

Optimasi Proses Nanopresipitasi pada Nanoenkapsulasi Ekstrak Kasar Daun Kakao (*Theobroma cacao L.*) Menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM)

Optimization of Nanoprecipitation Process in Nanoencapsulation of Cocoa Leaves Crude Extract (*Theobroma cacao L.*) Using Response Surface Methodology (RSM)

***Rahma Bayunita Hapsari, Yudi Pranoto, Agnes Murdiati, Supriyanto Supriyanto**

Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1 Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia
*Penulis korespondensi: Rahma Bayunita Hapsari, Email: rahmabayunita@ugm.ac.id

Submisi: 21 September 2019; Revisi: 27 September 2020, 24 Januari 2021, 10 Februari 2021;
Diterima: 12 Maret 2021

ABSTRAK

Ekstrak kasar daun kakao mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami. Perlindungan senyawa tersebut dari kerusakan selama penyimpanan dapat dilakukan enkapsulasi. Metode nanopresipitasi merupakan metode yang mudah dan cepat dibandingkan metode lain. Efisiensi enkapsulasi yang tinggi sebagai penentu keberhasilan dari nanopresipitasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya konsentrasi ekstrak yang ditambahkan dan konsentrasi gelatin. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimal proses nanopresipitasi dengan mengoptimasi konsentrasi ekstrak yang ditambahkan (300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm dan 700 ppm) dan konsentrasi gelatin (1% ; 1,25% ; 1,5% ; 1,75% dan 2%) dilihat dari parameter efisiensi enkapsulasi menggunakan metode *Central Composite Design* (CCD) dan *Response Surface Methodology* (RSM) (p -value < 0,05). Analisis lain yang dilakukan yaitu efisiensi enkapsulasi, distribusi ukuran partikel dan pengamatan profil morfologi. Dari analisis RSM, konsentrasi ekstrak 509,57 ppm dan konsentrasi gelatin 1,57% memberikan hasil yang terbaik dengan efisiensi enkapsulasi nanokapsul sebesar 78,04%. Kondisi optimum nanokapsul juga memberikan hasil ukuran nanokapsul berada dalam kisaran nanometer yaitu sebesar 178,9 nm dan persebaran nanokapsul merata karena indeks polidispersitas bernilai kurang dari 1 yaitu 0,716. Sedangkan profil morfologi menunjukkan bahwa nanokapsul berbentuk bulat dan utuh.

Kata kunci: Ekstrak kasar daun kakao; gelatin; nanoenkapsulasi; nanopresipitasi; optimasi

ABSTRACT

Cocoa leaves crude extract has the potential to be used as a source of natural antioxidants. To protect the compound from damage during storage, encapsulation is carried out. Nanoprecipitation method is an easy and fast method compared to other methods. A high encapsulation efficiency as a success factor of the nanoprecipitation is influenced by several factors including the concentration of the added extract and gelatin. This research was conducted to obtain the optimal condition of the nanoprecipitation method by optimizing the concentrations of the

added extract (300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, and 700 ppm) and gelatin concentrations (1%; 1.25%; 1.5%; 1.75%; and 2%) seen from the encapsulation efficiency parameters using the Central Composite Design (CCD) and Response Surface Methodology (RSM) method (p -value < 0.05). Other analyses carried out involved encapsulation efficiency, particle size distribution, and polydispersity index. The RSM analysis showed that the best result was obtained by 509.57 ppm added extract and 1.57% gelatin concentration with an encapsulation efficiency of 78.04%. The optimum nanocapsules have a size of 178.9 nm and homogenous distribution with a polydispersity index less than 1 (0.716 precisely). Meanwhile, the morphological profiles showed round and intact nanocapsules.

Keywords: Cocoa leaves crude extract; gelatin; nanoencapsulation; nanoprecipitation; optimization

PENDAHULUAN

Dalam budidaya tanaman kakao, daun kakao banyak yang terbuang dan belum dimanfaatkan semaksimal mungkin. Hanya sebagian kecil yang dimanfaatkan sebagai pakan ternak, pupuk kompos dan sebagainya. Daun kakao tersebut apabila diekstrak mengandung beberapa metabolit sekunder diantaranya flavonoid, saponin, tanin, triterpene, polifenol dan steroid. Metabolit sekunder tersebut merupakan antioksidan yang berfungsi sebagai agen antikanker, antikarsinogenik dan antimutagenik (Zuidam & Nedović, 2010). Senyawa fenolik dan antosianin merupakan senyawa yang tidak stabil terhadap pH, ion logam, paparan cahaya, suhu, oksigen dan aktivitas enzimatik (Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, 2011) to a large extent, due to its content of bioactive nutrients and their importance as dietary antioxidants. There is a growing demand for delivery of antioxidants through functional foods with the related challenge of protecting their bioactivity during food processing and subsequent passage through the gastrointestinal tract. This study focuses on the evaluation of concentration of bioactive compounds in black currant berries (*Ribes nigrum* L.. Maka dari itu diperlukan cara untuk melindungi komponen atau senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak daun kakao.

Salah satu cara untuk melindungi komponen bioaktif dari kerusakan yaitu dengan teknologi enkapsulasi. Enkapsulasi merupakan proses pembungkusan atau penyalutan bahan inti berbentuk cair atau padat menggunakan suatu enkapsulan khusus, proses ini membuat partikel-partikel inti mempunyai sifat fisikokimia yang diinginkan (Deladino dkk., 2008). Enkapsulasi menghasilkan partikel berdiameter atau berukuran mikrometer sampai nanometer (Zuidam & Nedović, 2010). Nanoenkapsulasi merupakan perkembangan inovasi teknologi dengan cara mengenkapsulasi senyawa aktif dalam suatu enkapsulan pada ukuran kecil pada skala nanometer (0-1000 nm) (Carvajal-Zarrabal dkk., 2009).

Pada umumnya teknik pengeringan *spray drying* sangat sering dilakukan dalam nanoenkapsulasi. Namun

teknik pengeringan *spray drying* ini masih terdapat kelemahan salah satunya yaitu komponen bioaktif yang mudah hilang dikarenakan penggunaan aliran udara bersuhu tinggi. Untuk itulah perlu kombinasi teknik atau metode lain dalam nanoenkapsulasi ini. Salah satu teknik atau metode nanoenkapsulasi adalah nanopresipitasi.

