

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan dan Alat Penelitian

4.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kurkumin (derajat kemurnian 65%) (Sigma-Aldrich, Singapura), fosfolipid *Egg Phosphatidylcholine* (EPC) (Lipoid GmbH, Jerman), dan *Hydrogenated Egg Phosphatidylcholine* (HEPC) (Lipoid GmbH, Jerman), kolesterol (Sigma-Aldrich, Singapura), *D-alpha tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate* (TPGS) (Sigma-Aldrich, Singapura), sukrosa (Sigma-Aldrich, Singapura), HPMC (Metolose 90SH 15000) (Shin Etsu, Japan), PBS buffer pH 7,4 (Sigma-Aldrich, Singapura) dengan derajat kemurnian *pharmaceutical grade*, pelarut kloroform (Merck, Jerman) dan metanol (Merck, Jerman) dengan derajat kemurnian proanalisis.

4.1.2 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, *Rotary Evaporator* (Buchi Rotavapor R-215, Switzerland), *Waterbath Ultrasonic* (Elma, Switzerland), *Particle Analyzer (Delsa™ Nano C*, USA), *Scanning Electron Microscopy (SEM) (TM3000 TableTop SEM)* (Hitachi, USA), *Differential Thermal Analysis (DTA) (Mettler Toledo FP 85, Switzerland)*, *X-Ray Diffractometer (XRD) (Phillips Xpert, Netherland)* dan alat-alat gelas.

4.2 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan metode eksperimental untuk melakukan karakterisasi sistem liposom kering kurkumin dengan fosfolipid EPC dan HEPC. Pembentukan sistem liposom dilakukan dengan metode *Thin Film Hydration* yang dapat menghasilkan liposom dengan partikel *multilamellar vesicles*. Selanjutnya, dilakukan pencampuran terhadap larutan HPMC 15000 kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C selama 48jam. Bentuk liposom kering yang diperoleh kemudian dikarakterisasi yang meliputi pengukuran ukuran partikel menggunakan *Particle Analyzer (DelsaTM Nano C, USA)*, pengamatan morfologi liposom menggunakan *Scanning Electron Microscope (TM3000 TableTop SEM)* (Hitachi, USA), pengamatan sifat termal menggunakan *Differential Thermal Analysis (Mettler Toledo FP 85, Switzerland)* dan pengamatan pola difraksi menggunakan *X-Ray Diffractometer (Phillips Xpert, Netherland)*.

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Rancangan Formula Liposom Kering Kurkumin

Rancangan formula liposom kering kurkumin dengan jenis fosfolipid yang berbeda dapat dilihat pada Tabel IV.1.

Tabel IV.1 Formula liposom kering kurkumin dengan jenis fosfolipid yang berbeda

Bahan	Fungsi	Formula	
		I	II
Kurkumin	Bahan aktif	1mg	1mg
EPC	Fosfolipid	20mg	-
HEPC	Fosfolipid	-	20mg
Kolesterol	<i>Membrane stabilizer</i>	2mg	2mg
TPGS	<i>Membrane stabilizer</i>	0,5 mg	0,5 mg
HPMC	Pembentuk matriks	20mg	20mg
Larutan PBS pH 7,4 (dengan penambahan sukrosa 10%)	Larutan penghidrasi dan lioprotektan	1 mL	1 mL

Keterangan :

Formula I : Liposom kering kurkumin dengan fosfolipid EPC (Cur-EPC-L)

Formula II: Liposom kering kurkumin dengan fosfolipid HEPC(Cur-HEPC-L)

4.3.2 Pembuatan Liposom Kering Kurkumin

Liposom kurkumin dengan masing-masing fosfolipid EPC dan HEPC dibuat dengan metode *Thin Film Hydration*. Skema pembuatan liposom kering kurkumin dapat dilihat pada Gambar 4.1. Pertama, dibuat larutan stok masing-masing bahan yaitu kurkumin, fosfolipid, kolesterol, dan TPGS dalam pelarut campuran kloroform:metanol (9:1) dalam vial. Kemudian, masing-masing bahan dipipet sesuai dengan jumlah formula yang tertera pada tabel 4.1 menggunakan mikropipet. Keempat bahan tersebut dicampur di dalam labu alas bulat 100 mL. Setelah itu, pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* selama 1 jam pada suhu 45⁰C dengan

tekanan 320mbar dan kecepatan rotasi 100rpm. Lapisan tipis lipid yang terbentuk kemudian dihidrasi dengan 1 mL larutan penghidrasi (larutan dapar PBS pH 7,4 dengan penambahan sukrosa 10%) yang dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 60°C. Setelah itu dilakukan sonikasi dengan menggunakan *waterbath ultrasonic* hingga seluruh lipid terdispersi homogen, dimana pada tahap ini telah terbentuk *Multi Lamellar Vesicles* ditandai dengan sampel yang keruh. Selanjutnya dilakukan pencampuran terhadap gel HPMC 4% dengan perbandingan 1:1 sehingga kadar HPMC dalam sediaan menjadi 2%, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C selama 48jam.

