



**OPTIMASI DAN KARAKTERISASI NANOPARTIKEL KITOSAN -
NARINGENIN DENGAN VARIASI PH DAN KONSENTRASI
NATRIUM TRIPOLIFOSFAT**

SKRIPSI

Oleh:

**DAVID IRAWAN
NIM. 102210101042**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2014



**OPTIMASI DAN KARAKTERISASI NANOPARTIKEL KITOSAN -
NARINGENIN DENGAN VARIASI PH DAN KONSENTRASI
NATRIUM TRIPOLIFOSFAT**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Farmasi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

**DAVID IRAWAN
NIM 102210101042**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2014**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Tuhan Yesus Kristus yang senantiasa memberikan bimbingan, kekuatan, karunia, dan hikmat-Nya selama ini. Segala puji syukur hanya bagi Tuhan Yesus yang telah memberikan kesempatan untuk menjadi pribadi yang berguna dan lebih baik lagi;
2. Mama dan papa tersayang, mama Ernawati dan papa Gimpe Lompo atas segala pengorbanan dan jerih payahnya selama ini untuk keberhasilanku;
3. Bibiku tercinta, Wai Cok dan Wai Kim Ki serta Kakak-kakakku terkasih, Ce Shirly, Ko Herry, Ko Swanki, Meme, Ko Syekwen, Cc Santi yang selalu mendukung dan memberi semangat untuk terus berjuang dan segera menyelesaikan studiku ini;
4. Bapak dan Ibu Gembalaku, Pdt. Soehadi Widjaja, S.Th dan Pdp. Dr. Megawati atas segala bantuan, dorongan, motivasi, dukungan, serta doa yang tiada batas;
5. Teman-teman seperjuanganku satu angkatan 2010 dan dosen-dosenku di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Semua guru-guruku, yaitu guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi atas kesabaran, ketekunan, dan keikhlasan dalam membimbing dan membagikan ilmunya kepadaku;

MOTTO

Segala perkara dapat kutanggung di dalam Dia yang memberi kekuatan kepadaku.

(**Filipi 4 : 13**)

Sebab Aku ini mengetahui rancangan-rancangan apa yang ada pada-Ku mengenai kamu, demikianlah firman TUHAN, yaitu rancangan damai sejahtera dan bukan rancangan kecelakaan, untuk memberikan kepadamu hari depan yang penuh harapan.

(**Yeremia 29 : 11**)

“Sikap kita adalah landasan yang menentukan apakah kita akan sukses atau gagal.

Sikap kita mencerminkan apa yang kita harapkan dari hidup ini.”

(**John Maxwell**)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : David Irawan

NIM : 102210101042

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Optimasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan - Naringenin dengan Variasi pH dan Konsentrasi Natrium Tripolifosfat” adalah hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Mei 2014

Yang menyatakan,

(David Irawan)

NIM 102210101042

SKRIPSI

**OPTIMASI DAN KARAKTERISASI NANOPARTIKEL KITOSAN -
NARINGENIN DENGAN VARIASI PH DAN KONSENTRASI
NATRIUM TRIPOLIFOSFAT**

Oleh
David Irawan
NIM 102210101042

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Lina Winarti, S.Farm, M.Sc., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Lusia Oktora R.K.S., S.F, M.Sc., Apt.

PENGESAHAN

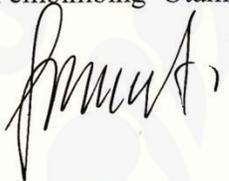
Skripsi berjudul “Optimasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan - Naringenin dengan Variasi pH dan Konsentrasi Natrium Tripolifosfat” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada :

hari, tanggal : Senin, 19 Mei 2014

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



Lina Winarti, S.Farm, M.Sc., Apt.

NIP 197910192006042002

Dosen Pembimbing Anggota,



Lusiana Oktora R.K.S., S.F, M.Sc., Apt.

NIP 197910032003122001

Tim Penguji

Penguji I,



Eka Deddy Irawan, S.Si., M.Sc., Apt.

NIP 197503092001121001

Penguji II,



Ayik Rosita P, S.Farm., M.Farm., Apt.

NIP 198102012006042001

Mengesahkan

Dekan,



Destyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm

NIP. 197604142002122001

Optimasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan - Naringenin dengan Variasi pH dan Konsentrasi Natrium Tripolifosfat (*Optimization and Characterization of Chitosan - Naringenin Nanoparticles with Variation of pH and Concentration of Sodium Tripolyphosphate*)

David Irawan

Fakultas Farmasi, Universitas Jember

ABSTRACT

Nanoparticles based on natural polymer such as chitosan have been widely applied as drug delivery system due to their specific properties such as biocompatible, biodegradable, mucoadhesive and enhanced intestinal permeation. The aim of this study was to synthesize chitosan-naringenin nanoparticles by ionic gelation method with using tripolyphosphate (TPP) ion as anionic crosslinker. The formula of chitosan-naringenin nanoparticles with variation of pH and concentration of TPP optimized by using factorial design method. The effects of pH and concentration of TPP to % entrapment efficiency (%EE) were studied. In this study it was found that the optimum formula of chitosan-naringenin nanoparticles was TPP pH of 4 and TPP concentration of 0,1%. Optimum chitosan-naringenin nanoparticles formula had an average %EE of 57,23 %. The research showed that %EE increased with the decrease of pH TPP and increase concentration of TPP. The selected optimum formula derived from a factorial design further characterized i.e., complex formation, particle size distribution, polydispersity index (PI), zeta potential, and particle morphology. FT-IR spectra of optimum formula indicated N-H bond at 3400 cm^{-1} wave number had been changed from a primary amine into a quaternary amine and the presence of a phosphate group at 1157 cm^{-1} wave number. Particle size, polidispersity index, and zeta potential was 25,9 nm; 0,624; 16,59 mV respectively. Chitosan-naringenin nanoparticles showed a smooth surface morphology and approaching a spherical shape.

Key words: *chitosan, entrapment efficiency, ionic gelation, naringenin, tripolyphosphate*

RINGKASAN

Optimasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan - Naringenin dengan Variasi pH dan Konsentrasi Natrium Tripolifosfat; David Irawan, 102210101042; 2014; 110 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Beberapa dekade terakhir ini penggunaan nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat mendapat perhatian yang sangat penting dan menarik untuk dikembangkan sebagai sistem penghantaran yang efektif. Nanopartikel dari bahan polimer alam seperti kitosan banyak diaplikasikan pada sistem penghantaran obat karena sifat-sifatnya yang istimewa seperti biokompatibel, biodegradabel, mukoadhesif dan meningkatkan permeasi usus.

Pembuatan nanopartikel dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain komposisi material dan metode yang digunakan. Secara umum, nanopartikel dengan metode gelasi ionik dapat dibuat dengan komposisi material seperti polimer, *crosslinker*, dan surfaktan. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan kitosan sebagai polimer, TPP sebagai *crosslinker*, dan tween 80 sebagai surfaktan dalam pembuatan nanopartikel. Pembuatan nanopartikel kitosan dilakukan dengan metode gelasi ionik dengan pengadukan magnetik stirer pada suhu kamar dengan kecepatan 1000 rpm selama 1 jam. Pembentukan nanopartikel merupakan hasil interaksi antara gugus negatif TPP dengan muatan positif gugus amina dari kitosan.

Bahan aktif yang digunakan dalam penelitian ini adalah naringenin. Naringenin merupakan senyawa flavonoid yang memiliki efek bioaktif bagi kesehatan manusia sebagai antioksidan, antiinflamasi, promotor metabolisme karbohidrat, dan modulator sistem imun. Kelarutan naringenin yang rendah menyebabkan bioavailabilitasnya dalam tubuh menjadi semakin berkurang sehingga efek biologis yang ditimbulkannya pun menjadi menurun. Hal ini membutuhkan pengembangan naringenin dalam bentuk yang dapat diformulasikan menjadi

sediaan yang memiliki bioavailabilitas tinggi untuk terwujudnya efek terapeutik yang diharapkan. Salah satu cara untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan menyulut naringenin dalam bentuk nanopartikel sehingga bioavailabilitas naringenin dapat ditingkatkan.

Optimasi dilakukan dalam penelitian ini untuk mendapatkan formula optimum nanopartikel kitosan ter-*loading* naringenin dengan persentase *entrapment efficiency* (%EE) yang optimum. Metode optimasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain faktorial. Penelitian ini bertujuan membuat nanopartikel kitosan-naringenin dengan variasi pH dan konsentrasi TPP serta menentukan karakterisasinya yang meliputi pembentukan kompleks, ukuran partikel, distribusi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial, dan morfologi partikel.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa %EE meningkat dengan menurunnya pH TPP dan meningkatnya konsentrasi TPP. Data respon %EE untuk formula (1), (a), (b), dan (ab) masing-masing sebesar 53,33%; 53,17%; 57,23%; 54,47%. Analisis dengan FTIR menunjukkan ikatan N-H pada bilangan gelombang 3400 cm^{-1} telah mengalami perubahan dari amina primer menjadi amina kuartener. Hal ini berarti telah terjadi interaksi ionik (ikatan sambung silang) antara ion amonium kitosan dan ion fosfat dari TPP dalam nanopartikel. Pita serapan P=O dari senyawa TPP muncul di bilangan gelombang 1157 cm^{-1} . Ukuran partikel, indeks polidispersitas, dan zeta potensial yang dihasilkan adalah 25,9 nm; 0,624; 16,59 mV. Analisis dengan TEM menghasilkan morfologi permukaan nanopartikel yang halus dan mendekati sferis.

Dari keseluruhan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penggunaan TPP sebagai agen *crosslinker* pada pH yang tinggi akan menurunkan respon %EE, sedangkan penggunaan TPP dengan konsentrasi tinggi mampu meningkatkan respon %EE, dan penggunaan kombinasi keduanya akan menurunkan respon %EE nanopartikel kitosan-naringenin. pH dan konsentrasi TPP yang memenuhi persyaratan respon %EE optimum berdasarkan hasil optimasi dalam penelitian ini adalah pada pH TPP 4 dan konsentrasi TPP 0,1%.

PRAKATA

Segala puji syukur bagi Tuhan Yang Maha Esa yang telah mencurahkan kasih dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Optimasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan - Naringenin dengan Variasi pH dan Konsentrasi Natrium Tripolifosfat”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penulis menyadari dalam penyusunan skripsi ini tidak mungkin terselesaikan tanpa bantuan serta dorongan dari semua pihak, oleh karena itu tiada kata yang lebih layak untuk menghormati selain ucapan terima kasih. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt. atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu Lina Winarti, S.Farm, M.Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama, Ibu Lusia Oktora R.K.S., S.F, M.Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang dengan penuh kesabaran memberi bimbingan, dorongan, meluangkan waktu, pikiran, perhatian, dan saran kepada penulis selama penyusunan skripsi ini sehingga dapat terlaksana dengan baik.
3. Bapak Eka Deddy Irawan, S.Si., M.Sc., Apt. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Ayik Rosita Puspaningtyas, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi.
4. Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm, Apt., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama menjadi mahasiswa.
5. Keluarga besarku tercinta, Mama, Papa, Wai, Koko, Cece, yang telah memberikan pengorbanan yang tak terhingga, perhatian, kasih sayang,

tenaga, pikiran, doa dan semangat yang besar pada penulis terutama selama penyusunan skripsi ini.

6. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu, bimbingan, saran, dan kritik kepada penulis serta seluruh karyawan yang telah membantu kelancaran studi.
7. Ibu Itus dan Mbak Titin selaku teknisi Lab. Farmasetika serta Ibu Wayan dan Mbak Hany selaku teknisi Lab. Kimia atas segala bantuannya selama proses penyelesaian skripsi ini.
8. Rekan kerjaku, Alief Rizky, Helmi Nur Laeli, Dian Ayu Eka Pitaloka, serta teman-teman seperjuangan di Laboratorium Farmasetika, Rizky, Arif, Tanfidz, Hanifia, Hendra, Ayu, Indri, Nina, Tira yang telah berjuang bersama-sama untuk mencapai kelulusan dan saling memberikan bantuan semangat, tenaga, dan sumbangan pemikiran selama ini.
9. Teman-teman UK3 Farmasi, Andreas, Peni, Lia, Rara, Marsela, Angel, Anggar, Rosa, Aslini, dan semua yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terimakasih atas rasa kekeluargaan dan kebersamaan yang telah terjalin.
10. Teman-teman Angkatan 2010, yang telah berjuang dalam suka dan duka selama empat tahun di kampus Farmasi serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna sehingga penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak dengan senang hati demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan dan dukungan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Tuhan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan pengembangan ilmu teknologi Farmasi. Amin.

