

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan semua bagian yang menjadi sasaran objek penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah fikosianin dari ekstrak spirulina sebagai pigmen alami yang dibuat mikroenkapsulasi.

2. Sampel

Sampel merupakan bagian dari populasi yang digunakan saat melakukan penelitian. Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah formulasi mikrokapsul fikosianin dengan maltodextrin dan isolat protein kedelai sebagai penyalut dengan berbagai perbandingan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian terdiri atas variabel terkontrol, variabel bebas, dan variabel tergantung. Variabel dalam penelitian ini adalah formulasi dari mikrokapsul fikosianin yang dibuat dengan variasi konsentrasi dan kombinasi penyalut serta uji karakteristik mikrokapsul dengan berbagai macam pengujian.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi digolongkan dalam beberapa macam variabel seperti variabel terkontrol, variabel bebas dan variabel tergantung.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Adapun variabel terkontrol pada penelitian ini adalah proses ekstraksi, proses pembuatan mikrokapsul, kondisi penelitian dan metode yang digunakan.

Variabel bebas yaitu variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Adapun variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi konsentrasi dari kombinasi penyalut.

Variabel tergantung adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian pada penelitian. Adapun variable tergantung pada penelitian ini adalah karakterisasi mikrokapsul fikosianin yaitu kadar fikosianin, kadar air, efisiensi penjerapan dan distribusi ukuran partikel.

3. Definisi oprasional variabel utama

Pertama, serbuk spirulina adalah serbuk dari spirulina yang sudah dikeringkan dengan oven yang berasal dari PT. Albitec, Kec Ungaran, Kab. Semarang, Jawa Tengah dengan identitas serbuk kering dan tidak rusak.

Kedua, ekstrak spirulina adalah ekstrak berupa fikosianin hasil dari ekstraksi dengan metode sonikasi menggunakan buffer fosfat pH 6,7 sebagai pelarut.

Ketiga, formulasi mikrokapsul adalah formulasi yang terdiri dari fikosianin (90%) dan penyalut (10%) dengan kombinasi perbandingan maltodextrin dan isolat protein kedelai 10%:0% (F1), 7.5%:2.5% (F2), 5%:5% (F3) (b/b).

Keempat, karakterisasi sediaan mikrokapsul fikosianin adalah uji fisikokimia mikrokapsul yang meliputi kadar fikosianin, kadar air, efisiensi enkapsulasi, distribusi ukuran dan ukuran partikel.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Penelitian ini menggunakan alat timbangan digital (Shimadzu TX423L), magnetic stirrer, hot plate (J Lab tech), ultrasonikator (Biobase UCD250), sentrifuge (8 hole Oregon LS-04S), spektrovotometer Uv-Vis (Shimadzu UV-1800 Double Beam), lemari pendingin (Sharp), *freeze dryer* (BenchTop Pro with Omnitronics), PSA mastersizer 3000 malvern prinsip *Laser Diffraction*, alat-alat gelas Pyrex (gelas ukur, pipet volume, labu takar, vial) dan alat non gelas (tabung effendrof dan rak), kertas saring, kurs porselin.

2. Bahan

Penelitian ini menggunakan serbuk spirulina kering sebagai bahan yang akan dibuat menjadi fikosianin berasal dari (PT. Albitec, Ungaran, Jawa Tengah), penyalut dengan maltodextrin dari Cargill, Telangana India dan isolat protein kedelai dari (Shandong Kawah Oils., Ltd., Guanxian Industrial Zone, China), buffer fosfat pH 6,7 ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$), aquades (H_2O) dan arang aktif sebagai pemurni.

D. Jalannya Penelitian

1. Prosedur kerja

1.1. Ekstraksi dan purifikasi pigmen fikosianin. (Gustiningyas, 2020) dengan modifikasi. Ekstraksi fikosianin dilakukan dengan cara biomassa kering *Spirulina platensis* ditimbang sebanyak 45 gram, ditambahkan pelarut buffer fosfat pH 6,7 sebanyak 900 mL atau dengan perbandingan biomassa dan pelarut 1:20 (b/v). Campuran biomassa kering dan pelarut diekstraksi menggunakan ultrasonikator pada frekuensi 42 kHz, amplitude 50 selama 22,5 menit jeda 10 detik. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 G selama 15 menit. Fikosianin yang merupakan komponen yang terlarut dalam pelarut akan terakumulasi dalam supernatan yang dihasilkan. Kemudian, supernatan tersebut dipisahkan. Supernatan yang dihasilkan dipurifikasi dengan arang aktif sebanyak 2,5 gram untuk 500 mL menggunakan *homogenizer* (stirer) selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Supernatan tersebut disentrifugasi kembali dengan kecepatan 4000 G selama 10 menit., kemudian disaring menggunakan kertas saring. Analisis yang dilakukan untuk karakteristik fikosianin adalah konsentrasi dan indeks murni dengan pengujian absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

1.2. Pembuatan mikrokapsul fikosianin (Astuti *et al.*, 2019) dengan modifikasi. Proses pembuatan mikrokapsul fikosianin dengan metode *freeze drying* yang dimodifikasi yaitu menggunakan penambahan enkapsulan sebanyak 10% dari jumlah total pelarut yang akan di mikroenkapsulasi. Penyalut yang digunakan adalah maltodekstrin kombinasia isolat protein kedelai dengan perbandingan 10%: 0% (F1), 7.5%: 2.5% (F2), 5%: 5% (F3) (b/b) dengan replikasi formulasi masing-masing 3 replikasi. Berikut disajikan formulasi dari mikrokapsul fikosianin per 100 mL larutan fikosianin pada Tabel 2.

