4	6	2	20	15
2.2	0,1	4	6	2	20	30
2.3	0,1	4	6	2	20	45
2.4	0,1	4	6	2	20	60
2.5	0,1	4	6	2	20	75

c. Konversi Produk Dispersi NLC-CP-LA-Mp menjadi Produk Kering Menggunakan *Spray Drying*.

Konversi produk dispersi NLC-CP-LA-Mp menjadi produk kering dengan pengeringan semprot (*spray dry*) dilakukan untuk membuat produk NLC-CP-LA-Mp memiliki stabilitas kimia dan fisik yang lebih baik daripada dalam bentuk dispersi. Proses ini dilakukan seperti yang dijelaskan oleh Xia *et al.* (2016) dan Mozaffar *et al.* (2021) dengan sedikit modifikasi pada bagian bahan. Proses ini dilakukan menggunakan instrumen *spray dryer mini* BÜCHI B-290 (BÜCHI, Swiss). Secara singkat, serbuk NaCl (10% dari berat total) dicampurkan ke dalam larutan dispersi NLC-CP-LA-Mp dan di homogenkan menggunakan *ultra-turrax*. Setelahnya, proses *spray dry* dilakukan dengan suhu inlet dipertahankan pada 100 °C dengan menyesuaikan laju pompa peristaltik (%) dengan laju 4 hingga 5 mL/menit. Setelah proses selesai, bubuk yang dihasilkan dikumpulkan.

3.4.3 Karakterisasi Produk NLC-CP-LA-Mp.

a. FTIR

Karakterisasi FTIR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dan interaksi antara ekstrak *M. pruriens* dengan setil palmitat dan asam linoleat. Dalam proses ini, produk NLC-CP-LA-Mp ditimbang sekitar 5 mg dan dicampur dengan pelat KBr seberat 150 mg, selanjutnya sampel digerus hingga halus dan dimasukkan ke *sample holder* lalu di *press*. Pelat yang berisi sampel kemudian dimasukkan ke dalam perangkat FTIR. Proses yang sama juga dilakukan untuk sampel setil palmitat dan asam

linoleat. Setelah pengukuran selesai, spektrum hasil FTIR dari masing-masing sampel dibandingkan untuk melihat interaksi yang terjadi antara ekstrak *M. pruriens* dengan lipid penyusun NLC. Dengan membandingkan spektrum, dapat diketahui adanya perubahan atau interaksi yang terjadi antara komponen-komponen tersebut.

b. Ukuran Partikel dan Zeta Potensial

Karakterisasi *Particle Size Analyzer* (PSA) digunakan untuk mengukur distribusi ukuran partikel dalam suatu sampel. Instrumen PSA yang digunakan adalah *Nano Particle Analyzer* Horiba SZ-100 dengan spesifikasi *scattering angle* 90 dan suhu holder 25 °C. Sampel NLC-CP-LA-Mp dilarutkan dengan akuades. Setelahnya instrumen PSA dikalibrasi terlebih dahulu. Pengukuran dilakukan dengan menempatkan sampel ke dalam instrumen PSA. Hasil pengukuran berupa ukuran partikel dan indeks polidispersitas.

Pengukuran zeta potensial (ZP) digunakan untuk mengkarakterisasi muatan permukaan partikel. Pengukuran zeta potensial dilakukan menggunakan instrumen PSA. Singkatnya, diambil larutan sampel sebanyak 1 mL kemudian diletakan ke dalam kuvet zeta potensial, lalu diletakan dalam holder instrumen PSA.

d. SEM

Karakterisasi menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dilakukan untuk mengetahui morfologi sampel nanoformulasi ekstrak *M. pruriens* dalam sistem NLC berbasis setil palmitat dan asam linoleat. Sampel NLC-CP-LA-Mp yang telah dikeringkan disuspensikan dalam 1 ml aquades, 2 μ l suspensi ditempatkan pada permukaan kaca kemudian dikeringkan dalam oven. Setelah itu, potongan melintang sampel dilapisi dengan emas (Au). Pengujian morfologi dilakukan menggunakan SEM pada kondisi vakum dengan tegangan 10 kV (Xie, *et al.*, 2011).

e. TEM

Karakterisasi sampel menggunakan TEM bertujuan untuk mengetahui ukuran partikel. Preparasi sampel untuk analisis TEM dilakukan dengan melarutkan sampel NLC-CP-LA-Mp kering dalam etanol. Alat yang digunakan adalah HT7700 yang memiliki tegangan maksimum 100 kV. Kemudian hasil diukur menggunakan perangkat lunak *Image J*.

