

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan dari Februari–Agustus 2023 di Laboratorium Riset Program Studi Kimia UPI, sementara *freeze dry* dilakukan di Universitas Garut dan Swiss German University. Selanjutnya, proses *spray dry* dilakukan di Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Universitas Gajah Mada, serta analisis menggunakan instrumen *Particle Size Analyzer* (PSA), *Scanning Electron Microscope* (SEM), dan *Transmission Electron Microscope* (TEM) dilakukan di Laboratorium PPNN Institut Teknologi Bandung.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ultrasonikator, *rotary evaporator*, pompa vakum, desikator, sonikator, *freeze dryer*, neraca analitik, *hot plate*, *spray dryer*, dan alat gelas lainnya. Sementara itu, instrumen yang digunakan dalam tahap karakterisasi meliputi *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), *Particle Size Analyzer* (PSA), *Fourier Transform Infrared* (FTIR) *Spectrometer*, *Scanning Electron Microscope* (SEM), dan *Transmission Electron Microscope* (TEM).

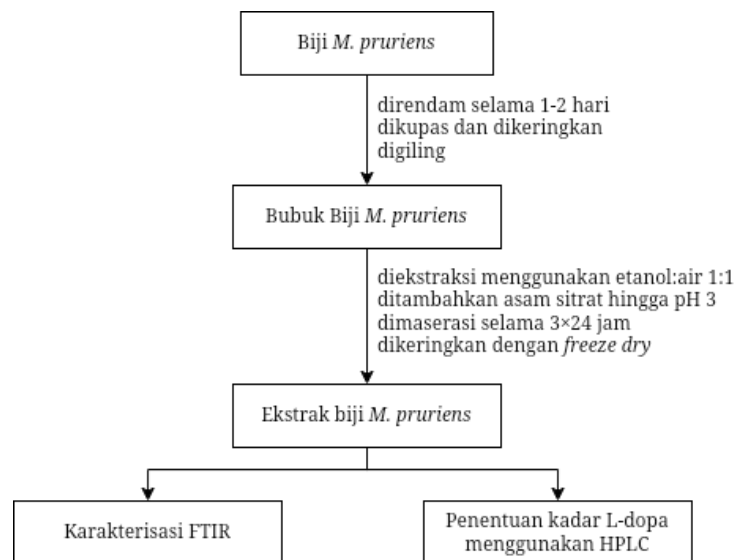
Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi biji *M. pruriens*, setil palmitat (teknis), asam oleat (PA, JT Baker), Tween 80, etanol 96%, asam sitrat, NaCl, HCl, NaOH, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, kantung dialisis, air demineralisasi, dan akuades.

### 3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan kerja pada penelitian ini terbagi menjadi dua tahapan utama, yakni tahap pra-nanoformulasi dan tahap nanoformulasi.