Jember, 19 Mei 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
ABSTRAK	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.5 Batasan Masalah	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Nanopartikel	7
2.1.1 Pengertian dan perkembangan nanopartikel.....	7
2.1.2 Keuntungan dan kerugian nanopartikel.....	9
2.1.3 Metode Pembuatan Nanopartikel.....	10

2.2	Kitosan	11
2.2.1	Sumber dan sintesis kitosan.....	11
2.2.2	Sifat fisika kimia kitosan.....	14
2.2.3	Aplikasi kitosan.....	15
2.3	Natrium Tripolifosfat	15
2.4	Tween 80	17
2.5	Naringenin	18
2.6	Gelasi Ionik	19
2.7	<i>Entrapment Efficiency</i>	21
2.8	Karakterisasi Nanopartikel	22
2.8.1	Pembentukan kompleks kitosan-naringenin.....	22
2.8.2	Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel.....	23
2.8.3	Zeta potensial.....	23
2.8.4	Morfologi partikel.....	24
2.9	Desain Faktorial	25
BAB 3. METODE PENELITIAN		27
3.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	27
3.2	Alat dan Bahan Penelitian	28
3.2.1	Alat.....	28
3.2.2	Bahan.....	28
3.3	Lokasi dan Waktu Penelitian	28
3.4	Prosedur Penelitian	29
3.4.1	Formula.....	29
3.4.2	Pembuatan nanopartikel kitosan-naringenin.....	30
3.4.3	Penentuan panjang gelombang maksimum naringenin.....	31
3.4.4	Pembuatan kurva baku naringenin.....	31
3.4.5	Penentuan <i>entrapment efficiency</i>	31
3.4.6	Penentuan formula optimum.....	32

3.4.7	Pembuatan nanopartikel formula optimum	32
3.4.8	Karakterisasi nanopartikel.....	32
a.	Pengujian pembentukan kompleks kitosan-naringenin	32
b.	Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel	33
c.	Zeta potensial.....	33
d.	Morfologi partikel.....	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN		35
4.1	Pembuatan Nanopartikel Kitosan-Naringenin	35
4.2	Hasil Analisis Pembuatan Nanopartikel Kitosan- Naringenin dengan Variasi pH dan Konsentrasi TPP	36
4.3	Hasil Analisis Penentuan <i>Entrapment Efficiency</i>	38
4.3.1	Penentuan panjang gelombang maksimum naringenin.....	38
4.3.2	Penentuan <i>entrapment efficiency</i>	40
4.4	Hasil Analisis Desain Faktorial dan Penentuan Formula Optimum	44
4.5	Hasil Analisis Karakterisasi Nanopartikel Kitosan- Naringenin	48
4.5.1	Pembentukan kompleks kitosan-naringenin.....	48
4.5.2	Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel.....	51
4.5.3	Zeta potensial	54
4.5.4	Morfologi partikel.....	56
BAB 5. PENUTUP		60
3.1	Kesimpulan.....	60
3.2	Saran.....	60
DAFTAR PUSTAKA		61
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....		70

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur nanospere dan nanokapsul	8
2.2 Struktur kimia (a) kitin dan (b) kitosan.....	12
2.3 Proses deasetilasi kitin menjadi kitosan	13
2.4 Struktur kimia TPP.....	16
2.5 Struktur kimia tween 80	17
2.6 Struktur kimia naringenin.....	19
2.7 Skema proses gelasi ionik antara kitosan, TPP, dan tween 80	20
2.8 Interaksi ionik antara kitosan dan TPP (a) deprotonasi (b) ikatan silang.....	21
2.9 Contoh gambar hasil TEM dari nanopartikel kitosan/TPP-insulin.....	24
3.1 Skema langkah kerja penelitian	27
4.1 Nanopartikel kitosan-naringenin tiap formula.....	38
4.2 Pemindaian panjang gelombang maksimum naringenin.....	39
4.3 Kurva baku naringenin dalam etanol 96%	40
4.4 Profil kurva absorbansi nanopartikel kitosan-naringenin.....	41
4.5 <i>Contour plot</i> respon %EE.....	46
4.6 Spektrum FTIR kitosan murni	49
4.7 Spektrum FTIR TPP murni	49
4.8 Spektrum FTIR naringenin.....	50
4.9 Spektrum FTIR dari nanopartikel kitosan terisi naringenin	51
4.10 Hasil pengukuran ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel dari nanopartikel kitosan-naringenin menggunakan Delsa Nano	52
4.11 Hasil pengukuran zeta potensial dari nanopartikel kitosan-naringenin	55
4.12 Hasil analisis TEM nanopartikel kitosan-naringenin	57

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Susunan aras faktor berdasarkan desain faktorial	29
3.2 Rancangan percobaan berdasarkan desain faktorial	29
3.3 Susunan formula	30
4.1 Nilai % <i>entrapment efficiency</i> (%EE)	42
4.2 Hasil respon %EE yang digunakan pada desain faktorial	44
4.3 Nilai efek faktor pH dan konsentrasi TPP serta interaksi keduanya	45
4.4 Volume sedimentasi suspensi nanopartikel kitosan-naringenin	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. <i>Safety Data Sheet</i>	69
A.1 Naringenin	69
A.2 Kitosan	70
A.3 TPP	71
B. Hasil Penimbangan Bahan F(1), F(a), F(b), dan F(ab).....	72
C. Hasil Serapan dan Kadar Naringenin Bebas Nanopartikel.....	72
C.1 Tabulasi hasil serapan dan kadar naringenin bebas <i>batch</i> ke-1.....	72
C.2 Tabulasi hasil serapan dan kadar naringenin bebas <i>batch</i> ke-2.....	73
C.3 Tabulasi hasil serapan dan kadar naringenin bebas <i>batch</i> ke-3.....	73
C.4 Hasil scanning panjang gelombang maksimum naringenin	74
C.5 Hasil pengukuran serapan larutan naringenin dalam etanol 96% dalam satu seri pengenceran	74
C.6 Contoh perhitungan <i>entrapment efficiency</i> nanopartikel kitosan-naringenin	75
D. Hasil Evaluasi Volume Sedimentasi	76
D.1 Tabulasi tinggi endapan dan tinggi awal nanopartikel	76
D.2 Contoh perhitungan volume sedimentasi.....	76
E. Hasil Evaluasi Efek Faktor	76
E.1 Tabulasi efek faktor <i>batch</i> 1 dan perhitungannya.....	76
E.2 Tabulasi efek faktor <i>batch</i> 2 dan perhitungannya.....	77
E.3 Tabulasi efek faktor <i>batch</i> 3 dan perhitungannya.....	78
F. Hasil Pengujian dengan <i>Software Design Expert 9 trial</i>	78
F.1 Hasil uji anova <i>entrapment efficiency</i>	78
F.2 Hasil efek <i>half-NORMAL plot</i>	81
F.3 Hasil kriteria <i>entrapment efficiency</i> yang diinginkan.....	81

F.4 Hasil optimasi daerah formula optimum (<i>contour plot</i>) desirability	82
F.5 Hasil 3D <i>surface</i> EE.....	82
F.6 Hasil 3D <i>surface</i> desirability	83
F.7 Prediksi formula optimum	83
G. Hasil Karakterisasi Nanopartikel	84
G.1 Hasil pengukuran diameter nanopartikel kitosan-naringenin	84
G.2 Hasil pengukuran zeta potensial nanopartikel kitosan-naringenin.....	85
H. Hasil Validasi Metode Analisis	87
I. Dokumentasi Penelitian.....	88
I.1 Foto pembuatan nanopartikel kitosan-naringenin.....	88
I.2 Foto penentuan <i>entrapment efficiency</i> nanopartikel kitosan-naringenin.....	89
I.3 Foto karakterisasi nanopartikel kitosan-naringenin	89
I.4 Foto uji sedimentasi nanopartikel kitosan-naringenin	90

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Nanopartikel adalah dispersi partikel dengan ukuran 10-1000 nm (Mohanraj dan Chen, 2006). Nanopartikel berperan sebagai pembawa (*carrier*) dalam suatu sistem penghantaran obat. Obat yang ada di dalam nanopartikel akan terperangkap, terlarut, terenkapsulasi atau menempel pada matrik nanopartikel (Soppimath *et al.*, 2001).

Beberapa dekade terakhir ini penggunaan nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat mendapat perhatian yang sangat penting dan menarik untuk dikembangkan sebagai sistem penghantaran yang efektif. Nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat menawarkan banyak keuntungan. Pertama, nanopartikel mampu menembus pembuluh darah kapiler yang lebih kecil dan menghindari *clearence* dari tubuh sehingga durasinya dalam aliran darah semakin lama. Kedua, nanopartikel dapat menembus sel dan jaringan untuk sampai ke organ target seperti hati, limpa, paru-paru, dan sumsum tulang belakang. Ketiga, nanopartikel menunjukkan sifat pelepasan obat terkontrol. Keempat, nanopartikel dapat mengurangi efek samping dari obat (Emeje *et al.*, 2012). Kelima, permukaan nanopartikel dapat dikongjugasi dengan ligan untuk mencapai target penghantaran obat spesifik (Mohanraj dan Chen, 2006; Moghimi *et al.*, 2001).

Pembuatan nanopartikel dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain komposisi material dan metode yang digunakan. Komposisi material yang sesuai akan menghasilkan nanopartikel dengan morfologi yang seragam. Saat ini banyak metode yang dikembangkan untuk menghasilkan nanopartikel dengan ukuran kecil dan morfologi yang seragam (Wahyono, 2010). Menurut Mohanraj dan Chen (2006), ada tiga metode dalam pembuatan nanopartikel. Metode tersebut yaitu dispersi polimer, polimerisasi monomer, dan gelas ionik. Metode yang berkembang luas dan banyak digunakan adalah metode gelas ionik (Tiyaboonchai, 2003). Hal ini

dikarenakan metode gelasi ionik tidak menggunakan pelarut organik yang bersifat toksik (Racovita *et al.*, 2009) sehingga dalam penelitian ini dipilih metode gelasi ionik dalam pembuatan nanopartikel.

Menurut Fardiaz (1989) gelasi atau pembentukan gel merupakan gejala penggabungan atau pengikatan silang rantai-rantai polimer membentuk jaringan tiga dimensi yang sinambung satu sama lain. Pada metode gelasi ionik, mekanisme pembentukan nanopartikel kitosan didasarkan pada interaksi elektrostatis antara gugus positif amino kitosan dan gugus negatif dari polianion seperti tripolifosfat (Bodmeier *et al.*, 1989). Reaksi sambung silang kitosan dengan tripolifosfat secara ionik terjadi lebih banyak pada pH rendah dibandingkan pada pH tinggi. Pada pH rendah atau asam, tripolifosfat lebih banyak terionisasi dalam bentuk ion $-P_3O_{10}^{5-}$ dibandingkan bentuk ion $-OH^-$. Reaksi sambung silang secara ionik terjadi antara ion $-P_3O_{10}^{5-}$ dari tripolifosfat dengan ion $-NH_3^+$ dari kitosan (Ko *et al.*, 2002; Bhumkar dan Pokharkar, 2006).

Secara umum, nanopartikel dengan metode gelasi ionik dapat dibuat dengan komposisi material seperti polimer, *crosslinker*, dan surfaktan (Rachmania, 2011). Polimer yang biasanya digunakan adalah gelatin, amilum, kitosan, dan natrium alginat (Soppimath *et al.*, 2001). Kitosan dipilih sebagai polimer dalam pembuatan nanopartikel pada penelitian ini. Kitosan adalah polisakarida alami yang memiliki sifat nontoksik, biokompatibel, biodegradabel (Sugita *et al.*, 2010), dan polikationik dalam suasana asam (Sutriyo *et al.*, 2005). Kitosan juga bersifat nonimunogenik dan nonkarsinogenik sehingga cocok digunakan dalam teknologi farmasi (Hejazi dan Amiji, 2003). Kitosan dapat membentuk gel yang berfungsi sebagai matriks dalam penghantaran obat karena tautan silang kitosan-kitosan yang terjadi secara ionik. Kitosan memiliki keunikan tersendiri dari polisakarida lain, yaitu keberadaan gugus amino pada strukturnya yang mengakibatkan kitosan bersifat kationik dan mukoadesif serta memanjangkan waktu tinggal obat di dalam tubuh. Hal tersebut membuat pemanfaatan kitosan sangat baik sebagai penghantaran obat (Sutriyo *et al.*, 2005; Berger *et al.*, 2004).

Senyawa *crosslinker* yang digunakan untuk membuat nanopartikel dalam penelitian ini adalah tripolifosfat (TPP) yang berfungsi sebagai senyawa penaut-silang. TPP dianggap sebagai zat pengikat yang paling baik (Mohanraj dan Chen, 2006). Shu dan Zhu (2002) melaporkan bahwa penggunaan TPP untuk pembentukan gel kitosan dapat meningkatkan kekuatan mekanik dari gel yang terbentuk. Hal ini karena TPP memiliki rapat muatan negatif yang tinggi sehingga interaksi dengan polikationik kitosan akan lebih besar. Penelitian ini akan membuat nanopartikel kitosan yang terikat silang secara ionik dengan menggunakan zat pengikat silang polianion TPP.

Surfaktan yang banyak dipakai dalam pembuatan nanopartikel kitosan adalah surfaktan nonionik seperti tween 80 dan span 80. Penelitian ini menggunakan tween 80 sebagai surfaktan karena tween 80 memiliki nilai HLB yang lebih tinggi dibandingkan span 80 sehingga kemampuan tween 80 dalam menurunkan tegangan antarmuka lebih besar daripada span 80. Berdasarkan penelitian Silva *et al.* (2006) diketahui bahwa penambahan surfaktan dapat memperkecil ukuran partikel kitosan. Penggunaan tween 80 sebagai surfaktan berfungsi untuk menurunkan tegangan antarmuka sehingga dapat memperkecil ukuran partikel kitosan yang diharapkan sangat membantu dalam pembentukan partikel dalam skala nano.

Pembuatan nanopartikel kitosan dengan metode gelasi ionik dalam penelitian ini dilakukan dengan pengadukan magnetik stirer pada suhu kamar. Menurut hasil penelitian Rachmania (2011), dengan pengadukan magnetik stirer ukuran nanopartikel yang dihasilkan paling kecil dibandingkan dengan metode yang lain seperti metode *homogenizer* dan ultrasonik. Pengadukan magnetik stirer menyebabkan penyebaran energi cenderung merata sehingga seluruh molekul terkena energi yang sama dan molekul larutan suspensi akan terpecah dengan ukuran yang sama serta distribusi ukuran partikelnya cenderung lebih homogen. Hal ini menyebabkan nanopartikel di dalamnya juga akan dapat terpisah satu sama lain sehingga didapatkan partikel dengan ukuran nano. Menurut Wahyono (2010) proses homogenisasi antara kitosan, TPP, dan tween 80 melalui pengadukan magnetik stirer

dapat dikendalikan secara merata dengan kecepatan 1000 rpm sehingga lebih efektif menghasilkan nanopartikel dan dapat menghasilkan rendemen yang tinggi.

Naringenin digunakan sebagai bahan aktif yang akan di-*loading* dalam pembuatan nanopartikel kitosan. Naringenin merupakan senyawa flavonoid yang memiliki efek bioaktif bagi kesehatan manusia sebagai antioksidan, antiinflamasi, promotor metabolisme karbohidrat, dan modulator sistem imun (Felgines *et al.*, 2000). Naringenin juga memiliki aktivitas lain seperti antitrombotik (Corvazier dan Maclouf, 1985), antiestrogenik (Kao *et al.*, 1998), agen kemopreventif (Kafshgari dan Carroll, 1998), anti radikal bebas (Rodriguez *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002), efek hepatoprotektif (Lee *et al.*, 2004), dan antitumor (Kanno *et al.*, 2005). Naringenin karena merupakan senyawa golongan flavon dan memiliki gugus hidroksil yang banyak pada struktur kimianya menyebabkan naringenin memiliki aktivitas antioksidan.

Naringenin dengan banyak potensi biologis yang dapat dimanfaatkan bagi kesehatan manusia, memiliki kelemahan yaitu kelarutannya yang rendah menyebabkan absorpsinya ke dalam tubuh juga menurun. Absorpsi yang rendah ini akan menyebabkan bioavailabilitas naringenin dalam tubuh menjadi semakin berkurang sehingga efek biologis yang ditimbulkannya pun menjadi menurun. Hal ini membutuhkan pengembangan naringenin dalam bentuk yang dapat diformulasikan menjadi sediaan yang memiliki bioavailabilitas tinggi untuk terwujudnya efek terapeutik yang diharapkan. Salah satu cara untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan menyalut naringenin dalam bentuk nanopartikel sehingga bioavailabilitas naringenin dapat ditingkatkan. Hal yang serupa telah dilakukan oleh Stoica *et al.* (2013) yang menyalut polifenol dari tumbuhan *Rosa canina* dalam bentuk nanopartikel untuk meningkatkan stabilitasnya dalam jangka waktu yang lama.

Guna mendapatkan kondisi preparasi yang dapat menghasilkan partikel dalam skala nano dengan persentase *entrapment efficiency* yang optimum, maka dilakukan optimasi. Metode optimasi yang digunakan dalam penelitian adalah desain faktorial. Desain ini dipilih karena dapat digunakan untuk mengetahui terjadinya interaksi antar

faktor, dapat diketahui faktor dominan yang berpengaruh terhadap respon, dan semua kemungkinan kombinasi tiap aras dari faktor-faktor dapat diselidiki secara lengkap (Kurniawan dan Sulaiman, 2009; Voight, 1995).

Kajian pengaruh kondisi preparasi (pH TPP dan konsentrasi TPP) terhadap karakteristik nanopartikel yang terbentuk dapat dilakukan dengan desain faktorial. Tahap penelitian meliputi pembuatan nanopartikel kitosan-naringenin dengan variasi pH dan konsentrasi TPP, penentuan *entrapment efficiency*, penentuan formula optimum, *scale up* nanopartikel kitosan-naringenin, karakterisasi nanopartikel, dan analisis data. Karakterisasi nanopartikel yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi pembentukan kompleks kitosan-naringenin, ukuran partikel, distribusi ukuran partikel, indeks polidispersitas (PI), zeta potensial, dan morfologi partikel. Dari keseluruhan penelitian ini diharapkan dapat diperoleh formulasi nanopartikel kitosan optimum yang telah dikarakterisasi fungsinya sebagai sistem penghantaran naringenin.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas, perumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimanakah pengaruh pH dan konsentrasi TPP serta interaksi keduanya pada *entrapment efficiency* nanopartikel kitosan-naringenin?
2. Berapa komposisi optimum pH dan konsentrasi TPP pada formulasi nanopartikel kitosan-naringenin yang memiliki *entrapment efficiency* yang optimum?
3. Bagaimanakah karakteristik nanopartikel kitosan-naringenin yang memiliki *entrapment efficiency* optimum yang meliputi pembentukan kompleks kitosan-naringenin, ukuran partikel, distribusi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial, dan morfologi partikel?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh pH dan konsentrasi TPP serta interaksi keduanya pada *entrapment efficiency* nanopartikel kitosan-naringenin
2. Mengetahui komposisi optimum pH dan konsentrasi TPP pada formulasi nanopartikel kitosan-naringenin yang memiliki *entrapment efficiency* yang optimum
3. Mengetahui karakteristik nanopartikel kitosan-naringenin yang memiliki *entrapment efficiency* optimum yang meliputi pembentukan kompleks kitosan-naringenin, ukuran partikel, distribusi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial, dan morfologi partikel

1.4 Manfaat Penelitian

Pada akhir penelitian ini diharapkan akan diperoleh data ilmiah mengenai pengaruh pH dan konsentrasi TPP terhadap karakteristik nanopartikel kitosan-naringenin yang terbentuk sehingga dapat digunakan sebagai dasar pengembangan formulasi selanjutnya.

1.5 Batasan Penelitian

Batasan yang digunakan pada penelitian optimasi dan karakterisasi nanopartikel kitosan-naringenin dengan variasi pH dan konsentrasi natrium tripolifosfat adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan nanopartikel dalam penelitian ini menggunakan metode gelasi ionik dengan magnetik stirer kecepatan 1000 rpm.
2. Metode gelasi ionik dilakukan dengan proses pengadukan menggunakan magnetik stirer selama 1 jam pada suhu kamar.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Nanopartikel

2.1.1 Pengertian dan Perkembangan Nanopartikel

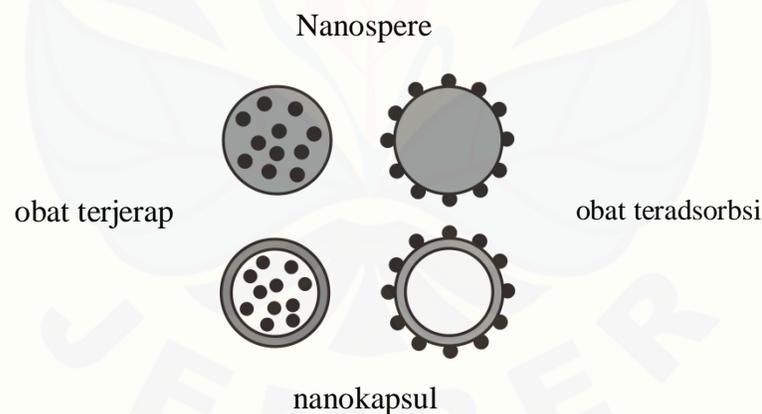
Nanopartikel adalah dispersi partikel dengan ukuran 10-1000 nm (Mohanraj dan Chen, 2006). Dalam sistem penghantaran obat, nanopartikel berperan sebagai pembawa (*carrier*) dimana obat di dalamnya terperangkap, terlarut, terenkapsulasi atau menempel pada matrik nanopartikel (Soppimath *et al.*, 2001).

Penggunaan nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat telah berkembang selama beberapa tahun terakhir ini. Sistem penghantaran obat dalam bentuk nanopartikel telah menunjukkan potensi yang sangat besar di bidang biologi, kesehatan, dan aplikasi kefarmasian. Saat ini banyak penelitian mengenai sistem penghantaran obat nanopartikel yang berfokus pada: (1) pemilihan dan kombinasi material pembawa untuk memperoleh kecepatan pelepasan obat yang sesuai; (2) modifikasi permukaan nanopartikel untuk meningkatkan kemampuan aksinya di organ target; (3) mengoptimalkan preparasi nanopartikel untuk meningkatkan kemampuannya dalam penghantaran obat; (4) penelitian mengenai proses dinamik *in vivo* untuk memperlihatkan interaksi nanopartikel dengan darah, jaringan target, dan organ (Emeje *et al.*, 2012).

Tujuan utama dalam merancang nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat adalah untuk mengontrol ukuran partikel, sifat permukaan, dan pelepasan zat aktif untuk mencapai sisi spesifik di dalam tubuh dalam laju optimal sesuai regimen dosis (Mohanraj dan Chen, 2006). Nanopartikel memiliki peranan yang penting dalam sistem penghantaran obat tertarget dan memiliki durasi yang lama di dalam tubuh serta dapat terperangkap obat di dalam matriknya. Dengan terperangkap di dalam nanopartikel, obat akan terlepas dengan dosis dan kecepatan yang tepat pada sisi spesifik di dalam tubuh selama waktu tertentu. Hal ini akan membuat efikasi terapeutik akan semakin meningkat dan efek samping/toksik akan semakin berkurang

(Sun *et al.*, 2003). Selain untuk penghantaran obat tertarget, sistem penghantaran nanopartikel juga dapat digunakan untuk meningkatkan bioavailabilitas per oral, memperpanjang efek obat pada jaringan target, melarutkan obat-obatan untuk penghantaran intravaskular, dan untuk meningkatkan stabilitas agen terapeutik terhadap degradasi enzim (Abdelwahed, 2006). Tiyaboonchai (2003) juga menyebutkan bahwa nanopartikel dapat dijadikan sebagai bahan pembantu yang baik untuk penghantaran vaksin.