Nanopresipitasi adalah salah satu metode terbaru yang biasanya digunakan untuk persiapan nanopartikel gelatin. Metode tersebut cepat, mudah dibandingkan dengan metode yang lainnya (Khan & Schneider, 2013). Menurut penelitian sebelumnya bahwa nanopresipitasi apabila dibandingkan dengan teknik emulsi-difusi, emulsifikasi ganda dan metode lainnya memiliki beberapa keuntungan. Prosesnya mudah, memberikan hasil yang bagus pada ukuran partikel dan enkapsulasi (Barreras-Urbina dkk., 2016). Metode ini melibatkan antar dua fase yaitu fase organik dan fase berair. Fase organik merupakan pelarut yang larut atau sebagian larut ketika dicampurkan pada fase berair. Sedangkan polimer (sintesis atau alami) akan digunakan untuk membuat matriks polimer dalam pembentukan nano partikel. Oleh karena itu polimer harus larut dalam pelarut fase organik meskipun tidak larut dalam fase berair. Bahan aktif yang digunakan harus larut dalam pelarut, dan harus memiliki beberapa interaksi dengan matriks polimerik yang akan dibentuk, dan fase berair akan dibentuk dari air dan surfaktan (stabilizer, tensoaktif). Selama proses, fase organik ditambahkan setetes demi tetes ke fase berair sambil dilakukan pengadukan dengan magnetik stirrer (Galindo-Rodriguez dkk., 2004). Keberhasilan dari metode ini berdasarkan dari berbagai macam parameter antara lain ukuran partikel yang kecil, efisiensi enkapsulasi yang tinggi, kelarutan yang tinggi, persebaran nanopartikel maupun nanokapsul yang merata dan lain sebagainya.

Tinggi atau rendahnya efisiensi enkapsulasi diantaranya tergantung pada konsentrasi ekstrak atau *core* dan konsentrasi polimer. Menurut penelitian sebelumnya bahwa tingginya efisiensi enkapsulasi diakibatkan oleh tingginya konsentrasi polimer. Hal ini dikarenakan konsentrasi polimer berhubungan dengan ukuran nanokapsul, semakin besar ukuran nanokapsul maka

efisiensi enkapsulasi tinggi. Sedangkan dengan peningkatan konsentrasi ekstrak dapat mengakibatkan menurunnya efisiensi enkapsulasi. Hal ini dikarenakan polimer mempunyai kapasitas terbatas dalam mengkapsulkan ekstrak, apabila melebihi kapasitas maksimal maka ekstrak akan terbuang. Sehingga besar kecilnya konsentrasi ekstrak kasar daun kakao dan konsentrasi polimer dapat mempengaruhi besar kecilnya efisiensi enkapsulasi (Dong & Feng, 2004). Berdasarkan penelitian sebelumnya, untuk mengkapsulkan ekstrak polifenol kakao digunakan konsentrasi ekstrak 1000 ppm dan konsentrasi gelatin sebesar 2%. Sehingga efisiensi enkapsulasi yang diperoleh sebesar 77,56% (Quiroz-Reyes dkk., 2018).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi nanopresipitasi yang optimum dengan mengoptimasi konsentrasi ekstrak kasar daun kakao dan konsentrasi gelatin dilihat dari parameter efisiensi enkapsulasi menggunakan metode RSM (*Response Surface Methodology*). Nanokapsul optimum kemudian dikarakterisasi dan dibandingkan dengan pembanding yang menggunakan enkapsulan maltodekstrin saja.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kakao yang berasal dari Gunung Kidul, Yogyakarta. Daun kakao yang digunakan yaitu daun yang sehat dan berbentuk bulat memanjang/oval. Daun yang sehat pada tanaman kakao yaitu berwarna hijau tanpa ada bercak coklat pada bagian atasnya (Permata, Suherman & Maulana, 2014). Bahan polimer yang digunakan adalah gelatin B. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol (Merck, Jerman), glutaraldehid 25% (Merck, Jerman), aquades dan *stabilizer* poloxamer (Merck, Jerman) dan maltodekstrin.

Alat

Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun kakao, preparasi nanopartikel dan pembuatan nanokapsul antara lain: *vacuum rotary evaporator*, waterbath, hotplate, magnetic stirrer, gelas ukur, gelas beaker, pipet tetes, agitator (GT series Stirrer, 4000 rpm/Glas Col) dan *spray dryer*. Alat-alat untuk analisis antara lain Particle Size Analyzer (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Malvern Inggris), optilab (Advance, Indonesia), spectrophotometer UV-Vis (Spectronic 2000, Thermo Scientific), vortex (Wizard, Velp Scientifica, Italia), SEM (Scanning Electron Microscope JEOL JSM-5310 LV, Jepang), FT-IR (Fourier Transform Infra Red Spectroscopy Shimadzu FT-IR-8201 PC), oven (Mettler, Jerman), *Ultraturax Homogenizer*, peralatan gelas dan peralatan lainnya.

Metode

Pembuatan Nanokapsul Ekstrak Kasar Daun Kakao Menggunakan Metode Nanopresipitasi

Pembuatan larutan nanopartikel mengacu pada penelitian sebelumnya dengan modifikasi (Khan and Schneider, 2013). Penelitian ini menggunakan lima variasi antara ekstrak kasar daun kakao (variasi 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, dan 700 ppm) dan konsentrasi gelatin (variasi 1%; 1,25%; 1,5%; 1,75%; dan 2%). Pada tahap awal gelatin dilarutkan dalam aquades 4 mL lalu dilakukan penambahan ekstrak kasar daun kakao. Larutan yang sudah tercampur diaduk sampai larut. Lalu larutan dihangatkan di dalam waterbath pada suhu 45C selama 7 menit. Sementara itu, poloxamer 407 disiapkan sebanyak 5% (w/v) dengan cara menimbang 8 mg lalu dilarutkan ke dalam etanol 40 mL. Kemudian dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* pada suhu ruang dan kecepatan 300 rpm sampai poloxamer 407 larut dalam etanol. Larutan ekstrak kasar daun kakao yang tercampur oleh gelatin diteteskan sedikit demi sedikit pada larutan etanol yang mengandung poloxamer sambil dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer*. Sampai terbentuk suspensi berwarna putih keruh. Setelah itu larutan glutaraldehid 2% (w/v) sebagai agen *crosslinker* sebanyak 2 mL juga diteteskan pada campuran tersebut. Pengadukan dilanjutkan sampai 2 jam pada suhu ruang hingga terbentuk nanopartikel. Nanopartikel yang terbentuk dicampurkan pada larutan maltodekstrin 10% (Hoffmeister dkk., 2012). Campuran tersebut dihomogenisasi dengan agitator selama 2 menit dan kecepatan 4000 rpm. Lalu dilakukan pengeringan dengan alat *spray dryer* sampai membentuk nanokapsul berupa bubuk. Pengeringan dilakukan dengan suhu inlet 90C, kecepatan aliran 6-8 mL/menit, tekanan pada nozzle atomizer 1 bar dan suhu outlet 55-60C. Sementara nanokapsul pembanding dibuat dengan mencampurkan larutan ekstrak kasar daun kakao konsentrasi optimum dengan larutan maltodekstrin 10%. Lalu dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* dan pengeringan dengan alat *spray drying*.

