

OPTIMASI KECEPATAN DAN LAMA PENGADUKAN TERHADAP UKURAN NANOPARTIKEL KITOSAN-EKSTRAK ETANOL 70% KULIT JERUK SIAM (*Citrus nobilis* L.var Microcarpa)

OPTIMIZATION OF STIRRING SPEED AND STIRRING TIME TOWARD NANOPARTICLE SIZE OF CHITOSAN-SIAM CITRUS PEEL (*Citrus nobilis* L.var Microcarpa) 70% ETHANOL EXTRACT

Wintari Taurina*, Rafika Sari, Uray Cindy Hafinur, Sri Wahdaningsih, Isnindar

Departement of Pharmacy, Medical Faculty, Tanjungpura University, Prof.Dr.H.Hadari Nawawi Street, 78124 Pontianak.

ABSTRACT

Siam citrus peel (Citrus nobilis L. var. Microcarpa) is a plant derived from Sambas Regency, West Kalimantan Province. Bioavailability of herbal active compounds can be enhanced by formulating extract into nanoparticle. The polymer used was chitosan with crosslinker Na-TPP. Stirring speed and stirring time play an important role to produce small particle size in forming nanoparticle using ionic gelation method. Enhancement of stirring speed and stirring time could reduce particle size. Nanoparticles were prepared using ionic gelation method by mixing Na-TPP, extract and chitosan (1:1:6) with varying the stirring speed 500 rpm, 1000 rpm, 1500 rpm and stirring time 1 hrs, 2 hrs, 3 hrs. The particle size of nanoparticle was found to be 85.3 nm at 1000 rpm of stirring speed and 3 hrs of stirring times, with polydispersity index 0.287, zeta potential +32.37 mV and entrapment efficiency 87.12 %.

Keywords : *siam citrus peel, nanoparticle, chitosan, ionic gelation*

ABSTRAK

Kulit jeruk siam (Citrus nobilis L. var. Microcarpa) merupakan tanaman yang berasal dari Kabupaten Sambas Provinsi Kalimantan Barat. Bioavailabilitas senyawa aktif herbal dapat ditingkatkan dengan memformulasikan ekstrak dalam bentuk nanopartikel. Polimer yang digunakan adalah kitosan dengan crosslinker Na-TPP. Kecepatan dan lama pengadukan dengan metode gelasi ionik berperan penting dalam menghasilkan partikel berukuran nano. Peningkatan kecepatan dan lama pengadukan dapat memperkecil ukuran partikel yang dihasilkan. Pembuatan nanopartikel dilakukan menggunakan metode gelasi ionik dengan mencampurkan Na-TPP, ekstrak dan kitosan (1:1:6) dengan memvariasikan kecepatan pengadukan 500 rpm, 1000 rpm, 1500 rpm dan lama pengadukan 1 jam, 2 jam, 3 jam. Ukuran partikel optimum yang diperoleh dari kecepatan pengadukan 1000 rpm dengan lama pengadukan 3 jam yaitu 85.3 nm dengan nilai indeks polidispers 0.287, nilai potensial zeta +32.37 mV dan efisiensi penjerapan 87.12 %.

Kata Kunci : *kulit jeruk siam, nanopartikel, kitosan, gelasi ionik*

PENDAHULUAN

Jeruk siam (*Citrus nobilis* var Microcarpa) dikembangkan di daerah Tebas, Pemangkat dan disekitar Kabupaten Sambas. Limbah kulit jeruk siam selama ini belum banyak dimanfaatkan padahal bagian kulit jeruk mengandung fenol dan flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan IC₅₀ sebesar 98.94813 µg/mL (Septiani, 2012).

Ekstrak tanaman banyak diformulasikan dalam berbagai bentuk sediaan, namun senyawa aktif herbal memiliki kelemahan yaitu rendahnya

kelarutan dalam air sehingga menurunkan bioavailabilitasnya (Dewandari, 2013). Naringenin merupakan salah satu flavonoid golongan flavonon yang banyak terdapat pada kulit jeruk yang hampir tidak larut dalam air namun larut dalam pelarut organik seperti alkohol (Wilcox, Borradaile dan Huff, 1999). Nanopartikel adalah salah satu strategi untuk meningkatkan bioavailabilitas senyawa aktif herbal.

Nanopartikel dibentuk menggunakan metode gelasi ionik yang berprinsip pada interaksi ionik antara gugus amino pada kitosan dengan polianion yang bermuatan negatif (Tiyaboonchai, 2003). Nanopartikel pada penelitian ini ditujukan untuk pemberian oral. Kitosan dapat membuka

Corresponding Author : Wintari Taurina
Email: wintari.taurina@gmail.com

kait antar sel pada membran usus secara sementara (Bhardwaj dan Kumar, 2006; Martien *et al.*, 2008) sehingga sangat potensial dalam pembuatan nanopartikel *per oral*.

