

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Sampel

Rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.) yang diambil dari hasil Perkebunan Pare berumur 8 bulan yang dideterminasi di **UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi-LIPI**, Jl. Raya Surabaya Malang Km. 65, Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur 67163, Indonesia.

4.2. Bahan Kimia

- *Phosphatidylcholine* SIGMA-Aldrich
- Propilenglikol (Merck)
- NaH₂PO₄
- Na₂HPO₄
- Metanol pro analysis (Merck)
- Aquadest
- Etanol 96% pro analysis (Merck)
- Standar EPMS

4.3. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Ultraturax T-25 ULTRA-TURRAX Digital Homogenizer
- **Scanning Electron Microscopy (SEM) Merk FEI**
- **Centrifuge**
- **Auto Sampler Linomat 5**
- **Automatic Development Chamber 2**
- **Camag TLC scanner**

4.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk mengetahui persen penjerapan pada satu formula liposom ekstrak etanol 96% kencur yang diperlakukan dengan dua metode yang berbeda. Yang pertama formula liposom ekstrak etanol kencur 96% dibuat dengan metode *Thin Film* dan yang kedua dilakukan pembuatan dengan metode Injeksi. Selanjutnya melihat karakteristik dari hasil liposom ekstrak etanol 96% kencur dari kedua metode menggunakan Scanning Electron Microscopy (SEM). Dari hasil karakteristik yang berbeda (ukuran partikel) selanjutnya melihat persen terjerap dari ekstrak kencur pada liposom dengan melakukan pemisahan ekstrak bebas dengan ekstrak terjerap menggunakan teknik centrifuge dan Triton X 100. Hasil pemisahan ekstrak pada liposom selanjutnya dilakukan penetapan kadar EPMS pada ekstrak menggunakan instrument TLC untuk mendapatkan persen terjerap.

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang dipilih untuk diteliti untuk ditentukan hubungan antara fenomena yang diamati, antara lain :

- Metode *Thin Film*
- Metode Injeksi

4.4.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel yang diukur yang hasilnya berpengaruh pada variabel bebas, variabel tergantung yang digunakan adalah:

- Persen penjerapan (% *Entrapment Efficiency*)

4.4.3. Variabel Comfounding

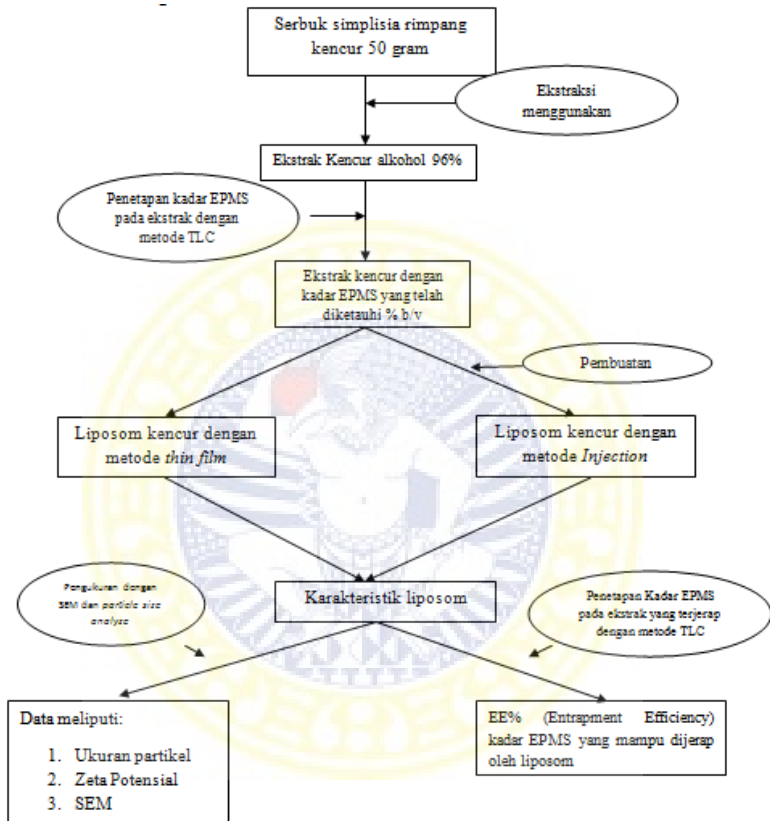
Variabel confounding merupakan faktor-faktor yang perlu dikontrol agar tidak mengganggu hasil penelitian:

- Jenis dan jumlah Fosfolipid yang digunakan (PC)
- Jumlah ekstrak kencur pada formula liposom
- pH buffer



4.5. Metode Penelitian

4.5.1. Kerangka Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka kerja penelitian

4.5.2. Pembuatan Ekstrak Kencur

1. Serbuk rimpang kering, ditimbang sebanyak 50 gram.
2. Serbuk rimpang kering diekstraksi menggunakan alkohol 96% sebanyak 500ml yang merupakan volume total 4 kali ekstraksi.
3. Proses ekstraksi dilakukan dengan microwave pada setiap tahap dengan power 30 selama 2 detik sebanyak 10 kali.