Menurut Allemann *et al.* (1993), ada dua tipe nanopartikel yang tergantung dari proses preparasinya, yaitu nanospere dan nanokapsul. Perbedaannya terletak pada morfologi dan arsitekturnya. Nanospere memiliki struktur monolitik (matrik) polimer yang padat dan obat terdispersi atau teradsorpsi secara seragam pada permukaannya, sedangkan nanokapsul terdiri atas obat yang terperangkap dalam inti likuid (umumnya minyak) yang dikelilingi oleh membran polimer (Tiyaboonchai, 2003).



Gambar 2.1. Struktur nanospere dan nanokapsul (Tiyaboonchai, 2003)

Kebanyakan nanopartikel dibuat dari polimer yang tidak larut dalam air. Polimer tersebut harus dipanaskan atau dilarutkan dalam pelarut organik agar dapat larut sempurna. Hal ini akan menyebabkan ketidakstabilan obat yang ada di dalamnya. Beberapa metode preparasi seperti polimerisasi emulsi dan evaporasi

pelarut juga sangat sulit dilakukan dan membutuhkan waktu dan energi yang lebih lama dan besar. Sebaliknya, polimer yang larut dalam air menawarkan metode yang sangat sederhana dan ringan tanpa menggunakan pelarut organik (Tiyaboonchai, 2003).

Di antara banyak polimer larut air yang ada, kitosan merupakan polimer yang paling banyak diteliti. Ini dikarenakan kitosan memiliki beberapa sifat ideal sebagai polimer pembawa untuk nanopartikel, seperti biokompatibel, biodegradabel, nontoksik, dan murah. Kitosan juga memiliki muatan positif dan menunjukkan efek peningkatan absorpsi. Sifat-sifat ini membuat kitosan menjadi material yang menarik untuk dijadikan pembawa suatu penghantaran obat. Dua dekade terakhir ini, nanopartikel kitosan dikembangkan dan diselidiki secara luas untuk aplikasi di bidang kefarmasian (Tiyaboonchai, 2003). Wu *et al.* (2005) juga melaporkan bahwa nanopartikel dari bahan polimer yang biodegradabel dan biokompatibel seperti kitosan merupakan kandidat yang baik sebagai pembawa obat untuk sistem penghantaran karena nanopartikel akan terjerap secara utuh di dalam saluran pencernaan setelah masuk ke dalam tubuh.

2.1.2 Keuntungan dan Kerugian Nanopartikel

Nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat menawarkan banyak keuntungan yang diperoleh, yaitu: (1) nanopartikel mampu menembus pembuluh darah kapiler yang lebih kecil dan menghindari *clearence* dari tubuh sehingga durasinya dalam aliran darah semakin lama; (2) nanopartikel dapat menembus sel dan jaringan untuk sampai ke organ target seperti hati, limpa, paru-paru, dan sumsum tulang belakang; (3) nanopartikel menunjukkan sifat pelepasan obat terkontrol; (4) nanopartikel dapat mengurangi efek samping dari obat (Emeje *et al.*, 2012); (5) permukaan nanopartikel dapat dikonjugasi dengan ligan untuk mencapai target penghantaran obat spesifik (Moghimi *et al.*, 2001); (6) ukuran partikel dan karakteristik permukaan nanopartikel dapat dengan mudah dimanipulasi sesuai dengan target pengobatan; (7) nanopartikel mengatur dan memperpanjang pelepasan

obat selama proses perjalanan obat ke sasaran; (8) obat dapat dimasukkan ke dalam sistem nanopartikel tanpa reaksi kimia; (9) sistem nanopartikel dapat diterapkan untuk berbagai rute administrasi seperti oral, nasal, parenteral, dan intra-okular (Mohanraj dan Chen, 2006).

Walaupun memiliki banyak keuntungan, nanopartikel juga memiliki beberapa keterbatasan. Contohnya, ukuran nanopartikel yang sangat kecil dan luas permukaannya yang besar dapat menyebabkan antar partikel saling beragregasi, sehingga hal ini membuat penanganan nanopartikel dalam bentuk likuid dan kering menjadi sulit. Ukuran partikel yang kecil dan area permukaan yang luas juga menyebabkan obat ter-*loading* dalam jumlah yang terbatas dan terjadinya *burst release*. Abdelwahed (2006) menyebutkan bahwa halangan yang membatasi penggunaan nanopartikel adalah ketidakstabilan fisika (agregasi/penggabungan partikel) dan ketidakstabilan kimia (hidrolisis polimer, kebocoran obat pada sistem nanopartikel, dan reaktivitas kimia obat selama penyimpanan). Masalah praktis ini harus diatasi terlebih dahulu sebelum nanopartikel digunakan secara klinis. Solusi yang dapat diberikan untuk mengatasi hal ini adalah dengan modifikasi permukaan, strategi *loading* obat, dan pelepasan terkontrol (Mohanraj dan Chen, 2006).

2.1.3 Metode Pembuatan Nanopartikel

Pemilihan metode pembuatan nanopartikel tergantung pada bahan awal yang akan digunakan serta karakteristik kelarutan dari bahan obatnya. Nanopartikel dapat dibuat dari berbagai macam bahan, seperti protein, polisakarida, dan polimer sintetik. Pemilihan bahan awal bergantung pada beberapa faktor, yaitu biokompatibilitasnya, sifat degradasinya, pemilihan rute pemberian, profil pelepasan yang diinginkan, tipe aplikasi biomedisnya (Vidyavathi *et al.*, 2011), ukuran nanopartikel yang diinginkan, sifat obat yang akan di-*loading*, karakteristik permukaan seperti muatan dan permeabilitasnya, derajat biodegradabilitas, dan toksisitasnya (Mohanraj dan Chen, 2006).

Menurut Mohanraj dan Chen (2006), kebanyakan nanopartikel dibuat dengan tiga metode, yaitu dispersi polimer, polimerisasi monomer, dan gelasi ionik, namun demikian metode lain seperti *supercritical fluid technology* juga disebutkan dalam literatur untuk produksi nanopartikel (Reverchon dan Adami, 2006).

Dispersi polimer merupakan teknik umum yang digunakan untuk membuat nanopartikel biodegradabel dari PLA (*poly-lactic acid*), PLG (*poly-D,Lglycolide*), PLGA (*poly-D,L-lactide-co-glycolide*), dan PCA (*poly-cyanoacrylate*). Teknik dispersi polimer ini dapat digunakan dalam berbagai cara, antara lain metode evaporasi pelarut dan metode difusi pelarut. Dalam metode evaporasi pelarut, polimer dan obat masing-masing dilarutkan dalam pelarut organik, seperti diklorometana, kloroform, atau etil asetat. Campuran larutan polimer dan obat tersebut kemudian diemulsifikasi dalam larutan yang mengandung surfaktan untuk membentuk emulsi minyak dalam air (o/w). Setelah emulsi yang terbentuk stabil, pelarut organik kemudian diuapkan (Zambaux *et al.*, 1998).

Pada metode polimerisasi, monomer dipolimerisasi untuk membentuk nanopartikel dalam larutan. Suspensi nanopartikel selanjutnya dipisahkan dari penstabil dan surfaktan yang digunakan dengan ultrasentrifugasi dan partikel disuspensikan kembali dalam medium surfaktan yang isotonis (Zhang *et al.*, 2001).

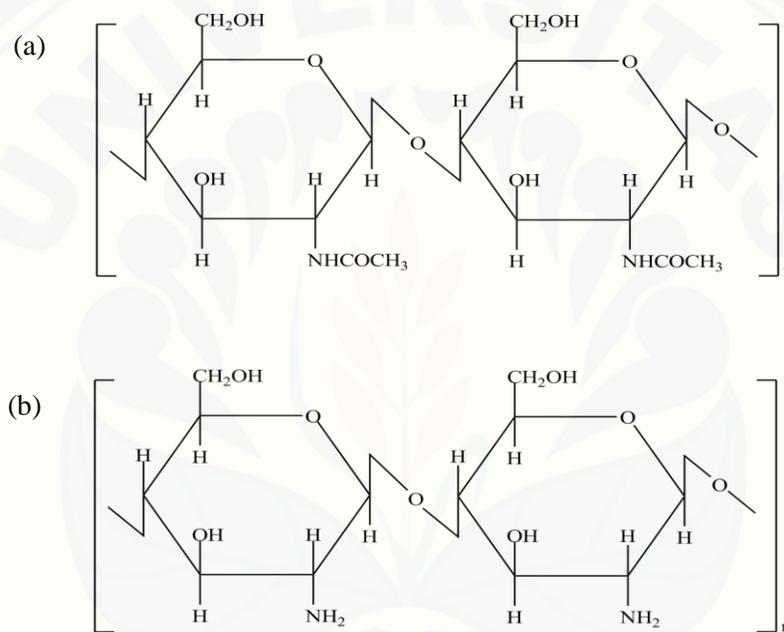
Metode lain yang dapat digunakan adalah metode gelasi ionik. Metode ini berkembang luas dan banyak digunakan (Tiyaboonchai, 2003). Hal ini dikarenakan metode gelasi ionik sangat sederhana dan mudah dilakukan dibanding dengan metode lainnya (Racovita *et al.*, 2009). Dalam metode ini, muatan positif pada gugus amino kitosan berinteraksi dengan muatan negatif TPP untuk membentuk partikel dalam ukuran nanometer (Mohanraj dan Chen, 2006).

2.2 Kitosan

2.2.1 Sumber dan Sintesis Kitosan

Kitosan merupakan polisakarida alam kedua yang melimpah di muka bumi setelah selulosa (Liu *et al.*, 2012). Kitosan adalah polimer karbohidrat alami yang

termodifikasi yang dibuat dari N-deasetilasi parsial kitin, suatu biopolimer alami yang berasal dari kulit kepiting, udang, lobster, dan cumi-cumi (Yi *et al.*, 2005). Kitosan juga ditemukan pada beberapa mikroorganisme, seperti ragi dan jamur (Illum, 1998). Unit utama polimer kitin adalah *2-deoxy-2-(acetylamino) glucosa*. Unit ini dikombinasikan dengan ikatan β -(1,4) glikosidik membentuk polimer linier rantai panjang (Tiyaboonchai, 2003). Struktur kimia dari kitin dan kitosan dapat dilihat pada gambar 2.2.



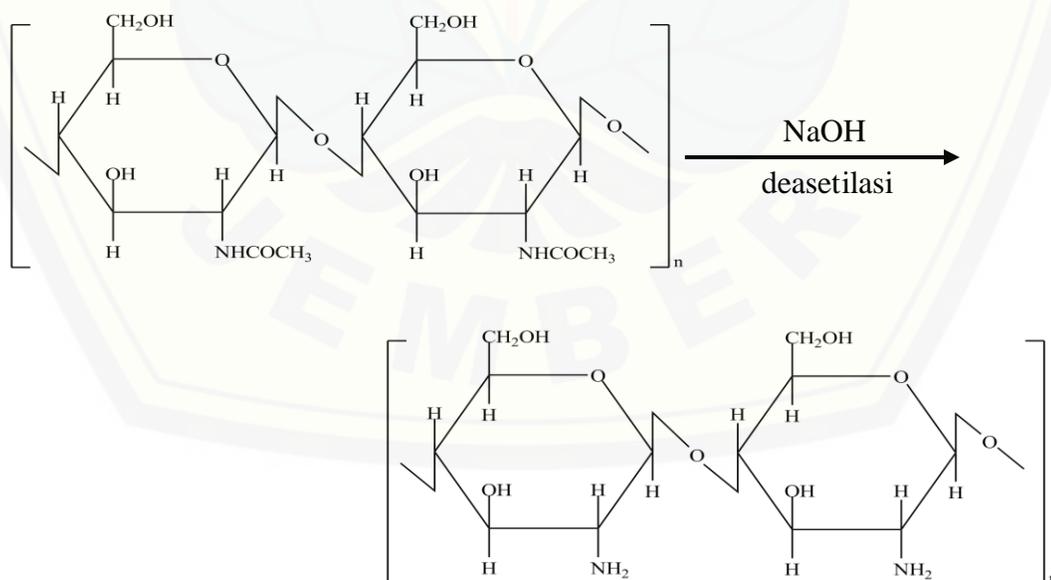
Gambar 2.2. Struktur kimia (a) kitin dan (b) kitosan (Kumar, 2000)

Kitosan dengan rumus molekul $(C_6H_{11}NO_4)_n$ merupakan sumber bahan alami hasil dari buangan produk pengalengan kepiting dan udang oleh industri makanan. Kitosan juga berasal dari hasil buangan dari kerang, kijing, cumi-cumi, tiram, dan fungi yang selanjutnya mengalami proses pengolahan. Proses pengolahan kitosan yang berasal dari bahan-bahan di atas, melibatkan proses penghilangan protein dan pemutusan kalsium karbonat yang ada pada kulit kepiting atau udang (Dutta *et al.*, 2004).

Ada empat proses utama yang dilakukan dalam memproduksi kitosan dari kulit kepiting/udang, yaitu proses deproteinasi, demineralisasi, penghilangan warna/pemucatan, dan deasetilasi. Kitosan didapatkan dari kitin melalui proses yang disebut dengan deasetilasi. Adapun kitin dengan rumus molekul $(C_8H_{13}NO_5)_n$ diperoleh dengan proses deproteinasi dan demineralisasi. Proses demineralisasi adalah proses penghilangan mineral yang dikandung kulit kepiting/udang dalam larutan asam klorida (HCl).

Setelah melalui proses demineralisasi dilanjutkan dengan tahap deproteinasi, yaitu proses penghilangan protein dalam larutan natrium hidroksida (NaOH) dan selanjutnya dilakukan pemucatan dalam kalium permanganat ($KMnO_4$). Pada tahap ini terbentuk kitin.

Tahap terakhir adalah proses deasetilasi yaitu penghilangan gugus asetil ($-COCH_3$) dari kitin melalui proses perebusan dalam natrium hidroksida pekat. Setiap tahap selalu diikuti dengan proses pencucian dengan menggunakan akuades atau air bersih sampai netral (Suptijah *et al.*, 1992). Proses deasetilasi kitin menjadi kitosan dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3. Proses deasetilasi kitin menjadi kitosan (Kumar, 2000)

Derajat deasetilasi dari kitosan menentukan banyaknya gugus asetil yang telah hilang selama proses deasetilasi kitin menjadi kitosan. Semakin besar derajat deasetilasi, maka kitosan akan semakin aktif karena semakin banyak gugus amina menggantikan gugus asetil. Gugus amina lebih reaktif dibandingkan gugus asetil karena adanya pasangan elektron bebas pada atom nitrogen dalam struktur kitosan (Muzzarelli, 1997). Hal ini membuat derajat deasetilasi menjadi karakter yang penting dalam produksi kitosan karena dapat berpengaruh pada sifat fisika kimia kitosan yang ditimbulkan. Menurut Goycoolea *et al.* (2002) derajat deasetilasi dari kitosan dapat mempengaruhi ukuran dari nanopartikel yang terbentuk dan zeta potensial yang dihasilkan. Nanopartikel yang dibuat dengan derajat deasetilasi kitosan yang tinggi, cenderung memiliki ukuran partikel yang lebih besar dan zeta potensial yang menjauhi (+/-) 30 mV, sedangkan nanopartikel yang dibuat dengan derajat deasetilasi kitosan yang rendah, cenderung memiliki ukuran partikel yang lebih kecil dan zeta potensial yang mendekati (+/-) 30 mV. Derajat deasetilasi kitosan berkisar antara 56% hingga 99% dengan rata-rata biasanya 80%, bergantung pada sumber dan metode pembuatannya. Kitin dengan derajat deasetilasi 75% atau lebih besar di atasnya dikenal dengan nama kitosan.

2.2.2 Sifat Fisika Kimia Kitosan

Kitosan merupakan polisakarida alami yang banyak digunakan untuk sistem penghantaran obat farmasetik karena sifatnya yang menguntungkan seperti biokompatibel, nontoksik, biodegradabel, dan kemampuannya membentuk gel (Can *et al.*, 2013). Kitosan memiliki rumus molekul $(C_6H_{11}NO_4)_n$ dan merupakan salah satu dari sedikit polimer alam yang berbentuk polielektrolit kationik dalam larutan asam organik. Kitosan memiliki sifat tidak berbau, berwarna putih dan terdiri dari dua jenis polimer yaitu poli (2-deoksi,2-asetilamin,2-glukosa) dan poli(2-deoksi,2-amino glukosa) yang berikatan secara beta (1,4). Kitosan larut dalam pelarut organik, HCl encer, HNO₃ encer, CH₃COOH encer, HCOOH encer, dan H₃PO₄ 0,5%, tetapi tidak larut dalam basa kuat dan H₂SO₄. Sifat kelarutan kitosan ini dipengaruhi oleh

berat molekul dan derajat deasetilasi. Berat molekul kitosan beragam, bergantung pada degradasi yang terjadi selama proses deasetilasi (Sugita *et al.*, 2010). Kitosan tersedia dalam variasi berat molekul dan derajat deasetilasi yang luas. Berat molekul dan derajat deasetilasi merupakan faktor utama yang mempengaruhi ukuran partikel, pembentukan partikel, dan agregasi (Tiyaboonchai, 2003).

2.2.3 Aplikasi Kitosan

Saat ini kitosan telah diaplikasikan secara luas. Kitosan telah menjadi biopolimer yang serbaguna dan aplikasi potensialnya sekarang banyak diteliti dan dikembangkan. Sebagai contoh, kitosan memiliki potensi sebagai antimikrobal, *emulsifying agent*, pengental, dan penstabil dalam berbagai kebutuhan. Kitosan juga menunjukkan bioaktivitas dalam bidang biomedis, mencakup peningkatan penyembuhan luka, antifungi, antitumor, peningkatan sistem imun, dan aktivitas hipolipidemia serta hemostastik (Liu *et al.*, 2012).

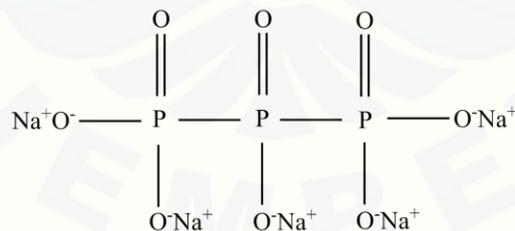
Valenta dan Auner (2004) menyatakan bahwa kitosan dapat meningkatkan permeabilitas paraseluler membran mukosa dengan membuka *tight junctions* dan dengan cara demikian meningkatkan penetrasi senyawa obat. Penelitian lain menyebutkan bahwa kitosan digunakan sebagai biopolimer untuk mengontrol laju pelepasan obat dalam sistem penghantaran transdermal dan sifat bioadesif kitosan memiliki peranan yang besar pada aplikasi transdermal. Kumar dan Babu (2011) juga berpendapat bahwa kitosan dipilih sebagai polimer dalam preparasi mikrosfer mukoadesif karena kitosan memiliki sifat mukoadesif dan biodegradabel yang baik. Polimer alami seperti kitosan ini digunakan untuk mengembangkan sistem penghantaran obat untuk memperangkap obat dan menghantarkan obat secara per oral.

2.3 Natrium Tripolifosfat

Natrium Tripolifosfat (Na-TPP/TPP) dengan rumus kimia $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ adalah garam nontoksik yang diperoleh dari kondensasi rangkap tiga dari kelompok PO_4 .

TPP berbentuk granul berwarna putih dengan berat molekul 367,86 g/mol dan memiliki sifat tidak berbau, larut dalam air, titik lebur 622⁰C, dan higroskopis. TPP merupakan pengawet untuk makanan laut, daging, dan makanan hewan. Dalam bidang makanan, TPP digunakan sebagai emulsifier dan untuk memelihara kelembaban. Dalam aplikasi nanopartikel, TPP berperan sebagai zat pengikat silang untuk meningkatkan interaksi (ikatan silang) ionik antara gugus amino kitosan dan gugus anionik TPP (Aral dan Akugba, 1998).

TPP dianggap sebagai zat pengikat silang yang paling baik. TPP lebih disukai dan banyak digunakan karena sifatnya yang tidak toksik dibandingkan dengan zat pengikat silang yang lain. Shu dan Zhu (2002) melaporkan bahwa penggunaan TPP untuk pembentukan gel kitosan dapat meningkatkan sifat mekanik dari gel yang terbentuk. Hal ini karena TPP memiliki rapat muatan negatif yang tinggi sehingga interaksi dengan polikationik kitosan akan lebih besar. Peran TPP sebagai zat pengikat silang akan memperkuat matriks nanopartikel kitosan. Semakin banyak ikatan silang yang terbentuk antara kitosan dan TPP maka kekuatan mekanik matriks kitosan akan meningkat sehingga partikel kitosan menjadi semakin kuat dan keras, serta semakin sulit untuk terpecah menjadi bagian-bagian yang lebih kecil (Wahyono, 2010). Struktur kimia dari TPP dapat dilihat pada gambar 2.4.



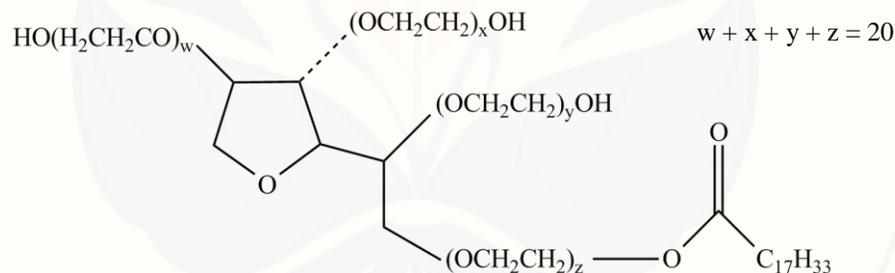
Gambar 2.4. Struktur kimia TPP (Calvo *et al.*, 1997)

Beberapa penelitian telah berhasil membuat nanopartikel kitosan dengan zat pengikat silang TPP, diantaranya Xu dan Du (2003) berhasil membuat nanopartikel kitosan berukuran 20–200 nm dengan menggunakan konsentrasi kitosan 1,5 mg/ml dan konsentrasi TPP 0,7 mg/ml. Wu *et al.* (2005) juga berhasil membuat nanopartikel

kitosan berukuran 20–80 nm dengan menggunakan konsentrasi kitosan 1,44 mg/ml dan konsentrasi TPP 0,6 mg/ml. Nanopartikel kitosan terisi ketoprofen berhasil dibuat oleh Wahyono (2010) dengan mencampurkan larutan kitosan konsentrasi 2,50–3,50% (b/v) dan TPP 0,84–1,50 mg/ml.

2.4 Tween 80

Surfaktan yang banyak dipakai dalam pembuatan nanopartikel kitosan adalah surfaktan nonionik hidrofilik seperti tween 80 (polietilena sorbitan monooleat). Tween 80 memiliki karakteristik bau yang khas, rasa sedikit pahit, berwarna kuning dalam bentuk cairan berminyak, larut dalam etanol dan air, serta memiliki nilai HLB 15. Secara umum tween 80 di bidang kefarmasian berfungsi sebagai *emulsifying agent*, *solubilizing agent*, dan *wetting agent*. Tween 80 juga digunakan secara luas dalam bidang kosmetik dan produk makanan (Rowe *et al.*, 2009). Struktur kimia dari tween 80 dapat dilihat pada gambar 2.5.



Gambar 2.5. Struktur kimia tween 80 (Tejwani *et al.*, 2000)

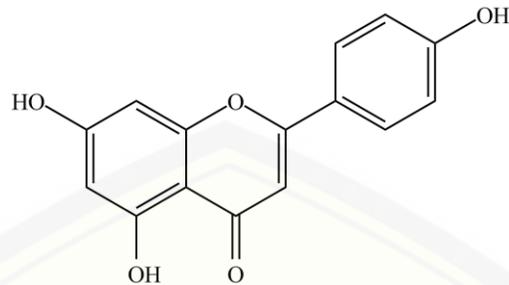
Berdasarkan penelitian Silva *et al.* (2006) diketahui bahwa penambahan surfaktan dapat memperkecil ukuran partikel kitosan. Tween 80 adalah agen penstabil yang diadsorpsi pada permukaan nanopartikel. Tween 80 membuat nanopartikel yang terbentuk akan memiliki ukuran yang lebih kecil dan bentuk sferis. Pada proses nanoenkapsulasi, surfaktan (tween 80) berperan menurunkan tegangan antarmuka sehingga partikel-partikel berukuran besar akan terpecah menjadi lebih kecil dan didapatkan lebih banyak partikel berukuran nano (Jazuli, 2011). Tween 80 juga

berfungsi sebagai molekul yang diadsorpsi oleh permukaan partikel untuk mencegah terjadinya gumpalan (Sugita *et al.*, 2010). Semakin meningkatnya konsentrasi tween 80, maka ukuran partikel yang terbentuk juga semakin kecil. Konsentrasi tween 80 yang semakin tinggi akan mereduksi energi bebas permukaan pada perluasan yang besar dan oleh karena itu stabilitas partikel yang lebih kecil akan terbentuk (Rajaram dan Natham, 2013).

2.5 Naringenin

Naringenin merupakan senyawa flavonoid yang memiliki efek bioaktif bagi kesehatan manusia, yaitu sebagai antioksidan, antiinflamasi, promotor metabolisme karbohidrat, dan modulator sistem imun (Felgines *et al.*, 2000). Naringenin juga memiliki aktivitas lain seperti antitrombotik (Corvazier dan Maclouf, 1985), antiestrogenik (Kao *et al.*, 1998), agen kemopreventif (Guthrie dan Carroll, 1998), anti radikal bebas (Rodriguez *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002), efek hepatoprotektif (Lee *et al.*, 2004), dan antitumor (Kanno *et al.*, 2005).

Nama kimia naringenin adalah *2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on* dan memiliki berat molekul 272,26 g/mol ($C_{15}H_{12}O_5$). Naringenin berbentuk serbuk yang berwarna kuning muda dan hampir tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik seperti alkohol. Naringenin memiliki titik lebur 247-250°C. Naringenin diturunkan dari proses hidrolisis bentuk glikon dari flavon naringin. Tidak seperti aglikon naringenin, naringin relatif lebih larut dalam air (1 mg/ml air pada suhu 40°C) (Wilcox *et al.*, 1999). Naringenin karena merupakan senyawa golongan flavon dan memiliki gugus hidroksil yang banyak pada struktur kimianya, menyebabkan naringenin memiliki aktivitas antioksidan. Naringenin merupakan senyawa aglikon yang terdistribusi luas dalam buah jeruk, tomat, *cherri*, jeruk bali, anggur dan coklat (Jain *et al.*, 2010). Struktur kimia dari naringenin dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6. Struktur kimia naringenin (Jain *et al.*, 2010)

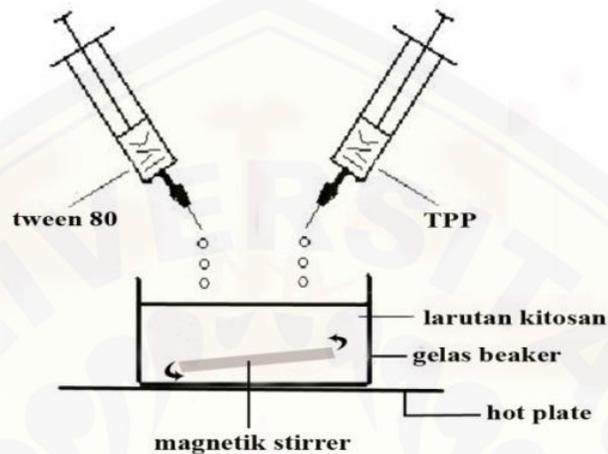
2.6 Gelasi Ionik

Gelasi atau pembentukan gel merupakan penggabungan atau pengikatan silang rantai-rantai polimer membentuk jaringan tiga dimensi yang sinambung dan dapat memerangkap air di dalamnya menjadi suatu struktur yang kompak dan kaku (Fardiaz, 1989). Gelasi ionik didasarkan pada kemampuan makromolekul untuk bertaut silang dengan adanya ion yang bermuatan berlawanan untuk membentuk hidrogel (Adiningsih, 2012).

Metode yang paling umum dalam pembuatan nanopartikel melalui proses gelasi ionik yaitu metode magnetik stirer, *homogenizer*, dan ultrasonik. Banyak penelitian difokuskan untuk membuat nanopartikel dari polimer yang biodegradabel seperti kitosan, gelatin, dan sodium alginat (Rachmania, 2011). Salah satu contoh penerapan metode gelasi ionik ini adalah pembuatan nanopartikel kitosan dengan cara mencampurkan polimer kitosan dengan polianion TPP yang menghasilkan interaksi antara muatan positif pada gugus amino kitosan dengan muatan TPP.

Proses pembuatan nanopartikel kitosan dengan metode gelasi ionik pertama kali dilaporkan oleh Calvo *et al.* (1997). Mekanisme pembentukan nanopartikel dengan metode ini didasarkan pada interaksi elektrostastik antara gugus amino kitosan dengan muatan negatif dari gugus polianion TPP (Bodmeier *et al.*, 1989). Teknik ini menawarkan metode pembuatan yang sederhana dan mudah. Pertama, kitosan dilarutkan dalam asam asetat terlebih dahulu dan setelah larut kemudian ditambahkan surfaktan dan TPP ke dalamnya. Nanopartikel akan terbentuk secara spontan di

bawah pengadukan stirer pada suhu ruang (Tiyaboonchai, 2003). Proses gelasi ionik antara kitosan, TPP, dan tween 80 dapat dilihat pada gambar 2.7.

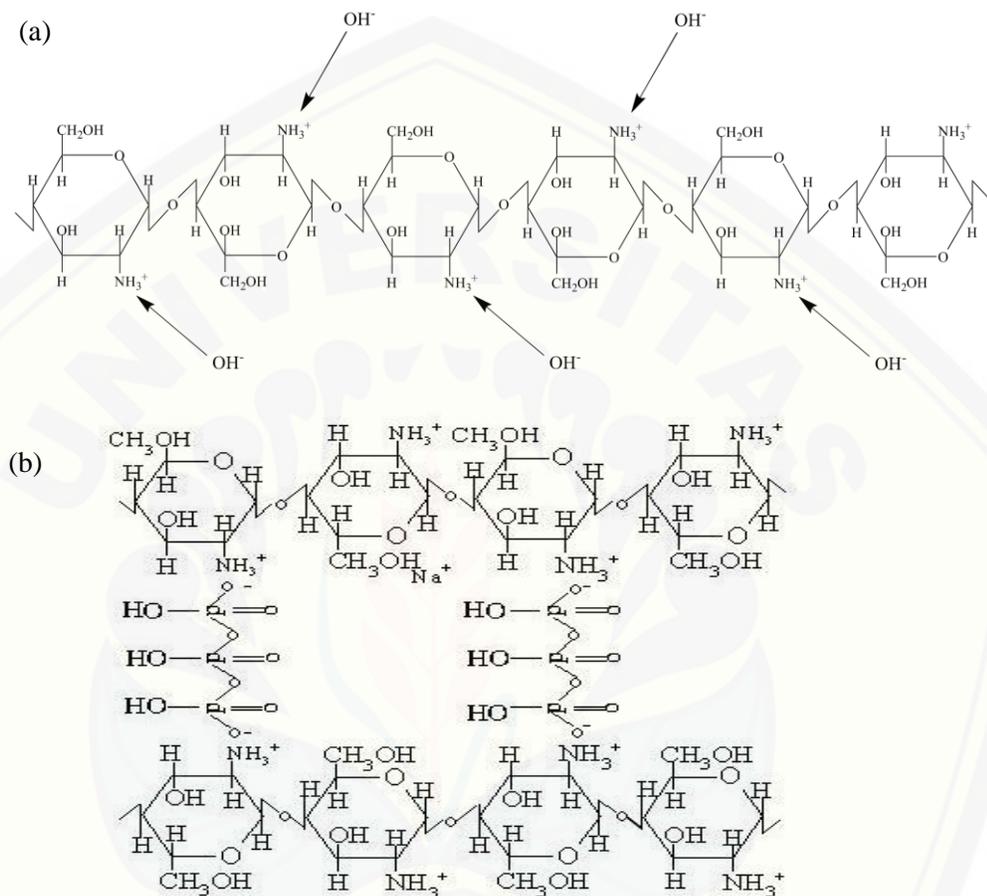


Gambar 2.7. Skema proses gelasi ionik antara kitosan, TPP, dan tween 80 (Racovita *et al.*, 2009)

Penelitian Wu *et al.* (2005) menunjukkan bahwa pembentukan nanopartikel dengan metode gelasi ionik hanya terjadi pada konsentrasi kitosan dan TPP tertentu. Nanopartikel dengan hasil rendemen yang tinggi didapatkan dengan perbandingan berat/massa antara kitosan dan TPP dalam rentang 4:1 – 6:1. Penelitian Grenha *et al.* (2005) menunjukkan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi kitosan yang digunakan, semakin besar pula ukuran partikel yang terbentuk. Studi Tsai *et al.* (2008) memperlihatkan bahwa ukuran partikel kitosan-TPP yang dibuat dengan metode gelasi ionik dipengaruhi oleh penggunaan energi mekanik yang berbeda, waktu perlakuan yang berbeda, konsentrasi kitosan yang berbeda, dan suhu larutan yang berbeda.

Larutan kitosan direaksikan dengan larutan tween 80 dan larutan TPP di bawah pengadukan konstan magnetik stirer pada suhu kamar. Pada metode gelasi ionik ini, mekanisme pembentukan nanopartikel kitosan didasarkan pada interaksi elektrostatik antara gugus positif amino kitosan ($-\text{NH}_3^+$) dan gugus negatif TPP ($-$

$P_3O_{10}^{5-}$) yang akhirnya secara spontan membentuk nanopartikel (Bodmeier *et al.*, 1989) seperti pada gambar 2.8.



Gambar 2.8. Interaksi ionik antara kitosan dan TPP (a) deprotonasi (b) ikatan silang (Longmi *et al.*, 1999)

2.7 Entrapment Efficiency

Entrapment efficiency digunakan untuk menentukan rasio antara kandungan *loading* bahan aktif yang terperangkap dalam nanopartikel dengan total bahan aktif yang digunakan dalam formulasi (Chabib *et al.*, 2012). Penentuan *entrapment efficiency* (% EE) nanopartikel untuk bahan aktif yang memiliki gugus kromofor dapat dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometer UV (Ramachandran *et al.*, 2011). Banyak faktor yang berpengaruh terhadap *entrapment efficiency*, yaitu

sifat alami bahan aktif, konsentrasi kitosan, rasio polimer obat, dan kecepatan pengadukan. Secara umum konsentrasi kitosan yang semakin rendah menunjukkan *entrapment efficiency* yang rendah juga namun jika konsentrasi kitosan semakin tinggi, maka akan terbentuk larutan dengan viskositas tinggi dan proses preparasinya juga semakin sulit (Orienti *et al.*, 1996). Nilai *entrapment efficiency* yang dinyatakan baik adalah yang nilainya lebih besar dari 50% (Ibezim *et al.*, 2011; Kafshgari *et al.*, 2010).

