

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati Program Studi Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia untuk proses nanoformulasi, uji efisiensi pemuatan, uji kapasitas pemuatan dan uji pelepasan obat menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Proses ultrasentrifugasi dilakukan di Laboratorium Karakterisasi Lanjut, BRIN Bandung. Karakterisasi PSA, ZP, SEM, dan TEM dilakukan di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi Institut Teknologi Bandung. Pengeringan sampel menggunakan *spray dry* dilakukan di Laboratorium Uji Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Universitas Gadjah Mada. Karakterisasi FTIR di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI. Lalu, penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret hingga Juli 2023.

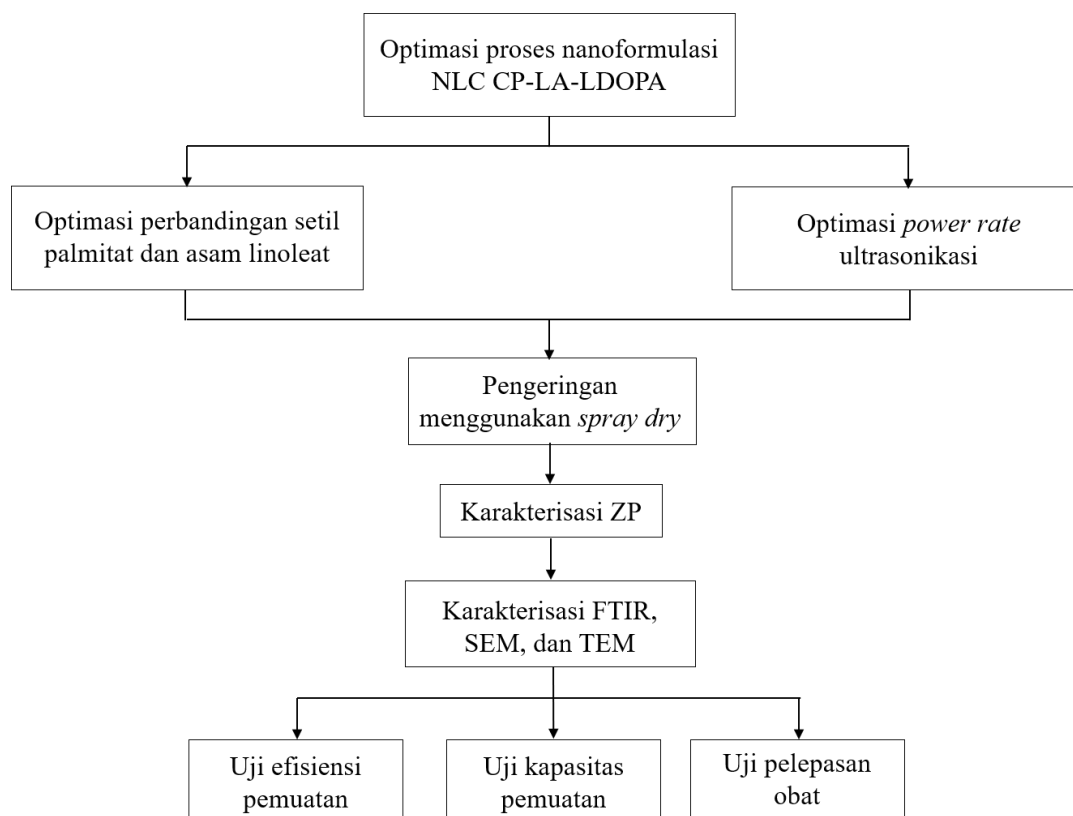
3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu neraca analitik Mettler Toledo, *Ultrasonic Cell Disruptor* (UCD-250) Biobase, *hot plate*, pH meter Mettler Toledo, gelas kimia 200 ml, gelas ukur 100 ml, pipet ukur 5 ml dan 1 ml, spatula, batang pengaduk, *stirrer*, labu ukur 1 L, 250 ml, 50 ml dan 10 ml, *dialysis bag*, kaca arloji, termometer, statif, klem dan tali. Selain itu, digunakan beberapa instrument untuk karakterisasi seperti FTIR, SEM (*Scanning Electron Microscope*) SU3500, TEM (*Transmission Electron Microscope*) HT7700, PSA (*Particle Size Analyzer*) Horiba SZ-100, *spray dryer* Buchi Mini *Spray Dryer* B-290, *ultrahigh centrifuge* CS 150 NX dan spektrometer UV-Vis. Sedangkan bahan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu senyawa L-dopa, setil palmitat, asam linoleat, aqua DM, Tween 80, NaCl, HCl 37%, dan KH_2PO_4 .

