

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Karakterisasi menggunakan *Partikel Size Analyzer (PSA)*, *Scanning Electron Microscopy (SEM)*, dan *Transmission Electron Microscope (TEM)* dilakukan di Laboratorium PNN Institut Teknologi Bandung. Proses pengeringan sampel menggunakan *spray dryer* dilakukan di Universitas Gadjah Mada. Untuk pengujian karakterisasi menggunakan instrumen *Fourier Transform Infrared (FTIR)*, spektrofotometer UV/Vis untuk uji efisiensi pemuatan, uji kapasitas pemuatan, dan uji pelepasan obat dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI. Waktu pelaksanaan penelitian dapat dilihat dari jadwal kegiatan pada **Tabel 3.1** yang dimulai pada bulan Februari 2025 sampai bulan Juli 2025.

Tabel 3.1 Jadwal Kegiatan Penelitian

No	Kegiatan	Bulan Pelaksanaan					
		Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul
1.	Persiapan Alat Bahan						
2.	Pembuatan NLC						
3.	Penentuan Kondisi Optimum						
4.	Karakterisasi NLC, Uji pemuatan, dan pelepasan obat						
5.	Analisis Hasil Karakterisasi						
6.	Pengolahan Data						

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

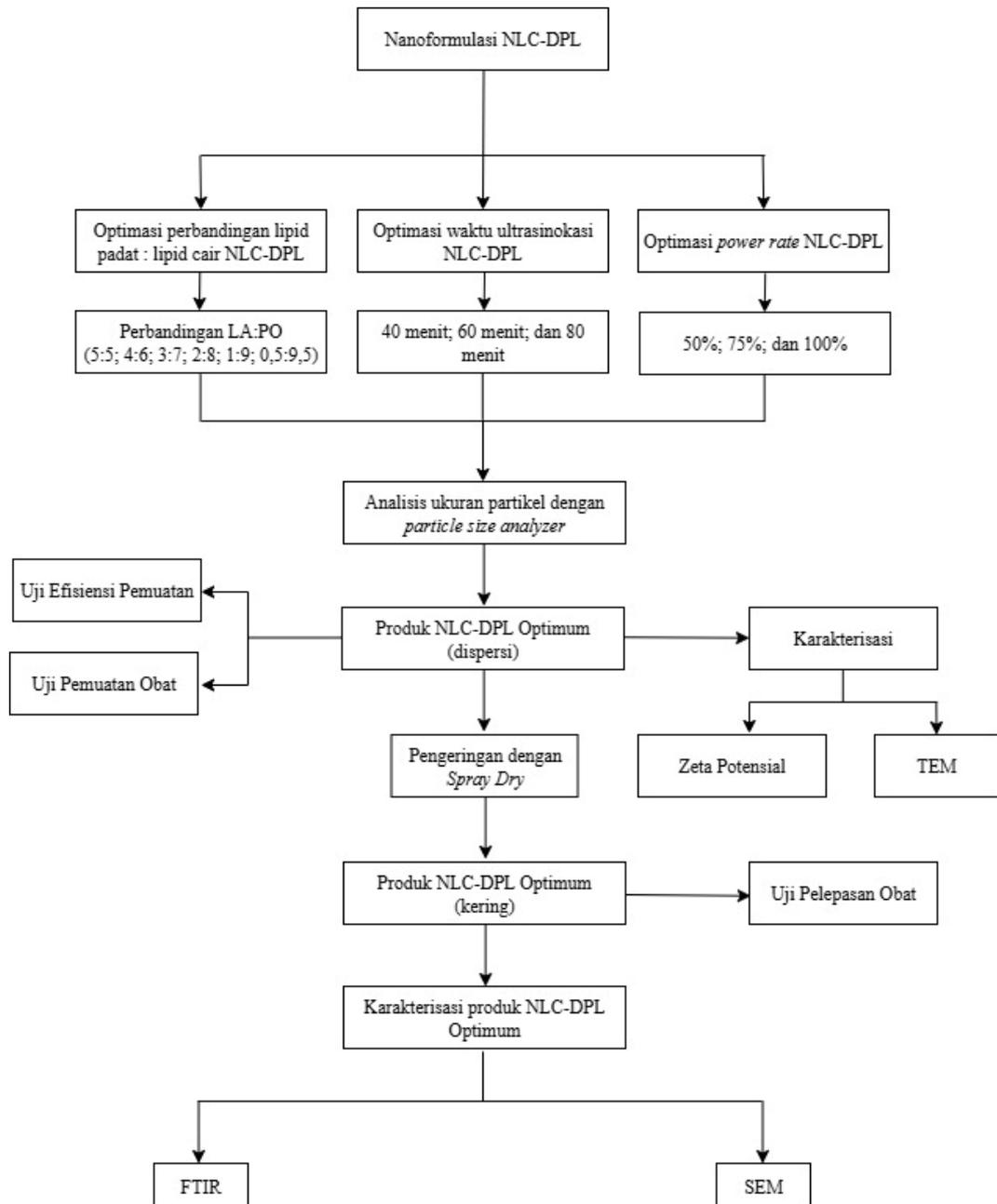
Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu neraca analitik Mettler Toledo, *magnetic stirrer*, *hot plate*, *Ultrasonic Cell Disruptor Biobase* (UCD-250), *waterbath*, pipet tetes, pipet ukur 5 ml dan 1 ml, batang pengaduk, spatula, gelas kimia 200 ml, gelas ukur 100 ml, termometer, labu ukur 1 liter, 100 ml, 50 ml, 25 ml dan 10 ml, *dialysis bag*, kaca arloji, lem, statif dan tali, pH meter Mettler Toledo, dan botol vial. Alat instrumen yang digunakan untuk karakterisasi diantaranya instrumen *Particle Size Analyzer* (PSA), *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR), Spektrofotometer UV-Vis, *Transmission Electron Microscope* (TEM), *Scanning Electron Microscopy* (SEM), 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 sawit, dan tween 80 untuk membuat formulasi. Pada proses *spray drying* digunakan maltodextrin 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 dialisis, kertas saring, tabung sentrifugasi, botol vial dan *plastic wrap*.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan ditunjukkan pada Gambar 3.1.