Optimasi Menggunakan RSM

Sebelum menentukan titik optimum, penentuan titik nol harus dilakukan terlebih dahulu. Penentuan titik nol dilakukan dengan menguji efisiensi enkapsulasi nanokapsul tertinggi pada masing-masing variabel bebas. Sementara itu, variasi yang digunakan oleh variabel bebas pada penentuan titik nol antara lain konsentrasi ekstrak kasar daun kakao yang terdiri dari 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, dan 700 ppm dan konsentrasi gelatin yang terdiri dari 1%; 1,25%; 1,5%; 1,75%; dan 2%. Hasil efisiensi enkapsulasi tertinggi dihasilkan pada variasi 500 ppm (konsentrasi

Tabel 1. Kode level optimasi

| Faktor | Level | | | | |
|---------------------------|--------|------|-----|------|--------|
| | -α | -1 | 0 | +1 | + α |
| Konsentrasi ekstrak (ppm) | 358,58 | 400 | 500 | 600 | 641,42 |
| Konsentrasi gelatin (%) | 1,15 | 1,25 | 1,5 | 1,75 | 1,85 |

ekstrak kasar daun kakao) dan 1,5% (konsentrasi gelatin). Titik tertinggi ini akan dijadikan sebagai titik pusat atau kode 0 pada rancangan ini (Tabel 1). Setelah itu ditentukan titik optimum menggunakan metode permukaan respon (*Response Surface Methodology*) atau biasa disebut dengan RSM yang dilakukan dengan Program Design Expert 7.0. Karena menggunakan 2 variabel bebas maka rancangan yang digunakan yaitu *Central Composite Design* (CCD). Pada rancangan CCD, taraf dari tiap variabel menghasilkan 5 titik respon yang menjadi daerah percobaan penelitian utama. Titik-titik respon ini dikode dengan interval (+1,414; +1; 0; -1; -1,414). Taraf variabel yang diduga sebagai titik optimum dikode menggunakan kode 0, sedangkan kode +1,414; +1; -1; dan -1,414 digunakan untuk mengkode daerah percobaan sebelum dan sesudah titik optimum.

Sehingga dari rancangan CCD ini menghasilkan 13 unit eksperimen (Tabel 2).

Efisiensi Enkapsulasi dan *Persen Recovery*

Efisiensi enkapsulasi adalah seberapa banyak senyawa aktif yang berhasil terkapsul oleh enkapsulan dengan cara membandingkan total senyawa aktif nanokapsul dikurangi senyawa aktif yang berada pada permukaan kapsul dengan total senyawa aktif nanokapsul. Sedangkan persen recovery ini dihitung dengan cara membandingkan total senyawa aktif dalam nanokapsul (baik di dalam maupun di luar enkapsulan) dengan total senyawa aktif awal (Noronha dkk., 2013).

Efisiensi enkapsulasi dihitung pada Persamaan 1.

Efisiensi enkapsulasi (%) =

$$\frac{\text{total flavonoid} - \text{flavonoid pada permukaan nanokapsul}}{\text{total flavonoid}} \times 100\% \quad (1)$$

Sementara persen recovery dihitung pada Persamaan 2

Persen recovery (%) =

$$\frac{\text{total flavonoid nanokapsul}}{\text{total flavonoid awal}} \times 100\% \quad (2)$$

Tabel 2. *Central composite design* (CCD) optimasi konsentrasi ekstrak kasar daun kakao dan konsentrasi gelatin pada proses nanopresipitasi

| Running | Variabel asli | | Variabel kode | |
|---------|---------------|-------------|----------------|----------------|
| | Ekstrak (ppm) | Gelatin (%) | X ₁ | X ₂ |
| Run 1 | 358,58 | 1,50 | -1,41 | 0 |
| Run 2 | 500 | 1,85 | 0 | +1,41 |
| Run 3 | 600 | 1,75 | +1 | +1 |
| Run 4 | 500 | 1,50 | 0 | 0 |
| Run 5 | 500 | 1,15 | 0 | -1,41 |
| Run 6 | 641,42 | 1,50 | +1,41 | 0 |
| Run 7 | 600 | 1,25 | +1 | -1 |
| Run 8 | 500 | 1,50 | 0 | 0 |
| Run 9 | 400 | 1,25 | -1 | -1 |
| Run 10 | 500 | 1,50 | 0 | 0 |
| Run 11 | 500 | 1,50 | 0 | 0 |
| Run 12 | 500 | 1,50 | 0 | 0 |
| Run 13 | 400 | 1,75 | -1 | +1 |

Total Flavonoid

Total flavonoid ditentukan menggunakan metode pada penelitian sebelumnya dengan modifikasi (Sulaiman & Balachandran, 2012) Sebanyak 25 mg bubuk nanokapsul dilarutkan dengan 0,5 mL aquades. Kemudian 0,3 mL NaNO₂ 5% ditambahkan dan 0,3 mL AlCl₃ 10% juga ditambahkan ke sampel. Setelah 5 menit, 2 mL NaOH 1 M ditambahkan kemudian inkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit. Sampel ditera absorbansinya menggunakan *spectrophotometer* UV-Vis (Spectronic 2000, Thermo Scientific) dengan panjang gelombang 510 nm. Hal ini sama dengan penentuan total flavonoid awal dihitung berdasarkan total flavonoid pada ekstrak kasar daun kakao. Dan total flavonoid dihitung berdasarkan persamaan kurva standar katekin yang diperoleh. Penentuan flavonoid yang berada permukaan nanokapsul dianalisis menggunakan metode sebelumnya dengan modifikasi (Cilek dkk., 2012) Sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 2 mL etanol kemudian dihomogenisasi dan disaring menggunakan kertas saring. Larutan yang lolos, diambil 0,5 mL dan dianalisis total flavonoidnya.

