

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis/Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan pendekatan kuantitatif yang bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pembentukan multikomponen kristal niklosamid menggunakan koformer asam kafeat, sakarin, dan piperin melalui metode *solvent drop grinding* terhadap karakteristik fisikokimia, profil disolusi, dan aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara T47D. Penelitian dilakukan secara bertahap meliputi pembentukan multikomponen kristal, karakterisasi menggunakan DSC, PXRD, FT-IR, dan SEM, pengujian disolusi, serta evaluasi aktivitas sitotoksik menggunakan metode *Microculture Tetrazolium Assay (MTT)*. Hasil yang diperoleh dari masing-masing kelompok perlakuan dibandingkan dengan niklosamid murni sebagai kontrol untuk menilai hubungan antara modifikasi struktur kristal, perbaikan karakteristik farmasetika, dan peningkatan aktivitas sitotoksik.

4.2 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Januari 2022 sampai juli 2025 di Laboratorium Kultur Sel Fakultas Farmasi Universitas Andalas (UNAND), Laboratorium Sentral Universitas Andalas (UNAND), Laboratorium Sentral Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang, dan Laboratorium Instrumen Jurusan Fisika dan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang (UNP).

4.3 Alat dan Bahan Penelitian

4.3.1 Alat Penelitian

Timbangan digital analitik (OHAUS PA224), lumpang dan stamper, desikator, (DSC) *Differential Scanning Calorimetry* (Type EVO-131, Setaram, France), *FT-IR Fourier Transform Infra Red* (Perkin Elmer, Jerman), Difraktometer sinar-X (Philips X'Pert Pro-PAN alitycal, Belanda), *Scanning Electron Microscope* (SEM) (Hitachi FlexSEM 1000, Japan), Spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV 1800, Japan), *Ultra high performance liquid chromatography* (UHPLC) (Thermo Fisher Scientific®, USA), pH meter (Mettler Toledo), alat uji disolusi (Copley Scientific NE4-COPD, USA), Inkubator CO₂ (NU-5100E, Nuaire, USA), flask culture 25 cm³ (Corning), 96 well plate, pipet tip 1000 µL, 200 µL, 10 µL, ELISA reader (Biorad), LAF (laminar air flow), autoklaf serta alat-alat yang menunjang pelaksanaan penelitian.

4.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi niklosamid (PT. Tatarasa Primatama, Indonesia), asam kafeat, sakarin, dan piperin (Merck/Sigma-Aldrich), etanol pro analisis (Novalindo, Indonesia), metanol grade HPLC (Merck, Germany), kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄), natrium hidroksida (NaOH), akuades, serta bahan lain yang digunakan untuk preparasi sampel, analisis HPLC, dan pengujian disolusi. Untuk pengujian aktivitas sitotoksik digunakan sel kanker payudara T47D yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, medium kultur RPMI-1640, *fetal bovine serum* (FBS),

penicillin-streptomycin, *phosphate buffered saline* (PBS), trypsin-EDTA, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Calbiochem, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Fisher Chemical, USA), serta bahan pendukung lainnya yang diperlukan selama proses kultur sel dan pengujian sitotoksik.

4.4 Pemeriksaan Bahan Baku

A. Niklosamid

Pemeriksaan bahan baku niklosamid dilakukan sesuai dengan yang tercantum pada British Pharmacopoeia, 2008 yang meliputi: pemerian, identifikasi, penetapan kadar, dan kelarutan.

- 1) Pemerian : berdasarkan organoleptisnya kristal halus, serbuk putih kekuningan atau kekuningan.
- 2) Identifikasi : pemeriksaan titik lebur menggunakan DSC dan sisa pemijaran dengan cara kawat tembaga diberi sampel niklosamid murni kemudian dipanaskan pada nyala api, amati hingga nyala api berubah menjadi warna hijau.
- 3) Penetapan Kadar : dilakukan pengujian dengan pelarut etanol pa menggunakan *Ultra-High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) atau Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi.

4) Uji kelarutan

Pemeriksaan kelarutan yang meliputi pemeriksaan berapa banyak pelarut yang dibutuhkan untuk melarutkan suatu sampel dengan menggunakan buret sebagai pengukur volume pelarut. Kelarutan niklosamid dilakukan dengan cara menimbang 10 mg niklosamid

lalu larutkan dalam 100 ml air; 10 mg niklosamid lalu larutkan dalam 1 ml aseton pro analysis; 10 mg niklosamid lalu larutkan dalam 0,1 ml etanol.