4.5.3. Penetapan Kadar EPMS pada ekstrak kencur

1. Standar EPMS dibuat baku induk dengan kadar 8000 ppm
2. Dari baku induk dibuat 5 kadar yang berbeda 160ppm, 200ppm, 240ppm, 280ppm, 320ppm
3. Masing-masing kadar ditotolkan sebanyak 0.5 μ l pada plat TLC
4. Sampel ditotolkan pada plat yang sama dengan standar EPMS dengan cara berselang seling
5. Plat TLC diekspansi dengan eluen EA:Hexan 9:1
6. Scan plat TLC dengan *Camag TLC Scanner* lalu dilihat spesifisitas meliputi *purity* dan *identity*
7. Dari data scanner didapat data linieritas dari kurva baku meliputi r , v_{x0} , persamaan regresi
8. Dari persamaan regresi nilai area sampel dikonversikan dan didapat data kadar EPMS dalam sampel

4.5.4. Preparasi Formula Liposom metode *Thin Film*

1. Pembuatan formula liposom pertama yang dilakukan adalah menimbang phosphatidylcholine 4gram dan dilarutkan pada alkohol 96% 400ml sebagai fase lipid.
2. Panaskan pada *heater* dan lechitin disaring.
3. Larutan PC dalam alkohol dilakukan kesetaraan dengan cara mengambil 1ml larutan PC kedalam vial kosong yang telah ditimbang uapkan hingga pelarut menguap sempurna.

4. Ekstrak kencur dipipet yang setara dengan 100mg EPMS
5. Larutan PC dipipet yang setara 1000mg PC
6. Ekstrak dan PC dicampur hingga membentuk *true solution*
7. Lakukan penguapan solven dengan rotavapory pada suhu 40⁰ C hingga membentuk *thin film*
8. Setelah terbentuk *thin film* selanjutnya penambahan buffer fosfat 9ml dan 1ml Propilenglikol sebagai fase aquose
9. Proses aging dilakukan dengan alat rotavapory tanpa vakum selama 60 menit.

4.5.5. Preparasi Formula Liposom metode Injeksi

1. PC dengan pelarut alkohol dipipet yang setara 1000mg PC(fase lipid)
2. Fase lipid ditambahkan ekstrak kencur yang setara 100mg EPMS
3. Fase aquose (9ml buffer phospat dan 1ml propilenglikol)
4. Fase aquose diinjeksikan pada fase lipid dengan cara diteteskan perlahan dan dibantu oleh homogenizer ultraturax.

4.5.6. Karakterisasi Formula liposom

Masing-masing formula liposom dilakukan karakterisasi SEM, ukuran partikel, Zeta Potensial, dan % terjerap.

4.5.7. SEM

Scanning electron microscopy (SEM) yaitu dengan cara 1 tetes formula liposom yang dipilih dioleskan pada lempeng logam dan di lakukan coating yang selanjutnya akan dilihat pada mikroskopi dengan perbesaran 10.000.

4.5.8. Ukuran Partikel

Ukuran partikel diukur dengan mengambil cuplikan liposom dan dimasukkan kedalam instrumen *particle size analyzer*.

4.5.9. Persen Penjerapan

Persen penjerapan dapat diartikan sebagai rasio dari obat yang terjebak dibagi kadar obat total dalam liposom dikali 100 persen. Hal tersebut dapat diatasi dengan teknik mikrofiltrasi atau sentrifugasi dan dialisis

Untuk mengetahui jumlah bahan obat yang tidak terjebak dalam sistem liposom dapat menggunakan beberapa cara, antara lain :

1. *Dialysis*

Sistem liposom didialisis dengan tabung dialisis (mol. Cut off weight 12000) menggunakan media dialisis campuran alkohol dan air (Maestrelli, 2006) Filtrat kemudian diukur kadar bahan aktifnya.

2. *Gel Filtration*

Obat yang tidak terjebak dipisahkan dari sistem dengan cara filtrasi gel menggunakan *Sephadex-G-50* column dan dieluasi dengan dapar fosfat salin atau normal salin (Patel, 2007). Filtrat kemudian diukur kadar bahan aktifnya

3. *Centrifugation*

Liposom disentrifus, supernatan yang dapat dipisahkan (Patel, 2007). Cara sentrifugasi untuk lebih jelasnya dapat dilakukan dengan cara berikut : Sejumlah 5,0 ml liposom disentrifus pada 10.000 rpm selama \pm 5 jam dan didekantasi. Supernatan yang diperoleh dipipet 1,0 ml dan dimasukkan ke dalam labu takar 25,0 ml, kemudian ditepatkan volumenya dengan buffer fosfat pH 7,4 hingga garis tanda. Larutan kemudian diukur kadar bahan aktifnya

4.5.10 Penetapan Kadar EPMS yang Terjerap pada Formula Liposom dengan Instrumen TLC

1. Standar EPMS dibuat baku induk dengan kadar 8000 ppm
2. Dari baku induk dibuat 5 kadar yang berbeda 160ppm, 200ppm, 240ppm, 280ppm, 320ppm
3. Masing-masing kadar ditotolkan sebanyak 0.5 μ l pada plat TLC
4. Sampel ditotolkan pada plat yang sama dengan standar EPMS dengan cara berselang seling
5. Plat TLC dieluasi dengan eluen EA:Hexan dengan perbandingan 9:1
6. Scan plat TLC dengan *Camag TLC Scanner* dengan panjang gelombang 307nm lalu dilihat spesifisitas meliputi *purity* dan *identity*
7. Dari data scanner didapat data linieritas dari kurva baku meliputi r , v_{x0} , persamaan regresi
8. Dari persamaan regresi nilai area sampel dikonversikan dan didapat data kadar EPMS dalam sampel.