

PREPARASI NANOPARTIKEL KITOSAN-TPP/ EKSTRAK ETANOL DAGING BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleriamacrocarpa* (Scheff) Boerl) DENGAN METODE GELASI IONIK

RAUHATUN NAPSAH, IIS WAHYUNINGSIH
Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
Jl. Prof. Dr. Soepomo, Janturan, Yogyakarta
Email korespondensi: *avinagi@gmail.com*

Abstract: Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) is one of the plants frequently used as anticancer. But mahkota dewa extract have a high toxicity. One of certain effort that could reduces the toxic effect of medicine is nanoparticle delivery. The aims of this study were to make nanoparticle from chitosan-mahkota dewa extract using TPP as a cross linker and to determine it's particle size, zeta potential, loading capacity and loading efficiency. Chitosan nanoparticles extract of *Phaleria macrocarpa* fruits with TPP as cross linker by ionic gelation method. Chitosan was dissolved in acetic buffer solution at pH 4 with various concentrations (0.045 and 0.09 % b/v), meanwhile tripolyphosphate (0.009 dan 0.018 % b/v) with volume compare (5 : 1). The characterizations of chitosan nanoparticles of extract were determined by measure its particle size, zeta potential, loading capacity, and determining efficiency value nanoparticle process formed. The results showed that the most stable extract were on concentration 0.68 and 0.9 mg/ml (kitosan 0.09 % b/v, TPP 0.018 % b/v) with 350 rpm stirring speed. The average of nanoparticle size were 190.9 and 162.87 nm. The zeta potential were 48.5 mV and 60.86 mV, the loading capacity were 2.96 and 5.33 %, than the loading efficiency were 35.75 and 45.26 %. Preparation of chitosan-extract of mahkota dewa fruits by ionic gelation method can produced nanoparticles and has a short range of size distribution, grade of uniformity and good stability.

Key words: Mahkota dewa, nanoparticles, chitosan, ionic gelation.

1. Pendahuluan

Tanaman mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) merupakan salah satu tanaman yang digunakan untuk menyembuhkan penyakit kanker (Siswanto dan Nurulita, 2007). Senyawa yang terkandung dalam buah mahkota dewa yang berefek sebagai antikanker adalah flavonoid, alkaloid, dan polifenol (Anonim, 2002). Ekstrak etanol daging buah mahkota dewa mempunyai aktivitas sebagai sitotoksik dengan IC_{50} 86,28 μ g/ml (Mudahar, 2005). Disamping itu kandungan flavonoid dari buah mahkota dewa memiliki kemampuan dalam menangkap radikal bebas yang dapat menyebabkan kanker (Sundaryono, 2011).

Buah mahkota dewa jika dikonsumsi secara berlebihan dapat menyebabkan nefrotoksik (Johnson *et al.*, 2000) dan efek toksik pada sel normal. Penghantaran obat

tertarget (*Targeted Drug Delivery Sistem/TDDS*) dikembangkan untuk meningkatkan efektivitas senyawa antikanker. Salah satu metode TDDS penyakit kanker adalah dengan mengikatkan senyawa antikanker ke dalam makromolekul atau nanopartikel yang terbukti membantu obat terkonsentrasi lebih banyak dalam jaringan kanker (*pasive targeting*), sedangkan di sisi yang lain yang tidak dikehendaki dibuat sesedikit mungkin yang sampai (Minko *et al.*, 2004).

Nanopartikel adalah partikel koloid atau padatan dengan diameter yang berkisar dari 10-1000 nm. Nanopartikel dengan menggunakan polimer dapat dimanfaatkan untuk sistem penghantaran tertarget, meningkatkan bioavailabilitas, pelepasan obat terkendali, atau melarutkan obat untuk penghantaran sistemik. Juga dapat

digunakan untuk melindungi agen terapeutik akibat adanya degradasi enzim (*nuclease dan protease*) (Mohanraj dan Chen, 2006).

