

**FORMULASI NANOPARTIKEL NARINGENIN UNTUK MEMPERBAIKI
KARAKTERISTIK FISIKA-KIMIA NARINGENIN SEBAGAI AGEN
KEMOPREVENTIF SECARA IN VITRO DAN IN VIVO**

Peneliti : Lusya Oktora Ruma Kumala Sari¹, Lina Winarti²
Mahasiswa terlibat : -
Sumber Dana : Hibah Bersaing Desentralisasi BOPTN Penguatan 2014 (Tahun ke-2)
Kontak Email : oktorarks@gmail.com
Diseminasi : Lina Winarti, Lusya Oktora Ruma Kumala Sari, Preparation and Characterization of Naringenin-Loaded Chitosan Nanoparticles for Chemoprevention, Oral Presentation, The 1st International Conference on Pharmaceutics and Pharmaceutical Sciences (ICPPS), November 2014

¹Fakultas Farmasi Universitas Jember

²Fakultas Farmasi Universitas Jember

ABSTRAK

Naringenin merupakan agen kemopreventif yang potensial, namun karena kelarutannya yang rendah menyebabkan absorpsinya ke dalam tubuh sangat jelek. *Nanocarrier* potensial untuk memodifikasi bahan aktif melalui peningkatan efikasi, stabilitas, kelarutan, menurunkan toksisitas serta men-sustaining pelepasan bahan aktif. Dalam penelitian ini telah dilakukan formulasi naringenin menjadi nanopartikel melalui metode enkapsulasi menggunakan polimer biodegradable dan hidrofilik kitosan sehingga kelarutan dan efikasi sebagai agen kemopreventif dapat diperbaiki/ditingkatkan. Nanopartikel naringenin-kitosan 0,06 - 0,1 % memiliki ukuran submikron, monodispersi, dan bentuk mendekati sferis. Suspensi nanopartikel naringenin-kitosan dengan kadar kitosan 0,08% memberikan nilai *entrapment efficiency* (EE) dan zeta potensial tertinggi sehingga memberikan *cellular uptake* terbesar. Formulasi kitosan dengan naringenin dalam penelitian ini menjadi nanopartikel memberikan intraselular uptake yang tinggi karena ukuran subselulernya yang unik dibandingkan dengan sistem berukuran mikro sehingga efektivitas sitotoksiknya dapat ditingkatkan dibanding dengan penggunaan senyawa aslinya yaitu naringenin. Perlakuan naringenin dan nanopartikel kitosan-naringenin dengan konsentrasi kitosan 0,06%, 0,08%, dan 0,10% mampu memacu apoptosis pada sel T47D dengan

intensitas fluoresensi oranye yang hampir sama. Besarnya kemampuan pemacuan apoptosis dianalisis secara kualitatif dengan melihat sel yang berwarna oranye. Dari pengamatan morfologinya, baik perlakuan naringenin bebas dan nanopartikel kitosan-naringenin menunjukkan fragmentasi inti sel. Semakin meningkatnya tanda-tanda apoptosis yaitu permeabilitas sel pada perlakuan naringenin bebas dibanding dengan perlakuan dengan nanopartikel kitosan-naringenin. Hal ini sejalan dengan uji sitotoksitas dimana besarnya viabilitas sel pada naringenin bebas sangat rendah atau hampir nol untuk konsentrasi 10 µg/ml.