B. Asam Kafeat

Pemeriksaan asam kafeat dilakukan mengacu pada spesifikasi bahan baku yang tercantum dalam Farmakope Indonesia dan referensi resmi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia yang meliputi pemerian dan identifikasi bahan. Pemerian dilakukan secara organoleptis dengan mengamati bentuk, warna, dan karakteristik fisik bahan (Depkes RI, 2020).

C. Sakarin

Pemeriksaan sakarin dilakukan berdasarkan spesifikasi yang tercantum dalam referensi resmi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia meliputi pemerian, kelarutan, dan identifikasi bahan. Pemerian dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan karakteristik fisik sakarin (Depkes RI, 2020).

D. Piperin

Pemeriksaan piperin dilakukan berdasarkan spesifikasi bahan baku yang tercantum dalam referensi resmi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dan literatur standar bahan alam yang relevan. Pemerian dilakukan secara organoleptis dengan mengamati bentuk, warna, dan karakteristik fisik bahan (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

Seluruh hasil pemeriksaan bahan baku dibandingkan dengan spesifikasi referensi yang digunakan untuk memastikan kesesuaian identitas dan mutu bahan sebelum digunakan dalam proses pembentukan multikomponen kristal niklosamid (Depkes RI, 2020).

4.5 Pembentukan Multikomponen Kristal Niklosamid

4.5.1 Penentuan Formula Multikomponen Kristal

Tabel 3.1 Formula kokristal

No	Bahan	Formula Multikomponen Kokristal (mol)		
		Formula 4:6 (gram) (F1)	Formula 5:5 (gram) (F2)	Formula 6:4 (gram) (F3)
1	Niklosamid	1,3084	1,6355	1,9626
	Sakarin	1,0992	0,916	0,7328
2	Niklosamid	1,3084	1,6355	1,9626
	Asam Kafeat	1,0809	0,9008	0,7206
3	Niklosamid	1,3084	1,6355	1,9626
	Piperin	1,7120	1,4267	1,1413

4.5.2 Pembuatan Sistem Multikomponen Kristal Niklosamid

Sistem multikomponen kristal niklosamid dengan koformer sakarin, asam kafeat, dan piperin dibuat menggunakan metode *solvent drop grinding* (SDG). Niklosamid dan masing-masing koformer ditimbang sesuai rasio molar 4:6, 5:5, dan 6:4, kemudian dicampurkan secara homogen dalam lumpang porselen. Ke dalam campuran ditambahkan etanol sebagai pelarut sebanyak volume tertentu yang telah ditetapkan berdasarkan optimasi pendahuluan. Campuran selanjutnya digerus secara kontinu selama 15 menit pada suhu ruang hingga diperoleh massa yang homogen dan pelarut menguap sempurna. Hasil penggerusan kemudian dikeringkan dalam desikator yang berisi silika gel selama 24 jam untuk menghilangkan sisa pelarut. Serbuk yang diperoleh

disimpan dalam wadah tertutup rapat di dalam desikator hingga digunakan untuk pengujian lebih lanjut.

4.6 Karakterisasi Multikomponen Kristal

4.6.1 Analisis *Differential Scanning Calorimetry* (DSC)

Karakterisasi termal dilakukan menggunakan *Differential Scanning Calorimeter* (DSC) (EVO-131, Setaram, France) yang telah dikalibrasi. Sampel niklosamid, koformer (sakarín, asam kafeat, dan piperin), serta sistem multikomponen kristal yang diperoleh melalui metode *solvent drop grinding* ditimbang sebanyak ± 3 mg dan ditempatkan dalam aluminium pan tertutup. Analisis dilakukan pada rentang suhu 30-300°C dengan laju pemanasan 10°C/menit di bawah aliran gas nitrogen. Termogram yang diperoleh digunakan untuk mengevaluasi perubahan titik lebur, entalpi peleburan, dan kemungkinan terbentuknya fase padat baru.

4.6.2 Analisis *Powder X-Ray Diffraction* (PXRD)

Karakterisasi kristalinitas dilakukan menggunakan *Powder X-Ray Diffractometer* (X'Pert PRO, PANalytical, Netherlands). Sampel niklosamid, koformer (sakarín, asam kafeat, dan piperin), serta sistem multikomponen kristal ditempatkan pada sample holder dan diratakan secara hati-hati untuk meminimalkan orientasi preferensial. Analisis dilakukan menggunakan radiasi Cu-K α pada tegangan 40 kV dan arus 30 mA. Data difraksi direkam pada rentang sudut 2θ 5-40° dengan step size 0,02° dan kecepatan pemindaian 2°/menit. Difraktogram yang diperoleh digunakan untuk mengevaluasi perubahan pola difraksi, munculnya puncak baru, hilangnya puncak

karakteristik, serta kemungkinan terbentuknya fase kristal baru pada sistem multikomponen kristal dibandingkan dengan masing-masing komponen penyusunnya.