#### 3.3.1 Tahap Pra-nanoformulasi

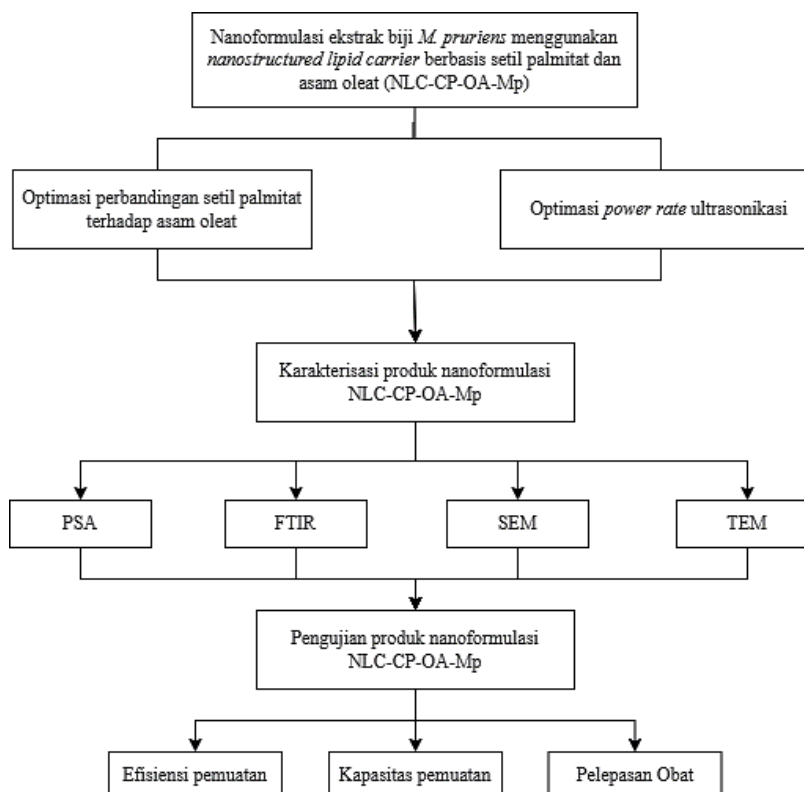
Tahapan ini bertujuan untuk memperoleh ekstrak biji *M. pruriens* kering yang kemudian digunakan dalam proses nanoformulasi. Adapun alur kerja tahap pra-nanoformulasi ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



**Gambar 3.1** Tahapan kerja pra-nanoformulasi

### 3.3.2 Tahap Nanoformulasi

Tahapan ini dirancang untuk memperoleh produk nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp sebagai kandidat obat Parkinson, penelitian dilakukan melalui beberapa tahapan kerja seperti ditunjukkan pada **Gambar 3.2**.



**Gambar 3.2** Tahapan kerja nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.3.3 Tahap Pra-Nanoformulasi

##### a. Penyiapan dan Ekstraksi *M. pruriens*

Biji *M. pruriens* dipisahkan antara bagian kulit dan dagingnya dengan terlebih dahulu direndam dalam air selama 1-2 hari. Setelah itu, daging biji *M. pruriens* dianginkan hingga kering dan kemudian digiling hingga didapat serbuk *M. pruriens*. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi seperti yang dijelaskan oleh Sardjono *et al.* (2018). Secara singkat, sampel dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96%-air dengan perbandingan volume 1:1 dan dilakukan penambahan asam sitrat hingga mencapai pH 3. Maserasi dilakukan selama 3×24 jam dengan penggantian pelarut setiap 24 jam. Setelahnya, maserat dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga didapat ekstrak yang lebih pekat. Ekstrak tersebut kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer* hingga diperoleh ekstrak *M. pruriens* kering.

##### b. Karakterisasi Ekstrak *M. pruriens*

Ekstrak *M. pruriens* kering dikarakterisasi menggunakan instrumen FTIR pada bilangan gelombang  $400\text{ cm}^{-1}$  –  $400\text{ cm}^{-1}$  untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat di dalam ekstrak biji *M. pruriens*. Karakterisasi dilaksanakan di Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia UPI.

##### c. Penentuan Kadar L-dopa dalam Ekstrak *M. pruriens*

Penentuan kadar L-dopa dalam ekstrak *M. pruriens* dianalisis menggunakan alat HPLC. Analisis dilakukan menggunakan fasa terbalik kromosil C18 250×4,6 mm. Digunakan fasa gerak yang terdiri dari air, metanol, dan asam fosfat dengan perbandingan volume 97:20:1 mL dengan laju alir 1 mL/menit. Larutan standar primer 500 ppm dibuat dengan melarutkan 12,5 mg standar L-dopa dalam 25 mL fasa gerak, selanjutnya disiapkan deret larutan standar dengan konsentrasi 25, 50, 75, 100, 125, dan 150 ppm. Ditimbang 12,5 mg Ekstrak *M. pruriens* dan dilarutkan dalam 10 mL fasa gerak serta dihomogenasi menggunakan sonikator. Selanjutnya, larutan diencerkan dalam labu ukur 25 mL. Kadar L-dopa dalam ekstrak *M. pruriens* dihitung dari kurva kalibrasi larutan L-dopa standar.

