

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental. Daun insulin (*Tithonia diversifolia*) diekstraksi dengan metode refluks yaitu menggunakan pelarut etanol 96%. Kemudian hasil dari ekstraksi akan dibuat menjadi nanoenkapsulasi ekstrak etanol daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dengan metode gelasi ionik dengan variasi konsentrasi kadar kitosan 0,1%-0,4% kemudian dilakukan uji karakteristik nanopartikel dari ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*).

B. Lokasi Penelitian

1. Pembuatan nanoenkapsulasi ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo.
2. Pembuatan uji fitokimia menggunakan metode uji tabung ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pembuatan uji karakteristik nanoenkapsulasi ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dilakukan di Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini dilakukan secara eksperimental yaitu dengan sampel yang digunakan adalah ekstrak daun insulin yang telah

diekstrak sebelumnya oleh peneliti sebelumnya kemudian dilakukan uji karakteristik nanoenkapsulasi dengan menggunakan metode galasi ionik.

D. Variable Penelitian

1. Variabel bebas ialah variabel yang mempengaruhi atau sebab perubahan yang akan timbul dari variabel terikat. Variable bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak daun insulin dan kadar kitosan dalam 6 mL larutan Asam Asetat 1% dibuat larutan kitosan dengan varian 0,1% b/v, 0,2% b/v, 0,3% b/v, dan 0,4 % b/v.
2. Variabel tergantung ialah variabel yang dipengaruhi akibat adanya variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu skrining fitokimia, formulasi terbaik dan karakteristik nanoenkapsulasi ekstrak etanol daun insulin.
3. Variabel terkendali ialah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu pembuatan sediaan nanoenkapsulasi ekstrak etanol daun insulin (*Tithonia diversifolia*).

E. Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, tabung teaksi, pipet tetes, corong kaca, gelas beaker 100 mL, beaker glas 250 mL, magnetic stirrer, Partikel Size Analyzer, spatula, gelas ukur 10 mL, gelas ukur 100 mL, neraca analitik, *Particle Size Analyzer*

(PSA), tabung reaksi, rak tabung, spektrofotometer UV-VIS, serbet, tissue, sentrifugasi, tabung sentrifugasi 10 mL, climatic chamber.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*), kitosan, dan Na-TPP, etanol 96%, etanol p.a, kuarsetin, HCl, aquadest, butir magnesium, HCl 2N, kloroform, pereaksi Dragendorff dan Mayer, NaCl 10%, FeCl₃ 1%, asam asetat glacial 1%.

F. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Daun insulin (*Tithonia diversifolia*) diperoleh dari daerah Magelang, Provinsi Jawa Tengah. Pengambilan tumbuhan dilakukan dengan cara sengaja (porpusif) dan tidak membandingkan hasil dari ekstrak daun insulin dengan ekstrak daun insulin dari tumbuhan yang sama yang berasal dari daerah lain.

2. Determinasi Tumbuhan

Detarminasi bahan tumbuhan daun insulin (*Tithonia diversifoia*) dilakukan di Laboratium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi FSM Universitas Diponegoro, Semarang.

3. Pengelolaan Sampel

Daun insulin (*Tithonia difersifolia*) dipetik dalam kondisi segar, berwarna hijau dan belum terdapat potongan yang kering, setelah itu dilakukan sortasi basah. Kemudian daun insulin dicuci pakai dengan

air mengalir hingga bersih kemudian airnya ditiriskan. Daun insulin kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari secara tidak langsung dengan menggunakan kain hitam sebagai penutup, kemudian dilakukan sortasi kering. Daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang sudah kering diserbuk dengan cara di blender sampai halus. Kemudian serbuk diayak dengan menggunakan ayakan dengan derajat kehalusan 40 mesh agar memperoleh serbuk daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang lebih halus (Ningsih, *et al.*, 2017).

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Serbuk daun insulin (*Tithonia diversifolia*) sebanyak 1800 gram yang telah diblender dan diayak, kemudian dilarutkan ke dalam etanol 96%. Pelarut yang digunakan sebanyak 600 ml (1:3). Proses perolehan filtrat dilakukan dengan metode refluks selama 4 jam selama 5 hari, pada suhu 80°C. pemilihan metode refluks menghasilkan rendemen yang lebih besar (Apriliana, *et al.*, 2019). Ekstrak diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40-60°C dan dilanjutkan dengan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental (Ningsih, *et al.*, 2017)

5. Skrining Fitokimia Dengan Uji Tabung

a. Uji Flavonoid

Ekstrak dua insulin (*Tithonia diversifolia*) ditimbang sebanyak 0,5 mL, ditambahkan 3 tetes Asam Klorida pekat, 3-4 butir Magnesium. Warna berubah menjadi merah, kuning atau

jingga menandakan adanya kandungan flavonoid (Purwati, *et al.*, 2017)

b. Uji Alkaloid

Timbang 1,5 mL ekstrak kasar daun insulin, siapkan 2 tabung dan kemudian masukkan ke masing-masing tabung. Kemudian pada tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer membentuk endapan putih menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Pada tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendrof jika terdapat endapan jingga atau merah coklat menunjukkan adanya kandungan alkaloid.

c. Uji Saponin

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) ditimbang 10 mg, ditambah 20 mL aquadest lalu dipanaskan. Selanjutnya dikocok kuat selama 10 detik, akan terbentuk buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 30 menit, dan tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin (Tarigan, *et al.*, 2008)

d. Uji Tanin

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) ditimbang 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas dan 5 tetes larutan NaCl 10%. Campuran dibagi menjadi 2 tabung reaksi, tabung pertama sebagai kontrol dan tabung kedua ditambahkan larutan FeCl₃ 1% 3 tetes.