Salah satu metode yang digunakan untuk pembuatan nanopartikel adalah dengan gabungan kompleks koaservasi dan gelasi ionik. Kompleks koaservasi atau gelasi ionik dapat diinduksi dalam sistem yang mempunyai dua dispersi koloid hidrofilik yang mempunyai muatan yang berlawanan. Netralisasi muatan positif oleh muatan negatif menyebabkan pemisahan kompleks (Versic, 2010). Mekanisme terbentuknya formulasi nanopartikel kitosan ini berdasarkan pada interaksi elektrostatis antara gugus amina kitosan dengan gugus bermuatan negatif dari suatu polianion (Tiyaboonchai, 2003). Metode gabungan kompleks koaservasi dan gelasi ionik menggunakan teknik pembuatan nanopartikel dengan teknologi *bottom up*, dimana teknologi ini membentuk partikel skala nano dari larutan molekuler dengan mengontrol karakteristik partikelnya (ukuran dan morfologinya), contohnya dengan penguapan pelarut (Ober dan Gupta, 2011).

Polimer yang digunakan untuk pembentukan nanopartikel salah satunya adalah kitosan dan Na TPP. Muatan positif gugus amina kitosan berinteraksi dengan muatan negatif TPP untuk membentuk kompleks dengan ukuran dalam rentang nanopartikel (Kafshgari *et al.*, 2011).

Nanopartikel yang terbentuk dianalisis karakteristiknya yang meliputi ukuran partikel, zeta potensial, *loading capacity* dan nilai *loading efficiency*.

2. Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl), *Chitosan Low molecular weight* (Sigma Aldrich® China), Sodium tripolyphosphate (Sigma Aldrich® China), Asam asetat (Merck), Natrium Asetat (Merck), air bebas CO₂, Etanol 70% (Merck).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex), timbangan elektrik (Ohaus carat series),

soxhlet (Pyrex), *rotary evaporator* (Heidolph Germany), mikropipet (pipet PAL), pH meter, *hotplate stirrer* (Thermo scientific cimarec), *waterbath* (Mettler), *ultrasonic bath* (Elmasonic S 30H), spektrofotometri Visibel (Shimadzu UV-1800), *ultra sentrifuge* (Hettich zentrifugen mikro 220 R), *particle size analyser* (Nicom PSS 380).

3. Tata Cara Penelitian

3.1. Proses Ekstraksi Daging Buah Mahkota Dewa

Daging buah mahkota dewa yang sudah kering kemudian dihaluskan untuk memperkecil ukuran partikel. Senyawa aktif daging buah mahkota dewa dipisahkan dengan metode ekstraksi soxhlet (Rohyami, 2008). Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan soxhlet dengan pelarut etanol 70 %, ekstrak etanol yang diperoleh, dipekatkan dengan bantuan *rotary evaporator*, kemudian diuapkan pada *waterbath* hingga terbentuk ekstrak kental (Mudahar *et al.*, 2005).

3.2. Preparasi Perbandingan Kadar Ekstrak dengan Kadar Kitosan

Ekstrak diencerkan dengan etanol hingga mendapatkan kadar ekstrak bervariasi. Setiap larutan ekstrak (5 ml) dicampur dengan larutan kitosan (5 ml) dalam wadah asetat pH 4 dengan kadar kitosan bervariasi. Variasi kadar ekstrak dan kadar kitosan tersaji dalam Tabel I.

Tabel I. Formula nanopartikel ekstrak mahkota dewa pada variasi kadar ekstrak dan kadar kitosan (volume 5 mL)

Kadar ekstrak (mg/ml)	TPP 0,1 %		TPP 0,1 %	
	K 0,1 %	K 0,2 %	K 0,1 %	K 0,2 %
0,5	F.A	F.B	F.K	F.L
1	F.C	F.D	F.M	F.N
1,5	F.E	F.F	F.O	F.P
2	F.G	F.H	F.Q	F.R
2,5	F.I	F.J	F.S	F.T

Keterangan: K (kitosan) ; F.A (formula A).

