

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama \pm 4 bulan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Kimia UPI, sedangkan untuk karakterisasi hasil enkapsulasi seperti TEM dilakukan di Laboratorium PPNN ITB serta karakterisasi menggunakan SEM dilakukan di LIPI Bandung.

3.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian utama adalah biji karabenguk (*Mucuna pruriens*) dari Yogyakarta dan asam stearat. Bahan penelitian lainnya antara lain etanol 96%, aseton, aquades, HCl, NaOH, KH₂PO₄, kantung dialisis, tabung sentrifugasi, kertas saring, botol timbang, botol vial, *plastic wrap*.

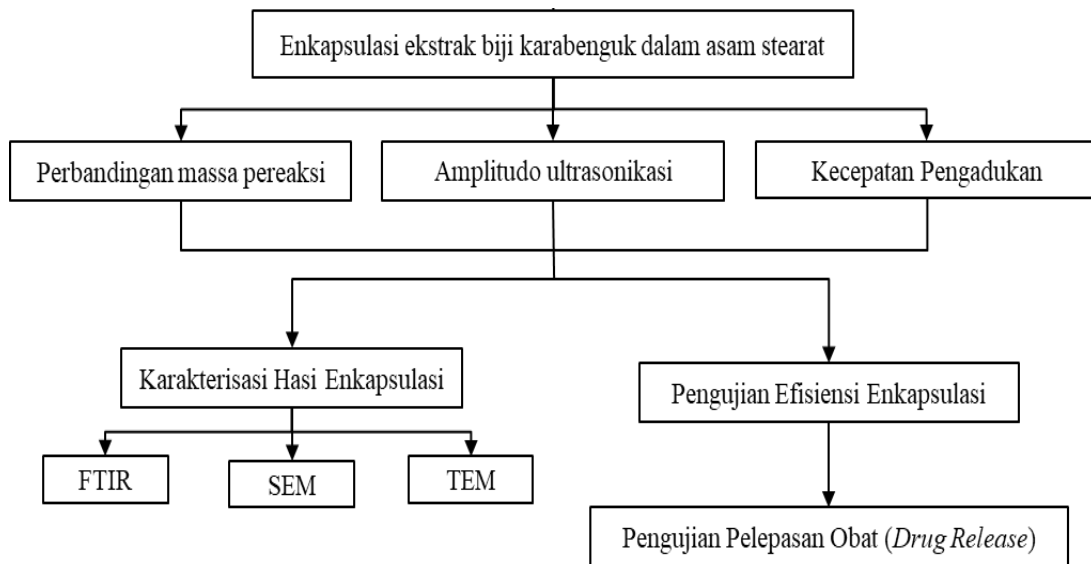
3.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam pengumpulan data penelitian meliputi:

1. Alat untuk pembuatan enkapsulasi biji karabenguk dalam asam stearat, yaitu labu erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 100 mL, gelas kimia 200 mL, *hotplate*, penangas, termometer, *magnetic stirrer*, pipet gondok 5 mL & 1 mL, *ultrasonic cell crusher noise isolating chamber*, pH meter, sentrifugasi, desikator, cawan penguapan.
2. Instrumen untuk keperluan karakterisasi enkapsulasi biji karabenguk dalam asam stearat, diantaranya spektrometer FTIR, *Scanning Electron Microscopy* (SEM), *Transmission Electron Microscopy* (TEM).
3. Alat dan instrumen untuk uji efisiensi enkapsulasi dan *drug release*, antara lain labu ukur 50 mL, labu ukur 10 mL, pipet ukur 5 mL dan 1 mL, sonikator, *hotplate*, penangas, termometer, labu erlenmeyer 200 mL, *magnetic stirrer*, corong, dan Spektrofotometer UV-VIS.