Penurunan ukuran partikel terjadi seiring dengan meningkatnya kecepatan dan lama pengadukan nanopartikel (Gupta, 2011; Dangi, 2013). Peningkatan kecepatan akan memperbesar intensitas molekul pelarut untuk bersentuhan dengan kitosan sehingga semakin besar intensitas kecepatan putaran pada *magnetic stirrer*, partikel yang dihasilkan semakin kecil (Chang, 2005). Semakin lama pengadukan akan menghasilkan ukuran partikel yang semakin kecil karena semakin banyak partikel yang terpecah menjadi partikel berukuran nano.

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi kecepatan dan lama pengadukan yang menghasilkan ukuran partikel yang optimal serta hasil karakterisasinya.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Particle Size Analyzer dan Zetasizer (Delsa™ Nano), Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu 2450), *magnetic stirrer* (IKA®C-MAG HS7).

Buah jeruk siam berasal dari Tebas, Kabupaten Sambas Kalimantan Barat yang berusia 4 bulan berwarna hijau-kekuningan dan dipanen pada pagi hari, kitosan (kualitas farmasi, Biotech Surindo, Indonesia), natrium tripolifosfat (kualitas farmasi, Wako, Jepang), buffer asetat pH 4 yang terdiri dari asam asetat glasial (p.a. Merck, Germany) dan natrium asetat (p.a. Merck, Germany), etanol (p.a. Merck, Germany), etanol 70% (teknis, Brataco, Indonesia), naringenin (p.a. Sigma-Aldrich, USA) dan akuades (Kualitas Farmasi, Brataco, Indonesia).

Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Kulit Jeruk Siam (EEKJS)

Kulit jeruk siam yang telah di keringkan dan dibuat serbuk dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70 % hingga diperoleh ekstrakental.

Pembuatan Larutan Kitosan 0.2 %

Serbuk kitosan 0,1 g dilarutkan dalam 50mL larutan buffer asetat pH 4 menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 1000rpm selama 30 menit.

Pembuatan Larutan Natrium Tripolifosfat (Na-TPP) 0.1 %

Serbuk natrium tripolifosfat 0,01g dilarutkan dalam 10mL akuades menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 1000 rpm selama 30 menit.

Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Kulit Jeruk Siam 100 µg/mL

Ekstrak kulit jeruk siam (10 mg) dilarutkan dalam 100 mL etanol 70 % sehingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL. Konsentrasi ini digunakan berdasarkan penelitian aktivitas antioksidan jeruk siam sebelumnya dengan nilai IC₅₀ sebesar 98,948 µg/mL (Septiani I, 2012).

Preparasi Nanopartikel Kitosan-Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Siam

Satu mililiter EEKJS 100µg/mL dicampurkan dengan 1 mL larutan natrium tripolifosfat 0,1% lalu diteteskan pada 6 mL larutan kitosan 0,2% (Calvo, 1997).

Optimasi Kecepatan Pengadukan

Rancangan optimasi kecepatan pengadukan terhadap ukuran nanopartikel ekstrak etanol kulit jeruk siam dapat dilihat pada tabel 1 (Ruby, 2015).

Optimasi Lama Pengadukan

Kecepatan pengadukan optimum pada tabel 1 digunakan untuk mengoptimasi lama pengadukan nanopartikel EEKJS. Rancangan optimasi lama pengadukan dapat dilihat pada tabel 2 (Ruby, 2015).

Tabel I. Rancangan optimasi kecepatan pengadukan

Stirring speed (rpm)	500	1000	1500
Stirring time (hour)	1	1	1

Tabel II. Rancangan optimasi lama pengadukan

Stirring speed (rpm)	1000	1000	1000
Stirring time (hour)	1	2	3

Karakterisasi Nanopartikel

Penetapan Ukuran Partikel dan Nilai Zeta Potensial

Ukuran dan zeta potensial nanopartikel EEKJS diukur dengan *Particle Size dan Zeta Potential Analyzer* (Delsa™ Nano). Sampel diencerkan menggunakan fase cair dengan rentang pH 6,9-7,2 (Thatipamula, 2011).

