

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung dari Februari hingga Juli 2025 atau selama 6 bulan. Proses formulasi *Nanostructured Lipid Carrier* (NLC) berlangsung di Laboratorium Riset Kimia Hayati, FPMIPA UPI yang menjadi tempat utama pelaksanaan penelitian. Untuk analisis karakterisasi partikel, seperti pengujian *Particle Size Analyzer* (PSA), *Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive Spectroscopy* (SEM-EDS), dan *Transmission Electron Microscope* (TEM) dilakukan di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi, Institut Teknologi Bandung (PPNN ITB). Sedangkan, karakterisasi dengan *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) dilaksanakan di Laboratorium Kimia Instrumen, FPMIPA UPI. Karakterisasi tambahan dengan teknik ultrasentrifugasi berlangsung di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi Institut Teknologi Bandung (PPNN ITB) dan pengeringan sampel dengan *spray dryer* dilakukan di Laboratorium Uji Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Universitas Gadjah Mada (UGM).

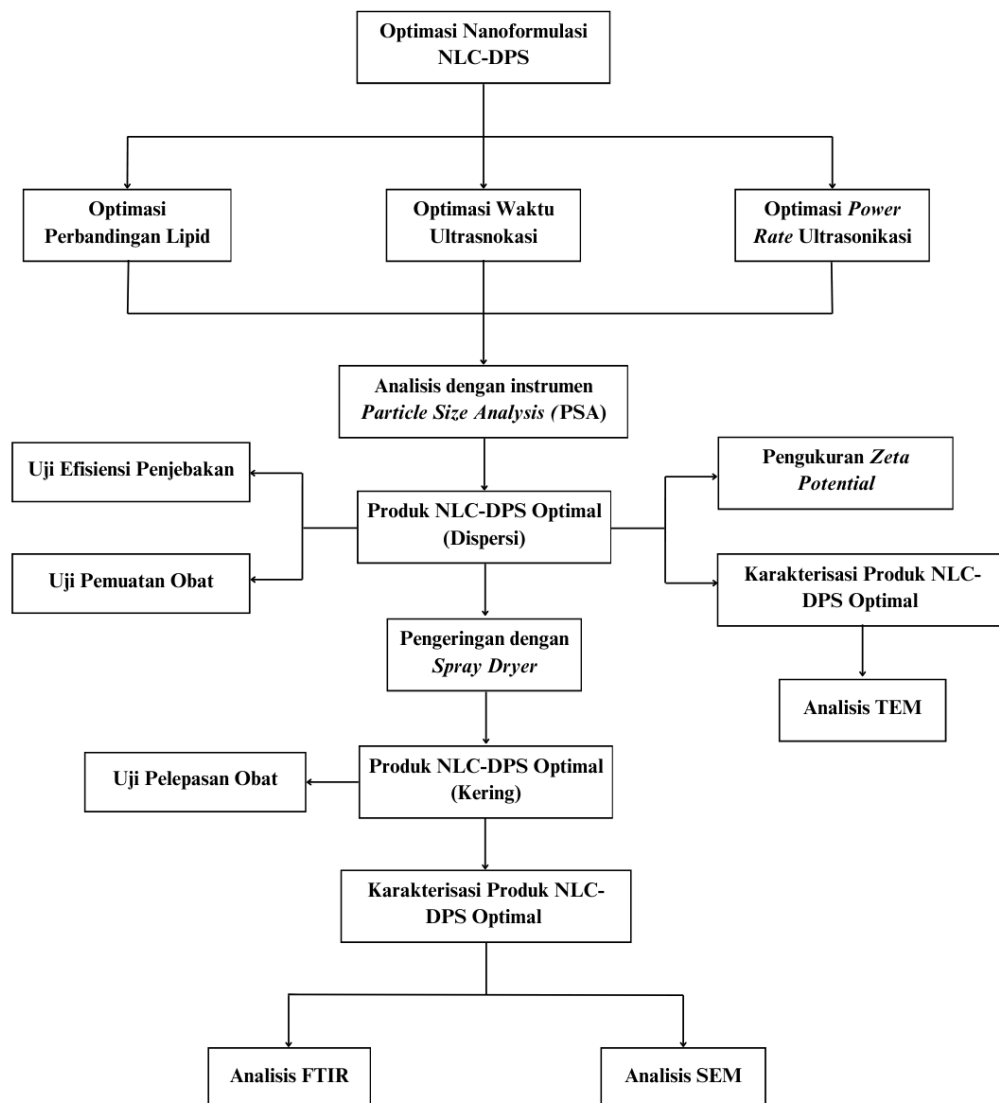
3.2 Alat dan Bahan