Kata kunci: Naringenin, nanopartikel, ukuran partikel, uji sitotoksik, in vitro

**FORMULASI NANOPARTIKEL NARINGENIN UNTUK MEMPERBAIKI
KARAKTERISTIK FISIKAKIMIA NARINGENIN SEBAGAI AGEN
KEMOPREVENTIF SECARA IN VITRO DAN IN VIVO**

Peneliti : Lusya Oktora Ruma Kumala Sari¹, Lina Winarti²
Mahasiswa terlibat : -
Sumber Dana : Hibah Bersaing Desentralisasi BOPTN Penguatan (Tahun ke-2)
Kontak Email : oktorarks@gmail.com
Diseminasi : Lina Winarti, Lusya Oktora Ruma Kumala Sari, Preparation and Characterization of Naringenin-Loaded Chitosan Nanoparticles for Chemoprevention, Oral Presentation, The 1st International Conference on Pharmaceutics and Pharmaceutical Sciences (ICPPS), November 2014

¹Fakultas Farmasi Universitas Jember

²Fakultas Farmasi Universitas Jember

Latar Belakang dan Tujuan Penelitian

Naringenin (4',5,7-trihidroksi flavon) merupakan suatu senyawa golongan flavon yang berasal dari buah jeruk (*Citrus reticulata* dan *Citrus aurantium*) (De Leo dan De Bosco,2005) serta banyak terdistribusi dalam buah tomat, *cherri*, anggur dan coklat (*cocoa*). Sifatnya tidak larut dalam air karena merupakan senyawa aglikon. Naringenin merupakan agen kemopreventif yang telah terbukti sitotoksik pada sel kanker lambung (KATOIII dan MKN-7) dan sel kanker liver (HepG2,Hep3B, Huh7) dalam menginduksi apoptosis melalui jalur independen p53 (Kanno dkk, 2005). Selain itu naringenin juga dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi induksi NF-κB pada sel HL-60 dan mengaktifasi p38 MAPK dan JNK1/2 (Kanno dkk, 2006; Gopalakrishnan dkk, 2006).

Nanopartikel menggunakan bahan polimer biodegradable menarik perhatian untuk dikembangkan, terutama pada pengembangan bahan terapi onkologi. Polimer kitosan merupakan polisakarida biodegradabel yang banyak digunakan dalam formulasi nanopartikel. Gugus amin pada unit glukosamin dari kitosan merupakan bagian yang penting karena memberikan muatan positif yang tinggi dan sangat reaktif. Kitosan juga dapat meningkatkan transport obat melintasi membran sel. Formulasi kitosan dengan naringenin dalam penelitian ini menjadi nanopartikel diharapkan akan memberikan intaselular *uptake* yang tinggi karena

ukuran subselulernya yang unik dibandingkan dengan sistem berukuran mikro (Mosqueira dkk., 2001) sehingga efektifitas sitotoksiknya dapat ditingkatkan dibanding dengan penggunaan senyawa aslinya yaitu naringenin.

Metodologi

Bahan

Naringenin (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), Kitosan rantai pendek ($C_6H_{11}NO_4$)_n dari kulit kepiting (*chitosan from crab shells*) rantai pendek/*low viscosity* dengan viskositas > 200 cps, bobot molekul 150 kDa, dan derajat deasetilasi $\geq 85\%$ (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), Sel kanker payudara T47D (Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada).

Alat

*Delsa*TM Nano Submicron Particle Size and zeta potential analyzer (Beckman Coulter, USA), Transmission Electron Microscopy (TEM) (JOEL-JEM 1400, Japan), Mikroskop Fluoresens (Carl Zeiss Axiolab HB50, Germany) dilengkapi canon *power shot* A620, ELISA reader (Bio-Rad microplate reader Benchmark, serial no 11565, Jepang).

Jalannya Penelitian

1. Preparasi Nanopartikel

Nanopartikel dibuat melalui proses gelasi ionik, melalui penambahan larutan TPP dalam air (1 mg/ml) pada kitosan (2 mg/ml) yang diaduk pada suhu ruang dengan kecepatan 400 rpm. Pembentukan nanopartikel merupakan hasil interaksi antara gugus negatif TPP dengan muatan positif gugus amino terprotonasi pada kitosan. Rasio antara kitosan/TPP diperoleh dari uji pendahuluan. Jumlah Naringenin yang akan ditambahkan pada kitosan didasarkan pada pembentukan nanopartikel untuk investigasi efek konsentrasi awal Naringenin pada karakteristik nanopartikel dan profil pelepasan in vitro. Nanopartikel dikoleksi melalui sentrifugasi pada 10000 rpm selama 40 menit dan supernatant dipisahkan.