Distribusi Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersitas (PdI)

Distribusi ukuran partikel nanokapsul optimum dan nanokapsul perbandingan mengacu pada penelitian sebelumnya dengan modifikasi (Saloko dkk., 2013). Kedua sampel tersebut masing-masing ditimbang sebanyak 0,25 g kemudian dilarutkan ke dalam 50 mL

aquades. Kemudian sampel diukur menggunakan sinar laser (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Malvern Inggris). Distribusi ukuran partikel ditentukan dengan nilai massa/waktu.

Profil Morfologi dengan SEM

Pengamatan morfologi nanokapsul dilakukan dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM). Sampel nanokapsul diletakkan pada logam yang dilapisi karbon. Proses berikutnya yaitu pelapisan emas (Au) 300 Å di dalam *Magnetron Sputtering Device* yang dilengkapi dengan pompa vakum. Pelapisan emas pada sampel terjadi karena adanya loncatan logam emas kearah sampel saat proses vakum. Sampel yang telah dilapisi emas diletakkan pada lokasi sampel dalam mikroskop elektron. Selanjutnya tembakan elektron kearah sampel terjadi, sehingga terekam ke dalam monitor dan pemotretan pada sampel dapat dilakukan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Optimasi Menggunakan RSM (*Response Surface Methodology*)

Hasil percobaan menggunakan RSM dengan respon efisiensi enkapsulasi dengan 13 unit eksperimen dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3 dapat dijelaskan bahwa kisaran nilai respon efisiensi enkapsulasi yaitu antara

Tabel 3. Hasil percobaan

| <i>Running</i> | Variabel 1 ekstrak (ppm) | Variabel 2 gelatin (%) | Respon efisiensi enkapsulasi (%) |
|----------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| <i>Run 1</i> | 358,58 | 1,5 | 56,86 |
| <i>Run 2</i> | 500 | 1,85 | 76,5 |
| <i>Run 3</i> | 600 | 1,75 | 58,32 |
| <i>Run 4</i> | 500 | 1,5 | 72,47 |
| <i>Run 5</i> | 500 | 1,15 | 51,17 |
| <i>Run 6</i> | 641,42 | 1,5 | 69,82 |
| <i>Run 7</i> | 600 | 1,25 | 66,93 |
| <i>Run 8</i> | 500 | 1,5 | 81,13 |
| <i>Run 9</i> | 400 | 1,25 | 56,08 |
| <i>Run 10</i> | 500 | 1,5 | 78,93 |
| <i>Run 11</i> | 500 | 1,5 | 75,47 |
| <i>Run 12</i> | 500 | 1,5 | 78,21 |
| <i>Run 13</i> | 400 | 1,75 | 65,59 |

Tabel 4. Analisis model untuk respon efisiensi enkapsulasi

| Respon | Model | Persamaan | p-value | Lack of fit | R ² |
|-----------------------|-------------------------|---|---------|-------------|----------------|
| Efisiensi enkapsulasi | Kuadratik/ Quadratic | $Y = 2,74A + 4,59B - 4,53AB - 7,42 A^2 - 7,17B^2$ | 0,0193 | 0,0656 | 0,8067 |

51,17% hingga 81,13%. Hasil ANOVA pada Tabel 4, menunjukkan bahwa model yang terpilih untuk respon efisiensi enkapsulasi adalah kuadratik (*quadratic model*) dan memiliki R² sebesar 0,8067. Nilai p (*p-value*) yaitu 0,0193 bisa diartikan bahwa model ini signifikan dengan nilai p lebih kecil dari 0,05. Sehingga bisa disimpulkan bahwa masing-masing variabel (konsentrasi ekstrak kasar daun kakao dan konsesentrasi gelatin) berpengaruh nyata terhadap terhadap respon efisiensi enkapsulasi. Nilai *lack of fit* juga menunjukkan tidak signifikan dengan nilai p lebih besar dari 0,05 atau mempunyai nilai 0,0656. Syarat model yang baik yaitu nilai *lack of fit* yang tidak signifikan karena menunjukkan adanya kesesuaian data respon rendemen dengan model (Keshani dkk., 2010).

Analisis Respon Efisiensi Enkapsulasi

Persamaan RSM untuk optimasi proses nanopresipitasi terhadap respon efisiensi enkapsulasi tersedia pada Persamaan 3.

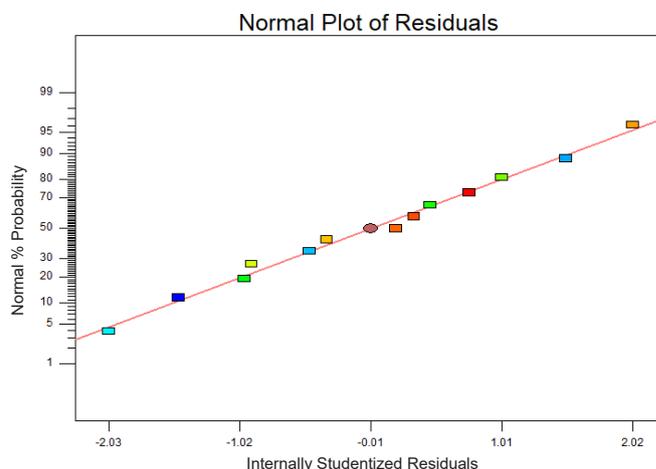
Efisiensi enkapsulasi

$$Y = 77,24 + 2,74A + 4,59B - 4,53AB - 7,42 A^2 - 7,17B^2 \quad (3)$$

Dimana A: konsentrasi ekstrak kasar daun kakao, dan B: konsentrasi gelatin

Persamaan 3 menunjukkan adanya nilai konstanta positif dengan respon efisiensi enkapsulasi akan meningkat berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi ekstrak kasar daun kakao dan peningkatan konsentrasi gelatin. Hal ini sesuai penelitian sebelumnya bahwa penggunaan polimer polimetakrilat dengan meningkatkan rasio obat terhadap polimer menjadi 1:7 dapat memaksimalkan efisiensi enkapsulasi (El-Say, 2016) Efisiensi penyerapan obat juga meningkat dengan adanya peningkatan rasio polimer dan obat pada fase internal. Hal ini karena peningkatan viskositas pada fase internal dapat mengurangi migrasi molekul obat ke fase cair (Dhakar dkk., 2016).