2.8 Karakterisasi nanopartikel

2.8.1 Pembentukan Kompleks Kitosan-Naringenin

Analisis kompleks kitosan-naringenin dianalisis dengan menggunakan spektrometer *infrared* (IR). Pemeriksaan nanopartikel dengan menggunakan spektrometer *infrared* dilakukan untuk melihat terbentuknya ikatan sambung silang antara kitosan dengan TPP yang menandakan bahwa proses pembentukan nanopartikel telah terjadi (Rijal *et al.*, 2010). Analisis dilakukan dengan metode KBr dimana naringenin, kitosan, dan nanopartikel kitosan-naringenin dibuat pelet dengan KBr kemudian dianalisis dalam spektrometer *infrared*. FTIR (*Fourier Transform Infrared*) merupakan metode analisis dengan memanfaatkan spektroskopi sinar *infrared* yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi kandungan gugus kompleks pada senyawa dengan melihat ikatan-ikatan yang dihasilkan. Radiasi *infrared* pada FTIR ditembakkan pada sampel. Sebagian dari radiasi *infrared* diserap oleh sampel dan sebagian lainnya diteruskan. Frekuensi dari suatu vibrasi akan menentukan spektrum yang dihasilkan dengan penggambaran transmitan. Dari spektrum ini dapat dilihat ikatan-ikatan apa saja yang berubah maupun yang dihasilkan dari sampel (Wahyono, 2010). Pada spektra kitosan, ikatan N-H muncul pada bilangan gelombang 3500-3300 cm^{-1} , ikatan C=O pada 1600-1650 cm^{-1} , ikatan C-O-C pada 1150 cm^{-1} , dan ikatan C-N pada 1317 cm^{-1} . Pada spektra TPP, muncul ikatan P=O pada bilangan gelombang 1170 cm^{-1} dan ikatan silang antara gugus $-\text{NH}_3^+$ kitosan dan gugus fosfat TPP muncul pada bilangan gelombang 1655 cm^{-1} (Dounighi *et al.*,

2012; Ibezim *et al.*, 2011). Kompleks yang terbentuk antara kitosan, TPP, dan naringenin dalam nanopartikel ditandai dengan terjadinya penurunan puncak pada bilangan gelombang yang sama (Dhanasingh dan Nallaperumal, 2010; Ibezim *et al.*, 2011).

2.8.2 Ukuran partikel dan Distribusi Ukuran Partikel

Ukuran dan distribusi nanopartikel diukur dengan menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*). PSA merupakan instrumen yang menggunakan *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS) untuk analisis ukuran dan distribusi ukuran nanopartikel yang dihasilkan. Parameter yang dianalisis meliputi diameter partikel rata-rata dan indeks polidispersitas (PI). Diameter partikel rata-rata yang baik berada dalam rentang skala nano (10-1000 nm) dan indeks polidispersitas yang baik nilainya lebih kecil dari 0,7 yang menyatakan sampel dengan partikel yang monodispersi (Nidhin *et al.*, 2008). Ukuran partikel sering digunakan untuk mengkarakterisasi nanopartikel karena dapat digunakan untuk mengetahui dispersi dan agregasi. Mohanraj dan Chen (2006) menyebutkan bahwa ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel adalah karakteristik yang paling penting dari sistem nanopartikel. Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel menentukan distribusi *in vivo*, toksisitas, kemampuan *targetting* sistem nanopartikel, dan dapat mempengaruhi *loading* obat, pelepasan obat, serta stabilitas nanopartikel. Sampel yang digunakan untuk pengukuran PCS harus terdiri dari fase dispersi dalam medium pensuspensi. Jika sampel nampak seperti susu, berarti konsentrasinya terlalu tinggi sehingga perlu diencerkan. Sampel harus diencerkan dengan menggunakan akuabides untuk analisis ukuran dan muatan (Kishore *et al.*, 2011).

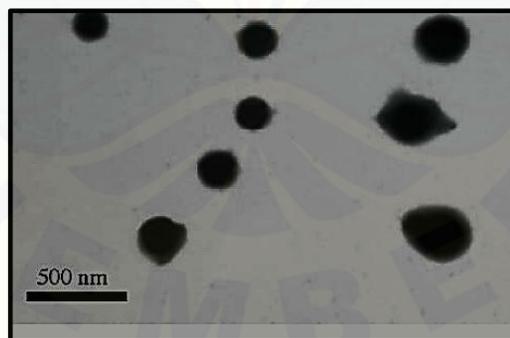
2.8.3 Zeta Potensial

Zeta potensial dari nanopartikel secara umum digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan nanopartikel (Couvreur *et al.*, 2002). Zeta potensial dianalisis dengan menggunakan *Zeta Potential Analyzer*. Zeta potensial

merefleksikan potensi elektrik partikel dan dipengaruhi oleh komposisi partikel dan medium tempat nanopartikel tersebut didispersikan. Nanopartikel dengan zeta potensial (+/-) 30 mV menunjukkan bentuk yang stabil dalam suspensi karena muatan permukaan tersebut mencegah terjadinya agregasi partikel. Zeta potensial juga dapat digunakan untuk menentukan apakah muatan material aktif terenkapsulasi di tengah-tengah nanokapsul atau diadsorpsi di permukaannya saja (Mohanraj dan Chen, 2006).

2.8.4 Morfologi Partikel

Morfologi nanopartikel dan estimasi ukuran nanopartikel dievaluasi dengan TEM (*Transmission Electron Microscopy*). TEM adalah teknik mikroskop dimana elektron ditransmisikan melalui spesimen ultra tipis, berinteraksi dengan spesimen dan dilewatkan. Gambar terbentuk dari interaksi antara transmisi elektron melewati spesimen dan menghasilkan sebuah gambar di atas layar fluoresen. Gambar dilihat sebagai sebuah proyeksi dari spesimen. Analisis TEM dapat melihat perbesaran dengan resolusi tinggi diatas 500000 kali (Wahyono, 2010). Contoh hasil TEM dari nanopartikel dapat dilihat pada gambar 2.9.



Gambar 2.9. Contoh gambar hasil TEM dari nanopartikel kitosan/TPP-insulin (Grenha *et al.*, 2005)

Evaluasi morfologi partikel dengan menggunakan analisis TEM ini ditujukan untuk mengidentifikasi morfologi permukaan, bentuk, dan mikrostruktur nanopartikel yang terbentuk. Bentuk dan kondisi permukaan nanopartikel penting untuk diketahui

karena dapat memberikan informasi mengenai sifat pelepasan obat (Gupta dan Kompella, 2006). Bentuk nanopartikel juga sangat berpengaruh pada efisiensi transfeksi. 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. Morfologi partikel yang diharapkan adalah memiliki struktur permukaan yang sferis (Chithrani dan Chan, 2007).

2.9 Desain Faktorial

Desain faktorial merupakan aplikasi persamaan regresi yaitu teknik untuk memberikan model hubungan antara variabel respon dengan satu atau lebih variabel bebas. Metode ini digunakan dalam percobaan untuk menentukan secara simulasi efek dari beberapa faktor dan interaksinya yang signifikan (Kurniawan dan Sulaiman, 2009). Desain faktorial merupakan solusi paling efisien bila digunakan untuk meneliti pengaruh dari dua atau lebih faktor karena semua kemungkinan kombinasi tiap aras dari faktor-faktor dapat diselidiki secara lengkap (Wahyudi *et al.*, 2002).

Desain faktorial mengandung beberapa pengertian, yaitu faktor, aras, efek, dan respon. Faktor merupakan setiap besaran yang mempengaruhi respon, merupakan variabel yang ditetapkan dan bersifat kualitatif ataupun kuantitatif (Kurniawan dan Sulaiman, 2009; Voight, 1995). Aras merupakan nilai atau tetapan untuk faktor. Pada percobaan dengan desain faktorial perlu ditetapkan aras yang diteliti yang meliputi aras rendah dan aras tinggi. Efek adalah perubahan respon yang disebabkan variasi tingkat dari faktor. Efek faktor atau interaksi merupakan rata-rata respon pada aras tinggi dikurangi rata-rata respon pada aras rendah. Respon merupakan sifat atau hasil percobaan yang diamati. Respon yang diukur harus dikuantitatifkan (Bolton, 1997). Persamaan umum dari desain faktorial untuk dua faktor dan dua aras adalah sebagai berikut :

$$Y = B_0 + B_a X_A + B_b X_B + B_{ab} X_A X_B$$

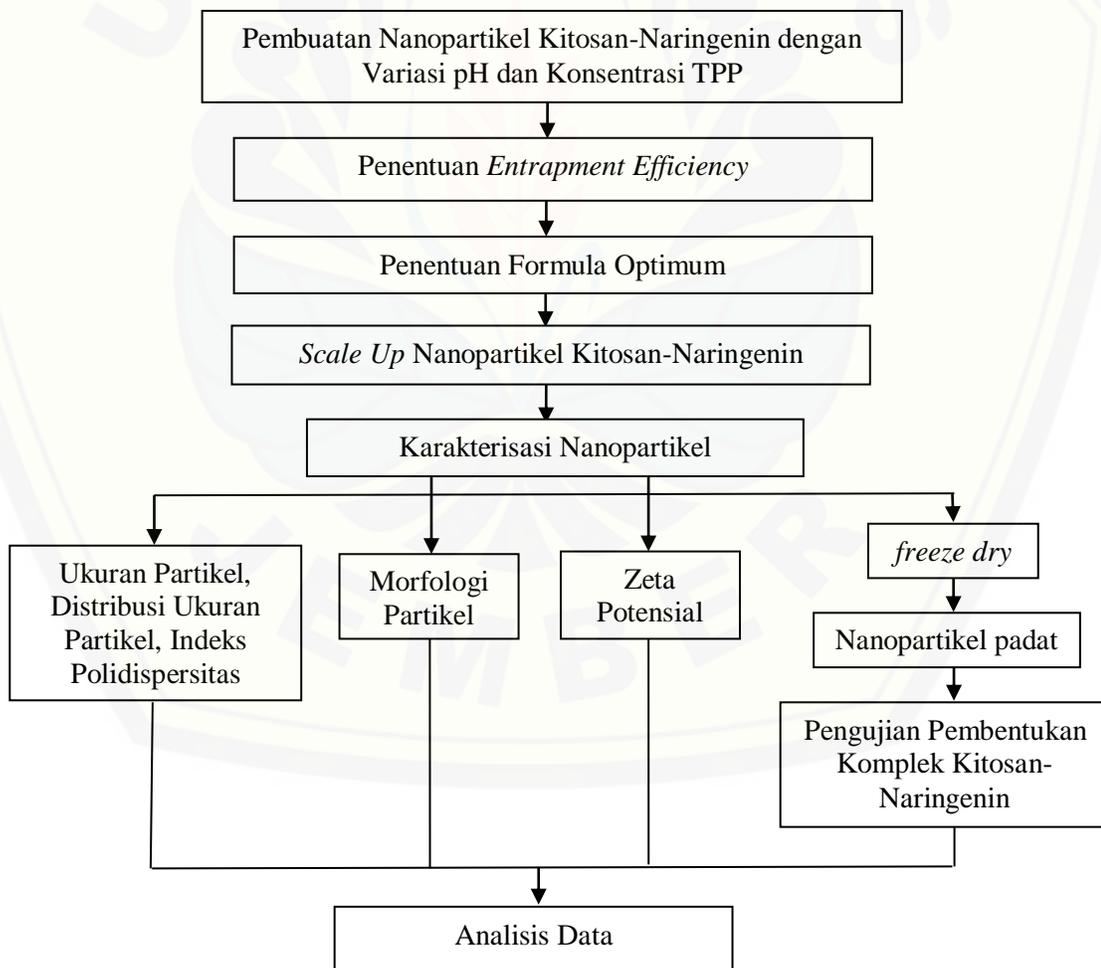
Y	=	respon hasil atau sifat yang diamati
X_A	=	faktor A
X_B	=	faktor B
B_0, B_a, B_b, B_{ab}	=	koefisien, dapat dihitung dari hasil percobaan

Desain faktorial dua aras berarti ada dua faktor (misalnya A dan B) yang masing-masing faktor diuji pada dua aras yang berbeda, yaitu aras rendah dan aras tinggi. Suatu percobaan dapat dirancang dengan desain faktorial untuk mengetahui faktor dominan yang berpengaruh secara signifikan terhadap suatu respon (Voight, 1995). Metode desain faktorial juga dapat mengetahui adanya interaksi yang terjadi. Nilai interaksi dapat dihitung dengan mengurangkan rata-rata respon pada aras tinggi dengan rata-rata respon pada aras rendah (Kurniawan dan Sulaiman, 2009).

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang akan dilaksanakan merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan metode desain faktorial. Tahap-tahap dalam penelitian ini adalah: 1. Pembuatan nanopartikel kitosan-naringenin dengan variasi pH dan konsentrasi TPP; 2. Penentuan *entrapment efficiency*; 3. Penentuan formula optimum; 4. *Scale up* nanopartikel kitosan-naringenin; 5. Karakterisasi nanopartikel; 6. Analisis data. Rancangan penelitian secara skematis dapat dilihat pada gambar 3.1.