Tabel 2. Formulasi mikrokapsul fikosianin

Sampel	Maltodextrin (%)	IPK (%)	Fikosianin (%)
F1	10	0	90
F2	7.5	2.5	90
F3	5	5	90

Enkapsulan atau bahan penyalut ditambahkan ke dalam larutan fikosianin, selanjutnya dihomogenisasi menggunakan *homogenizer* (stirer) dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit (1 rpm = 1/60 Hz).

Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 4000 G selama 10 menit, kemudian dibekukan di dalam *deep freezer* dengan suhu -80°C selama 24 jam hingga beku. Sampel yang sudah beku dimasukkan ke alat *freeze dryer* dengan suhu -67°C selama 96 jam untuk mengubahnya menjadi mikrokapsul.

2. Prosedur analisis

2.1 Kadar, rendemen dan indeks kemurnian fikosianin (Kurniasih *et al.*, 2018). Metode yang digunakan untuk menentukan kadar fikosianin dengan menggunakan alat spektrofotometer Uv-Vis. Fikosianin yang didapatkan setelah purifikasi sebanyak 0,2 mL dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL, ditambahkan buffer fosfat pH 6,7 sampai tanda batas, lalu digojok dan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometri Uv-Vis untuk menentukan indeks kemurnian dan kadar fikosianin. Mikrokapsul fikosianin (40 mg) ditambahkan 10 mL buffer fosfat pH 6,7 kemudian divorteks dan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer Uv-Vis untuk menentukan rendemen dan kadar mikrokapsul fikosianin. Absorbansi fikosianin diukur pada tiga panjang gelombang yaitu 280nm, 620 nm dan 652 nm. Untuk mengetahui kadar dan kemurnian fikosianin dapat diukur berdasarkan persamaan Bennett dan Bogoard (1973):

$$\text{PC} = \frac{\{A_{620} - (0,474 \times A_{652})\}}{5,34} \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{PP} = \frac{A_{620}}{A_{280}} \dots\dots\dots (2)$$

Untuk menghitung hasil rendemen mikrokapsul fikosianin digunakan rumus:

$$\text{Yield} = \frac{\text{PC} \times V}{\text{bk}} \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

- PC = konsentrasi fikosianin
- PP = kemurnian fikosianin
- Yield = rendemen fikosianin
- A280 = absorbansi pada 280 nm
- A620 = absorbansi pada 620 nm
- A652 = absorbansi pada 652 nm
- V = volume larutan (mL)
- bk = berat kering (mg)

2.2 Kadar air (Purnamayati *et al.*, 2016). Analisa kadar air menggunakan metode termogravimetri dengan cara menimbang kurs

porselin kosong yang sudah dipanaskan di dalam oven selama 1 jam (A) g, selanjutnya memasukkan 1 gram sampel serbuk mikrokapsul fikosianin kedalam kurs porselin, kemudian dimasukkan kedalam oven selama 5 jam, tiap satu jam dikeluarkan dari oven kemudian ditimbang sampai mendapatkan berat konstan (B) g. Kadar air dihitung dengan persamaan:

$$KA\% = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\% \dots \dots \dots (4)$$

Keterangan:

KA = kadar air
A = bobot cawan kosong
B = bobot cawan + serbuk
W1 = bobot serbuk
W2 = (B-A)

2.3 Distribusi ukuran partikel (Jasmina *et al.*, 2017). Analisis distribusi ukuran partikel diukur menggunakan PSA (*Particle Size Analysis*) Mastersizer 3000 Malvern *Instrument* dengan prinsip kerja *Laser Diffraction* pada rentang ukuran 0,01-3500 mikron. Mikrokapsul fikosianin (3 gram) dimasukkan ke alat Mastersizer 3000 Malvern dengan pendispersi udara (air compressor) dengan tekanan 0,1-4 Bar pada panjang gelombang 633nm (*red laser*). Lebar distribusi ukuran partikel dinyatakan sebagai *span value*, yang dapat dihitung dengan persamaan :

$$\text{span value}\% = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \dots \dots \dots (5)$$

2.4 Efisiensi enkapsulasi (Sadiah *et al.*, 2022) Efisiensi enkapsulasi didefinisikan sebagai jumlah fikosianin yang dapat dienkapsulasi. Efisiensi enkapsulasi dihitung berdasarkan rasio persen kadar fikosianin setelah dilapisi penyalut dan kadar fikosianin sebelum proses mikroenkapsulasi.