Gambar 1 merupakan grafik kenormalan residual respon efisiensi enkapsulasi menggambarkan hubungan antara nilai aktual dan nilai yang diprediksikan. Grafik tersebut menunjukkan bahwa data respon efisiensi enkapsulasi menyebar normal dengan mendekati garis kenormalan. Maka hubungan antara hasil aktual dan



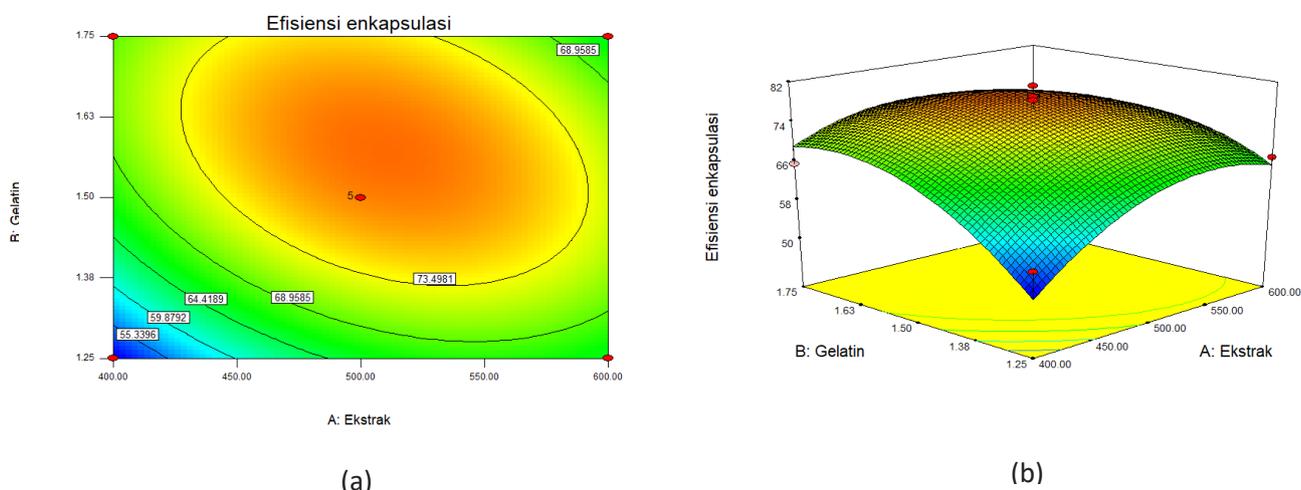
Gambar 1. Plot kenormalan residual respon efisiensi enkapsulasi

hasil yang diprediksikan oleh Program Design Expert 7 mempunyai hasil yang berdekatan (Karanam, Babu & Rao, 2008).

Respon optimum dapat digambarkan secara visual melalui kontur plot dan *response surface plot* (Gambar 2). Melalui plot tersebut dapat diketahui bentuk hubungan antara respon dengan variabel bebasnya. Kontur plot merupakan gambaran visual dari bentuk permukaan efisiensi enkapsulasi sebagai respon serta perubahan variabel bebas yaitu konsentrasi ekstrak kasar daun kakao dan konsentrasi gelatin. Apabila kontur plot interaksi dari dua variabel terhadap respon memiliki titik optimum berada di tengahnya, berarti menunjukkan bahwa model hasil optimasi menggambarkan secara benar hubungan antara variabel dan respon. Sementara pada *response surface plot* terlihat bahwa kurva yang terbentuk merupakan parabola terbalik. Kurva tersebut menggambarkan bahwa respon akan dalam bentuk maksimal.

Optimasi Kondisi Proses Nanopresipitasi

Optimasi dilakukan setelah mendapatkan model persamaan untuk respon efisiensi enkapsulasi. Optimasi ini bertujuan untuk mendapatkan respon yang sesuai dengan yang diinginkan (*desireability*). Tabel 5 menunjukkan komponen respon yang dioptimasi, target, batas bawah,



Gambar 2. Respon optimum efisiensi enkapsulasi (a) Kontur plot dan (b) *Response surface plot*

batas atas dan kepentingan pada tahap optimasi formula. Konsentrasi ekstrak kasar daun kakao dan konsentrasi gelatin merupakan komponen yang dioptimalkan dengan kisaran masing-masing 400 sampai 600 ppm dengan tingkat kepentingan 3 (+++) dan 1,25 sampai 1,75 % dengan tingkat kepentingan 3 (+++). Konsentrasi ekstrak kasar daun kakao dan konsentrasi gelatin ini akan mempengaruhi efisiensi enkapsulasi nanokapsul. Sementara respon efisiensi enkapsulasi dioptimalkan dengan target maksimal dan tingkat kepentingan 5 (++++) . Efisiensi enkapsulasi ini merupakan respon yang menentukan keberhasilan nanoenkapsulasi.

Berdasarkan prediksi hasil optimasi dengan Program Design Expert 7.0, kondisi proses dengan konsentrasi ekstrak kasar daun kakao sebesar 509,57 ppm dan konsentrasi gelatin sebesar 1,57% dirokemendasikan sebagai solusi formula optimal. Pada kondisi ini merupakan solusi formula yang optimal karena mempunyai nilai *desireability* sebesar 0,897. Nilai *desireability* yang mendekati 1 diartikan mendekati sempurna antara target dengan hasil optimasi yang dihasilkan sebesar 89,7% dan diprediksi menghasilkan efisiensi enkapsulasi sebesar 78,04%.

