

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati Program Studi Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia untuk proses nanoformulasi hingga pelaksanaan penelitian. Riset berlangsung pada bulan Februari 2024 sampai bulan Juli 2024. Uji karakterisasi menggunakan instrumen *Partikel Size Analyzer* (PSA) dan *Transmission Electron Microscope* (TEM) dilakukan di Laboratorium PPNN Institut Teknologi Bandung. sementara itu, untuk pengujian karakterisasi menggunakan instrumen *Fourier Transform Infrared* (FTIR), spektrofotometer UV/Vis untuk uji efisiensi pemuatan, uji kapasitas pemuatan dan uji *drug release* dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI. Proses pengeringan sampel menggunakan spray dryer dilakukan di Universitas Gadjah Mada.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu neraca analitik Mettler Toledo, magnetic stirrer, *hot plate*, *Ultrasonic Cell Disruptor Biobase* (UCD-250), *waterbath*, pipet tetes, pipet ukur 5 ml dan 1 ml, batang pengaduk, spatula, gelas kimia 200 ml, gelas ukur 100 ml, termometer, labu ukur 1 liter, 25 ml, 50 ml dan 10 ml, dialysis bag, kaca arloji, lem, statif dan tali, pH meter Mettler Toledo. Alat instrumen yang digunakan untuk karakterisasi diantaranya instrumen *Particle Size Analyzer* (PSA), *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR), Spektrofotometer UV-Vis, *Transmission Electron Microscope* (TEM), dan Spray dryer.

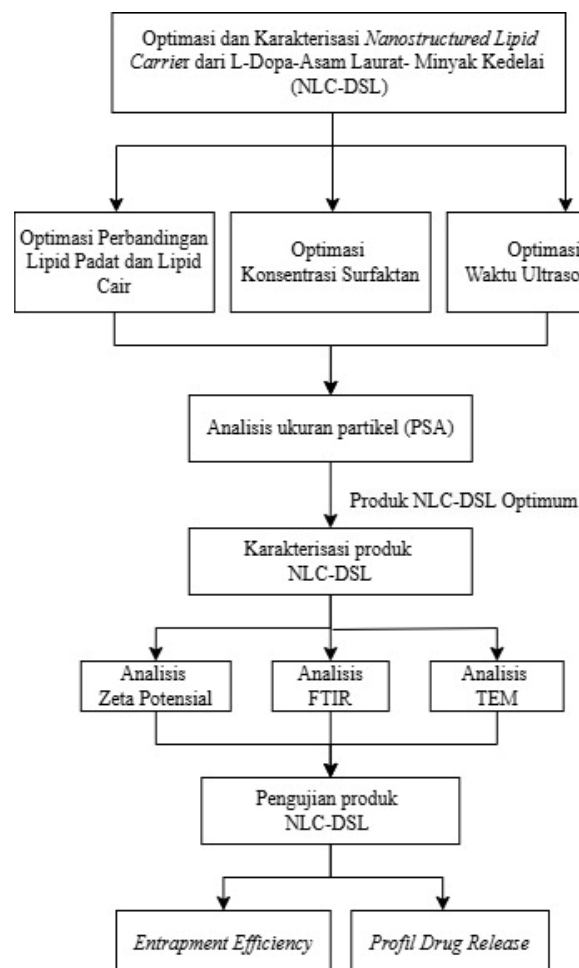
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu L-Dopa murni, aqua demineralisasi, asam laurat (PA, Pro-analis Sigma-aldrich), minyak kedelai, dan tween 80 untuk membuat formulasi. Pada proses spray drying digunakan NaCl

sebagai eksipien. Kemudian digunakan KH_2PO_4 dan aquades untuk membuat buffer fosfat pH 7,4, dan digunakan NaOH, HCl 37% untuk membuat larutan pH 1,2. Bahan tambahan seperti kantung dilisis, kertas saring, tabung sentrifugasi, botol vial dan plastic wrap.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa tahapan yaitu, pembuatan NLC atau nanoformulasi menggunakan asam laurat dan minyak kedelai. Respon yang diteliti berupa pengukuran ukuran partikel, nilai *polydispersity indeks* (PI) dan zeta potential (ZP), efisiensi enkapsulasi, profil *drug release*, dan karakterisasi NLC menggunakan FTIR, SEM, dan TEM seperti yang tertera pada **Gambar 3.1**.