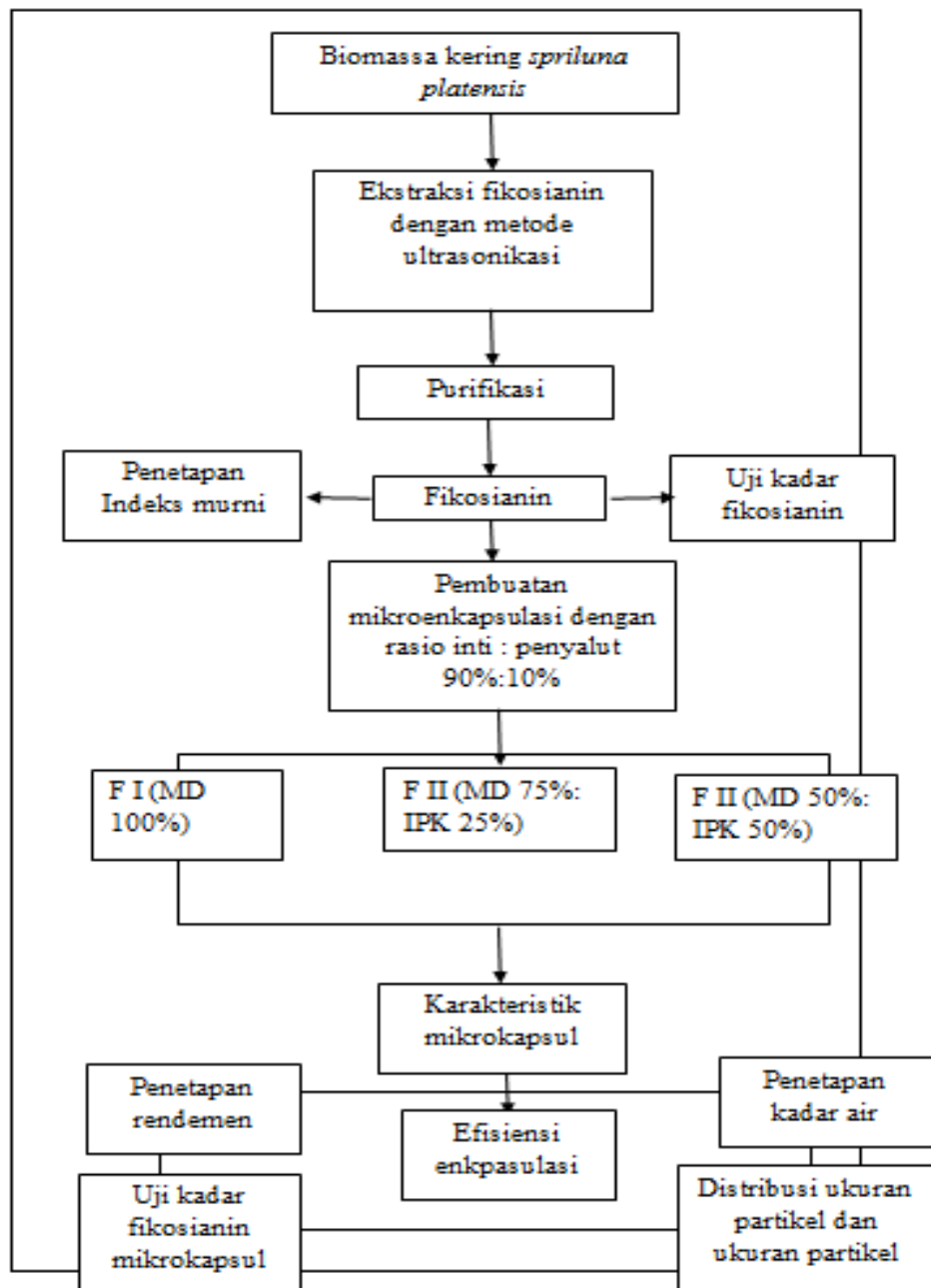
$$EE = \frac{\text{PC setelah dilapisi}}{\text{PC sebelum dilapisi}} \times 100\% \dots \dots \dots (6)$$

E. Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan untuk mengetahui suatu data terhadap terjadinya kesalahan dalam penelitian, penyimpangan dari aturan baku yang sudah ditentukan. Analisis hasil suatu pengujian yang mengacu pada parameter dapat dilakukan dengan cara, data yang diperoleh

dalam penelitian dilakukan analisis dan dilihat kesesuaian dengan persyaratan baku yang telah menjadi ketentuan dari sediaan mikrokapsul fikosianin dan penyalut, misalnya pengacuan data hasil pengujian dengan referensi secara teori yang ada, dengan demikian hasil penelitian dengan referensi teori tersebut dibandingkan satu sama lainnya. Pengacuan terhadap referensi teori dilakukan untuk menghindari adanya kesalahan dalam penelitian. Pada penelitian ini data hasil pengujian dianalisa dengan SPSS for Windows versi 20 pada tingkat kepercayaan 95%. Metode analisa yang digunakan adalah One Way Anova. Jika ditemukan adanya perbedaan signifikan, data dianalisa lebih lanjut menggunakan uji Duncan.

F. Rancangan Penelitian



Gambar 5. Rancangan penelitian.