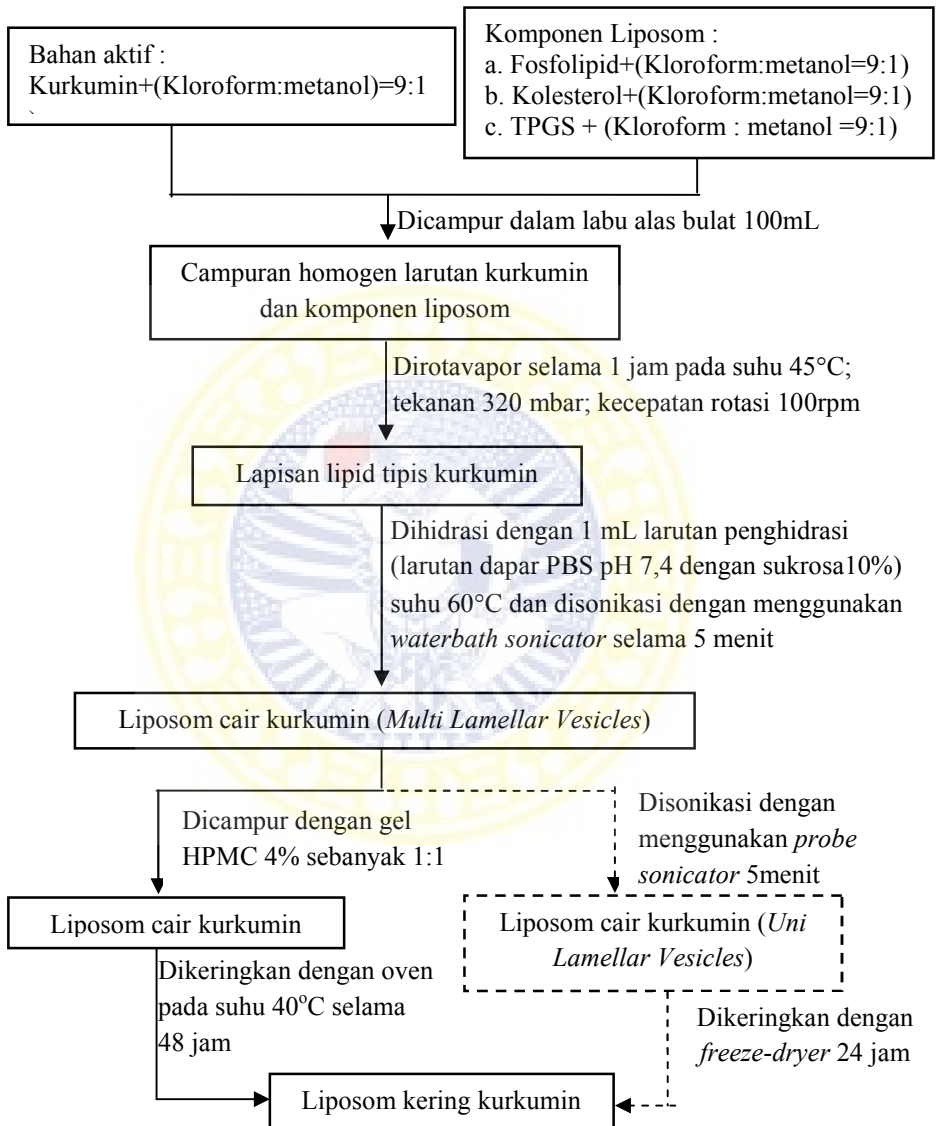
4.4 Karakterisasi Sifat Fisika Sistem Liposom Kering Kurkumin

4.4.1 Particle Size Analyzer (PSA)

Sampel liposom cair kurkumin dievaluasi dengan mengukur ukuran partikel. Sejumlah 50µL liposom cair kurkumin didispersikan dalam 1mL aquades. Ukuran partikel diukur dengan menggunakan alat *Particle Analyzer (Delsa™ Nano C, USA)* pada suhu ruangan (25°C). Pengujian ukuran partikel dilakukan sebanyak tiga kali untuk masing-masing formula.

4.4.2 Differential Thermal Analysis (DTA)

Differential Thermal Analysis (DTA) digunakan untuk mengevaluasi perubahan sifat termodinamika yang terjadi saat sampel diberikan energi panas, yang ditunjukkan puncak endotermik atau eksotermik pada termogram DTA. Komponen murni dan campuran fisik



Gambar 4.1 Skema Pembuatan Liposom Kering Kurkumin

bahan dari masing-masing formula digunakan sebagai kontrol pembanding. *Differential Thermal Analysis* (DTA) digunakan untuk. Sejumlah 2 mg sampel diambil dan diletakkan dalam pan yang kering. Laju pemanasan dibuat 10°C per menit pada rentang suhu 30-250°C. Kontrol pembanding digunakan bahan awal kurkumin, sukrosa dan campuran fisik bahan penyusun liposom dan diuji dengan cara yang sama dengan liposom kering kurkumin.

4.4.3 *X-Ray Diffraction (XRD)*

Uji difraksi sinar-X dilakukan pada komponen awal yaitu kurkumin, campuran fisik bahan penyusun liposom, Cur-EPC-L dan Cur-HEPC-L. Sampel dimasukkan dalam holder kemudian diletakkan dalam alat difraktometer sinar-X dan diamati pada rentang 2θ dari 5-50°. Kondisi pengukuran diatur sebagai berikut: sumber Cu K α , voltase 30mA dan 40kV, kecepatan scanning 0,017° per detik.

4.4.4 *Scanning Electron Microscope (SEM)*

Bentuk dan morfologi permukaan liposom kering kurkumin diketahui dengan menggunakan alat *Scanning electron microscopy* (SEM). Sampel liposom kering kurkumin ditempatkan pada holder (stub) dan ditutup dengan lapisan emas/paladium untuk membentuk sebuah lapisan konduktif menggunakan *Bal-tec cool sputter coater*. Selanjutnya holder tersebut dimasukkan dalam *specimen chamber* pada mesin SEM untuk dilakukan pengamatan dan pemotretan. Liposom kering kurkumin diamati dengan SEM dengan perbesaran 500, 1500, 2000, 3000, 4000, dan 5000.