Hasil positif apabila terbentuk warna biru atau biru hitam (Tarigan, *et al.*, 2008)

e. Uji Fenolik

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) ditimbang 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas dan 5 tetes larutan NaCl 10%. Campuran dibagi menjadi 2 tabung reaksi, tabung pertama sebagai kontrol dan tabung kedua ditambahkan larutan FeCl₃ 1% 3 tetes. Hasil positif apabila terbentuk warna biru atau biru hitam (Tarigan, *et al.*, 2008).

6. Prosedur Pembuatan Kadar Kitosan Dalam 100 mL Larutan Asam Asetat 1%

- a. Sebanyak 0,1 gram serbuk kitosan yang digunakan dalam 100 mL larutan asam asetat 1 % dan diaduk dengan magnetik stirrer sehingga kitosan larut.
- b. Sebanyak 0,2 gram serbuk kitosan yang digunakan dalam 100 mL larutan asam asetat 1 % dan diaduk dengan magnetik stirrer sehingga kitosan larut.
- c. Sebanyak 0,3 gram serbuk kitosan yang digunakan dalam 100 mL larutan asam asetat 1 % dan diaduk dengan magnetik stirrer sehingga kitosan larut.
- d. Sebanyak 0,4 gram serbuk kitosan yang digunakan dalam 100 mL larutan asam asetat 1 % dan diaduk dengan magnetik stirrer sehingga kitosan larut.

7. Prosedur Pembuatan Kadar Na-TPP 1% Dalam 50 mL Larutan Air

Sebanyak 50 mg serbuk Na-TPP (Natrium Tripolifosfat) dilarutkan dalam 50 mL aquadest dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer hingga Na-TPP larut.

8. Formulasi Pembuatan Nanoenkapsulasi Ekstrak Etanol Daun Insulin

(*Tithonia diversifolia*)

Tabel 3.1 Formula Nanoenkapsulasi

Bahan	P1	P2	P3	P4
Ekstrak etanol daun insulin (<i>Tithonia diversifolia</i>) (gram)	0,1	0,1	0,1	0,1
Kadar kitosan (%b/v) dalam 100 mL larutan asam asetat 1%	0,1	0,2	0,3	0,4
Kadar Na-TPP (%b/v) dalam 1 mL larutan air	0,1	0,1	0,1	0,1

9. Prosedur Pembuatan Nanoenkapsulasi Ekstrak Etanol Daun Insulin

(*Tithonia diversifolia*)

Pembuatan nanoenkapsulasi ekstrak etanol daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dengan menimbang 0,1 gram ekstrak kental daun insulin. Ekstrak kental daun insulin kemudian dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 12,5 mL dalam gelas beaker. Sebanyak 5 mL larutan stock ekstrak ditambahkan kedalam larutan Na-TPP 0,1% sebanyak 12,5 mL dengan cara diteteskan disertai pengadukan menggunakan magnetik stirrer. Setelah itu campuran ekstrak dan tripolifosfat ditambahkan kedalam larutan kitosan (variasi konsentrasi 0,1 –0,4% b/v) sebanyak 62,5 mL setetes demi setetes pada temperature ruangan di bawah putaran magnetik stirrer dengan kecepatan 1500 rpm selama 3 jam

sampai terbentuk suspensi nanopartikel. Kemudian nanopartikel ekstrak etanol daun insulin disaring menggunakan kertas saring. Kemudian diukur pada spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm. Supernatan yang diperoleh berupa suspensi nanopartikel ekstrak etanol daun insulin kemudian dilakukan karakterisasi PSA dan % transmittansi.

10. Uji Karakteristik Nanoenkapsulasi Ekstrak Etanol Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Pengecekan Karakterisasi Nanopartikel yang dilakukan meliputi ukuran partikel dan distribusi nanopartikel, % transmittansi:

a. Ukuran partikel dan distribusi nanopartikel

Ukuran partikel dengan satuan nm, nilai polidispersi indeks dengan satuan mV diukur menggunakan NanoQ Zetasizer (Malvern Instrument Ltd, Inggris). Pengukuran ukuran partikel menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dalam bentuk Zaverage (Malvern, 2008).

b. % Transmittansi

Nanopartikel ekstrak etanol daun insulin disaring menggunakan kertas saring. Larutan campuran nanopartikel dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dilihat % transmittansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 650 nm.

11. *Cycling Test*

Sediaan disimpan pada suhu $\pm 10^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam kemudian dipindahkan pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (satu siklus). Kemudian diukur PSA, PDI, dan %transmittannya kembali.

12. Analisis Data

Penentuan ukuran partikel dan distribusi nanopartikel diamati dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* untuk mengetahui ukuran nano ekstrak dan partikel atau indeks polidispersitas. Nilai persen transmittan diamati dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Nilai persen transmittan digunakan untuk mengukur kejernihan dari suatu larutan atau sistem disperse. Uji stabilitas untuk melihat kestabilan sediaan nanopartikel dalam penyimpanan. dilanjutkan dengan uji T.