### 3.3.4 Tahap Nanoformulasi

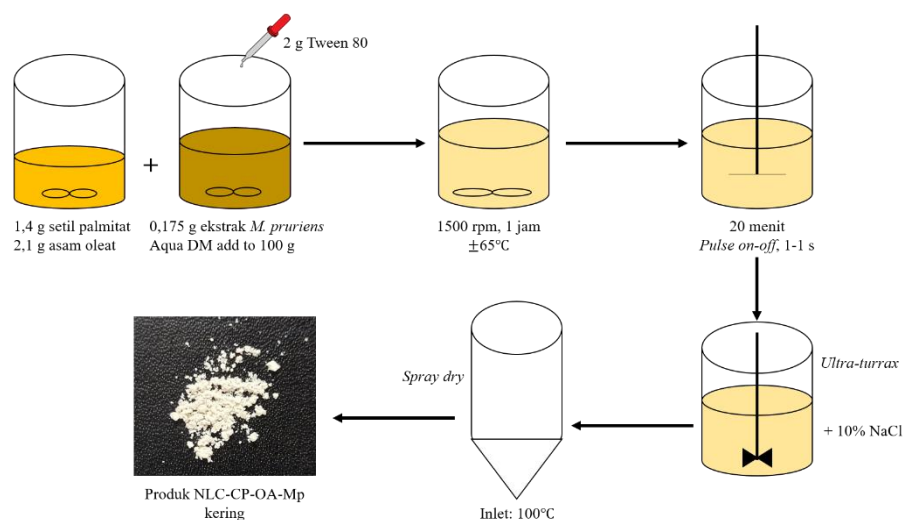
#### a. Nanoformulasi dan Optimasi NLC-CP-OA-Mp

Ekstrak *M. pruriens* yang termuat dalam *nanostructured lipid carrier* berbasis setil palmitat dan asam oleat (NLC-CP-OA-Mp) disintesis menggunakan metode homogenisasi panas yang dilanjutkan dengan ultrasonikasi. Komposisi dari bahan yang digunakan dalam nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp ditunjukkan seperti pada **Tabel 3.1**.

**Tabel 3.1** Massa dan fungsi bahan nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp

Bahan	Massa (g)	Fungsi
Ekstrak biji <i>M. pruriens</i>	0,175	Bahan bioaktif
Setil palmitat	3,5	Lipid padat
Asam oleat		Lipid cair
Tween 80	2	Surfaktan
Aqua DM	Add to 100	Pelarut

Fasa minyak disiapkan dengan mencampurkan setil palmitat dan asam oleat, sementara fasa aqueous dipreparasi dari ekstrak *M. pruriens*, Tween 80, dan air demineralisasi. Masing-masing fasa dipanaskan hingga suhu 65°C sambil diaduk di atas *hotplate*. Setelah mencapai suhu yang sama, fasa aqueous ditambahkan ke dalam fasa minyak secara perlahan melalui dinding gelas sambil diaduk. Selanjutnya, pra-emulsi yang terbentuk dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* 1500 rpm selama 60 menit dengan mempertahankan suhu pada  $\pm 65^{\circ}\text{C}$ . Emulsi yang diperoleh kemudian dengan segera disonikasi selama 20 menit menggunakan *probe ultrasonicator*. Secara singkat, prosedur kerja nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp ditunjukkan seperti pada **Gambar 3.3**. Pada proses optimasi, produk nanoformulasi hasil ultrasonikasi diukur menggunakan instrumen PSA sehingga diperoleh ukuran partikel produk NLC-CP-OA-Mp dalam sediaan dispersi.



**Gambar 3.3** Prosedur kerja nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp

Selanjutnya, dilakukan tahapan optimasi untuk memperoleh kondisi nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp yang optimal berdasarkan ukuran partikel terkecil yang diperoleh dari hasil pengukuran dengan instrumen PSA Horiba SZ-100 di Laboratorium PPNN ITB. Optimasi dilakukan pada dua variabel bebas, yakni perbandingan lipid setil palmitat terhadap asam oleat serta *power rate* ultrasonikasi. Sejumlah kondisi perbandingan massa setil palmitat terhadap asam oleat ditunjukkan seperti pada **Tabel 3.2**.

