

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu Dan Tempat Penelitian

Proses nanoenkapsulai dilakukan di Laboratorium Riset FPMIPA UPI, proses karakterisasi menggunakan instrumen SEM dilakukan di BRIN Bandung, karakterisasi menggunakan instrumen TEM dilakukan di ITB, sedangkan karakterisasi menggunakan instrumen FTIR dilakukan di Laboratorium Instrumen FPMIPA UPI. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Maret sampai Juli 2022.

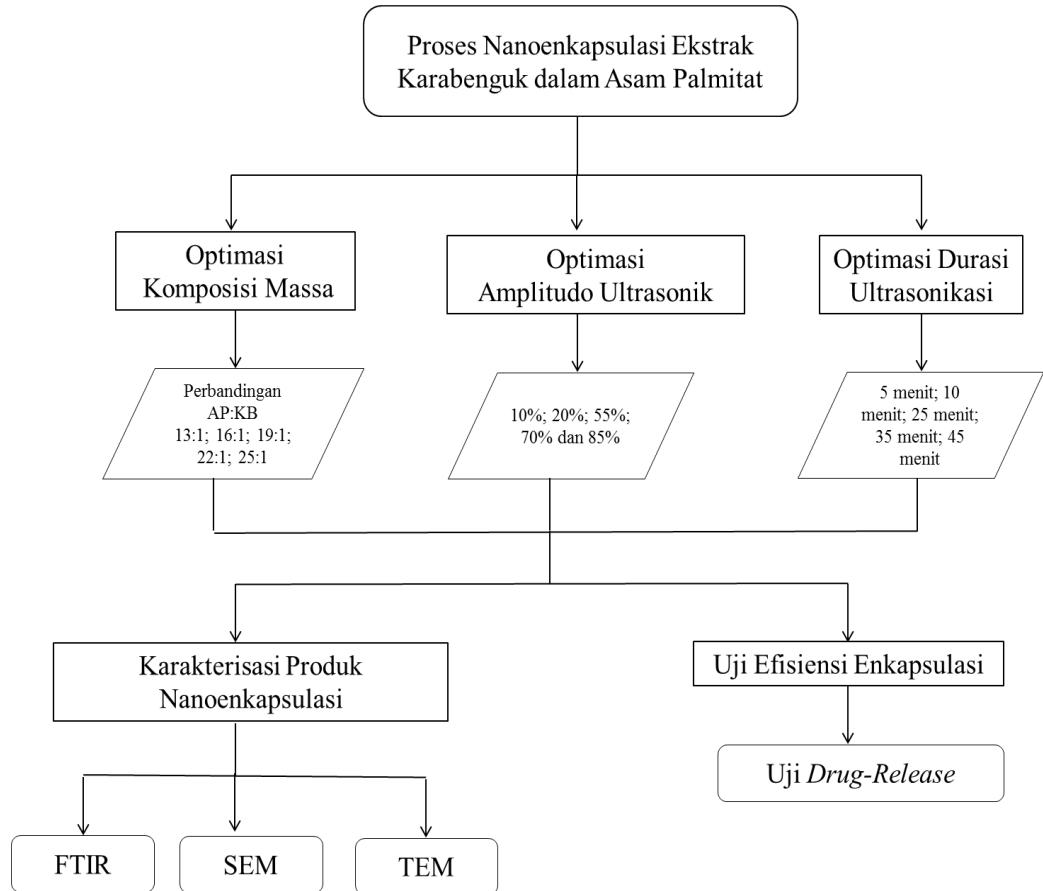
3.2. Alat dan Bahan

Proses nanoenkapsulasi ekstrak karabenguk dalam asam palmitat menggunakan bahan-bahan yang meliputi asam palmitat (Merck), ekstrak karabenguk, aseton, etanol pa (Merck), aquades, asam klorida (HCl) 0,1 M (Merck). Proses pengujian *drug-release* dalam pembuatan larutan pH 1,2 menggunakan natrium klorida (NaCl) dan HCl 37% , sedangkan pembuatan larutan buffer fosfat menggunakan monopotassium fosfat (KH₂PO₄), kantung dialisis dan natrium hidroksida (NaOH).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *hotplate*, *magnetic stirrer*, pH meter Mettler Toledo , *Ultrasonic Cell Disruptor* (UCD-250) Biobase , neraca analitik Mettler Toledo, gelas kimia 200 mL, labu Erlenmeyer 200 mL, mangkuk *stainless steel*, pipet ukur 5 mL, labu ukur 1L, kaca arloji, termometer, cawan penguapan, statif dan klem. Instrumen yang digunakan dalam proses karakterisasi, uji efisiensi enkapsulasi dan *drug-release* meliputi SEM, TEM, FTIR dan UV-Vis.