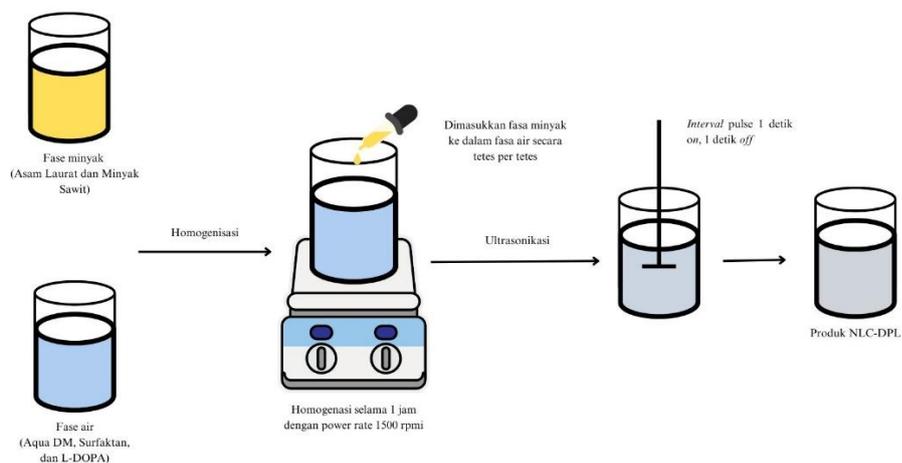


Gambar 3.1 Diagram alir tahapan penelitian (LA = *Lauric Acid* (Asam Laurat), PO = *Palm Oil* (Minyak Sawit), NLC-DPL = *Nanosructured Lipid Carrier-L-DOPA-Palm Oil-Lauric Acid*)

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahapan Pembuatan NLC

Tahapan pembuatan NLC dipreparasi menggunakan metode homogenisasi panas dan ultrasonikasi. Campuran lipid dipreparasi dengan mencampurkan asam laurat dan minyak sawit sesuai dengan perbandingannya yang tertera pada **Tabel 3.2**, kemudian diaduk dan dipanaskan pada suhu 48°C (di atas titik leleh asam laurat: 43,2°C). Kemudian disiapkan suspensi Tween 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 per tetes ke lipid yang sudah mencair sambil diaduk selama 1 jam dengan kecepatan stirrer 1500 rpm. Kemudian didapat emulsi kasar dan disonikasi selama 40 menit menggunakan sonikator (Izza et al., 2021). Waktu sonikasi dan kecepatan *power rate* diatur sesuai dengan variabel yang tertera pada **Tabel 3.3**. Skema pembuatan nanoformulasi dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2 Skema pembuatan nanoformulasi NLC-DPL

Tabel 3.2 Skema optimasi formulasi perbandingan massa lipid padat dan lipid cair

Formulasi	LA:PO (gram)	Massa LA (g)	Massa PO (g)	L-DOPA (g)	Tween (%)	Waktu ultrasonikasi (menit)	Power Rate (%)
1	5:5	0,875	0,875	0,0875	2	40	75
2	4:6	0,7	1,05	0,0875	2	40	75
3	3:7	0,525	1,225	0,0875	2	40	75
4	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	40	75
5	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	40	75
6	0,5:9,5	0,0875	1,6625	0,0875	2	40	75

LA = Lauric Acid (Asam laurat)
PO = Palm Oil (Minyak Sawit)

Tabel 3.3 Skema optimasi formulasi perbandingan waktu ultrasonikasi dan kecepatan *power rate*

Formulasi	LA:PO (gram)	Massa LA (g)	Massa PO (g)	L-DOPA (g)	Surfaktan (%)	Waktu Ultrasonikasi (Menit)	Power Rate (%)
1	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	40	50
2	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	40	75
3	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	40	100
4	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	60	50
5	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	60	75
6	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	60	100
7	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	80	50
8	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	80	75
9	1:9	0,175	1,575	0,0875	2	80	100
10	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	40	50
11	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	40	75
12	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	40	100
13	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	60	50
14	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	60	75
15	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	60	100
16	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	80	50
17	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	80	75
18	2:8	0,35	1,4	0,0875	2	80	100

LA = Lauric Acid (Asam laurat)
PO = Palm Oil (Minyak Sawit)

Kemudian produk NLC-DPL dikeringkan dengan metode *spray dryer*, proses tersebut menggunakan maltodextrin sebagai eksipien. Sampel dihomogenkan dengan *ultra-turrax* 12.000 rpm selama 10 menit, proses *spray drying* diatur dengan suhu inlet pada 150°C dengan laju 5 mL/menit. Dilakukan karakterisasi lebih lanjut pada padatan NLC-DPL yang diperoleh.