3.4 Alur Penelitian

Penelitian ini dirancang untuk memperoleh produk enkapsulasi ekstrak biji karabenguk (*Mucuna pruriens*) dalam asam stearat sebagai obat antiparkinson. Adapun tahapan penelitian yang akan dilakukan dapat dilihat dalam bagan alur yang ditunjukkan pada Gambar 3.1 berikut ini.



Gambar 3. 1 Alur penelitian.

3.5 Prosedur Kerja dan Pengolahan Data

3.5.1 Enkapsulasi Ekstrak Biji Karabenguk dalam Asam Stearat

Enkapsulasi ekstrak biji karabenguk dalam asam stearat dilakukan dengan menggunakan metode difusi pelarut yang sedikit dimodifikasi. Metode ini diadaptasi dari penelitian Hu *et al.*, (2005) dimana asam stearat (190 mg) ditambah 10 mg ekstrak karabenguk kemudian dilarutkan seluruhnya ke dalam campuran aseton (6 mL) dan etanol (6 mL) dalam penangas air pada suhu 70°C. Campuran yang dihasilkan dengan cepat didispersikan ke dalam 120 mL aquades menggunakan *magnetic stirrer* berkecepatan 400 rpm dalam penangas air pada 70°C selama ± 7 menit. Selanjutnya, sampel dimasukkan ke dalam *ultrasonic cell crusher noise isolating chamber* dengan amplitudo 62% selama 20 menit. Hasil yang diperoleh didinginkan pada suhu kamar dan diturunkan pH menggunakan HCl 0,1 M hingga

pH 1,5 dan membentuk agregasi nanopartikel. Kemudian, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 1 jam. Endapan hasil sentrifugasi dikumpulkan lalu dikeringkan menggunakan oven bersuhu 40°C hingga membentuk padatan serbuk. Variasi massa asam stearat nanopartikel, amplitudo ultrasonikasi, serta kecepatan pengadukan yang digunakan disajikan dalam Tabel di bawah ini.

Tabel 3. 1 Variasi perbandingan massa asam stearat dan ekstrak biji karabenguk

No	Perbandingan Massa AS: KB	Massa Asam Stearat (AS) (g)	Massa Ekstrak Biji Karabenguk (KB) (g)	Kecepatan pengadukan (rpm)	Amplitudo Ultrasonikasi (%)	Waktu Ultrasonikasi (menit)
1.1	9:1	0,09	0,01	400	62	20
1.2	14:1	0,14	0,01	400	62	20
1.3	19:1	0,19	0,01	400	62	20
1.4	24:1	0,24	0,01	400	62	20
1.5	29:1	0,29	0,01	400	62	20

Tabel 3. 2 Variasi amplitudo ultrasonikasi

No	Perbandingan Massa AS: KB	Massa Asam Stearat (AS) (g)	Massa Ekstrak Biji Karabenguk (KB) (g)	Kecepatan pengadukan (rpm)	Amplitudo Ultrasonikasi (%)	Waktu Ultrasonikasi (menit)
2.1	24:1	0,24	0,01	400	12	20
2.2	24:1	0,24	0,01	400	42	20
2.3	24:1	0,24	0,01	400	52	20
2.4	24:1	0,24	0,01	400	72	20
2.5	24:1	0,24	0,01	400	82	20

Tabel 3. 3 Variasi kecepatan pengadukan

No	Perbandingan Massa AS: KB	Massa Asam Stearat (AS) (g)	Massa Ekstrak Biji Karabenguk (KB) (g)	Kecepatan pengadukan (rpm)	Amplitudo Ultrasonikasi (%)	Waktu Ultrasonikasi (menit)
3.1	24:1	0,24	0,01	300	72	20
3.2	24:1	0,24	0,01	500	72	20
3.3	24:1	0,24	0,01	600	72	20
3.4	24:1	0,24	0,01	700	72	20
3.5	24:1	0,24	0,01	800	72	20