Gambar 3.1. Skema langkah kerja penelitian

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *Transmission Electron Microscopy (JOEL JEC-560, Japan)*, *Fourier Transform InfraRed (Genesys 10S)*, *DelsaTM Nano Submicron Particle Size (Beckman Coulter, USA)*, *Zeta Potential Analyzer (Malvern Instruments, UK)*, sentrifuse (*Hermle Labortechnik GmbH, Germany*), spektrofotometer UV (*Genesys*), kamera digital, pH meter (*Elmetron*), timbangan analitik (*Adventurer Ohaus*), botol semprot, spuit injeksi, hot plate (*IKA C-MAG HS4, Germany*), magnetik stirer, batang pengaduk, seperangkat alat gelas, vial, *ball filer*, *stopwatch*, eppendorf, perangkat lunak (*software*) *Design Expert 9 trial* sebagai program pengolahan data.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: 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*), naringenin (*Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA*), *sodium tripolyphosphate* (*Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA*), tween 80 (*PT. Brataco*), akuabidestilata (*Otsuka, Indonesia*), etanol teknis 96% (*Makmur Sejati*), asam asetat glasial (*PT. Merck*).

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasetika dan Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember, Laboratorium TEM Fakultas MIPA dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Airlangga, dan BPPT Sepong pada bulan Februari 2014 – Mei 2014.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Formula

Penelitian ini dilakukan dengan mengaplikasikan metode desain faktorial untuk menentukan formula optimum nanopartikel yang memiliki *entrapment efficiency* optimum. Penelitian menggunakan 4 rancangan formula dengan variabel terikat (respon) Y dan variabel bebas (faktor) X. Variabel bebas X_A adalah pH TPP dan X_B adalah konsentrasi TPP sedangkan variabel terikat Y adalah *entrapment efficiency*. Susunan aras faktor berdasarkan desain faktorial dapat dilihat pada tabel 3.1 dan rancangan percobaan berdasarkan desain faktorial dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.1 Susunan aras faktor berdasarkan desain faktorial

Faktor	Aras tinggi	Aras rendah
	(+1)	(-1)
pH TPP	8	4
Konsentrasi TPP	0,1%	0,067%

Formula yang akan dibuat sesuai desain faktorial memiliki dua faktor yaitu pH TPP sebagai faktor A dan konsentrasi TPP sebagai faktor B. Kedua faktor ini ditentukan interaksinya yaitu interaksi dari aras tinggi dan aras rendah dari masing-masing faktor.

Tabel 3.2 Rancangan percobaan berdasarkan desain faktorial

Percobaan	Faktor A	Faktor B	Interaksi A & B
	(pH TPP)	(Konsentrasi TPP)	
(1)	-1	-1	+1
a	+1	-1	-1
b	-1	+1	-1
ab	+1	+1	+1

Susunan formula dari penelitian yang penting adalah kombinasi antara pH dan konsentrasi TPP. Penelitian dilakukan dengan empat formula sesuai dengan desain faktorial 2ⁿ. Kitosan berfungsi sebagai polimer yang akan menyumbangkan gugus amino dan berinteraksi secara elektrostastik dengan muatan negatif dari gugus polianion TPP menghasilkan nanopartikel. Tween 80 berfungsi sebagai surfaktan yang akan menurunkan tegangan permukaan sehingga memperkecil ukuran partikel kitosan dan sangat membantu dalam pembentukan partikel dalam skala nano.

Respon dari penelitian ini adalah % EE yang diharapkan besarnya lebih dari 50% (Ibezim *et al.*, 2011; Kafshgari *et al.*, 2010). Susunan formula secara keseluruhan dapat dilihat pada tabel 3.3.

Tabel 3.3 Susunan formula

KOMPOSISI					
Formula	Naringenin/ Bahan Aktif (3ml)	Kitosan/ Polimer (30ml)	pH TPP	TPP/ <i>crosslinker</i> (6ml)	Tween 80/ Surfaktan (3,6ml)
(1)	0,2%	0,08%	4	0,067%	1%
a	0,2%	0,08%	8	0,067%	1%
b	0,2%	0,08%	4	0,1%	1%
ab	0,2%	0,08%	8	0,1%	1%

3.4.2 Pembuatan Nanopartikel Kitosan-Naringenin (Calvo *et al.*, 1997; Anonim, 2010)

Nanopartikel dibuat melalui proses gelasi ionik. Pertama, dibuat larutan kitosan 0,08% (b/v) dalam larutan asam asetat 1%. Selanjutnya dibuat larutan tween 80 1% (v/v) dengan melarutkannya dalam akuabidestilata. Larutan TPP dibuat dengan dua macam konsentrasi yaitu 0,067% dan 0,1% (b/v) dalam asam asetat 1%. Masing-masing konsentrasi TPP dibuat dengan variasi pH 4 dan 8. Bahan aktif naringenin 0,2% dilarutkan dalam etanol 96% (Wilcox *et al.*, 1999). Tahap

berikutnya dilakukan proses pencampuran semua bahan ke dalam gelas beaker. Sebanyak 30 ml larutan kitosan dalam gelas beaker ditambahkan 3 ml larutan naringenin. Nanopartikel terbentuk spontan melalui penambahan 3,6 ml larutan tween 80 dan 6 ml larutan TPP dengan cara diteteskan dengan kecepatan 0,1 ml/30 detik yang diaduk dengan magnetik stirer dengan kecepatan 1000 rpm pada suhu ruang. Proses pengadukan tersebut diteruskan selama 1 jam. Pembentukan nanopartikel merupakan hasil interaksi antara gugus negatif TPP dengan muatan positif gugus amino dari kitosan.

3.4.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Naringenin

Penentuan panjang gelombang maksimum naringenin dilakukan dengan cara melakukan pemindaian terhadap larutan naringenin dengan konsentrasi 15 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang terpilih ini selanjutnya digunakan untuk pembuatan kurva baku.

3.4.4 Pembuatan Kurva Baku Naringenin

Kurva baku naringenin ditentukan dengan mengukur absorbansi dari satu seri kadar larutan naringenin dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm yang di-*scanning* pada panjang gelombang maksimum.

3.4.5 Penentuan *Entrapment Efficiency* (Calvo *et al.*, 1997)

Penghitungan naringenin bebas dalam nanopartikel kitosan dilakukan dengan cara mensentrifugasi nanopartikel kitosan-naringenin yang telah terbentuk dengan kecepatan 15000 rpm, 4⁰C selama 1 jam 20 menit. Naringenin bebas yang tidak terenkapsulasi dalam supernatan kemudian ditetapkan kandungannya dengan menggunakan spektrofotometer UV dengan cara mengukur serapannya pada panjang gelombang 290 nm. Penentuan *entrapment efficiency* dilakukan dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Entrapment Efficiency} = \frac{\text{Jumlah Naringenin Awal} - \text{Jumlah Naringenin Bebas}}{\text{Jumlah Naringenin Awal}} \times 100\%$$

3.4.6 Penentuan Formula Optimum

Dari data hasil pengujian, didapatkan harga untuk masing-masing respon sehingga persamaan umum menjadi $Y = B_0 + B_1X_A + B_2X_B + B_{12}X_AX_B$ dan didapatkan persamaan umum hubungan antara faktor dan respon (*entrapment efficiency*).

Berdasarkan rumus $Y = B_0 + B_1X_A + B_2X_B + B_{12}X_AX_B$ dapat dihitung harga koefisien B_0, B_1, B_2, B_{12} . Hasil perhitungan yang diperoleh menggunakan rumus ini dapat dibuat *contour plot* dengan menggunakan program *design expert 9 trial*. Pemilihan formula optimum ditentukan berdasarkan nilai *desirability* yang mendekati 1.

3.4.7 Pembuatan Nanopartikel Formula Optimum

Formula optimum yang terpilih dibuat dengan urutan kerja sesuai prosedur pembuatan nanopartikel subbab 3.4.2.

3.4.8 Karakterisasi Nanopartikel

a. Pengujian Pembentukan Kompleks Kitosan-Naringenin

Analisis kompleks kitosan-naringenin dianalisis dengan menggunakan spektrometer *infrared* (IR). Analisis FTIR tersebut dimaksudkan untuk melihat perubahan gugus fungsi dari kitosan dan nanopartikel kitosan terisi naringenin. Analisis dilakukan dengan metode KBr dimana nanopartikel dikeringkan dengan *freeze dry* sehingga didapatkan serbuk nanopartikel kitosan-naringenin. Pelet dibuat dengan mencampurkan 1 mg serbuk dengan 50 mg kalium bromida. Campuran kemudian digerus hingga homogen. Koreksi *baseline* dibuat dengan menggunakan kalium bromida kering dan spektrum nanopartikel kering dicatat. Kemudian pelet di-*scan* pada daerah $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

Spektra IR naringenin, kitosan, dan TPP dibandingkan dengan spektra IR nanopartikel kitosan-naringenin. Analisis ini digunakan untuk melihat ada atau tidaknya interaksi antara naringenin, kitosan, dan TPP. Ada atau tidaknya interaksi tersebut dapat dilihat pada puncak spektra pada bilangan gelombang yang sama. Kompleks yang terbentuk antara kitosan, TPP, dan naringenin dalam nanopartikel ditandai dengan terjadinya penurunan puncak pada bilangan gelombang yang sama (Dhanasingh dan Nallaperumal, 2010; Ibezim *et al.*, 2011),

b. Ukuran Partikel dan Distribusi Ukuran Partikel

Nanopartikel yang terbentuk diukur di BPPT Serpong menggunakan DelsaTM *Nano Submicron Particle size* (Beckam Coulter) dengan temperatur 25⁰C; *refractive index* 1,3332; viskositas 0,8878 cp; *scattering intensity* 5769 cps. DelsaTM *Nano* merupakan instrumen yang menggunakan *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS) untuk analisis ukuran dan distribusi ukuran nanopartikel yang dihasilkan. Parameter yang dianalisis meliputi diameter partikel rata-rata dan indeks polidispersitas (PI).

Diameter partikel rata-rata yang baik berada dalam rentang skala nano (10-1000 nm). Indeks polidispersitas (PI) merupakan parameter yang digunakan untuk menentukan distribusi ukuran nanopartikel atau tingkat keseragaman nanopartikel. Nilai indeks polidispersitas (PI) 0,01 hingga 0,5-0,7 menunjukkan partikel yang monodispersi, sedangkan nilai indeks polidispersitas yang lebih besar dari 0,7 menyatakan sampel dengan distribusi ukuran partikel yang sangat luas/polidispersi (Nidhin *et al.*, 2008).

c. Zeta Potensial

Zeta potensial dianalisis dengan *Zeta Potential Analyzer* (Malvern Instrument, UK)) pada temperatur 25⁰C; *refractive index* 1,3332; viskositas 0,8878 cp; panjang gelombang 635,0 nm; konstanta dielektrik 78,3; *scattering angle* 14,1°. Sebanyak 2 tetes sampel nanopartikel ditambahkan 5 ml akuades dicampur dengan

cara membolak-balik. Setelah itu diambil 3 ml dan dimasukkan ke dalam kuvet untuk dianalisis (Sari, 2012).

Zeta potensial merupakan indikator utama untuk mengevaluasi stabilitas sistem koloid tersebar. Semakin tinggi nilai zeta potensial, semakin besar tolakan elektrostatis antar nanopartikel dalam larutan, sehingga dapat menghasilkan nanopartikel yang lebih stabil untuk waktu yang lama tanpa terjadi pengendapan serta mempertahankan homogenitasnya. Besarnya zeta potensial yang diharapkan adalah sebesar (+/-) 30 mV (Mohanraj dan Chen, 2006).

d. Morfologi Partikel

Morfologi nanopartikel dan estimasi ukuran nanopartikel dievaluasi dengan *Transmission Electron Microscopy* (TEM). Sampel nanopartikel ditetesi di atas *copper grid* kemudian dilapisi karbon dengan alat *Auto Carbon Coated* (JOEL JEC-560, Japan) selama 5 detik setelah itu dikeringkan pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah sampel nanopartikel kering, kemudian dilapisi lagi dengan karbon seperti di atas lalu *copper grid* dimasukkan ke dalam *holder* dan sampel siap dianalisis dengan percepatan voltage 120 kV. Morfologi partikel yang diharapkan adalah memiliki struktur permukaan yang sferis (Chithrani dan Chan, 2007).