Karakterisasi Nanokapsul

Efisiensi Enkapsulasi dan Efisiensi *Recovery*

Efisiensi enkapsulasi adalah seberapa banyak senyawa aktif yang berhasil terkapsul oleh enkapsulan dengan cara membandingkan total senyawa aktif nanokapsul dikurangi senyawa aktif yang berada pada permukaan kapsul dengan total senyawa aktif nanokapsul. Senyawa aktif yang berhasil terkapsul oleh enkapsulan pada penelitian ini adalah flavonoid. Hasil dari efisiensi enkapsulasi pada nanokapsul optimum dengan nanokapsul pembanding menunjukkan nilai yang berbeda. Efisiensi enkapsulasi nanokapsul optimum sebesar 77,16% sedangkan efisiensi enkapsulasi nanokapsul pembanding sebesar 18,26%. Nanokapsul pembanding dibuat dengan mencampurkan larutan ekstrak kasar daun kakao konsentrasi 500 ppm dengan larutan maltodekstrin 10%. Lalu dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* dan pengeringan dengan alat *spray drying*. Maltodekstrin merupakan enkapsulan yang umum digunakan dalam proses nanoenkapsulasi menggunakan *spray drying*. Karena maltodekstrin mempunyai kemampuan tahan terhadap panas saat dilakukan pengeringan dengan

Tabel 5. Komponen respon yang dioptimasi, target, batas dan kepentingan pada tahap optimasi formula

| Komponen respon | Target | Batas bawah | Batas atas | Kepentingan |
|-----------------------|----------|-------------|------------|-------------|
| Konsentrasi ekstrak | Kisaran | 400 | 600 | +++ |
| Konsentrasi gelatin | Kisaran | 1,25 | 1,75 | +++ |
| Efisiensi enkapsulasi | Maksimum | 51,17 | 81,13 | +++++ |

spray drying, hal ini sesuai dengan skema karakteristik *isothermal drying* bahan penyalut. Maltodekstrin merupakan bahan penyalut dalam kurva tipe 1 karena mempunyai kecepatan pengeringan yang dapat menurun dengan cepat sebanding dengan penurunan kadar air, yang berarti terbentuk lapisan padat dengan cepat dan melindungi dengan baik zat aktif dalam melawan transfer oksigen (Matsuno & Adachi, 1993). Maka nilai efisiensi enkapsulasi nanokapsul optimum lebih besar dibandingkan nilai efisiensi nanokapsul pembanding. Sementara persen recovery adalah seberapa banyak senyawa bioaktif yang masih berada dalam nanokapsul setelah dilakukan pengeringan (*spray drying*). Persen recovery ini dihitung dengan cara membandingkan total senyawa aktif dalam nanokapsul (baik di dalam maupun di luar enkapsulan) dengan total senyawa aktif awal (Noronha dkk., 2013).

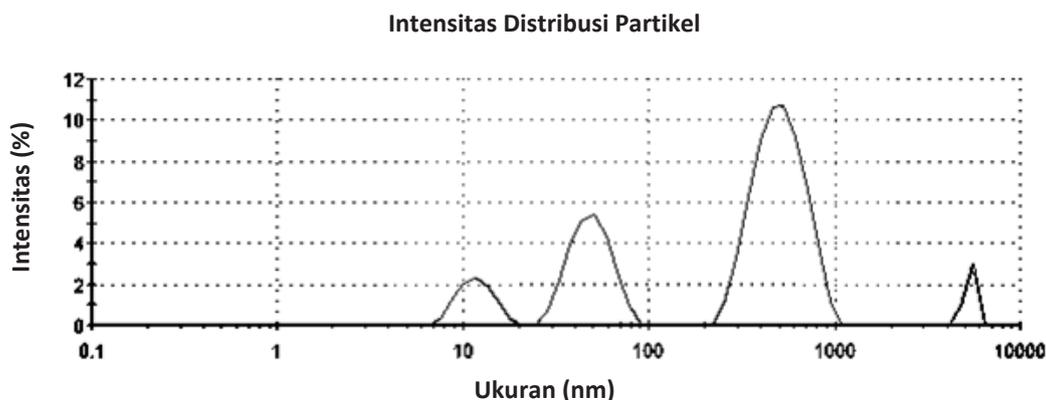
Hasil persen recovery nanokapsul optimum yaitu 0,12% sedangkan persen recovery nanokapsul pembanding yaitu 0,08%. Persen recovery nanokapsul optimum mempunyai nilai lebih tinggi dibandingkan nanokapsul pembanding. Nilai efisiensi enkapsulasi ini berbanding lurus dengan besarnya nilai efisiensi recovery. Penggunaan bahan penyalut berperan penting terhadap nilai efisiensi enkapsulasi dan nilai efisiensi recovery. Nanokapsul pembanding hanya menggunakan maltodekstrin saja sedangkan nanokapsul optimum menggunakan dua bahan penyalut yaitu gelatin dan maltodekstrin. Sehingga menyebabkan perbedaan pembentukan lapisan terluar pada nanokapsul. Selain itu nilai efisiensi dan nilai persen recovery yang tidak terlalu tinggi diduga karena komponen yang larut dalam air mudah lepas dari komponen penyalutnya akibat sifatnya yang sangat larut dalam air. Menurut penelitian sebelumnya bahwa tingginya pembentukan lapisan luar yang kering (kurang larut dalam air) menyebabkan difusi namun tetap dapat mempertahankan senyawa bioaktif (Gharsallaoui dkk., 2007)

Distribusi Ukuran Partikel

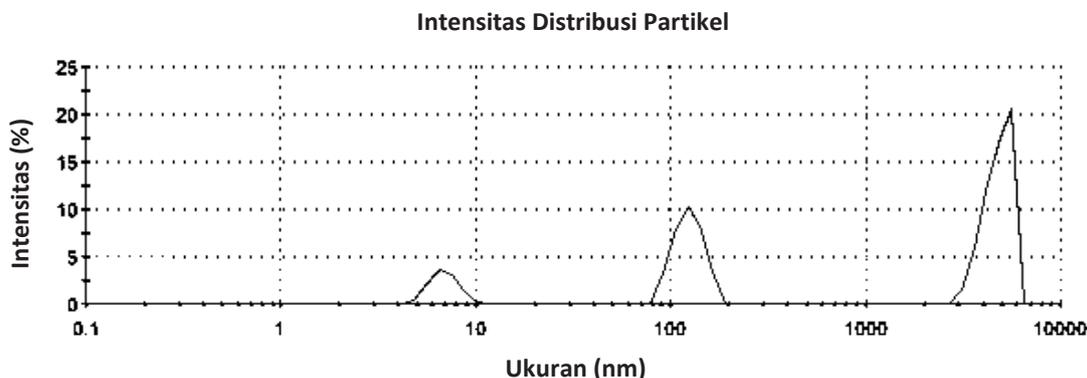
Sebaran ukuran nanokapsul ekstrak kasar daun kakao dapat diketahui dengan melakukan pengukuran distribusi ukuran partikel. Hasil pada nanokapsul optimum menunjukkan ukuran partikel terdistribusi mulai dari rata-rata ukuran 11,85 nm (9,2%), 49,36 nm (25,4%), 520,7 nm (61,4%) sampai 5,56 μm (3%). Partikel nanokapsul secara keseluruhan mempunyai nilai z-average sebesar 178,9 nm. Sedangkan pada nanokapsul pembanding menunjukkan ukuran partikel terdistribusi mulai dari rata-rata ukuran 6,914 nm (10,7%), 124,4 nm (32,8%) sampai 4,772 μm (56,6%). Secara keseluruhan partikel nanokapsul mempunyai nilai z-average sebesar 802,3 nm. Hasil pengukuran ini dapat dilihat bahwa nanokapsul optimum dengan menggunakan metode nanopresipitasi beserta nanokapsul pembanding menghasilkan produk nanokapsul berukuran nanometer (nm). Akan tetapi z-average pada nanokapsul pembanding mempunyai nilai yang lebih besar dibandingkan sampel optimum.

Penambahan agen *crosslinker* pada nanokapsul optimum mempengaruhi besar kecilnya ukuran partikel. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa penambahan glutaraldehid sebagai agen *crosslinker* sebanyak 2% menghasilkan ukuran partikel yang lebih kecil dibandingkan tanpa penambahan glutaraldehid yaitu sebesar 225,5 nm (Khan & Schneider, 2013). Berikut adalah hasil distribusi ukuran partikel pada nanokapsul optimum (Gambar 3) dan distribusi ukuran partikel pada nanokapsul pembanding (Gambar 4).

Pengukuran distribusi ukuran partikel selain menunjukkan ukuran partikel juga menunjukkan tingkat keseragaman nanokapsul ditunjukkan dengan nilai PdI. PdI atau polidispersitas index menunjukkan keseragaman nanopartikel maupun nanokapsul. Menurut penelitian sebelumnya bahwa nilai PdI menunjukkan tingkat keseragaman yang tinggi dan sebaliknya, nilai PdI diatas 1 menunjukkan produk sangat tidak seragam



Gambar 3. Distribusi ukuran partikel pada nanokapsul optimum

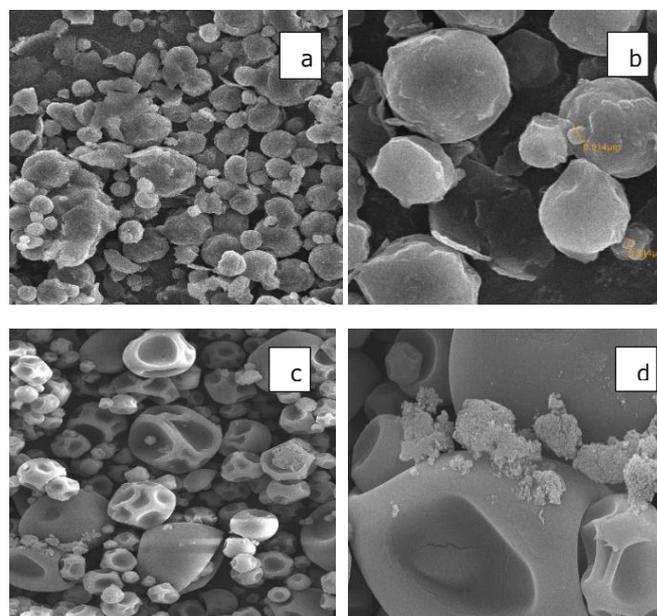


Gambar 4. Distribusi ukuran partikel pada nanokapsul pembeding

dan menunjukkan pola distribusi bimodal (Mardiyati dkk., 2012). Hasil pengukuran PdI nanokapsul optimum yaitu 0,716 dan nanokapsul pembeding yaitu 0,915. Hal tersebut menunjukkan bahwa sampel nanokapsul optimum mempunyai tingkat keseragaman yang lebih tinggi daripada nanokapsul pembeding.

Profil Morfologi dengan SEM

Berdasarkan Gambar 4 profil morfologi nanokapsul optimum dan nanokapsul pembeding disajikan dengan analisis SEM (*Scanning Electron Microscopy*). Hasil disajikan dengan perbesaran 1000x dan 5000x pada masing-masing sampel. Nanokapsul optimum pada perbesaran 1000x dan 5000x berbentuk bulat utuh tanpa ada kerutan dan sedikit mengalami aglomerasi. Menurut penelitian sebelumnya bahwa aglomerasi ini disebabkan karena muatan netralisasi selama *cross-linking* (Lee, Khan & Lim, 2012). Sedangkan nanokapsul pembeding pada perbesaran 1000x dan 5000x berbentuk bulat, terdapat kerutan dan sedikit mengalami aglomerasi. Kerutan yang terdapat pada nanokapsul ini menunjukkan bahwa profil morfologi tepung asap hasil *spray drying* yang disalut dengan maltodekstrin berkerut pada bagian dinding luar (Saloko dkk., 2013). Pengkerutan terjadi karena efek *balloning* akibat adanya penggunaan panas pada proses *spray drying* (Dewandari, Yuliani & Yasni, 2013). Berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa enkapsulasi maltodekstrin yang digunakan tidak mampu menahan tekanan pada suhu pemanasan saat proses *spray drying* (Yuliani & Harimurti, 2007). Akibatnya dinding kapsul dapat mengalami keretakan dan pecah disebabkan oleh peristiwa penggelembungan partikel nanokapsul sebagai akibat pembentukan uap air didalamnya. Hal ini sesuai dengan profil morfologi nanokapsul pembeding. Pada perbesaran 5000x dinding nanokapsul pembeding mengalami keretakan. Dinding nanokapsul yang mudah



Gambar 5. (a) Profil morfologi SEM nanokapsul optimum (1000x), (b) nanokapsul optimum (5000x), (c) nanokapsul pembeding (1000x), (d) nanokapsul pembeding (5000x)

retak dan pecah ini tidak dapat menyerap senyawa aktif sehingga senyawa aktif tidak terlindungi oleh enkapsulasi secara utuh.

KESIMPULAN

Kondisi optimum proses nanopresipitasi pada nanoenkapsulasi ekstrak kasar daun kakao dilihat dari parameter efisiensi enkapsulasi menggunakan metode RSM (*Response Surface Methodology*) adalah dengan menggunakan konsentrasi ekstrak kasar daun kakao

509,57 ppm dan konsentrasi gelatin 1,57%. Analisis dengan menggunakan metode RSM juga menghasilkan titik optimum efisiensi enkapsulasi sebesar 78,04%. Karakterisasi nanokapsul optimum memiliki hasil ukuran nanokapsul berada dalam kisaran nanometer yaitu sebesar 178,9 nm dan persebaran nanokapsul merata dilihat dari nilai indeks polidispersitas yang kurang dari 1 yaitu 0,716. Sedangkan profil morfologi menunjukkan bahwa nanokapsul berbentuk bulat dan utuh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah membantu penelitian ini melalui program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) tahun 2018.

KONFLIK KEPENTINGAN

Kami menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan dari berbagai pihak dalam penulisan naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bakowska-Barczak, A. M., & Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1301–1309. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.002>
- Barreras-Urbina, C. G., Ramírez-Wong, B., López-Ahumada, G. A., Burruel-Ibarra, S. E., Olivert Martínez-Cruz, O., Tapia-Hernández, J. A., & Félix, F. R. (2016). Nano- and micro-particles by nanoprecipitation: Possible application in the food and agricultural industries. *International Journal of Food Properties*, 19(9), 1912–1923. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1089279>
- Carvajal-Zarrabal, O., Hayward-Jones, P. M., Orta-Flores, Z., Nolasco-Hipólito, C., Barradas-Dermitz, D. M., Aguilar-Uscanga, M. G., & Pedroza-Hernández, M. F. (2009). Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body weight implication in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/394592>
- Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., & Sumnu, G. (2012). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: Effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, 235(4), 587–596. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1786-8>
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., & Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.030>
- Dewandari, K. T., Yuliani, S., & Yasni (2013). Ekstraksi dan karakterisasi nanopartikel ekstrak sirih merah (*Piper crocatum*). *Jurnal Pascapanen*, 58–65.
- Dhakar, R. C., Maurya, S. D., & Saluja, V. (2016). From formulation variables to drug entrapment efficiency of microspheres : A technical review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 2(6), 128-133. <https://doi.org/10.22270/jddt.v2i6.160>
- Dong, Y. & Feng, S. S. (2004). Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 25(14), 2843–2849. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.055>
- El-Say, K. M. (2016). Maximizing the encapsulation efficiency and the bioavailability of controlled-release cetirizine microspheres using Draper–Lin small composite design. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 825–839. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S101900>
- Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi H., & Doelker, E. (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428–1439. <http://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036917.75634.be>
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Hoffmeister, C. R. D., Durlí, T. L., Schaffazick, S. R., Raffin, R., P., Bender, E., A., Beck, R. C., Pohlmann, A. R., & Guterres, S. S. (2012). Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 251. <http://doi.org/10.1186/1556-276X-7-251>
- Karanam, S. K., Babu, I. S., & Rao, G. H. (2008). Process optimization for citric acid production from raw glycerol using response surface methodology. *Indian Journal of Biotechnology*, 7(4), 496–501.
- Keshani, S. Luqman, C. A., Nourouzi, M. M., Russly, A. R. & Jamilah, B. (2010). Optimization of concentration process on pomelo fruit juice using response surface methodology (RSM). *International Food Research Journal*, 17(3), 733–742.
- Khan, S. A. & Schneider, M. (2013). Nanoprecipitation versus two step desolvation technique for the preparation of gelatin nanoparticles. *Proceedings Volume 8595, Colloidal Nanocrystals for Biomedical Applications VIII, 85950H*. <https://doi.org/10.1117/12.2002419>

- Lee, E. J., Khan, S. A. & Lim, K. (2012). Gelatin nanoparticle preparation by nanoprecipitation. *Journal of Biomaterials Science*, 22(4-6), 37–41. <https://doi.org/10.1163/092050610X492093>
- Mardiyati, E., Muttaqien, S. E., Setyawati, D. R., Rosidah, I. & Sriningsih. (2012). Preparasi dan aplikasi nanopartikel kitosan sebagai sistem penghantaran insulin secara oral. *Prosiding inSINas*, 25–30.
- Matsuno, R. & Adachi, S. (1993). Lipid encapsulation technology - techniques and applications to food. *Trends in Food Science and Technology*, 4(8), 256–261. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90141-V](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90141-V)
- Noronha, C. M., Granada, A. F., Matos de Carvalho, S., Lino, R. C., Maciel, M., V., O. B., & Barreto, P. L. M. (2013). Optimization of tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. *Industrial Crops and Products*, 50, 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.015>
- Quiroz-Reyes, C., N., Jesús, N., R., Duran-Caballero, N. E., & Aguilar-Méndez, M. A. (2018). Original article development and characterization of gelatin nanoparticles loaded with a cocoa-derived polyphenolic extract. *Fruits*, 69, 481–489. <http://doi.org/10.1051/fruits/2014034>
- Permata, E., Suherman, A., & Maulana, A. (2014). Klasifikasi daun tanaman *Theobroma cacao* menggunakan metode neural network. *Seminar Nasional Teknologi Informasi dan Komunikasi, 2014*(Sentika), 160–165.
- Saloko, S., Darmadji, P., Setiaji, B., Pranoto, Y., & Anal, A. K. (2013). Encapsulation of coconut shell liquid smoke in chitosan-maltodextrin based nanoparticles. *International Food Research Journal*, 20(3), 1269–1276.
- Sulaiman, C. T. & Balachandran, I. (2012). Total phenolics and total flavonoids in selected indian medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(3), 258–260. <http://doi.org/10.4103/0250-474X.106069>
- Yuliani, S. & Harimurti, N. (2007). Pengaruh laju alir umpan dan suhu inlet spray drying. *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian*, 4(1), 18–26. <http://dx.doi.org/10.21082/jpasca.v4n1.2007.18-26>
- Zuidam, N. J. & Nedović, V. A. (2010). Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, (January 1970), 1–400. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0>