2. Pengujian Pembentukan Komplek Kitosan-naringenin dengan FTIR

Analisis kompleks kitosan-naringenin dianalisis dengan IR menggunakan infrared spektrofotometer. Analisis dilakukan dengan metode KBr, dimana naringenin, kitosan, dan nanopartikel kitosan-naringenin dibuat pellet dengan KBr kemudian dianalisis dalam spektrofotometer infrared.

3. Uji sitotoksitas dengan *MTT assay*

Uji sitotoksik nanopartikel menggunakan kitosan-naringenin dilakukan dengan metode *MTT Assay* pada sel kanker payudara T47D. Sel kanker payudara T47D sebanyak 5×10^3 sel/sumur dibiakkan dalam cawan 96 sumur dengan media DMEM semalam. Pada hari dilakukan uji sitotoksik medium diganti yang baru dan pellet dari suspensi nanopartikel 650 μ l (*freshly prepared*) diinkubasi dengan sel. Inkubasi dilakukan selama semalam, kemudian medium diganti dengan medium pertumbuhan setelah pencucian sel dengan PBS. Seratus mikroliter 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 0.5 mg/ml PBS) (Sigma-Aldrich, USA) ditambahkan pada setiap sumuran dan sel diinkubasi 4 jam pada suhu 37°C . Reaksi dihentikan dengan penambahan 100 μ l/sumuran reagen *stopper* SDS 10%, dan diinkubasi pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya selama semalam. Setelah semalam absorbansi dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550-600 nm (Mosmann, 1983, Martien dkk., 2006; Winarti dan Martien, 2011).

4. Pengamatan Apoptosis

Sebanyak 5×10^4 / 1 mL / sumur didistribusikan ke dalam *24-well plate* yang telah dilapisi *coverslip* pada bagian dasarnya dan dilanjutkan dengan inkubasi hingga keadaan normal kembali. Sel diberi perlakuan nanopartikel kitosan-naringenin dan diinkubasi kembali selama 15 jam. Sel dicuci PBS perlahan pada akhir inkubasi kemudian *coverslip* yang mengandung sel dipindahkan ke atas kaca obyek dan ditambahkan 10 mL pereaksi AE. Sel diamati di bawah mikroskop fluoresen segera setelah pereaksi mengering.

Pemaparan Hasil

1. Preparasi nanopartikel

Sebelum membuat suspensi nanopartikel naringenin dalam kitosan dilakukan percobaan terlebih dahulu untuk membuat suspensi nanopartikel kosong tanpa bahan aktif naringenin. Sebanyak 5 formula dibuat dengan konsentrasi kitosan yang berbeda dalam tiap formulanya yaitu 0,02% (F1), 0,04% (F2), 0,06% (F3), 0,08% (F4), dan 0,1% (F5). Suspensi yang diperoleh diamati organoleptis dan diukur volume sedimentasinya. Pengamatan selama 7 hari menunjukkan bahwa nanopartikel kitosan stabil pada kadar kitosan lebih dari 0,02 %.

Percobaan selanjutnya adalah menentukan kadar kitosan yang tepat untuk mencapai stabilitas nanopartikel naringenin-kitosan. Dalam percobaan ini digunakan kadar naringenin sebesar 0,02% dan diformulasikan menjadi nanopartikel dengan kitosan dengan kadar 0,02%

(F1), 0,04% (F2), 0,06% (F3), 0,08% (F4), dan 0,1% (F5). Pengamatan selama 7 hari menunjukkan bahwa F1 mengalami pengendapan yang lebih besar daripada F2, F3, F4, dan F5. Hal ini menunjukkan bahwa nanopartikel naringenin-kitosan kitosan stabil pada kadar kitosan lebih dari 0,02 %, hal ini sejalan dengan hasil uji pendahuluan pada suspensi nanopartikel kosong. Dari hasil pengamatan diketahui bahwa F3, F4, dan F5 merupakan suspensi nanopartikel naringenin-kitosan yang stabil secara visual. Percobaan selanjutnya menggunakan suspensi naringenin-kitosan F3, F4, dan F5.

