

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan selama ± 6 bulan terhitung dari Februari 2024 hingga Agustus 2024. Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati Program Studi Kimia, FPMIPA UPI untuk proses preparasi hingga proses penelitian. Proses *spray dry* produk NLC-DCL dilakukan di lab uji Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian (TPHP) Universitas Gadjah Mada. Proses *ultrahigh centrifuge* untuk uji efisiensi enkapsulasi dan kapasitas muatan dan analisis zeta potensial dilakukan di Badan Riset dan Inovasi Nasional di Cisu, Bandung. Analisis PSA dan TEM dilakukan di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi Institut Teknologi Bandung (PPNN ITB). Pengujian karakterisasi menggunakan FTIR dan UV-Vis dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu neraca analitik, *magnetic stirrer*, *hot plate*, sonikator, dan perlengkapan gelas lainnya. Alat instrument yang digunakan untuk karakterisasi diantaranya adalah instrument *Particle Size Analyzer (PSA)*, *Fourier Transform Infra-Red (FTIR)*, spektroskopi UV-Vis, *Transmission Electron Microscope (SEM)*, *ultra-high centrifuge* dan *spray dryer*.

3.2.2. Bahan

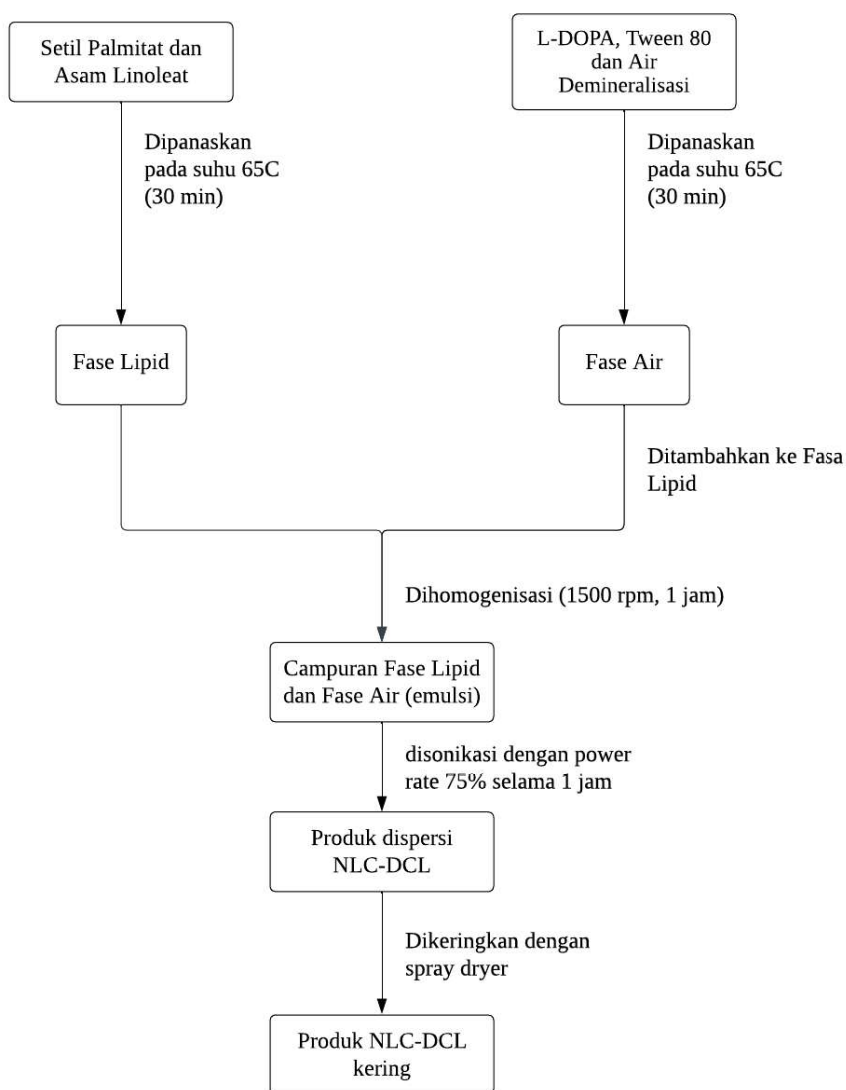
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah L-DOPA murni, aquades, aqua demineralisasi, setil palmitat, asam linoleat, dan tween 80 (surfaktan) untuk membuat formulasi NLC. Pada proses *spray drying* digunakan NaCl sebagai eksipien. Digunakan etanol sebagai pendispersi untuk proses analisis TEM. Digunakan larutan HCL 12 M dan padatan NaOH untuk membuat larutan pH 1,2.