Berbagai peralatan digunakan dalam penelitian ini mencakup neraca analitik Mettler Teledo, , *magnetic stirrer*, *hot plate*, *Ultrasonic Cell Disruptor Biobase* (UCD-250), *rotary evaporator*, desikator, corong Buchner, termometer, gelas kimia, gelas ukur, kaca arloji, labu ukur, pipet, batang pengaduk, spatula, klem, dan statif. Alat yang digunakan untuk karakterisasi, diantaranya *Particle Size Analyzer* (PSA), ultrasentrifugasi, *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR), *Scanning Electron Microscope* (SEM), serta *Transmission Electron Microscope* (TEM).

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi L-DOPA, asam stearat, minyak sawit, Tween 80, akuades, dan aqua demineralisasi (DM) untuk pembuatan *Nanostructured Lipid Carriers* (NLC). Selain itu, dalam proses *spray drying* digunakan natrium klorida (NaCl) sebagai eksipien.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan utama dalam penelitian ini adalah nanoenkapsulasi L-DOPA dengan *Nanostructured Lipid Carrier* (NLC). Selain itu, dilakukan pengukuran ukuran partikel dan *polydispersity index* (PDI) dengan *Particle Size Analyzer* (PSA), kemudian pengukuran zeta potensial (ZP). Karakterisasi NLC menggunakan *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR), *Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive Spectroscopy* (SEM-EDS), dan *Transmission Electron Microscope* (TEM) sebagaimana ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.