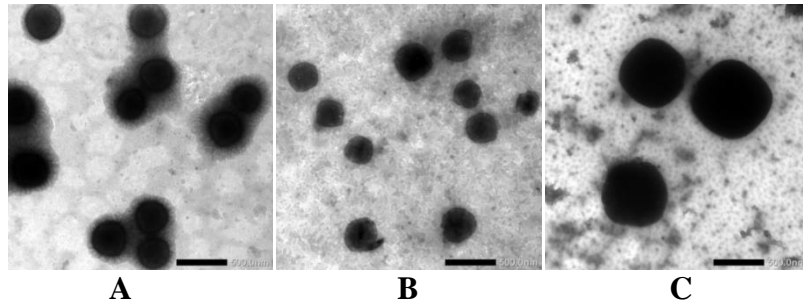
Banyaknya naringenin yang terperap dalam nanopartikel ditentukan dengan menghitung besarnya *entrapment efficiency* (EE). Hasil perhitungan nilai EE menunjukkan bahwa F4 yaitu nanopartikel naringenin-kitosan dengan kadar naringenin 0,02% dan kitosan 0,08% merupakan formula yang memberikan nilai EE tertinggi. F4 merupakan formula terbaik untuk menghantarkan naringenin dalam bentuk nanopartikel.

Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel merupakan karakteristik terpenting dari nanopartikel karena menentukan distribusinya di *in vivo*, mempengaruhi *loading* obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari nanopartikel tersebut. Banyak penelitian menunjukkan bahwa nanopartikel dengan ukuran submikron memiliki banyak keuntungan dibandingkan mikropartikel sebagai sistem penghantaran obat. Hasil pengukuran menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) adalah sebagai berikut : F3 memiliki ukuran partikel 469,6 nm; F4 memiliki ukuran 750,8 nm; dan F5 memiliki ukuran 564,0 nm. Selain data ukuran partikel dari hasil analisis dengan PSA juga diperoleh data *Polydispersity Index*. Hasil pengukuran menggunakan PSA menunjukkan bahwa semua formula yang dibuat memiliki *Polydispersity Index* lebih kecil dari 0,7 sehingga dapat dikatakan bahwa ukuran nanopartikel yang diperoleh dalam penelitian ini adalah seragam (*monodispers*).

Transmission Electron Microscopy (TEM) digunakan untuk menganalisis morfologi dan mikrostruktur nanopartikel yang terbentuk. Nanopartikel dengan bentuk sferis memiliki *uptake* yang lebih besar dibanding bentuk batang. Fenomena ini terkait dengan waktu yang dibutuhkan sel untuk menelan bentuk partikel yang berbeda yang akan berubah sesuai dengan volume dan permukaan partikel (Chithrani dan Chan, 2007). Gambar TEM yang diperoleh pada perbesaran yang tinggi menunjukkan morfologi permukaan yang halus dan mendekati sferis seperti terlihat pada gambar 1.

Zeta potensial menunjukkan potensi listrik partikel dan dipengaruhi oleh komposisi partikel dan medium dimana nanopartikel didispersikan (Covreur dkk., 2002). Nanopartikel dengan zeta potensial lebih dari (-/+) 30 mV menunjukkan suspensi yang stabil karena muatan permukaan mencegah agregasi partikel. Hasil pengukuran zeta potensial dari

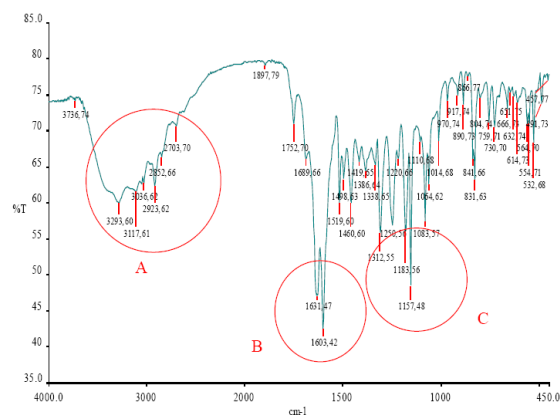
nanopartikel menunjukkan bahwa nanopartikel dengan kadar kitosan 0,08 % dan 0,1 % memiliki nilai zeta potensial lebih dari (-/+) 30 mV. Hal ini menunjukkan bahwa nanopartikel dengan kadar kitosan 0,08 % dan 0,1 % dapat membentuk suspensi yang relatif stabil.



Gambar 1. Mikrograf nanopartikel hasil pengamatan dengan TEM pada perbesaran 10.000x (A) F3, (B) F4, (C) F5.

Pengujian Pembentukan Komplek Kitosan-naringenin dengan FTIR

Kompleks kitosan-natrium tripolipospat terbentuk sebagai akibat adanya interaksi elektrostatik antara keduanya yang sesuai dengan prinsip metode gelas ionik. Kompleks kitosan dengan natrium tripolifosfat yang menjerap naringenin dikonfirmasi menggunakan instrumen spektrofotometer FT-IR. Terbentuknya *crosslink* kitosan-natrium tripolipospat dapat diketahui dari serapan IR nanopartikel padatan hasil *freeze-dry*.



Gambar 2. Spektra FTIR nanopartikel kitosan-naringenin

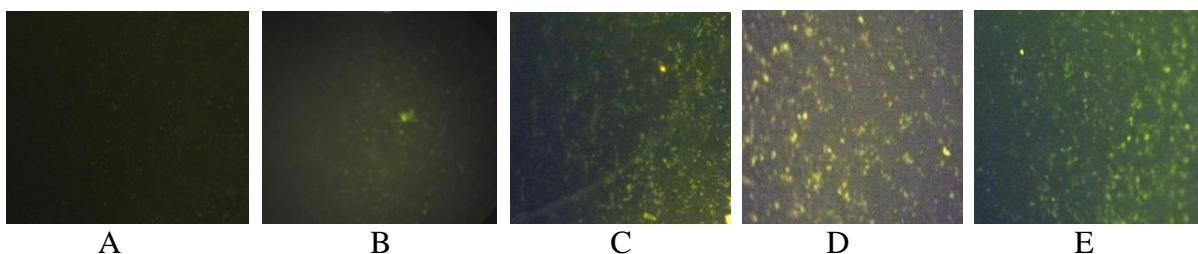
Hasil spektra FTIR nanopartikel kitosan-naringenin Fb pada gambar 2 memiliki perbedaan dengan spektra kitosan, antara lain terjadinya penurunan dan pergeseran puncak pada bilangan gelombang 3400 cm^{-1} menjadi $2703\text{-}3293\text{ cm}^{-1}$ (A). Puncak tersebut menjadi lebih lebar daripada sebelumnya yang mengindikasikan terjadi peningkatan ikatan hidrogen (Wu *et al.*, 2005). Pada spektra nanopartikel kitosan-naringenin, puncak 1655 cm^{-1} dari ikatan N-H mengalami pergeseran ke 1631 cm^{-1} dan muncul puncak baru pada bilangan gelombang 1603 cm^{-1} (B). Pergeseran dan munculnya puncak baru tersebut menandakan bahwa telah terjadi

interaksi taut silang antara ion amonium kitosan dan ion fosfat dari TPP dalam nanopartikel (Wu *et al.*, 2005; Bhumkar dan Pokharkar, 2006). Pita serapan baru juga muncul di bilangan gelombang 1157 cm^{-1} (C) yang menunjukkan pita serapan gugus P=O dari NaTPP.