Digunakan padatan K_2HPO_4 dan NaOH 0,2 M untuk membuat larutan buffer fosfat dengan pH 7,4. Kedua larutan buffer akan digunakan sebagai media dalam uji *drug release*.

3.3. Tahapan Penelitian

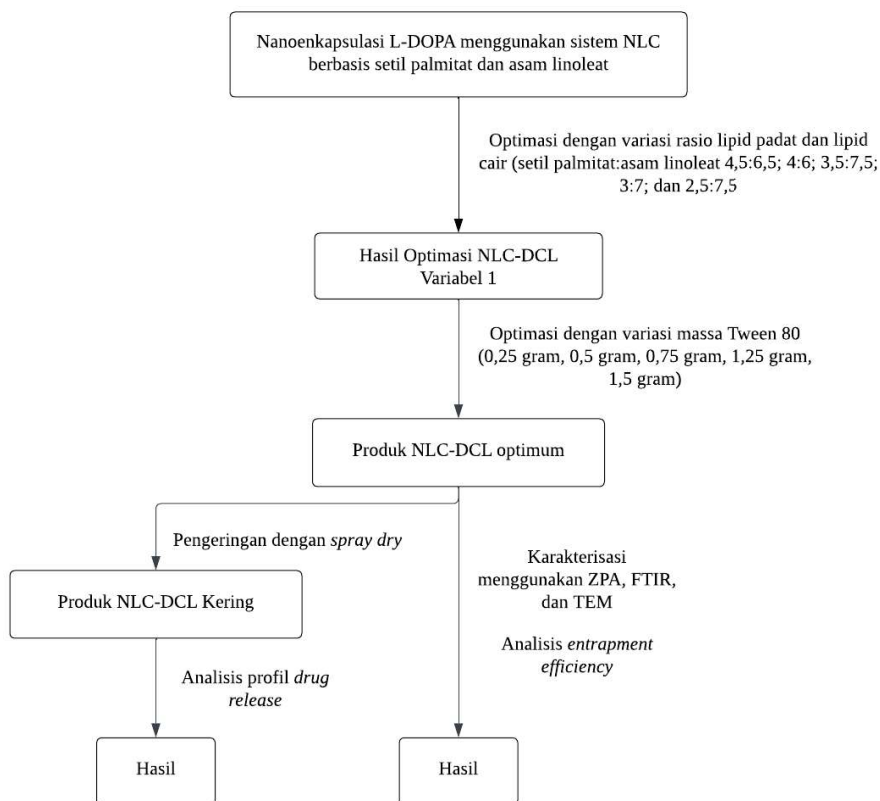
Tahapan penelitian ini meliputi optimasi sintesis NLC-DCL, karakterisasi hasil sintesis NLC, uji efisiensi enkapsulasi, dan uji pelepasan.

Bagan alir proses sintesis NLC yang dapat dilihat pada **Gambar 9**.



Gambar 9. Bagan alir sintesis NLC-DCL

Adapun tahapan penelitian ditampilkan dalam bagan alir pada **Gambar 10**.