**Tabel 3.2** Variasi komposisi pada tahap optimasi perbandingan lipid setil palmitat (CP) dan asam oleat (OA)

Formula	Perbandingan CP:OA	Massa CP (g)	Massa OA (g)	Massa Ekstrak <i>M. pruriens</i> (g)	<i>Power rate</i> Ultrasonikasi (%)
1.1	8:2	2,80	0,70	0,175	50
1.2	7:3	2,45	1,05	0,175	50
1.3	6:4	2,10	1,40	0,175	50
1,4	5:5	1,75	1,75	0,175	50
1.5	4:6	1,40	2,10	0,175	50

Setelah diperoleh formula perbandingan setil palmitat terhadap asam oleat yang optimal, tahapan optimasi dilanjutkan dengan variasi *power rate* ultrasonikasi seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 3.3**.

**Tabel 3.3** Variasi komposisi pada tahap optimasi *power rate* ultrasonikasi

Formula	Perbandingan CP:OA	Massa CP (g)	Massa OA (g)	Massa Ekstrak <i>M. pruriens</i> (g)	<i>Power rate</i> Ultrasonikasi (%)
2.1	4:6	1,40	2,10	0,175	15
2.2	4:6	1,40	2,10	0,175	30
2.3	4:6	1,40	2,10	0,175	45
2.4	4:6	1,40	2,10	0,175	60
2.5	4:6	1,40	2,10	0,175	75

Setelah diperoleh formula perbandingan lipid dan *power rate* ultrasonikasi yang optimal, produk NLC-CP-OA-Mp kemudian dikeringkan menggunakan *spray dryer* mengacu pada penelitian yang dilakukan Mozaffar *et al.* (2021) dan Xia *et al.* (2016). *Spray drying* dilakukan menggunakan Buchi B-290 *mini spray dryer* dengan terlebih dahulu menambahkan NaCl sebagai penyalut dengan perbandingan 10:6 terhadap dispersi NLC. Sampel dihomogenkan dengan Ultra Turrax 12.000 rpm selama 10 menit. Proses pengeringan diatur menggunakan suhu inlet diatur pada 100°C dengan laju 5 mL/menit. Serbuk NLC-CP-OA-Mp yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk karakterisasi lebih lanjut.

### 3.3.5 Karakterisasi Produk Nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp

Produk NLC-CP-OA-Mp yang telah dikeringkan dengan *spray dryer* kemudian dikarakterisasi menggunakan FTIR, Potensial zeta, SEM, dan TEM.

#### a. *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*

Karakterisasi menggunakan FTIR dilakukan pada bilangan gelombang 4000  $\text{cm}^{-1}$  – 400  $\text{cm}^{-1}$  untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam produk hasil nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp. Karakterisasi ini dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen menggunakan spektrofotometer FTIR Shimadzu 8400. Ditimbang 150 mg pellet KBr dan 50 mg sampel NLC-CP-OA-Mp, kemudian sampel digerus hingga halus dan dimasukkan ke dalam *sample holder* lalu dipress dan dimasukkan ke dalam alat FTIR. Hasil spektra yang diperoleh kemudian dianalisis untuk melihat interaksi yang terjadi antara ekstrak *M. pruriens* dengan setil palmitat dan asam oleat sebagai matriks lipid.

#### b. Potensial Zeta

Analisis potensial zeta dilakukan untuk mengetahui muatan permukaan produk nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp dalam sediaan dispersi, pengukuran

dilakukan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) Horiba SZ-100 pada suhu uji 25°C dan *scattering angle* 90° di Laboratorium PPNN ITB.

**c. *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM)**

Karakterisasi menggunakan SEM dilakukan untuk mengetahui morfologi permukaan produk nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp. Karakterisasi ini dilakukan menggunakan alat SEM SU3500 di laboratorium PPNN ITB. Sebelum dianalisis, sampel dipreparasi dengan *coating* menggunakan lapisan tipis emas.