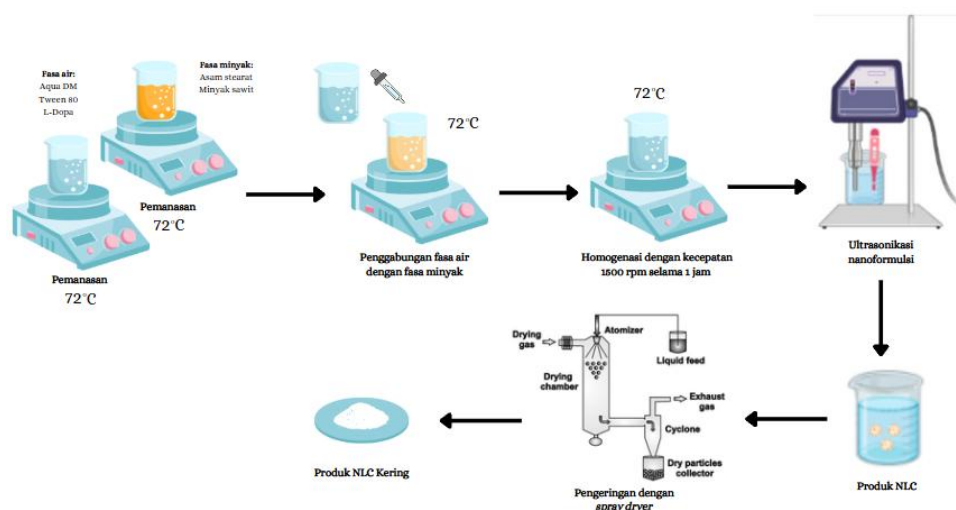


Gambar 3.1 Bagan Alir Tahapan Penelitian

3.4 Tahapan Penelitian

3.4.1 Pembuatan *Nanostructured Lipid Carrier L-Dopa-Palm Oil-Stearic Acid* (NLC-DPS)

Pembuatan *Nanostructured Lipid Carrier L-Dopa-Palm Oil-Stearic Acid* (NLC-DPS) atau *Nanostructured Lipid Carrier* (NLC) dari L-Dopa berbasis minyak sawit-asam stearat dilakukan menggunakan metode homogenisasi panas dan ultrasonikasi. Preparasi fase lipid dengan mencampurkan asam stearat dan minyak sawit dalam perbandingan sesuai dalam **Tabel 3.1**, komposisi lipid dengan perbandingan kemudian dipanaskan pada suhu 72°C (diatas titik leleh asam stearat) menggunakan *hot plate* sambil diaduk dengan *stirrer*. Selanjutnya, preparasi fase air dengan memanaskan 50 mL aqua DM hingga suhunya 72°C, kemudian ditambahkan Tween 80 seberat 1 gram (konsentrasi 2%) hingga larut menggunakan *stirrer* dan L-DOPA seberat 0,0875 gram (5% dari total massa lipid) dimasukkan ke dalam suspensi Tween 80 yang sudah terdispersi hingga terlarut sempurna. Setelah itu, fase air ditambahkan ke dalam fase lipid secara perlahan (setetes demi setetes) sambil diaduk perlahan hingga kecepatan 1.500 rpm selama 1 jam, dengan suhu tetap dijaga pada 72°C. Setelah diperoleh emulsi yang homogen, proses ultrasonikasi dilakukan dengan menggunakan *probe* ultrasonikator dengan variasi waktu ultrasonikasi dan *power rate* yang tertera pada **Tabel 3.2**. Skema proses optimasi dengan prosedur membuat NLC dicantumkan pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2 Skema Pembuatan NLC

Proses optimasi dilakukan dengan mempertimbangkan tiga variabel bebas diantaranya, perbandingan antara lipid padat dan lipid cair, waktu ultrasonikasi, serta *power rate* selama ultrasonikasi. Dalam optimasinya setiap produk hasil dari masing-masing variasi dianalisis ukuran partikel dan indeks polidispersitas atau *polydiversity index* (PDI) menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) untuk memastikan hasil yang sesuai dengan kriteria optimal.

Tabel 3.1 Variasi Perbandingan Massa Lipid Padat dan Cair

Formulasi	Perbandingan Massa Lipid AS:MS	Massa Asam Stearat (gram)	Massa Minyak Sawit (gram)	Tween 80 (%)
1	0,5 : 9,5	0,0875	1,6625	2
2	1 : 9	0,175	1,575	2
3	2 : 8	0,350	1,400	2
4	3 : 7	0,525	1,225	2
5	4 : 6	0,700	1,050	2
6	5 : 5	0,875	0,875	2

Keterangan: AS = Asam Stearat; MS = Minyak Sawit

Tabel 3.2 Variasi Waktu dan *Power Rate* Ultrasonikasi

Formulasi	Perbandingan Massa Lipid AS:MS	Konsentrasi Tween 80 (%)	Waktu Ultrasonikasi (menit)	<i>Power rate</i> (%)
1	0,5 : 9,5	2	40	100
2	0,5 : 9,5	2	40	75
3	0,5 : 9,5	2	40	50
4	0,5 : 9,5	2	60	100
5	0,5 : 9,5	2	60	75
6	0,5 : 9,5	2	60	50
7	0,5 : 9,5	2	80	100
8	0,5 : 9,5	2	80	75
9	0,5 : 9,5	2	80	50
10	1 : 9	2	40	100
11	1 : 9	2	40	75
12	1 : 9	2	40	50
13	1 : 9	2	60	100
14	1 : 9	2	60	75
15	1 : 9	2	60	50
16	1 : 9	2	80	100
17	1 : 9	2	80	75
18	1 : 9	2	80	50