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa tahapan yaitu, formulasi NLC menggunakan setil palmitat dan asam linoleat, pengukuran ukuran partikel, nilai

polydispersity index (PI) dan *zeta potential* (ZP), uji efisiensi pemuatan, uji kapasitas pemuatan, uji pelepasan obat dan karakterisasi NLC yang sudah kering menggunakan FTIR, SEM dan TEM seperti yang tertera pada Gambar 3.1.



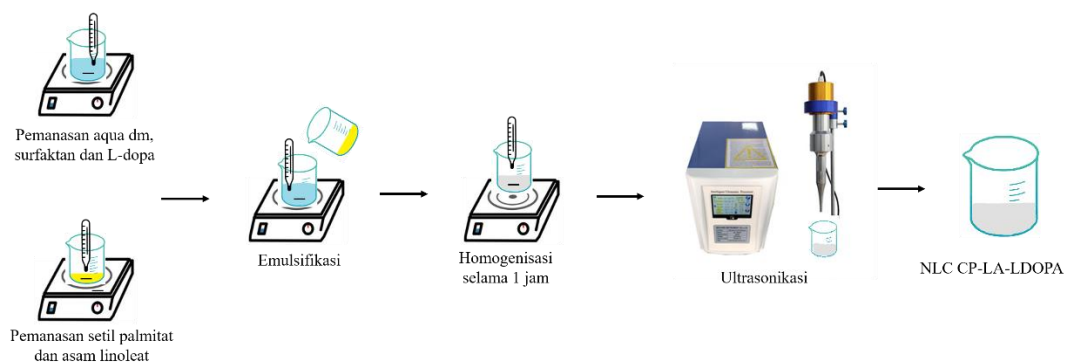
Gambar 3.1. Tahapan penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahap Pembuatan Nanoformulasi L-dopa menggunakan NLC berbasis Setil Palmitat dan Asam Linoleat

Nanoformulasi L-dopa menggunakan *nanostructured lipid carrier* berbasis setil palmitat dan asam linoleat dilakukan menggunakan metode homogenisasi panas dan ultrasonikasi (Sadegh *et al.*, 2018). Fasa lipid dibuat dengan cara menimbang lipid padat dan lipid cair sesuai dengan jumlah yang tertera pada Tabel 3.1 dan dipanaskan menggunakan *hotplate* sambil diaduk menggunakan *stirrer* pada suhu 60°C. Kemudian, ditimbang juga L-dopa dan Tween 80 masing-masing sebesar 0,1750 gram dan 2 gram. Lalu, ditimbang juga aqua dm hingga total keseluruhan bahan baku NLC sebanyak 100 gram. Fasa air diperoleh dengan cara aqua dm dipanaskan hingga 60°C, kemudian ditambahkan Tween 80 hingga larut

menggunakan *stirrer* dan dimasukkan L-dopa hingga larut. Fasa air dimasukkan perlahan-lahan ke dalam fasa lipid dengan kecepatan *stirrer* konstan pada 1500 rpm. Jika semua fasa air sudah dimasukkan, maka proses homogenisasi dilakukan selama 1 jam. Setelah 1 jam, sampel NLC dimasukkan ke dalam ultrasonikator selama 20 menit dan *power rate* diatur sesuai dengan variabel yang ditentukan. Sampel NLC yang didapatkan didiamkan selama 1 hari di suhu ruang, sebelum dimasukkan ke dalam *chiller*. Skema proses nanoformulasi NLC CP-LA-LDOPA ditunjukkan oleh Gambar 3.2. Formulasi NLC yang dibuat ditunjukkan oleh Tabel 3.1.