3.6 Karakterisasi Encapsulasi Ekstrak Biji Karabenguk dalam Asam Stearat

3.6.1 *Spektrofotometer Fourier Transformation Infrared (FTIR)*

Karakterisasi menggunakan FTIR digunakan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa hasil encapsulasi ekstrak biji karabenguk dalam asam stearat. Penentuan gugus fungsi ini dilakukan menggunakan spektrofotometer FTIR Simadzu 8400 dengan rentang bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} . Pelet KBr ditimbang sebanyak 150 mg dan sampel sejumlah ± 5 mg, selanjutnya sampel digerus hingga halus dan dimasukkan ke *sample holder* lalu di *press*. Pelet dimasukkan ke dalam FTIR. Hasil spektra yang diperoleh kemudian dibandingkan untuk melihat interaksi yang terjadi antara ekstrak biji karabenguk dengan asam stearat.

3.6.2 *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

Karakterisasi menggunakan *Scanning Electron Microscope (SEM)* digunakan untuk melihat morfologi permukaan struktur dan ukuran dari encapsulasi ekstrak karabenguk dalam asam stearat. Pengamatan dilakukan di Laboratorium LIPI Bandung. Alat SEM yang digunakan yaitu Hitachi SU 3500, dapat dioperasikan pada kondisi *low vacuum* agar menghindari kerusakan sampel. Alat SEM ini sudah dilengkapi dengan *Energy Dispersive Spectrometer (EDS)* yang dapat melakukan perbesaran hingga 300.000 kali.

3.6.3 *Transmission Electron Microscopy (TEM)*

Karakterisasi menggunakan *Transmission Electron Microscopy (TEM)* dilakukan untuk mengetahui morfologi struktur internal dan ukuran dari encapsulasi

ekstrak karabenguk dalam asam stearat. Pengamatan dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi ITB. Alat yang digunakan untuk melihat detail struktur internal sampel dalam resolusi tinggi adalah HT7700, dimana memiliki tegangan maksimum sebesar 120 kV. Perbesaran maksimum TEM HT7700 yaitu 600.000 kali, akan tetapi nilai perbesaran dibatasi oleh kualitas dan jenis sampel. Sampel harus dapat ditembus oleh berkas elektron dengan maksimal ketebalan 100nm. Pengamatan menggunakan TEM, tidak memperbolehkan sampel mengandung cairan atau berada dalam fasa cair.

3.7 Pengujian Enkapsulasi Ekstrak Biji Karabenguk dalam Asam Stearat

3.7.1 Efisiensi Enkapsulasi (Ee)

Efisiensi enkapsulasi dilakukan berdasarkan penelitian Ahmad *et al.* (2022) dan beberapa modifikasi, diukur menggunakan Spektrofotometer UV/VIS (UV Mini 240). Berikut merupakan langkah-langkah untuk mengukur efisiensi enkapsulasi:

1) Pembuatan larutan induk 100 ppm

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,005 gram lalu dilarutkan dalam labu ukur 50 mL menggunakan larutan yang sama dengan proses enkapsulasi yaitu etanol, aseton dan aquades dengan perbandingan 1:1:12. Kemudian, larutan tersebut disonikasi selama ± 20 menit.

2) Pembuatan larutan deret standar

Larutan deret standar 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm dibuat pada labu ukur 10 mL, selanjutnya diencerkan hingga tanda batas dan disonikasi selama ± 5 menit.

3) Penentuan panjang gelombang maksimum

Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan pada rentang 200-400nm. Salah satu larutan deret standar ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

4) Pengukuran deret standar dan sampel

Pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang yang telah ditentukan, selanjutnya kurva kalibrasi dibuat antara konsentrasi dengan serapan deret standar.

Hal yang sama dilakukan pada sampel, apabila serapan sampel berada di luar kurva kalibrasi maka sampel harus diencerkan.

5) Perhitungan hasil analisis

Persamaan garis linear yang didapat yaitu $y=ax+b$ dengan keterangan y adalah serapan dan x adalah konsentrasi. Efisiensi enkapsulasi (E_e) dan kapasitas pemuatan obat (L_c) ekstrak biji karabenguk dalam asam stearat dihitung dari persamaan sebagai berikut.

$$\% E_e = \frac{\text{massa awal (ekstrak)} - \text{massa terjerap (sampel)}}{\text{massa awal (ekstrak)}} \times 100$$

$$\% L_c = \frac{\text{massa terjerap}}{\text{massa total (massa terjerap + massa asam stearat)}} \times 100$$

3.7.2 Uji Pelepasan Obat (*Drug Release*)

Berdasarkan penelitian Morales *et al.* (2021) uji pelepasan obat (*drug release*) dilakukan pada larutan NaCl (pH 1,2) dan buffer fosfat (pH 7,4) diukur menggunakan Spektrofotometer UV/VIS (UV Mini 240). Langkah-langkah untuk menguji pelepasan obat:

1) Pembuatan larutan NaCl (pH 1,2) dan buffer fosfat (pH 7,4)

Pada pembuatan larutan NaCl, NaOH ditimbang sebanyak 2 gram lalu dilarutkan pada 1 L aquades, kemudian HCl 12 M ditambahkan sebanyak ± 14 mL dan diperoleh NaCl pH 1,2. Pada pembuatan buffer fosfat, KH_2PO_4 ditimbang sejumlah 6,8 gr lalu ditambahkan dengan 650 mL aquades, selanjutnya ditambahkan dengan NaOH sebanyak 2 gram yang telah dilarutkan pada 250 mL labu ukur. Aquades ditambahkan hingga tanda batas dan didapat buffer fosfat pH 7,4.

2) Pembuatan larutan induk 100 ppm (NaCl) dan 400 ppm (buffer fosfat)

Ekstrak masing-masing ditimbang sebanyak 0,005 gram dan 0,01 gram lalu dilarutkan dalam masing-masing labu ukur 50 mL menggunakan larutan NaCl dan buffer fosfat, kemudian larutan tersebut disonikasi selama ± 20 menit.

3) Pembuatan larutan deret standar

Larutan deret standar untuk NaCl pH 1,2 dibuat pada konsentrasi 4 ppm, 8 ppm, 12 ppm, 16 ppm dan 20 ppm di labu ukur 10 mL, sedangkan larutan deret standar untuk buffer fosfat 7,4 dibuat pada konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm dan 125 ppm. Larutan deret standar diencerkan hingga tanda batas dan disonikasi selama ± 5 menit.

4) Penentuan panjang gelombang maksimum

Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan pada rentang 200-300 nm. Salah satu larutan deret standar ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

5) Pengukuran deret standar

Pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang yang telah ditentukan, selanjutnya kurva kalibrasi dibuat antara konsentrasi dengan serapan deret standar.

6) Pengukuran sampel

Pada pengukuran *drug release* dilakukan menggunakan metode membran semipermeabel (membran selofan). Sampel ditimbang sejumlah 3 mg lalu dimasukkan ke dalam membran semipermeabel dan ditambah masing-masing larutan NaCl pH 1,2 dan buffer fosfat 7,4 sejumlah 10 mL. Membran semipermeabel yang telah diisi sampel dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan masing-masing menggunakan NaCl pH 1,2 dan buffer fosfat 7,4 sejumlah 30 mL, kemudian dipanaskan pada suhu 37°C dengan variasi waktu pemanasan 30 menit, 1 jam, 1,5 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam dan 5 jam. Variasi sampel diukur serapannya dan hasil *drug release* dibandingkan.

7) Perhitungan hasil analisis

Persamaan garis linear yang didapat yaitu $y = ax + b$ dengan keterangan y adalah serapan dan x adalah konsentrasi. Uji pelepasan obat (*drug release*) ekstrak biji karabenguk dalam asam stearat dihitung dari persamaan sebagai berikut.

$$\% \text{ Drug Release} = \frac{\text{Massa drug release}}{\text{Massa terjerap}} \times 100$$