Keterangan: AS = Asam Stearat; MS = Minyak Sawit

3.4.2 Penentuan Formulasi Optimal dengan Metode Analisis Faktor

Tahap penentuan formulasi optimal dilakukan setelah seluruh variasi waktu dan *power rate* ultrasonikasi dari *Nanostructured Lipid Carrier L-Dopa-Palm Oil-Stearic Acid* (NLC-DPS) berhasil diformulasikan dan diukur dengan *Particle Size Analyzer* (PSA). Parameter yang digunakan dalam optimasi ini meliputi ukuran partikel dan indeks polidispersitas (PDI). Parameter tersebut dipilih karena secara teoritis berperan penting dalam menentukan kualitas dan stabilitas sistem penghantaran obat berbasis NLC.

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan pendekatan statistika menggunakan metode analisis faktor. Analisis faktor digunakan untuk mereduksi sejumlah parameter menjadi faktor yang lebih sederhana, sebelum dilakukan analisis setiap data parameter dinormalisasi menggunakan metode *min-max normalization* dengan rumus perhitungan (Mazziotta & Pareto, 2021) untuk digunakan dalam Excel, sebagai berikut:

$$X_{norm} = \frac{X - X_{min}}{X_{max} - X_{min}}$$

Keterangan:

X = nilai parameter formulasi (misalnya: ukuran partikel formulasi 1)

X_{min} = nilai terkecil parameter

X_{max} = nilai terbesar parameter

X_{norm} = nilai hasil normalisasi (antara 0-1)

Selanjutnya, hasil normalisasi dilakukan perhitungan *Euclidean Distance* berdasarkan kedua nilai parameter yang telah dinormalisasi dengan rumus perhitungan (Kamal *et al.*, 2018), sebagai berikut:

$$Distance = \sqrt{(X_{norm} - 0)^2 + (Y_{norm} - 0)^2}$$

Keterangan:

Distance = jarak mendekati titik optimal

X_{norm} = nilai normalitas parameter ukuran partikel

Y_{norm} = nilai normalitas parameter indeks polidispersitas

Nilai 0 = acuan titik optimal setelah normalisasi

3.4.3 Karakterisasi *Nanostructured Lipid Carrier L-Dopa-Palm Oil-Stearic Acid* (NLC-DPS)

Karakterisasi pertama yang dilakukan adalah identifikasi gugus fungsi dalam produk *Nanostructured Lipid Carrier L-Dopa-Palm Oil-Stearic Acid* (NLC-DPS) menggunakan *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) dalam rentang bilangan gelombang 4000 cm^{-1} hingga 400 cm^{-1} . Pengujian ini dilakukan dengan metode pelet KBr pada suhu ruangan, di mana sampel dicampur dengan KBr lalu dikompresi hingga membentuk pelet tipis sebagai media analisis. Selain itu, karakterisasi juga mencakup pengukuran ukuran partikel, *polydispersity index* (PDI), serta *zeta potensial* (ZP) menggunakan instrumen *Particle Size Analyzer* (PSA) pada suhu 25°C dengan *scattering angle* sebesar 90° . Analisis lebih lanjut dilakukan untuk mengamati struktur permukaan menggunakan *Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive Spectroscopy* (SEM-EDS) pada sampel kering, serta memperoleh informasi mengenai diameter partikel menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM) dengan sampel berupa larutan dispersi *Nanostructured Lipid Carrier* (NLC) yang telah disiapkan pada grid TEM.