2. Hasil Uji Sitotoksitas

Uji MTT menunjukkan bahwa % availabilitas sel dari percobaan dengan nanopartikel naringenin pada kadar kitosan 0,08 % memberikan hasil yang lebih baik daripada percobaan dengan naringenin bebas. Hasil tersebut juga lebih baik daripada hasil uji pada nanopartikel naringenin dengan kadar kitosan 0,06 % dan 0,1 %.

Pengamatan *cellular uptake* dengan mikroskop fluoresens dilakukan untuk memastikan bahwa nanopartikel yang dihasilkan mampu menghantarkan naringenin untuk masuk ke dalam sel. Pengamatan dengan mikroskop fluoresens memberikan hasil bahwa naringenin yang diberikan tanpa diformulasikan dalam bentuk nanopartikel hanya sedikit sekali yang dapat masuk ke dalam sel. Hal ini ditunjukkan oleh pendaran fluoresens yang sangat kecil seperti terlihat pada gambar 2. Nanopartikel kitosan terbukti mampu untuk menghantarkan naringenin ditunjukkan dengan tampilan pendaran fluoresens pada kultur sel T47D. *Cellular uptake* yang terbesar diperoleh pada nanopartikel naringenin dengan kitosan pada kadar 0,08 %.



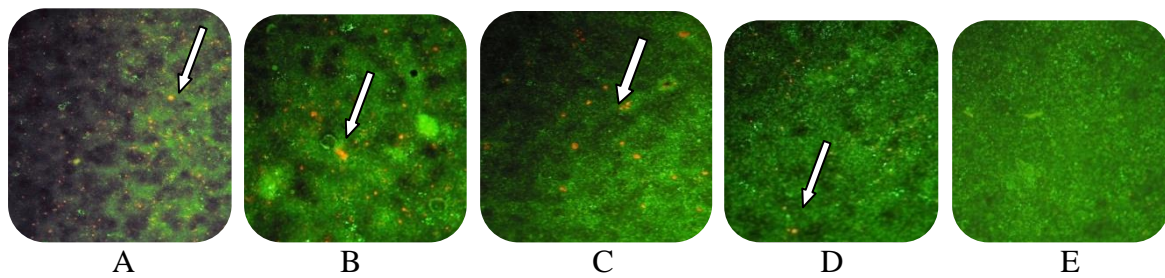
Gambar 2. Hasil pengamatan *Cellular Uptake* sel T47D di bawah mikroskop fluoresens dengan perbesaran 10x. (A) Kontrol Sel; (B) Free Naringenin; (C) F3 (D) F4; (E) F5.

Hasil pengamatan *cellular uptake* ini sejalan dengan hasil pengukuran zeta potensial yang menunjukkan bahwa nanopartikel naringenin dengan kadar kitosan 0,08 % memiliki zeta potensial yang paling besar. Zeta potensial yang positif penting untuk mengatasi barrier seluler ketika akan memasuki kompartemen seluler. Selain zeta potensial, nilai EE yang tertinggi juga menyebabkan nanopartikel naringenin-kitosan 0,08 % memiliki *cellular uptake* yang paling besar.

3. Pemacuan Apoptosis

Perlakuan naringenin dan nanopartikel kitosan-naringenin dengan konsentrasi kitosan 0,06%, 0,08%, dan 0,10% mampu memacu apoptosis pada sel T47D dengan intensitas fluoresensi

oranye yang hampir sama. Besarnya kemampuan pemacuan apoptosis dianalisis secara kualitatif dengan melihat sel yang berwarna oranye.