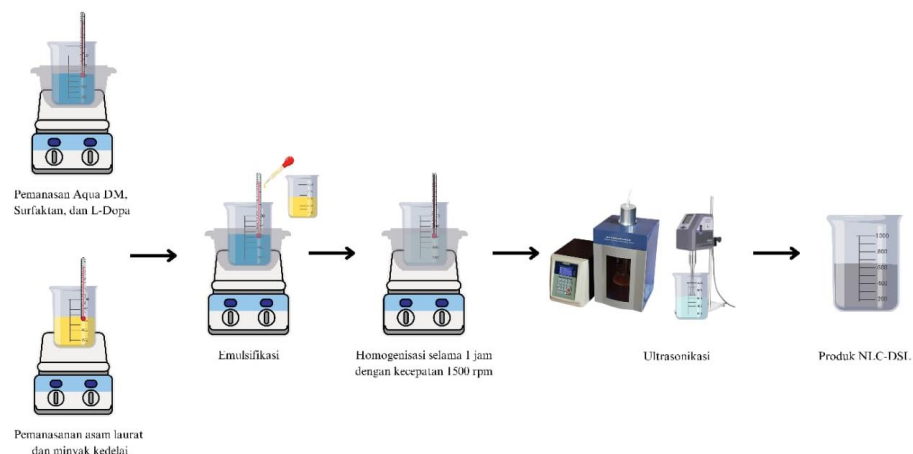


Gambar 3.7. Tahapan penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahapan pembuatan NLC

Tahapan pembuatan NLC dilakukan dengan serangkaian pekerjaan yaitu optimasi formulasi nanoformulasi dengan menggunakan metode homogenisasi panas dan ultrasonikasi. Campuran lipid dipreparasi dengan campuran asam laurat dan minyak kedelai sesuai dengan perbandingan lipid padat dan lipid cair yang tertera pada **Tabel 3.1**. campuran diaduk dan dipanaskan pada suhu 48°C (didas titik leleh asam laurat: 43,2°C). Kemudian disiapkan suspensi tweet 80 dengan cara didispersikan dalam air demineralisasi, dan dipanaskan pada 48°C. Kemudian ditambahkan L-Dopa sebanyak 0,0875 g (5% dari total massa lipid), dan dimasukkan ke dalam larutan. Suspensi yang telah dibuat kemudian ditambahkan tetes demi tetes ke fase lipid yang sudah mencair sambil diaduk selama 1 jam dengan kecepatan 1500 rpm, Tweet 80 dibuat variasi konsentrasi untuk mendapatkan hasil terbaik, perbandingan tertera pada **Tabel 3.2**. Kemudian didapat emulsi kasar dan disonikasi selama 40 menit menggunakan sonikator (Izza *et al.*, 2021). Waktu sonikasi diatur sesuai dengan variabel yang ditentukan tertera pada **Tabel 3.3**. Sampel NLC yang didapat didiamkan selama 1 hari di suhu ruang sebelum dilakukan pengujian. Skema prosedur pembuatan NLC ditunjukkan pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.8. Skema proses nanoformulasi NLC-DSL

Tabel 3.4. Skema optimasi formulasi perbandingan lipid padat dan lipid cair

Formulasi	LA : SO	Massa AL (g)	Massa MK (g)	L-Dopa (g)	Tween (%)	Waktu ultrasonikasi (menit)
F1	5:5	0,875	0,875	0,0875	2	40
F2	4:6	0,7	1,05	0,0875	2	40
F3	3:7	0,525	1,225	0,0875	2	40
F4	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	40
F5	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	40
F6	0,5:9,5	0,0875	1,6625	0,0875	2	40

Ket: LA = Lauric Acid, SO : Soybean Oil

Tabel 3.5. Skema optimasi formulasi konsentrasi surfaktan

Formulasi	LA : SO	Massa AL (g)	Massa MK (g)	L-Dopa	Tween	Waktu ultrasonikasi (menit)
F6	1:9	0,175	1,575	0,0875	0,5	40
F7	1:9	0,175	1,575	0,0875	1	40
F8	1:9	0,175	1,575	0,0875	1,5	40
F9	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	40
F10	1:9	0,175	1,575	0,0875	2,5	40

Ket: LA = Lauric Acid, SO : Soybean Oil

Tabel 3.6. Skema optimasi variasi waktu ultrasonikasi

Formulasi	LA : SO	Massa AL (g)	Massa MK (g)	L-Dopa	Tween	Waktu ultrasonikasi (menit)
F6	1:9	0,175	1,575	0,0875	2,5	20
F7	1:9	0,175	1,575	0,0875	2,5	30
F8	1:9	0,175	1,575	0,0875	2,5	40
F9	1:9	0,175	1,575	0,0875	2,5	50
F10	1:9	0,175	1,575	0,0875	2,5	60

Ket: LA = Lauric Acid, SO : Soybean Oil

Setelah proses formulasi perbandingan lipid, konsentrasi surfaktan, dan waktu ultrasonikasi yang optimal, produk NLC-DSL dikeringkan menggunakan *spray dryer* mengacu pada penelitian yang dilakukan (Mozaffar *et al.*, 2021). *Spray dryer* dilakukan menggunakan Buchi B-290 *mini spray dryer* dan menggunakan NaCl sebagai penyalut dengan perbandingan 10:6 terhadap dispersi NLC. Sebelum dikeringkan, NLC-DSL dihomogenikan dengan Ultra turrax dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Pengeringan menggunakan suhu inlet 100°C dengan laju 5 mL/menit. Padatan NLC-DSL yang peroleh selanjutnya dilakukan karakterisasi.