Setiap formula diaduk selama 30 menit (dengan magnetik stirer 350 rpm) dan larutan TPP sebanyak 1 mL ditambahkan ke dalam campuran larutan ekstrak-kitosan tetes demi tetes, sambil diaduk (30 menit dengan magnetik stirer 350 rpm). Masing-masing seri formula dengan beberapa variasi konsentrasi dilakukan replikasi 2 kali. Campuran dibiarkan semalam di dalam flakon yang tertutup. Formula terpilih ditentukan dengan mengamati partikel yang terbentuk pada dispersi nanopartikel. Formula yang terpilih adalah formula yang berupa dispersi opalesensi (Calvo *et al.*, 1997). Formula yang tidak memberikan endapan atau stabil selama pengamatan dijadikan sampel untuk dilakukan *scale up* untuk mencari *loading capacity* dan *loading efficiency*.

3.3. Uji Karakteristik Nanopartikel

Karakterisasi nanopartikel meliputi penentuan ukuran partikel dan zeta potensial. Keduanya dilakukan di Balai Inkubator Teknologi Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BIT-BPPT) Serpong, Tangerang.

3.4. Perhitungan Loading Capacity dan Loading Efficiency Menggunakan Spektrofotometri Visibel.

Setelah mengetahui jumlah flavonoid yang terbebas kemudian dilakukan perhitungan *loading* obat dari masing-masing formula dari hasil perhitungan kadar flavonoid total yang tidak terjerap sehingga dapat dihitung *Loading Capacity* dan

Loading Efficiency dari formula nanopartikel yang terbentuk.

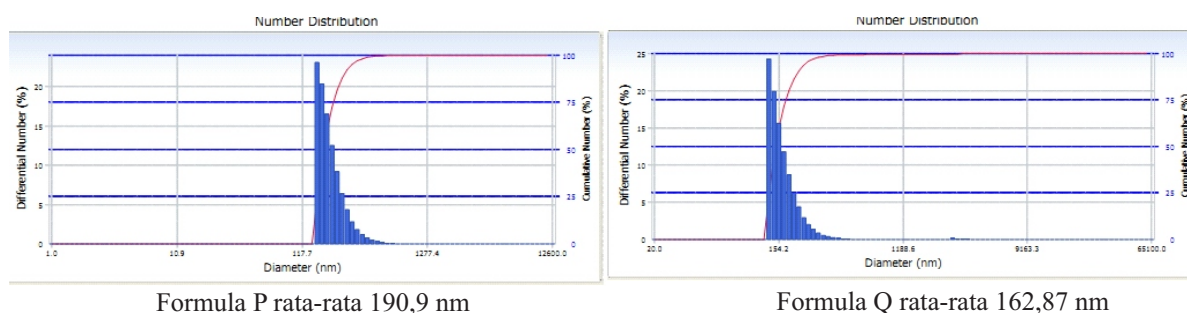
4. Hasil dan Pembahasan

4.1. Preparasi Formula Nanopartikel

Preparasi nanopartikel ekstrak etanol buah mahkota dewa dilakukan berdasarkan gabungan metode kompleks koaservasi dan gelasi ionik antara kitosan dan TPP serta dapar asetat pH 4.

Preparasi dilakukan terlebih dahulu untuk menentukan formula yang paling stabil. Formula dikatakan stabil jika terjadi opalesen dan dalam penyimpanan tidak terjadi pengendapan. Dari hasil preparasi formula nanopartikel yang stabil selama penyimpanan tiga hari tidak mengendap dan ukuran partikel yang terbentuk tidak mengalami agregasi selama penyimpanan adalah formula P dan R.