3.3. Alur Prosedur Penelitian

Penelitian terdiri dari empat proses utama yaitu proses nanoenkapsulasi, karakterisasi, penentuan efisiensi enkapsulasi dan uji *drug-release*. Alur prosedur penelitian ditunjukkan pada gambar 3.1.



Gambar 3.1. Alur Prosedur Penelitian

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Penyiapan Bahan Baku Biji Karabenguk

Biji karabenguk segar yang baru dipanen, dicuci, dirajang dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk.

3.4.2. Ekstraksi Biji Karabenguk

Proses ekstraksi biji karabenguk dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%-air (perbandingan volume 1:1). Sampel direndam dalam pelarut selama 3 x 24 jam dengan penggantian pelarut baru setiap 24 jam, kemudian ditambahkan asam sitrat hingga pH 3. Maserat diuapkan pelarutnya sampai kering pada suhu 40°C di bawah tekanan rendah dalam *rotary vacuum*.

evaporator. Kemudian dengan menggunakan alat *freeze dryer* ekstrak cair dikeringkan sampai didapatkan ekstrak karabenguk yang kering (Puspitasari, 2018).

3.4.3. Nanoenkapsulasi Ekstrak Biji Karabenguk (*Mucuna pruriens*) dalam Asam Palmitat

Prosedur enkapsulasi ekstrak biji karabenguk dalam asam palmitat menggunakan metode modifikasi difusi pelarut yang diadaptasi dari Benages *et al.* (2008) dengan adanya modifikasi perbandingan massa asam palmitat, durasi ultrasonikasi dan amplitudo ultrasonikasi. Asam palmitat dan ekstrak karabenguk (10 mg) dimasukkan ke dalam larutan campuran etanol dan aseton (18 ml:6 ml), di panaskan pada suhu $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ dalam penangas air kemudian ditambahlam aquades sebanyak 110 ml dan diaduk selama 5 menit menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan emulsi dalam keadaan panas kemudian di ultrasonikasi menggunakan *Ultrasonic Cell Disruptor* (UCD-250) Biobase dengan variasi durasi (5, 10, 25, 35 dan 45 menit) dan amplitudo (10%, 20%, 40%, 55%, 70% dan 85%) . Larutan didinginkan pada suhu ruang untuk membentuk dispersi larutan yang sempurna kemudian ditambahkan larutan HCl 0,1 M hingga pH 1,5 hingga terbentuk agregasi nanopartikel. Pemisahan agregasi nanopartikel dari larutan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 40 menit. Proses pengeringan serbuk nanopartikel dilakukan dengan menambahkan etanol pada endapan hasil sentrifugasi kemudian diuapkan. Asam palmitat nanopartikel dibuat dengan prosedur yang sama tanpa menambahkan ekstrak biji karabenguk.

3.4.4. Karakterisasi Produk Nanoenkapsulasi Ekstrak Biji Karabenguk (*Mucuna pruriens*) dalam Asam Palmitat.

3.4.4.1. *Fourier Transformation Infrared (FTIR)*

Spektrum FTIR digunakan untuk mengetahui gugus fungsi serta jenis interaksi antara ekstrak karabenguk dengan asam palmitat (Madhusudana Rao *et al.*, 2017). Produk nanoenkapsulasi ekstrak karabenguk dalam asam

palmitat ditimbang ± 5 mg dengan pelat KBr sebanyak 150 mg, selanjutnya sampel digerus hingga halus dan dimasukkan ke *sample holder* lalu di *press*. Pelat dimasukkan ke dalam FTIR. Hasil spektrum yang diperoleh kemudian dibandingkan untuk melihat interaksi yang terjadi antara ekstrak biji karabenguk dengan asam palmitat (Badshah *et al.*, 2018).