3.4.2 Karakterisasi Hasil NLC-DPL

Karakterisasi hasil NLC-DPL dilakukan menggunakan instrumen FTIR pada panjang gelombang $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$. Karakterisasi ini dilakukan untuk memastikan gugus fungsi dari yang terdapat dalam produk nanoformulasi. Proses karakterisasi dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia FPMIPA UPI.

Kemudian, optimasi yang telah dibuat akan dikarakterisasi menggunakan instrumen PSA, *Zeta Potential* (ZP), TEM, dan SEM. Analisis PSA menunjukkan distribusi ukuran partikel dari dispersi produk. Nilai ZP memberikan informasi mengenai kestabilan jangka panjang yang dapat dilihat dari potensi terjadinya target. TEM menunjukkan struktur partikel di dalam atom, diameter partikel, dan struktur matriks, analisis SEM menunjukkan morfologi permukaan, bentuk, dan ukuran partikel. Analisis PSA, ZP, TEM, dan SEM akan dilakukan di Institut Teknologi Bandung.

3.4.3 Pemuatan Obat dan Efisiensi Pemuatan

Uji pemuatan obat dan efisiensi pemuatan yang digunakan diadaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh (Nallasamy et al., 2020). Efisiensi pemuatan L-DOPA ditentukan dengan produk dispersi NLC yang disentrifugasi pada 100.000 rpm selama 60 menit. Bagian supernatan didekantasi, dan kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm, kemudian dibandingkan dengan serapan pada produk yang tidak disentrifugasi. Kurva kalibrasi diperoleh dengan menggunakan deret konsentrasi L-DOPA (5, 10, 15, 20, dan 25 ppm). Sedangkan untuk pemuatan obatnya, isi L-DOPA dianalisis

dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm, kemudian dikalkulasi dengan persamaan berikut;

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

$$Pemuatan\ Obat = \frac{W_0 - W_t}{W_L} \times 100\%$$

Dimana C_0 adalah konsentrasi awal L-DOPA, C_t adalah konsentrasi L-DOPA bebas yang terdapat pada supernatan, W_0 adalah massa awal L-DOPA, W_t adalah massa akhir L-DOPA yang terkandung pada supernatan hasil sentrifugasi, dan W_L adalah massa total lipid.

3.4.4 Pelepasan Obat

Uji pelepasan obat yang digunakan diadaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh Aisiyah et al., (2019). Uji pelepasan obat L-DOPA 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 lalu ditandabatkan 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. Lalu disiapkan deret standar untuk kedua kondisi pH pada konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm untuk larutan pH = 1,2 dan larutan buffer fosfat pH = 7,4. Hasil absorbansi dari semua konsentrasi kemudian diplot kedalam grafik, dan dibuat persamaan regresi.

Kemudian penentuan nilai pelepasan obat NLC-DPL dilakukan dengan mengambil sebanyak 2 mg produk NLC kering, kemudian dimasukkan ke dalam *dialysis bag* dan kedua ujung kantung diikat. Kantung dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian diisi masing-masing dengan buffer fosfat 30 mL pH = 7,4 dan larutan pH = 1,2. Suhu pada media dipertahankan pada 37°C, kemudian disampling pada interval waktu 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, dan 480 menit. Setiap

sampling dibaca sebanyak 3 kali. Kemudian hasilnya dapat dikalkulasi dengan persamaan berikut;

$$D (\%) = \frac{C_n}{C_{L-DOPA}} \times 100\%$$

Dimana D adalah jumlah L-DOPA, C_n adalah konsentrasi *release* (ppm), dan C_{L-DOPA} adalah konsentrasi L-DOPA awal (ppm).

Hasil kalkulasi dari pelepasan obat kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kinetika model orde nol, orde satu, Higuchi, dan Korsmeyer-Peppas. Kinetika pelepasan obat ditentukan dengan membandingkan nilai r^2 pada persamaan regresi linearnya. Rumus dari keempat model kinetika ditunjukkan pada **Tabel 3.4**.

Tabel 3.4 Rumus perhitungan kinetika obat (Haqie, 2010)

Persamaan	$y = a + bx$
Orde nol	$\frac{M_t}{M_o} = K_0 \cdot t$
Orde satu	$\ln M_t/M_o = K_1 \cdot t$
Higuchi	$\frac{M_t}{M_o} = K_H \cdot t^{1/2}$
Korsmeyer-peppas	$\log M_t/M_o = \log K + n \cdot \log t$