Pada pembuatan nanopartikel berdasarkan metode gelasi ionik mekanisme terbentuknya formulasi nanopartikel kitosan ini berdasarkan pada interaksi elektrostatis antara gugus amina kitosan dengan gugus muatan negatif dari suatu polianion (Tiyaboonchai *et al.*, 2003). Gugus amina pada kitosan yang dilarutkan dalam dapar pH 4 akan terprotonasi membentuk amina kationik ($-\text{NH}_3^+$). TPP mempunyai muatan negatif sehingga dapat berfungsi sebagai polianion. Reaksi dengan komponen bermuatan negatif baik ion ataupun molekul dapat menyebabkan pembentukan jaringan antara rantai polimer melalui jembatan ionik (Kumar, 2006).



Gambar 1. Distribusi ukuran partikel formula P dan R

4.2. Hasil karakteristik nanopartikel ekstrak etanol daging buah mahkota dewa

Gambaran distribusi ukuran partikel pada salah satu formula terpilih tersaji pada Gambar 1. Hasil rata-rata pengukuran distribusi ukuran partikel tersaji pada tabel II.

Konsentrasi proses formula P (ekstrak 0,69 mg/ml), formula R (ekstrak 0,9 mg/ml) dengan masing-masing kitosan 0,09 % b/v, dan TPP 0,018 % b/v). Hasil pengukuran formula P dan R, diperoleh rata-rata 190,9 dan 162,87 nm. Menurut Mohanraj dan Chen (2006) bahwa dikatakan nanopartikel jika rentang ukurannya antara 10 sampai dengan 1000 nm. Dari ukuran yang dihasilkan maka kedua formula tersebut dapat diklasifikasikan sebagai nanopartikel. Penggunaan kitosan yang berlebih menyebabkan ukuran partikel semakin besar, seperti terjadi pada formula P, jumlah ekstrak yang digunakan lebih sedikit dibanding dengan kitosan sehingga zat aktif yang

bereaksi dengan kitosan sedikit, sehingga sisa kitosan yang tidak bereaksi akan mengikat kembali zat aktif sehingga menyebabkan ukuran partikel semakin besar.

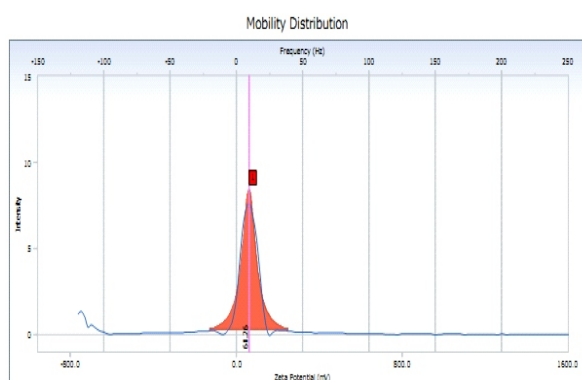
Polydispersity index (PI) digunakan untuk memperkirakan rentang distribusi ukuran partikel yang ada dalam suatu sampel serta mengetahui ada tidaknya agregasi. PI yang kecil berarti nanopartikel yang terbentuk memiliki rentang distribusi ukuran yang pendek atau dengan kata lain tingkat keseragaman cukup baik.

Potensial zeta menggambarkan stabilitas nanopartikel karena perbedaan muatan antar partikel akan mempengaruhi gaya tolak menolak antar partikel. Untuk memperoleh koloid nanopartikel yang stabil, nanopartikel harus memiliki zeta potensial lebih dari ± 30 mV (Akhtar *et al.*, 2012). Hasil pengukuran zeta potensial pada salah satu sampel tersaji pada Gambar 2.

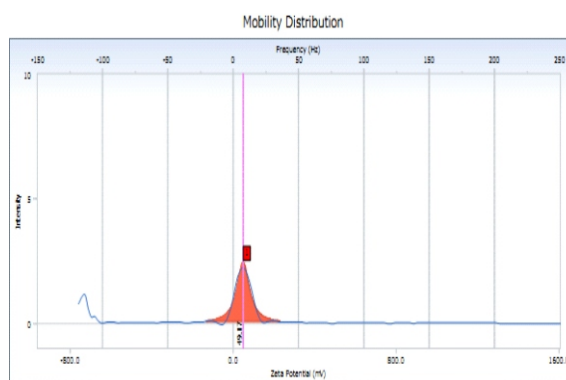
4.3. Perhitungan *Loading Efficiency* dan

Tabel II. Hasil rata-rata pengukuran partikel, distribusi ukuran partikel, dan potensial zeta formula P dan R.

Formula	Ukuran partikel (nm) - SD	Indeks Polidispersitas - SD	potensial zeta (mV) - SD
P	190,9 - 16,4	0,673 - 0,14	60,86 - 2,22
R	162,87 - 31,35	0,703 - 0,099	48,5 - 4,78



Formula P rata-rata 60,86 mV



Formula R rata-rata 48,5 mV

Gambar 2. Hasil pengukuran zeta potensial formula P dan R

Tabel III. Nilai *Loading Efficiency* dan *Loading Capacity*

Formula	Jumlah flavonoid total (25 mL)	Jumlah flavonoid bebas (50 mL)	LE (%) rata-rata	SD - CV	LC (%) rata rata	SD - CV
P	1,225 mg	0,791 mg	35,37	2,07 - 5,85	2,97	0,18 - 6,06
R	1,875 mg	1,026 mg	45,26	0,46 - 1,02	5,34	0,05 - 0,94

Loading Capacity

Penetapan *Loading Efficiency* dan *Loading Capacity* setelah mendapatkan flavonoid total dari ekstrak formula yang terpilih dan flavonoid bebas. Flavonoid ditentukan dengan menggunakan standar kuersetin, kadar kuersetin yang diperoleh dianggap sebagai flavonoid total yang nantinya digunakan untuk menghitung *loading efficiency* dan *loading capacity*.

Rumus *Loading capacity* dan *loading Efficiency* adalah sebagai berikut :

$$LC\% = \frac{(Ce \times Ve) - (Cf \times Vf)}{\text{bobot nanopartikel}} \times 100\% \dots (1)$$

$$LE\% = \frac{(Ce \times Ve) - (Cf \times Vf)}{(Ce \times Ve)} \times 100\% \dots (2)$$

LC = *Loading Capacity*

LE = *Loading Efficiency*

Ce = Konsentrasi flavonoid dalam ekstrak

Cf = Konsentrasi flavonoid dalam filtrat

Ve = Volume ekstrak

Vf = Volume filtrat

Hasil perhitungan *loading efficiency* dan *loading capacity* dapat dilihat pada Tabel III. *Loading efficiency* merupakan parameter yang menggambarkan keberhasilan polimer memerangkap obat terlarut dalam proses pembentukan nanopartikel atau efisiensi nanopartikel yang terbentuk. Dari tabel III didapatkan *loading efficiency* untuk formula P rata-rata 35,37% dan formula R rata-rata 45,26 % artinya keberhasilan polimer menjerap obat yang terlarut sebesar 35,37 dan 45,26 %. Dari hasil tersebut *loading efficiency* formula P lebih kecil dibandingkan dengan formula R. Hal ini kemungkinan disebabkan karena jumlah zat aktif yang

diikat oleh polimer lebih sedikit dan kemungkinan dipengaruhi oleh sifat muatan dari zat aktifnya, jika muatan zat aktifnya terionisasi sedikit maka kekuatan untuk mengikat kitosan lebih kecil sehingga proses penjerapan zat aktif oleh kitosan tidak efektif. Hal tersebut menyebabkan kitosan hanya berikatan dengan TPP.

Loading capacity merupakan jumlah zat aktif yang terjerap dalam nanopartikel. Dari tabel III didapatkan *loading capacity* masing-masing formula adalah 2,96 dan 5,33 %. Semakin besar kadar ekstrak etanol buah mahkota dewa maka *Loading capacity* akan besar. Disamping itu *Loading capacity* berbanding terbalik dengan jumlah endapan yang dihasilkan, semakin banyak endapan maka *Loading capacity* semakin kecil.

5. Kesimpulan

Nanopartikel ekstrak buah mahkota dewa dapat dibuat dengan metode gelasi ionik dengan karakteristik nanopartikel yang diperoleh sebagai berikut:

- Nanopartikel ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi 1,5 mg/ml ukuran partikel rata-rata 190,9 nm dan konsentrasi 2,0 mg/ml rata-rata 162,87 nm.
- Zeta potensial rata-rata 60,86 dan 48,5 mV.
- *Loading capacity* rata-rata 2,96 dan 5,33%.

Loading efficiency atau efisiensi proses nanopartikel yaitu rata-rata 35,75 dan 45,26%. Formula R mempunyai *loading capacity* dan *loading efficiency* lebih besar dibanding dengan formula P.

Daftar Pustaka

Akhtar, F., Rizvi, MM., and Kar, SK., 2012, Oral delivery of curcumin bound to chitosan nanoparticles cured *Plasmodium yoelii*

- infected mice, *Biotechnology Advances*, **30**(1): 310-20.
- Anonim, 2002, Dicari karena khasiatnya dihindari karena racunnya, http://www.aranormal.Web.id/obat/t_obat/b_dewa_01.htm.
- Calvo, P., Remuñan-López C., Vila-Jato JL., Alonso MJ., 1997, Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers, *Journal of Applied Polymer Science*, **63**(1): 125-132.
- Johnson, J.D., Ryan, M.J., Toft, J.D.I.I., Graves, S.W., Hejtmancik, M.R., Cunningham, M.L., Herbert, R.A., dan Kamal, M., 2000, Two-year toxicity and carcinogenicity study of methyleugenol in F344/N rats and B6C3F1 mice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(8): 3620-3632.
- Kafshgari, MH., Khorram, M., Khodadoost, M., and Khavari, S., 2011, Reinforcement of chitosan nanoparticles obtained by an ionic crosslinking process, *Iranian Polymer Journal*, **20**(5): 445-456.
- Kumar, C. S., 2006, DNA-Chitosan Nanoparticles for Gene Therapy, in *Current Knowledge and Future Trends*, Willey.
- Minko T., Dharap SS., Pakunlu RI., Wang Y., 2004, Molecular targeting of drug delivery systems to cancer, *Current Drug Targets*, **5**(4): 389-406.
- Mohanraj U. J and Y Chen, 2006, Nanoparticles - A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **5**(1): 561-573.
- Mudahar, H., Lelly, W., Sinta, D., 2005, Uji Sitotoksik Fraksi Etanol Daging Buah Mahkota Dewa Terhadap Sel Kanker Serviks, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, **4**(2): 1412-2855.
- Ober, C.A., dan Gupta, R.B., 2011, Nanoparticle technology for drug delivery, *Ideas Concyteg*, **6**(72), 714-726.
- Rohyami, Y., 2008, Penentuan kandungan flavonoid dari ekstrak metanol daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* Scheff Boerl), *Logika*, **5**(1): 1-8.
- Siswanto, A., dan Nurulita N. A., 2007, Efek sitotoksik dan antiproliferasi ekstrak kloroform buah mahkota dewa terhadap sel kanker payudara T47D, *Jurnal Farmasi Indonesia*, **3**(4): 168-175.
- Sundaryono A, 2011, Uji aktivitas senyawa flavonoid total dari *Gynura segetum* (lour) terhadap peningkatan eritrosit dan penurunan leukosit pada mencit (*Mus musculus*), *Jurnal Exacta*, **2**(9): 8-16.
- Tiyaboonchai, W., 2003, Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand, *Naresuan University Journal*, **11**(3) 51-66.
- Versic, R. J., 2010, *Coacervation for Flavor Encapsulation*, <http://rtdodgle.com/coacer.html>, 20 april 2011.