Selanjutnya, dilakukan karakterisasi dengan TEM yang bertujuan untuk mengetahui morfologi internal produk nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp. Preparasi sampel dilakukan dengan dispersi serbuk NLC-CP-OA-Mp menggunakan etanol, selanjutnya sampel dianalisis menggunakan alat TEM HT7700 di laboratorium PPNN ITB.

**3.3.6 Uji Efisiensi Pemuatan dan Kapasitas Pemuatan Obat Produk Nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp**

Nilai efisiensi pemuatan dihitung untuk menentukan persentase ekstrak *M. pruriens* yang berhasil terjerap dalam matriks nanoformulasi, sementara kapasitas pemuatan dihitung untuk mengetahui berat ekstrak *M. pruriens* yang terkandung dalam unit berat lipid.

Sebanyak 10 mL produk nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp dalam sediaan dispersi disentrifugasi selama 60 menit dengan kecepatan 20000 rpm. Selanjutnya, bagian supernatan diambil dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS (UV mini 240) pada panjang gelombang 280 nm. Efisiensi pemuatan dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$\% \text{Efisiensi Pemuatan} = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \times 100$$

dimana,

$C_0$  = konsentrasi *M. pruriens* mula-mula (ppm)

$C_t$  = konsentrasi *M. pruriens* sisa dalam supernatan (ppm)

Sementara itu, kapasitas pemuatan dihitung berdasarkan berat ekstrak *M. pruriens* yang tidak termuat dalam NLC-CP-OA-Mp.

$$\% \text{Kapasitas Pemuatan} = \frac{(W_0 - W_t)}{W_L} \times 100$$

dimana,

$W_0$  = berat *M. pruriens* mula-mula (mg)

$W_t$  = berat *M. pruriens* dalam supernatan (mg)

$W_L$  = berat total lipid yang digunakan (mg)

### 3.3.7 Uji Pelepasan Obat Produk Nanoformulasi NLC-CP-OA-Mp

Uji pelepasan obat dilakukan pada dua kondisi medium reseptor berbeda, yakni pH 1,2 dan pH 7,4. Larutan medium reseptor disiapkan seperti yang dilakukan Morales *et al.* (2021). Larutan pH 1,2 disiapkan dengan melarutkan 2 g NaCl dalam 1 L akuades dan ditambahkan HCl 37% hingga diperoleh larutan NaCl pH 1,2. Sementara itu, larutan pH 7,4 disiapkan dengan melarutkan 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dalam 650 mL akuades, kemudian ditambahkan 190 mL NaOH 0,2 M dan ditandabatkan hingga 1 L. Selanjutnya, ke dalam larutan ditambahkan NaOH 0,2 M hingga diperoleh pH 7,4.

Uji pelepasan obat pada masing-masing kondisi pH dilakukan dengan metode kantung dialisis (*dialysis bag*). Sebanyak 2 mg produk NLC-CP-OA-Mp dilarutkan dalam 3 mL medium reseptor dan dimasukkan ke dalam kantung dialisis. Selanjutnya, kantung dialisis direndam dalam 30 mL medium reseptor selama 7 jam pada suhu  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . Konsentrasi medium reseptor diukur setiap 60 menit menggunakan spektrofotometer UV-Vis (UV mini 240) pada  $\lambda = 276 \text{ nm}$  untuk pH 1,2 dan  $\lambda = 280 \text{ nm}$  untuk pH 7,4. Persentase pelepasan senyawa bioaktif ekstrak *M. pruriens* dari nanopartikel dihitung dengan persamaan berikut:

$$\% \text{Pelepasan obat} = \frac{C_t}{C_0} \times 100$$

dimana

$C_t$  = konsentrasi NLC-CP-OA-Mp pada waktu tertentu (ppm)

$C_0$  = konsentrasi NLC-CP-OA-Mp mula-mula (ppm)