Gambar 3.2. Skema proses nanoformulasi NLC CP-LA-LDOPA

Tabel 3.1. Formulasi *nanostructured lipid carrier*

Ket	CP : AL	Massa CP (g)	Massa LA (g)	L-dopa (g)	Tween 80 (g)	Aqua DM (g)
F 1	8:2	2,8	0,7	0.1750	2	Add to 100
F 2	7:3	2,45	1,05	0.1750	2	Add to 100
F 3	6:4	2,1	1,4	0.1750	2	Add to 100
F 4	5:5	1,75	1,75	0.1750	2	Add to 100
F 5	4:6	1,4	2,1	0.1750	2	Add to 100

Ket: CP = Setil Palmitat, LA = Asam Linoleat

3.4.2 *Spray Dry* Nanoformulasi L-dopa menggunakan *nanostructured lipid carrier* berbasis setil palmitat dan asam linoleat

Produk NLC dikeringkan menggunakan Buchi Mini *Spray Dryer* B-290. Sebelum pengeringan, sampel ditambahkan NaCl dengan perbandingan penyalut terhadap NaCl sebesar 6:10. Sampel diaduk menggunakan Ultra Turrax pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Metode pengeringan *spray dryer* ini

mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Xia *et al* (2016). Suhu inlet diatur pada suhu 100°C dan suhu inletnya pada suhu 50-55°C. Kemudian *feeding flow rate* sebesar 5 ml/menit.

3.4.3 Karakterisasi Nanoformulasi L-dopa menggunakan *nanostructured lipid carrier* berbasis setil palmitat dan asam linoleat

Nanoformulasi L-dopa dikarakterisasi menggunakan FTIR dengan rentang panjang gelombang 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} . Karakterisasi nanoformulasi dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam produk hasil nanoformulasi. Proses karakterisasi ini dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia FPMIPA UPI.

Selain itu, nanoformula yang dihasilkan akan dikarakterisasi untuk ditentukan ukuran partikel, nilai *polydispersity index* (PI), dan *zeta potential* (ZP). Penentuan nilai PI dilakukan untuk menentukan distribusi ukuran partikel dan juga homogenitas larutan. Lalu, nilai ZP dapat memberikan informasi mengenai kestabilan jangka panjang dilihat dari potensi terjadinya agregat. Pengukuran ukuran partikel, nilai PI dan ZP dilakukan di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi Institut Teknologi Bandung.

Nanoformula yang dihasilkan juga akan dikarakterisasi menggunakan SEM dan TEM. Analisis SEM mengungkapkan morfologi permukaan. Sedangkan analisis TEM dapat menggambarkan struktur partikel dan juga memberikan informasi mengenai diameter partikel. Karakterisasi menggunakan SEM dan TEM dilakukan di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi Institut Teknologi Bandung.

3.5 Tahap Pengujian

3.5.1 Efisiensi Pemuatan dan Kapasitas Pemuatan

Efisiensi pemuatan dan kapasitas pemuatan dilakukan dengan mengacu pada metode penelitian yang dilakukan oleh Nallasamy *et al* (2020). Efisiensi pemuatan dapat memberikan informasi mengenai konsentrasi L-dopa yang termuat dalam jumlah total bahan-bahan yang ada di suatu formulasi. Efisiensi pemuatan dapat diperoleh dengan cara menghitung perbedaan konsentrasi L-dopa bebas hasil ultrasentrifugasi terhadap konsentrasi awal sampel. Sedangkan, kapasitas pemuatan