4.6.3 Analisis *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR)

Analisis gugus fungsi dilakukan menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectrophotometer* (Perkin Elmer, Jerman). Spektrum inframerah niklosamid, koformer, dan sistem multikomponen kristal direkam pada rentang bilangan gelombang $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ menggunakan metode *Attenuated Total Reflectance* (ATR). Spektrum yang diperoleh digunakan untuk mengevaluasi kemungkinan terjadinya interaksi intermolekuler, terutama ikatan hidrogen dan interaksi antargugus fungsi yang terlibat dalam pembentukan sistem multikomponen kristal.

4.6.4 Analisis *Scanning Electron Microscopy* (SEM)

Karakterisasi morfologi permukaan dilakukan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (FlexSEM 1000, Hitachi, Japan). Sampel ditempatkan pada *specimen stub* menggunakan *carbon tape* dan dilapisi lapisan konduktif tipis berupa emas melalui proses *sputter coating* sebelum pengamatan. Analisis dilakukan pada beberapa tingkat perbesaran yang sesuai menggunakan tegangan akselerasi 5-15 kV. Mikrograf yang diperoleh digunakan untuk mengevaluasi perubahan bentuk partikel, habit kristal, dan morfologi permukaan sampel setelah pembentukan sistem multikomponen kristal dibandingkan dengan bahan penyusunnya.

4.7 Penetapan Kadar Niklosamid Menggunakan UHPLC

Penetapan kadar niklosamid dilakukan menggunakan *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) dengan kolom C18 ($4,6 \times 150$ mm). Fase gerak berupa campuran asetonitril dan aquabidest (30:70, v/v) dengan laju alir 0,5 mL/menit. Deteksi dilakukan pada panjang gelombang 333,50 nm menggunakan detektor UV dan volume injeksi 10 μ L. Larutan baku niklosamid dibuat dengan melarutkan 10 mg niklosamid dalam metanol hingga volume 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi 100 μ g/mL. Kurva kalibrasi dibuat pada rentang konsentrasi 5-100 μ g/mL dan digunakan untuk menentukan hubungan antara konsentrasi dan luas area kromatogram (AUC). Kesesuaian metode dievaluasi melalui pengujian linearitas, akurasi, dan presisi sebelum digunakan untuk penetapan kadar niklosamid. Kadar niklosamid dalam sampel dihitung berdasarkan persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi.

4.8 Penetapan Profil disolusi

Profil disolusi niklosamid murni dan sistem multikomponen kristal niklosamid-sakarin, niklosamid-asam kafeat, serta niklosamid-piperin ditentukan menggunakan metode dayung (USP Apparatus II) dengan medium disolusi berupa dapar fosfat pH 7,4 yang mengandung tween 80 sebesar 0,2% (v/v). Sebelum pengujian disolusi dilakukan, panjang gelombang serapan maksimum niklosamid ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang 200-400 nm, kemudian dibuat kurva kalibrasi menggunakan beberapa konsentrasi larutan baku niklosamid dalam medium disolusi untuk memperoleh persamaan regresi yang digunakan dalam penetapan kadar

niklosamid terdisolusi. Pengujian disolusi dilakukan dalam 900 mL medium pada suhu $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ dengan kecepatan putar 100 rpm. Sebanyak 20 mg niklosamid murni atau sistem multikomponen kristal yang setara dengan 20 mg niklosamid dimasukkan ke dalam labu disolusi, kemudian sampel medium diambil sebanyak 5 mL pada menit ke-5, 10, 15, 30, 45, 60, 80, 100, dan 120 menit. Setiap volume sampel yang diambil segera diganti dengan medium disolusi segar yang memiliki volume dan suhu yang sama untuk mempertahankan kondisi sink selama pengujian. Sampel yang diperoleh dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum niklosamid, kemudian konsentrasi niklosamid yang terdisolusi dihitung berdasarkan persamaan regresi dari kurva kalibrasi dan dinyatakan sebagai persentase kadar terdisolusi terhadap jumlah teoritis niklosamid. Selanjutnya, profil disolusi disajikan sebagai hubungan antara persentase niklosamid terdisolusi dan waktu, serta dievaluasi menggunakan parameter persentase terdisolusi untuk membandingkan performa disolusi niklosamid murni dengan masing-masing sistem multikomponen kristal.