3.4.4.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Karakterisasi menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dilakukan untuk mengetahui morfologi sampel nanoenkapsulasi ekstrak karabenguk dalam asam palmitat. Sampel yang telah dikeringkan disuspensikan dalam 1 ml aquades, 2 μl suspensi ditempatkan pada permukaan kaca kemudian dikeringkan dalam oven. Setelah itu, potongan melintang sampel dilapisi dengan emas (Au). Pengujian morfologi dilakukan menggunakan SEM dengan kondisi vakum pada tegangan 20 kV (Xie, *et al.*, 2011) kemudian foto hasil pemindaian menggunakan SEM tersebut digunakan untuk menentukan area pori serta diameter fiber sampel dengan menggunakan perangkat lunak. (Moritz *et al.*, 2014; Muller *et al.*, 2013).

1.4.4.3. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Karakterisasi sampel menggunakan TEM bertujuan untuk mengetahui ukuran partikel sampel. Preparasi sampel untuk analisis TEM dilakukan dengan melarutkan sampel dalam etanol. Alat yang digunakan adalah HT7700 yang memiliki tegangan maksimum 120 kV. Analisis TEM dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi ITB.

3.4.5. Uji Efisiensi Enkapsulasi dan Kapasitas Pemuatan

Pembuatan kurva kalibrasi untuk menentukan konsentrasi ekstrak biji karabenguk yang terjerap dalam asam palmitat dilakukan dengan membuat larutan stok 400 ppm yang dibuat dengan cara seperti pada prosedur proses nanoenkapsulasi akan tetapi tidak menggunakan asam palmitat. Larutan stok diencerkan menjadi 80, 160, 240, 300 dan 364 ppm menggunakan labu ukur 10 ml kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 290,5 nm. Proses penentuan efisiensi enkapsulasi dilakukan dengan mengukur absorbansi supernatan ekstrak karabenguk yang diproses seperti pada prosedur proses nanoenkapsulasi akan tetapi tidak menambahkan asam palmitat (konsentrasi ekstrak awal) dan mengukur absorbansi supernatant ekstrak karabenguk yang telah di enkapsulasi oleh asam palmitat (konsentrasi ekstrak akhir). Perhitungan untuk menentukan efisiensi enkapsilasi (EE) dan kapasitas pemuatan/*loading capacity* (LC) sebagai berikut.

$$\%EE = \frac{[ekstrak\ awal] - [ekstrak\ akhir]}{[ekstrak\ awal]} \times 100\%$$

$$LC = \frac{Massa\ ekstrak\ terjerap}{massa\ produk\ nanopartikel} \times 100\%$$

3.4.6. Uji Pelepasan (*Drug-Release*) Produk Nanoenkapsulasi Ekstrak Biji Karabenguk dalam Asam Palmitat

Uji *drug-release* dilakukan dalam kondisi dua pH yang berbeda, yaitu pH 1,2 dan 7,4. Pembuatan larutan pH 1,2 yaitu melarutkan 2 gram NaCl dalam 1 L aquades kemudian ditambah 14 ml HCl 37% hingga pH 1,2. Buffer fosfat pH 7,4 dibuat dengan melarutkan 6,8 gram KH₂PO₄ dalam 650 ml aquades kemudian ditambahkan 0,2 M NaOH dan ditandabataskan dalam labu ukur 1 L. Penentuan persen pelepasan obat menggunakan kurva kalibrasi dengan melarutkan ekstrak karabenguk dalam buffer fosfat pH 1,2 dan 7,4 Kemudian

diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 279,5 nm (pH 1,2) dan 281 nm (pH 7,4).

Uji *drug release* pada masing-masing pH menggunakan metode membran dialisis. Sampel hasil enkapsulasi ditimbang 2 mg ±0.2 mg kemudian dilarutkan dalam 3 ml larutan pH (larutan donor) dan dimasukkan ke dalam kantung dialisis. Kantung dialisis berisi sampel direndam dalam 30 ml larutan pH (larutan penerima) pada suhu 37°C±1°C. Perendaman dilakukan masing-masing selama 30 menit, 1, 2, 3, 4 dan 5 jam, kemudian larutan penerima di ukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis.