

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian berlangsung selama tujuh bulan, dari mulai bulan Februari-Agustus 2024. Riset ini berlangsung di Laboratorium Riset Kimia Hayati Program Studi Kimia FPMIPA UPI untuk proses pembuatan NLC sampai pelaksanaan penelitian. Pengujian karakterisasi *Particle Size Analyzer* (PSA), zeta potensial dan *Transmission Electron Microscope* (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. Sementara itu, pengujian karakterisasi ultrasentrifugasi dilakukan di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi Institut Teknologi Bandung (PPNN ITB) dan pengeringan sampel menggunakan metode *spray dryer* dilaksanakan di Laboratorium Uji Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Universitas Gadjah Mada.

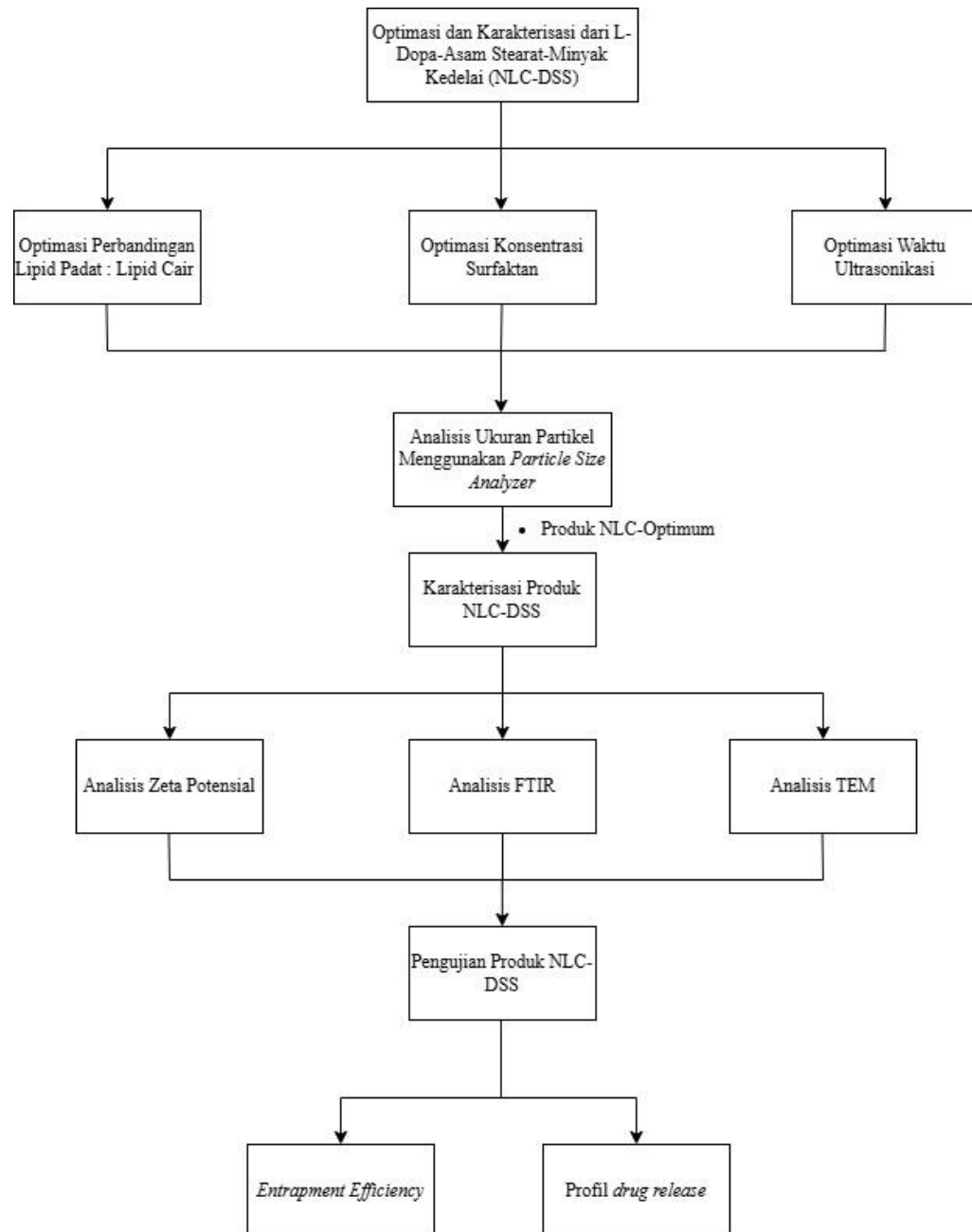
3.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, *hot plate*, *Ultrasonic Cell Disruptor Biobase* (UCD-250), gelas kimia, pipet, kaca arloji, termometer, *water bath*, spatula, klem, statif, batang pengaduk, magnetic stirrer, dan labu ukur. Sedangkan untuk instrumen yang digunakan dalam karakterisasi adalah instrumen *Particle Size Analyzer* (PSA), ultrasentrifugasi, *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR), spektrofotometer UV-Vis, *Transmission Electron Microscope* (TEM).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi L-Dopa, asam stearat, minyak kedelai, tween 80 dan aqua DM untuk membuat NLC. Pada proses *spray drying* digunakan NaCl untuk eksipien. Bahan lain yang digunakan adalah KH_2PO_4 , akuades, NaOH, dan HCl untuk pengujian *drug release*.