4.9 Uji Sitotoksitas (Metode *MTT Assay*)

1. Kultur dan Penanaman Sel T47D

Sel kanker payudara T47D dipelihara dalam medium RPMI-1640 yang disuplementasi dengan 10% *fetal bovine serum* (FBS) dan 1% *penicillin-streptomycin*. Sel diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator dengan atmosfer 5% CO_2 dan kelembapan terkontrol. Sel yang berada pada fase pertumbuhan logaritmik dipanen menggunakan tripsin-EDTA, kemudian dihitung jumlahnya menggunakan

hemositometer. Suspensi sel disiapkan hingga diperoleh kepadatan 1×10^4 sel/sumuran, kemudian sebanyak 100 μL suspensi sel dimasukkan ke dalam setiap sumuran mikrolat 96 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam untuk memungkinkan sel melekat dan beradaptasi sebelum perlakuan.

2. Perlakuan Sampel Uji

Sampel yang diuji terdiri atas niklosamid murni, sistem multikomponen kristal niklosamid-sakarin, niklosamid-asam kafeat, dan niklosamid-piperin. Masing-masing sampel dilarutkan terlebih dahulu dalam dimetil sulfoksida (DMSO) untuk memperoleh larutan stok, kemudian diencerkan secara bertingkat menggunakan medium RPMI-1640 hingga diperoleh seri konsentrasi akhir 0,1; 1; 10; dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi akhir DMSO pada seluruh kelompok perlakuan dijaga tidak melebihi 0,1% (v/v) untuk menghindari efek sitotoksik pelarut terhadap sel. Setelah sel T47D diinkubasi selama 24 jam dan melekat pada dasar sumuran, medium kultur dibuang secara hati-hati, kemudian ditambahkan 100 μL medium yang mengandung sampel uji ke masing-masing sumuran sesuai konsentrasi yang telah ditentukan. Selanjutnya mikrolat diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dalam atmosfer yang mengandung 5% CO_2 . Sel yang hanya diberi medium kultur digunakan sebagai kontrol sel (kontrol negatif), sedangkan sel yang diberi medium kultur mengandung 0,1% DMSO tanpa sampel uji digunakan sebagai kontrol pelarut/medium (*vehicle control*).

3. Uji MTT dan Pengukuran Viabilitas Sel

Setelah masa perlakuan selesai, ke dalam setiap sumuran ditambahkan 10 μ L larutan MTT (5 mg/mL dalam PBS steril), kemudian diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang masih hidup akan mereduksi garam tetrazolium menjadi kristal formazan berwarna ungu melalui aktivitas enzim dehidrogenase mitokondria. Setelah inkubasi selesai, medium kultur dibuang secara hati-hati dan kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dengan penambahan 100 μ L DMSO ke setiap sumuran. Plat kemudian dikocok perlahan hingga kristal larut sempurna dan terbentuk larutan homogen. Absorbansi masing-masing sumuran diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 550 nm.

$$\text{viabilitas sel (\%)} = \frac{(\text{Absorban perlakuan}) - (\text{absorban media atau blanko})}{(\text{absorban sel atau kontrol}) - (\text{absorban media atau blanko})} \times 100\%$$

4. Penentuan Nilai IC₅₀

Hubungan antara konsentrasi sampel dan persentase viabilitas sel dianalisis menggunakan metode nonlinear regression dengan model *sigmoidal dose-response curve*. Nilai IC₅₀ ditentukan sebagai konsentrasi sampel yang mampu menghambat pertumbuhan 50% sel kanker T47D dibandingkan dengan kontrol sel. Nilai IC₅₀ yang lebih rendah menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi. Data hasil pengujian disajikan sebagai rerata $\pm$ simpangan baku dari tiga data.

4.10 Analisis Data

Analisis Data hasil karakterisasi fisikokimia yang diperoleh dari analisis DSC, PXRD, FT-IR, dan SEM dianalisis secara deskriptif untuk mengevaluasi perubahan karakteristik padatan dan mengonfirmasi pembentukan sistem multikomponen kristal dibandingkan dengan niklosamid murni dan masing-masing koformer. Data kuantitatif yang meliputi persentase niklosamid terdisolusi, persentase viabilitas sel, dan nilai IC_{50} disajikan sebagai rerata $\pm$ simpangan baku dari sedikitnya tiga data uji. Sebelum analisis statistik, data diuji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitas varians menggunakan *Brown-Forsythe test*. Data yang memenuhi asumsi parametrik dianalisis menggunakan *One-Way and Two-Way Analysis of Variance* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD*. Perbedaan antar kelompok dinyatakan bermakna pada nilai $p < 0,05$.