3.4.2 Karakterisasi Optimasi Formulasi Nanostructured Lipid Carrier Dari campuran Asam Laurat dan Minyak Kedelai

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

Selain itu, optimasi yang dihasilkan akan dikarakterisasi untuk ditentukan ukuran partikel NLC, nilai *polydispersity indeks* (PI) dan *zeta potential* (ZP). Penentuan nilai PI dilakukan untuk menentukan distribusi ukuran partikel dan homogenitas larutan. Kemudian, nilai ZP memberikan informasi mengenai kestabilan jangka panjang yang dapat dilihat dari potensi terjadinya agregat.

Hasil optimasi juga akan di karakterisasi menggunakan TEM untuk mengetahui morfologi NLC-DSL dan memberikan informasi mengenai diameter partikel.

3.5 Tahapan Pengujian

3.5.1 *Entrapment efficiency*

Entrapment efficiency yang digunakan diadaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh (Nallasamy *et al.*, 2020). Nilai *Entrapment efficiency* memberikan informasi mengenai konsentrasi L-Dopa yang termuat dalam jumlah total bahan-bahan yang ada di suatu formula. *Entrapment efficiency*

dapat diperoleh dengan menghitung perbedaan L-Dopa bebas hasil sentrifugasi terhadap konsentrasi sampel. Setelah proses nanoformulasi, sampel disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 20.000 rpm dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280,5 nm. Kurva kalibrasi diperoleh dengan menggunakan deret konsentrasi L-Dopa (5, 10, 15, 20, dan 25 ppm) dalam aquades. Supernatan hasil sentrifugasi juga diukur pada panjang gelombang yang sama. Semakin besar persentase efisiensi pemuatan dan kapasitas muatan menandakan obat yang termuat di dalam matriks lipid jauh lebih besar dan optimal. Hasil pengukuran UV-Vis dikalkulasikan dengan persamaan berikut

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

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

Dimana C_0 adalah konsentrasi awal sampel, C_t adalah konsentrasi L-Dopa bebas yang terdapat pada supernatan hasil sentrifugasi, W_0 merupakan massa L-Dopa yang terkandung dalam sampel, W_t merupakan massa dari L-Dopa bebas yang terkandung pada supernatan hasil sentrifugasi, serta W_L adalah massa total lipid yang ditambahkan dalam proses formulasi.

3.5.2 Profil *drug release*

Pengujian *drug release* mengacu pada metode yang telah dilakukan oleh (Aisiyah *et al.*, 2019b). Uji *drug release* dilakukan dengan menggunakan metode *dialysis bag* pada media pH 1,2 dan pH 7,4. Dipersiapkan terlebih dahulu buffer fosfat pH 7,4 dengan melarutkan 6,8 gram KH_2PO_4 ke dalam 650 mL aquades, kemudian ditambahkan 0,2 M NaOH hingga didapat pH 7,4, ditanda bataskan pada labu ukur 1 L. Disiapkan juga larutan pH 1,2 dengan melarutkan sebanyak 2 gram NaOH pada 1 L aquades, kemudian ditambahkan HCl 12 M hingga didapat pH 1,2. Kemudian disiapkan deret standar pada konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 25 ppm, 30 ppm dan 35 ppm untuk pH 1,2 dan pada konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm untuk pH 7,4.

kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang 280 nm untuk kedua pH dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Kurva kalibrasi diperoleh dengan memplot hasil absorbansi dari semua konsentrasi kedalam grafik, dan dibuat persamaan regresinya.

Penentuan nilai *drug release* NLC-DSL dilakukan dengan mengambil 4 mg produk formulasi L-Dopa yang sudah kering kemudian dilarutkan dalam pH 1,2 dan larutan buffer fosfat 7,4 sebanyak 6 mL. Satu sisi *dialysis bag* diikat menggunakan tali kemudian larutan sampel dimasukkan kedalam dialysis bag dan sisi lain *dialysis bag* diikat juga menggunakan tali. Setelah *dialysis bag* terisi sampel dimasukkan ke dalam gelas kimia berisi larutan pH 1,2 dan larutan buffer fosfat 7,4 sebanyak 60 mL pada suhu konstan sebesar 37°C, sampel disampling pada interval waktu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 18, 22, dan 24 jam. Setiap sampling dibaca sebanyak 3 kali kemudian hasil dapat dikalkulasikan dengan persamaan berikut

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

Hasil kalkulasi 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.