3.3. Tahapan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa tahapan diantaranya formulasi NLC menggunakan asam stearat dan minyak kedelai (NLC-DSS), pengukuran ukuran partikel, *polydispersity index* (PI), *zeta potential* (ZP), uji *entrapment efficiency*, uji kapasitas pemuatan, uji *drug release* dan karakterisasi NLC menggunakan FTIR dan TEM seperti pada gambar 3.1.

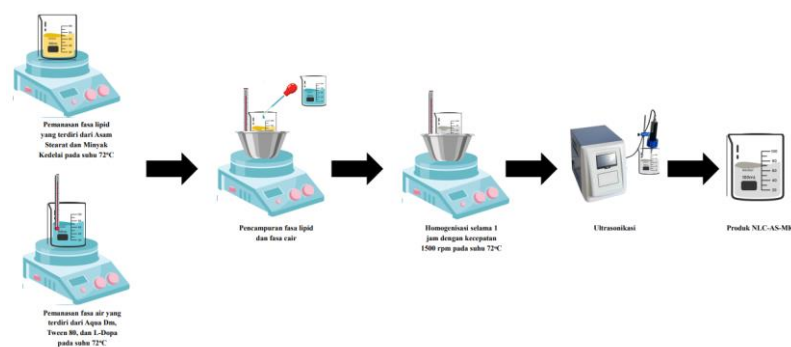


Gambar 3.1. Tahapan Penelitian

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan NLC dari L-DOPA-Asam stearat-Minyak Kedelai (NLC-DSS)

Pembuatan NLC-DSS menggunakan metode homogenisasi panas dan ultrasonikasi. Fase lipid dibuat dari asam stearat dan minyak kedelai dengan berbagai perbandingan sesuai pada tabel 2, dipanaskan menggunakan *hot plate* sambil diaduk dengan *stirrer* pada suhu 72°C . kemudian ditimbang juga L-dopa dan Tween 80 masing masing 0,0875 gram dan 1 gram. Lalu ditambahkan juga aqua dm hingga total keseluruhan bahan baku NLC sebanyak 50 mL. Fase air diperoleh dengan cara, aqua dm dipanaskan hingga 72°C , kemudian ditambah tween 80 hingga larut menggunakan *stirrer* dan dimasukkan L-dopa hingga larut. Fase air ditambahkan kedalam fase lipid setetes demi setetes dengan suhu yang dijaga konstan sekitar 72°C sambil diaduk selama 1 jam dengan kecepatan *stirrer* 1500 rpm. Kemudian didapat emulsi dan disonikasi menggunakan *probe ultrasonicator* selama 40 menit dengan amplitudo ultrasonikasinya sebesar 75%. Pada proses optimasi, produk nanoformulasi hasil ultrasonikasi diukur menggunakan instrumen PSA sehingga diperoleh ukuran partikel produk NLC dalam sediaan dispersi. Adapun skema prosedur dari pembuatan NLC ditunjukkan pada gambar 3.2.



Gambar 3.2. Skema Pembuatan NLC

Optimasi dilakukan pada tiga variabel bebas, yakni perbandingan lipid padat dan lipid cair, konsentrasi surfaktan serta waktu ultrasonikasi. Sejumlah kondisi perbandingan massa asam stearat terhadap minyak kedelai ditunjukkan seperti pada tabel 3.1.

Tabel 3.1. Variasi Perbandingan Lipid Padat dan Lipid Cair

Formulasi	Perbandingan AS:MK	Massa SA (gram)	Massa SO (gram)	Massa L-Dopa	Konsentrasi Tween 80 (%)
1.1	5:5	0,875	0,875	0,0875	2
1.2	6:4	0,700	1,050	0,0875	2
1.3	7:3	0,525	1,225	0,0875	2
1.4	8:2	0,350	1,400	0,0875	2
1.5	9:1	0,175	1,575	0,0875	2
1.6	9,5:0,5	0,0875	1,6625	0,0875	2

Keterangan :

SA : *Stearic Acid*

SO : *Soybean Oil*

Setelah diperoleh formula perbandingan lipid padat terhadap lipid cair yang optimal dilihat dari ukuran partikel yang diukur menggunakan PSA. Tahapan optimasi dilanjutkan dengan variasi konsentrasi surfaktan seperti yang ditunjukkan pada tabel 3.2.

Tabel 3.2. Variasi Konsentrasi Surfaktan

Formulasi	Perbandingan SA:SO	Massa L-Dopa (gram)	Konsentrasi Tween 80 (%)	Amplitudo (%)	Waktu Sonikasi (menit)
2.1	9:1	0,0875	0,5	75%	40
2.2	9:1	0,0875	1	75%	40
2.3	9:1	0,0875	1,5	75%	40
2.4	9:1	0,0875	2	75%	40
2.5	9:1	0,0875	2,5	75%	40

Setelah diperoleh formula massa surfaktan yang optimal, tahapan optimasi dilanjutkan dengan variasi waktu ultrasonikasi seperti yang ditunjukkan pada tabel 3.3.