3.5 Tahapan Pengujian

3.5.1 Efisiensi Penjebakan (*Entrapment Efficiency*) dan Pemuatan Obat (*Drug Loading*)

Proses pengujian efisiensi penjebakan (*Entrapment Efficiency*) dan pemuatan obat (*Drug Loading*) dilakukan berdasarkan jumlah L-Dopa yang terenkapsulasi dalam formulasi dibandingkan dengan total jumlah bahan yang digunakan, prosesnya mengacu pada metode penelitian (Devi *et al.*, 2022). Setelah NLC-DPS optimal dibuat, suspensi yang mengandung L-Dopa tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 100.000 rpm selama 1 jam untuk memisahkan obat yang tidak terenkapsulasi, kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada serapan bilangan gelombang L-Dopa, yaitu 280 nm. Supernatan yang diperoleh juga dianalisis pada bilangan gelombang yang sama. Pengukuran blanko menggunakan akuades untuk mendapatkan nilai absorbansi yang akurat. Kurva kalibrasi dibuat dengan deret konsentrasi standar L-Dopa dalam akuades (5, 10, 15,

20, dan 25 ppm). Nilai EE dan DL dapat dihitung berdasarkan persentase perbedaan antara konsentrasi dan massa L-Dopa yang digunakan dalam formulasi dengan jumlah konsentrasi yang tidak terenkapsulasi, menggunakan persamaan berikut:

$$EE (\%) = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\%$$

$$DL (\%) = \frac{W_0 - W_t}{W_L} \times 100\%$$

Keterangan:

C_t = konsentrasi L-Dopa dalam supernatan NLC-DPS (ppm)

C_0 = konsentrasi awal L-Dopa (ppm)

W_t = massa L-Dopa dalam supernatan NLC-DPS (gram)

W_0 = massa awal L-Dopa (gram)

W_L = massa lipid total (gram)

3.5.2 Pelepasan Obat (*Drug Release*)

Uji pelepasan obat (*Drug Release*) dilakukan berdasarkan metode *dialysis bag* (Aisiyah *et al.*, 2019). Pengujian dilakukan pada dua kondisi pH, yaitu 1,2 dan 7,4 dengan mempersiapkan buffer yang disesuaikan untuk masing-masing kondisi. Buffer fosfat pH 7,4 dibuat dengan melarutkan 3,4 gram KH_2PO_4 dalam 325 mL akuades, kemudian ditambahkan 0,2 M NaOH hingga mencapai pH yang diinginkan dan diencerkan hingga volume 500 mL pada labu ukur. Sementara itu, medium pH 1,2 dibuat dengan melarutkan 1 gram NaOH dalam 500 mL akuades, lalu ditambahkan HCl 12 M hingga pH mencapai 1,2. Untuk analisis kuantitatif pelepasan obat, dibuat kurva kalibrasi dengan serangkaian konsentrasi deret standar L-Dopa dalam setiap buffer pH, yaitu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm untuk pH 1,2 sama halnya untuk pH 7,4. Pengukuran absorbansi dilakukan pada 280 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan pengulangan sebanyak tiga kali, guna memperoleh persamaan regresi dari plot setiap hasil absorbansi.

Proses pengujian pelepasan obat dari formulasi NLC-DPS yang optimal dimulai dengan melarutkan 2 mg produk yang telah dikeringkan dalam 3 mL larutan pH 1,2 dan buffer fosfat pH 7,4. Sampel tersebut ditempatkan dalam dialysis bag,

yang kedua sisinya diikat dengan erat, kemudian direndam masing-masing dalam 30 mL larutan pH 1,2 dan buffer fosfat pH7,4 pada suhu 37°C. Pengambilan sampel dilakukan secara berkala pada interval 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 jam dengan masing-masing sampel diukur sebanyak tiga kali untuk dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$Drug\ release\ (\%) = \frac{C_t}{C_0} \times 100\%$$

Keterangan:

C_t = konsentrasi L-Dopa dari NLC-DPS pada waktu tertentu (ppm)

C_0 = konsentrasi L-Dopa dari NLC-DPS awal (ppm)

Hasil perhitungan ini kemudian dianalisis menggunakan model kinetika orde nol, orde satu, Higuchi, dan Korsmeyer-Peppas. Penentuan kinetika pelepasan obat berdasarkan perbandingan nilai r^2 dari persamaan regresi liniernya.