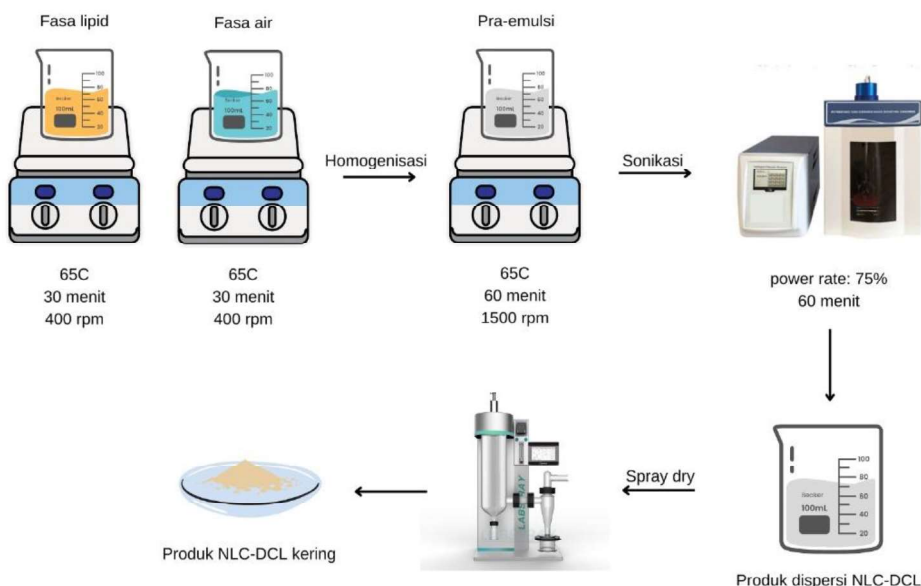
Gambar 10. Bagan alir tahapan penelitian

3.4. Prosedur Percobaan

3.4.1. Tahap Nanoformulasi NLC-DCL

Pembuatan NLC untuk mengkapsulasi L-DOPA dilaksanakan melalui metode homogenisasi dan ultrasonifikasi, sebagaimana dijelaskan oleh Izza et al., 2021. Fasa minyak dipersiapkan menggunakan Setil Palmitat dan Asam Linoleat, sementara fasa air dibuat dengan Tween 80 dan air demineralisasi. Kedua fase dipanaskan pada suhu 65°C selama 30 menit sambil diaduk. Larutan L-DOPA disiapkan dengan mencampurkan L-DOPA murni dengan aqua demineralisasi dan dipanaskan pada 30°C selama 10 menit. Larutan L-DOPA yang telah disiapkan ditambahkan ke dalam fasa minyak dan kemudian dihomogenisasi. Fasa air kemudian ditambahkan ke dalam campuran fasa minyak dan larutan L-DOPA, kemudian disonikasi dengan *power rate* 75%. Selanjutnya, produk NLC yang dihasilkan dikarakterisasi menggunakan spektroskopi FTIR, SEM, dan TEM.

Skema tahapan nanoformulasi NLC-DCL dapat dilihat pada **Gambar 11**.



Gambar 11. Skema nanoformulasi NLC-DCL

3.4.2. Optimasi Sintesis NLC-DCL

Tahap optimasi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan komposisi sintesis NLC yang paling baik dari ukuran partikel, indeks polidispersitas, dan homogenitas. Tahap optimasi dilakukan dengan membuat variasi komposisi NLC yang digunakan pada tahap sintesis seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 1** berikut.

Tabel 1. Optimasi variasi perbandingan lipid pada formulasi NLC-DCL

Formulasi	L-DOPA (g)	CP:AL	Tween 80 (g)	Waktu ultrasonikasi (menit)
1.1	0,0875	4,5:6,5	1	60
1.2	0,0875	4:6	1	60
1.3	0,0875	3,5:6,5	1	60
1.4	0,0875	3:7	1	60
1.5	0,0875	2,5:7,5	1	60

CP: Setil Palmitat, AL: Asam Linoleat

Optimasi juga dilakukan pada massa Tween 80 yang digunakan pada tahanan nanoenkapsulasi, formulasi yang digunakan merupakan hasil terbaik dari optimasi perbandingan lipid. Variasi konsentrasi tween 80 ditunjukkan pada **Tabel 2** berikut.

Tabel 2. Optimasi variasi massa Tween 80 pada formulasi NLC-DCL

Formulasi	L-DOPA (g)	CP:AL	Tween 80 (g)	Waktu ultrasonikasi (menit)
2.1	0,0875	4:6	0,25	60
2.2	0,0875	4:6	0,5	60
2.3	0,0875	4:6	0,75	60
2.4	0,0875	4:6	1,25	60
2.5	0,0875	4:6	1,5	60

CP: Setil Palmitat, AL: Asam Linoleat

3.4.3. Penentuan *Entrapment Efficiency* NLC-DCL

Pengujian *entrapment efficiency* yang digunakan telah diadaptasi dari studi yang dilakukan oleh (Rabima & Sari, 2019). Evaluasi efisiensi pemuatan L-DOPA dilakukan dengan mengambil produk dispersi NLC dan disentrifugasi pada 100.000 rpm selama 60 menit. Bagian supernatan dipisahkan, kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 280,5 nm.