Gambar 5.1. Efek perlakuan naringenin dan nanopartikel kitosan naringenin pada pemacuan apoptosis pada sel T47D (A), nanopartikel kitosan-naringenin 0.06% (B), nanopartikel kitosan-naringenin 0.08% (C), nanopartikel kitosan-naringenin 0.10% (D), tanpa perlakuan/ kontrol sel.

Keterangan \Rightarrow sel apoptosis berfluoresensi oranye dan terlihat fragmentasi inti sel.

Dari pengamatan morfologinya, baik perlakuan naringenin bebas dan nanopartikel kitosan-naringenin menunjukkan fragmentasi inti sel. Semakin meningkatnya tanda-tanda apoptosis yaitu permeabilitas sel pada perlakuan naringenin bebas dibanding dengan perlakuan dengan nanopartikel kitosan-naringenin. Hal ini sejalan dengan uji sitotoksitas dimana besarnya viabilitas sel pada naringenin bebas sangat rendah atau hampir nol untuk konsentrasi 10 μ g/ml.

Kesimpulan

Nanopartikel naringenin-kitosan dengan kadar kitosan 0,08% memberikan nilai *entrapment efficiency* (EE), *cellular uptake*, sitotoksitas, dan hambatan apoptosis tertinggi dibanding formula lainnya dan naringenin bebas.

Kata kunci: Naringenin, nanopartikel, ukuran partikel, uji sitotoksik, in vitro

Referensi

- Chithrani, B., Chan, W., 2007, Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-coated Gold Nanoparticles of Different Size and Shapes, *Nano Lett.*, 7:1542-50
- Cohen, S., Bernstein, H., 1996, *Microparticulate Systems for the Delivery of Gene*, New York, NY: Marcel Dekker, Inc
- De Leo, F., De Bosco, S., F., 2005, Citrus Flavonoids as Bioactive Compounds: Role, Bioavailability, Socio-economic Impact and Biotechnological Approach For Their

Modification, 9th ICABR International Conference on Agricultural Biotechnology: Ten Years Later, Rovello, Italy

- Gopalakrishnan, A., Xu, C., J., Nair, S., S., Chen, C., Hebbar, V., Kong, A., N., 2006, Modulation of activator protein-1 (AP-1) and MAPK pathway by flavonoids in human prostate cancer PC3 cells, *Arch. Pharmacol. Res.*, 29, 633-644
- Kanno, S., Tomizawa, A., Hiura, A., Osanai, A., Shouji, A., Ujibe, A., Ohtake, A., T., Kimura, K., Ishikawa, M., 2005, Inhibitory Effect of Naringenin on Tumor Growth in Human Cancer Cell Line and Sarcoma S-180-Implanted Mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 28(3), 527-530
- Kanno, S., Tomizawa, A., Ohtake, T., Koiwai, K., Ujibe, M., Ishikawa, M., 2006, Naringenin induce apoptosis via activation of NF- κ B and necrosis involving in the loss of ATP in Human Promyeloleukimia HL-60 cells, *Toxicol.Lett.*, 166, 131-139
- Martien, R., Loretz, B., 2006, Oral Gene Delivery: Design of Polymeric Carrier systems shielding toward Intestinal Enzymatic Attack, *Biopolymers* 83(4):327-36
- Mosqueira, V., Legrand, P., Gulik, A., Bourdon, O., Gref, R., Labarre, D., Barratt, G., 2001, Relationship Between Complement Activation, Cellular Uptake and Surface Physicochemical Aspects of Novel PEG-modified Nanocapsules, *Biomaterials*, 22:2967-79
- Mossmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Meth.*, 65:55-63.
- Winarti, L., Martien, R., 2011, Formulasi Nanopartikel Kitosan Rantai Pendek Dan Kitosan Rantai Pendek-TPP Sebagai Sistem Pengantaran Gen Non Viral Yang Ditransfeksi Pada Sel Kanker Payudara T47D, *Tesis*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.