Tabel 3.3. Variasi Waktu Ultrasonikasi

Formulasi	Perbandingan SA:SO	Massa L-Dopa (gram)	Konsentrasi Surfaktan (%)	Amplitudo ultrasonikasi (%)	Waktu sonikasi (menit)
3.1	9:1	0,175	2,5	75%	20
3.2	9:1	0,175	2,5	75%	30
3.3	9:1	0,175	2,5	75%	40
3.4	9:1	0,175	2,5	75%	50
3.5	9:1	0,175	2,5	75%	60

Setelah diperoleh formula perbandingan lipid, konsentrasi surfaktan dan waktu sonikasi yang optimal, produk NLC-DSS kemudian dikeringkan dengan cara *spray dryer*. Proses *spray dryer* dimulai dengan menambahkan NaCl sebagai excipien. 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-L Dopa-AS-MK yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk karakterisasi lebih lanjut.

3.4.2 Karakterisasi NLC-Asam stearat-Minyak Kedelai (NLC-DSS)

Karakterisasi yang pertama dilakukan adalah penentuan gugus fungsi menggunakan FTIR dengan rentang panjang gelombang 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} . Penentuan gugus fungsi menggunakan teknik pelet KBr pada suhu ruangan. Dalam teknik ini, sampel dicampur dengan KBr dan dikompres hingga membentuk pelet tipis yang digunakan untuk pengujian.

Karakterisasi lainnya adalah penentuan ukuran partikel, nilai indeks polidispersitas, dan zeta potensial (ZP) menggunakan instrumen *particle size analyzer* (PSA) dengan suhu uji 25°C dan *scattering angle* 90°.

Sementara itu, analisis selanjutnya adalah analisis struktur permukaan, informasi mengenai diameter partikel menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM) menggunakan larutan dispersi NLC.

3.4.3 Pengujian *entrapment efficiency*

Entrapment efficiency dilakukan dengan mengacu pada metode penelitian yang dilakukan oleh (Mishra et al., 2019). *Entrapment efficiency* bermanfaat untuk memberikan informasi mengenai konsentrasi L-Dopa yang termuat dalam jumlah total bahan bahan yang ada dalam suatu formulasi. *Entrapment efficiency* dilakukan dengan menggunakan instrumen UV/Vis. *Entrapment efficiency* dapat diperoleh dengan cara menghitung perbedaan konsentrasi L-Dopa bebas hasil ultrasentrifugasi terhadap konsentrasi awal sampel. Setelah proses pembuatan NLC, sampel disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 20.000 rpm, lalu diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 280,5 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 enkapsulasi maka obat yang termuat di dalam matriks lipid jauh lebih besar dan optimal.

$$\text{Entrapment efficiency (\%)} = \frac{C_o - C_t}{C_o} \times 100\%$$

Dimana C_0 merupakan konsentrasi L-Dopa awal, C_t merupakan konsentrasi L-Dopa akhir.

3.4.4 Profil *drug release*

Pengujian *drug release* menggunakan metode *dialysis bag*. Medium reseptor disiapkan pada pH 1,2 dan pH 7,4. Larutan medium reseptor ini diperoleh dengan cara melarutkan NaOH 2 gram dalam 1 L aquades dan ditambah HCl 37% sebanyak kurang lebih 8 mL sampai diperoleh larutan NaCl pH 1,2. Sementara itu, larutan pH 7,4 diperoleh dengan melarutkan 6,8 g KH_2PO_4 dalam 650 mL akuades, kemudian ditambahkan 200 mL NaOH 0,2 M dan ditandabatkan hingga 1L. Sebanyak 4 mg produk NLC dilarutkan dalam 6 mL medium reseptor dan dimasukkan kedalam kantong dialisis. Selanjutnya, kantong dialisis direndam dalam 60 mL medium reseptor selama 16 jam pada suhu 37°C . Konsentrasi medium reseptor diukur setiap 60 menit sekali selama 6 jam dan diukur 360 menit sekali setelah 6 jam menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan tiga kali pengulangan pada panjang gelombang 279,5 nm untuk pH 1,2 dan pH 7,4. Kurva kalibrasi L-Dopa pH 1,2 terdiri atas 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm dan 35 ppm. Kurva kalibrasi L-Dopa pH7,4 terdiri atas 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Persentase pelepasan senyawa bioaktif dari NLC dihitung dengan persamaan berikut:

$$\% \text{ drug release} = \frac{C_t}{C_0} \times 100$$

Dimana:

C_t = konsentrasi NLC pada waktu tertentu (ppm)

C_0 = konsentrasi NLC mula mula (ppm)

Hasil perhitungan dari *drug release* kemudian dimasukkan kedalam persamaan kinetika model orde nol, orde satu Higuchi, dan Korsmeyer-Peppas. Kinetika *drug release* ditentukan dengan membandingkan nilai r^2 pada persamaan regresi linearnya.