Entrapment efficiency ditentukan dengan mengurangi konsentrasi senyawa dalam ekstrak yang digunakan saat nanoenkapsulasi dengan filtrat yang tersisa setelah proses nanoenkapsulasi selesai dan dibagi dengan konsentrasi senyawa dalam ekstrak yang digunakan seperti yang ditunjukkan pada persamaan berikut.

$$\text{Entrapment Efficiency (\%)} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\%$$

dimana C_0 merupakan konsentrasi senyawa dalam ekstrak yang digunakan saat nanoenkapsulasi dan C_t merupakan konsentrasi filtrat yang tersisa setelah proses nanoenkapsulasi selesai.

3.4.4. Penentuan Profil *Drug Release* NLC-DCL

Profil drug release ditentukan secara *in vitro* melalui penerapan metode *dialysis bag* yang diambil dari penelitian Ajiboye et al., 2021. Pengujian dilaksanakan pada kondisi pH 7,4 dan 1,2. Secara singkat, buffer fosfat pH 7,4 disiapkan dengan melarutkan 6,8 gram KH_2PO_4 dalam 650 mL aquades, lalu ditambahkan 0,2 M NaOH dan diukur volumenya dalam labu ukur 1 L. Larutan NaCl pH 1,2 dibuat dengan menimbang 2 gram NaOH dan melarutkannya dalam 1 L aquades, kemudian menambahkan sekitar ± 7 mL HCl 12 M. Kedua larutan pH

ini diubah menjadi deret standar dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 279,5 nm (pH 7,4) dan 279,5 nm (pH 1,2). Selanjutnya, data absorbansi digunakan untuk membuat kurva kalibrasi.

Uji *drug release* dilaksanakan dengan menimbang sampel NLC-DCL sebanyak 2 mg. Selanjutnya, sampel larutkan dalam 3 mL larutan pH 1,2, dan kemudian dimasukkan ke dalam kantung dialisis. Kantung yang berisi sampel tersebut selanjutnya direndam dalam 30 mL larutan pH 7,4 pada suhu 37°C. Proses perendaman dilakukan selama 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 jam. Setelah itu, larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Persentase *drug release* dihitung menggunakan persamaan yang dinyatakan berikut,

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

dimana D (%) adalah jumlah obat yang dilepas, konsentrasi drug release 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).

Selanjutnya, hasil dari perhitungan *drug release* selama 7 jam dimasukkan ke dalam persamaan kinetika orde nol, orde satu, Higuchi, dan Korsmeyer-Peppars. Persamaan untuk setiap model pelepasan dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Persamaan model *drug release*

Model Kinetika	Persamaan
Orde Nol	$Mt/M_0 = k_0.t$
Orde Satu	$\ln Mt/M_0 = k_1.t$
Higuchi	$Mt/M_0 = k_H.t^{1/2}$
Korsmeyer-Peppars	$Mt/M_0 = k.t^n$

Kinetika *drug release* dapat ditentukan dengan melihat harga r^2 pada regresi linear yang didapatkan dari masing-masing model pelepasan. Apabila r^2 mendekati satu, maka dianggap kinetiknya mengikuti model pelepasan tersebut. Pada model pelepasan Korsmeyer-Peppars, kinetika pelepasan dilihat dari harga n atau

eksponen pelepasannya. Untuk kasus tablet berbentuk silinder, nilai $0,45 \leq n$ maka pelepasan zat aktif sesuai dengan mekanisme difusi Fickian, $0,45 < n < 0,89$ maka pelepasan zat aktif mengikuti mekanisme difusi non-Fickian, $n = 0,89$ menunjukkan pelepasan zat aktif dengan mekanisme *Case II transport*, dan $n > 0,89$ menunjukkan pelepasan dengan mekanisme *Super case II transport* (Pertiwi, 2015).