mengacu pada jumlah L-dopa yang termuat pada total lipid yang digunakan. Kapasitas pemuatan dapat dilakukan dengan cara menghitung massa L-dopa bebas pada supernatant hasil ultrasentrifugasi. Setelah proses nanoformulasi, sampel disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 100000 rpm dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 220 nm. Kurva kalibrasi diperoleh dengan menggunakan deret konsentrasi L-dopa (5, 10, 15, 20, dan 25 ppm) dalam akuades. Supernatan hasil ultrasentrifugasi juga diukur pada panjang gelombang yang sama. Semakin besar persentase efisiensi pemuatan dan kapasitas pemuatan berarti bahwa obat yang termuat di dalam matriks lipid jauh lebih besar dan optimal.

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

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

Dimana C_o adalah konsentrasi awal sampel, C_t adalah konsentrasi L-dopa bebas yang terdapat pada supernatant hasil ultrasentrifugasi, W_o merupakan massa L-dopa yang terkandung dalam sampel, W_t ialah massa dari L-dopa bebas yang terkandung pada supernatant hasil ultrasentrifugasi, serta W_L adalah massa total lipid yang ditambahkan dalam proses formulasi.

3.5.2 Uji Pelepasan Obat

Pengujian pelepasan obat mengacu pada metode penelitian yang telah dilakukan oleh Ajiboye *et al.* (2021) dengan menggunakan metode *dialysis bag* dan adanya sedikit modifikasi. *Dialysis bag* dipotong sepanjang 10 cm dan direndam ke dalam akuades selama 10 menit hingga dapat terbuka. Proses pelepasan obat dilakukan pada dua kondisi berbeda, yaitu pada larutan pH 1,2 dan larutan buffer fosfat 7,4. Larutan pH 1,2 dibuat dengan cara melarutkan 2 gram NaCl dalam 1 liter akuades, kemudian ditambahkan HCl 37% hingga diperoleh pH larutan sebesar 1,2. Sedangkan larutan buffer fosfat pH 7,4 dibuat dengan cara melarutkan 6,8 gram KH_2PO_4 dalam 650 ml akuades, lalu ditambahkan 0,2 M NaOH sebanyak 190 ml dan disesuaikan pH nya hingga 7,4. Sebanyak 2 mg produk nanoformulasi L-dopa yang sudah kering masing-masing dilarutkan dalam larutan pH 1,2 dan larutan buffer

Salma Rahmadianti, 2023

NANOFORMULASI L-DOPA MENGGUNAKAN NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER BERBASIS SETIL PALMITAT DAN ASAM LINOLEAT SEBAGAI KANDIDAT OBAT PARKINSON

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

fosfat 7,4 sebanyak 3 ml. Satu sisi *dialysis bag* diikat menggunakan tali, lalu larutan sampel dimasukkan kedalam *dialysis bag* dan sisi lain *dialysis bag* diikat juga menggunakan tali. Setelah itu, *dialysis bag* yang berisi sampel dimasukkan ke dalam gelas kimia berisi larutan pH 1,2 dan larutan buffer fosfat 7,4 sebanyak 30 ml pada suhu konstan sebesar 37°C. Pada interval waktu 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 jam, larutan pH 1,2 dan larutan buffer fosfat 7,4 diambil dan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 229 nm untuk pH 1,2 dan panjang gelombang 226 nm untuk pH 7,4 dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Kurva kalibrasi diperoleh dengan menggunakan deret konsentrasi L-dopa (5, 10, 15, 20, dan 25 ppm) dalam masing-masing larutan pH 1,2 dan larutan buffer fosfat 7,4. NLC harus dilepaskan secara perlahan agar jumlah obat yang masih terdapat pada matriks lipid dalam jumlah besar, sehingga obat akan terlindungi sebelum mencapai sel target atau otak.

$$\text{Pelepasan Obat (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi release}}{\text{Konsentrasi sampel yang digunakan}} \times 100$$