3.4.4 Penentuan Efisiensi Pemuatan dan Kapasitas Pemuatan Obat Produk NLC-CP-LA-Mp.

Efisiensi pemuatan (*loading efficiency*) dilakukan untuk mengetahui persentase ekstrak *M. pruriens* yang berhasil tersalut dalam sistem NLC. Efisiensi pemuatan dilakukan dengan menggunakan instrumen UV/Vis seperti yang dijelaskan oleh Ahmad *et al.* (2022) dan konsentrasi sampel dihitung menggunakan kurva kalibrasi. Singkatnya, larutan induk ekstrak *M. pruriens* 100 ppm diencerkan dan dibuat deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm, kemudian diukur pada panjang gelombang 280,0 nm. Setelahnya dibuat kurva regresi linear konsentrasi dan absorbansi hingga memperoleh persamaan regresi linear sehingga dapat digunakan untuk penetapan efisiensi pemuatan.

Penetapan efisiensi pemuatan pada produk NLC-CP-LA-Mp dilakukan dengan ultrasentrifugasi berkecepatan 20,000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan diambil secara hati-hati dan dilakukan pengenceran sebanyak 3 kali, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280,0 nm. Efisiensi pemuatan ditentukan dengan mengurangi konsentrasi senyawa dalam ekstrak yang digunakan saat nanoformulasi (C_o) dengan konsentrasi senyawa yang tersisa dalam supernatan setelah proses nanoformulasi selesai (C_t) dan dibagi dengan konsentrasi senyawa dalam ekstrak yang digunakan saat nanoformulasi (C_o) yang digunakan seperti yang ditunjukkan pada persamaan berikut.

$$\text{Efisiensi Pemuatan (\%)} = \frac{C_o - C_t}{C_o} \times 100\%$$

Kapasitas pemuatan obat dilakukan dengan mengukur selisih antara jumlah ekstrak awal yang digunakan saat penyalutan (W_o) dengan jumlah ekstrak *M. pruriens* yang tak termuat (*unloaded*) dalam penyalut (W_t) dibagi dengan total bahan penyalut (lipid) yang digunakan (W_L). Penentuan kapasitas pemuatan seperti pada persamaan berikut (Hu *et al.*, 2005).

$$\text{Kapasitas pemuatan (\%)} = \frac{W_o - W_t}{W_L} \times 100\%$$

3.4.5 Penentuan Persentase Pelepasan Obat Produk NLC-CP-LA-Mp

Penentuan Persentase pelepasan obat dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode *dialysis bag* yang diadaptasi dari Jamiati (2022) dan Ajiboye *et al.* (2021), pengujian ini dilakukan pada kondisi pH sebesar 7,4 dan 1,2. Secara ringkas, buffer fosfat pH 7,4 dibuat dengan melarutkan 6,8 gram KH_2PO_4 dalam 650 mL aquades, kemudian ditambahkan 0,2 M NaOH dan ditandabatkan dalam labu ukur 1 L. Larutan NaCl pH 1,2 dibuat dengan menimbang NaOH sebanyak 2 gram lalu dilarutkan pada 1 L aquades, kemudian HCl 12 M ditambahkan sebanyak ± 7 mL. Selanjutnya kedua larutan pH dibuat deret standar dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan panjang gelombang 280,0 nm (pH 7,4) dan 276,0 nm (pH 1,2). Kemudian hasil absorbansi dibuat kurva kalibrasi.

Uji pelepasan obat dilakukan dengan menimbang sampel NLC-CP-LA-Mp sebanyak 2 mg, kemudian larutkan dalam 3 mL larutan pH (larutan donor), setelahnya dimasukkan ke dalam kantung dialisis. Kantung berisi sampel kemudian direndam dalam 30 mL larutan pH (larutan penerima) pada suhu 37°C . Perendaman dilakukan selama 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 jam. Kemudian larutan penerima diukur menggunakan spektrofotometri UV/Vis.

$$\text{Pelepasan obat (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi pelepasan obat}}{\text{Konsentrasi NLC awal}} \times 100\%$$

Dimana pelepasan obat (%) adalah persen jumlah obat yang rilis, konsentrasi pelepasan obat berhubungan dengan jumlah obat yang lepas selama pengujian (dalam ppm), dan konsentrasi NLC awal berhubungan dengan jumlah sampel awal yang digunakan dalam pengujian (dalam ppm).