Efisiensi Penjerapan (% EE)

Pembuatan kurva kalibrasi dengan naringenin sebagai pembanding

Dibuat larutan seri konsentrasi naringenin yaitu 4, 6, 8, 10 dan 12 ppm lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yaitu 289,0 nm. *Penentuan Kandungan Flavonoid Bebas pada Ekstrak*

Ditimbang kurang lebih 10 mg ekstrak etanol 70% kulit jeruk siam kemudian dilarutkan

Tabel III. Optimasi Kecepatan Pengadukan Nanopartikel Kitosan-EEKJS

Stirring Speed	Stirring Time	Particle Size (nm)	Polidispersity Index
500 rpm	1 hour	829.0±98.1	0.313
1000 rpm	1 hour	236.5±65.4	0.341
1500 rpm	1 hour	24.4±2.7	0.236

Tabel IV Optimasi Lama Pengadukan Nanopartikel Kitosan-EEKJS

Stirring Speed	Stirring Time	Particle Size (nm)	Polidispersity Index
1000 rpm	1 hour	202.4±69.5	0.398
1000 rpm	2 hours	101.8±12.3	0.265
1000 rpm	3 hours	85.3±1.5	0.287

Tabel V. Hasil Karakterisasi Nanopartikel Kitosan-EEKJS

Stirring Speed	Stirring time	Particle size	Polidispersity Index	Zeta Potensial	% Entrapment Efficiency
1000 rpm	3 hours	85.3 nm	0.287	+ 32.37 mV	87.12 %

10 mL pelarutnya. Diambil 0,5 mL dan di tambahkan etanol *pro analysis* hingga 10 mL. Diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 289,0 nm. *Penentuan Kandungan Flavonoid pada Nanopartikel*

Suspensi nanopartikel-kitosan EEKJS disentrifus dengan kecepatan 15.000 rpm selama 20 menit. Filtrat diambil 0,5 mL dan ditambahkan etanol 96% hingga 10 mL. Diukur serapannya dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang maksimum 289,0 nm. Persentase efisiensi penjerapan dihitung dengan rumus sebagai berikut (Dounighi *et al.*, 2012):

$$\% EE = \frac{(\text{flavonoid bebas pada ekstrak} - \text{flavonoid pada nanopartikel})}{\text{flavonoid bebas pada ekstrak}} \times 100 \%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

EEKJS yang diekstraksi secara maserasi memiliki rendemen 23.627%. EEJKS yang dihasilkan berbentuk kental, berwarna coklat agak kehitaman, berbau khas jeruk.

Nanopartikel kitosan-EEJKS dibuat menggunakan metode gelas ionik berdasarkan interaksi ionik antara gugus amino negatif pada kitosan dengan polianion yang bermuatan negatif yaitu Na-TTP (Tiyaboonchai, 2003).

Hasil optimasi kecepatan pengadukan (Tabel 3) menunjukkan bahwa seiring dengan meningkatnya kecepatan pengadukan maka ukuran partikel yang dihasilkan semakin kecil. Peningkatan kecepatan pengadukan akan

memperbesar intensitas molekul pelarut untuk bersentuhan dengan kitosan sehingga semakin besarnya intensitas kecepatan putaran pada *magnetic stirrer* partikel yang dihasilkan semakin kecil (Chang, 2005). Ukuran nanopartikel yang dipersyaratkan dalam sistem penghantaran obat yaitu 50-300 nm (Gupta, 2006). Pengadukan dengan kecepatan 1000 rpm menghasilkan ukuran partikel yang berada pada rentang 50-300 nm sehingga kecepatan pengadukan ini digunakan untuk mengoptimasi lama pengadukan nanopartikel kitosan-EEKJS. Indeks polidispersitas menunjukkan distribusi ukuran partikel dimana rentang indeks polidispers berada diantara 0 sampai dengan 1. Nilai indeks polidispersitas yang mendekati nol menunjukkan distribusi partikel yang homogen atau seragam sedangkan nilai indeks polidispersitas yang melebihi 0,5 menunjukkan partikel memiliki tingkat heterogenitas yang tinggi. Nilai indeks polidispers pada tabel 3 tidak melebihi 0,5 sehingga menunjukkan bahwa seluruh formula nanopartikel yang dihasilkan memiliki distribusi ukuran partikel yang homogen sehingga memiliki kecenderungan stabil secara fisik sehingga tidak menyebabkan partikel saling beragregasi (Avadi 2010; Rahmawanty, 2014).

Hasil optimasi lama pengadukan (tabel 4) menunjukkan bahwa seiring dengan meningkatnya lama pengadukan maka ukuran partikel yang dihasilkan semakin kecil, hal ini dikarenakan semakin banyak partikel yang terpecah menjadi partikel berukuran nano, selain

itu peningkatan lama pengadukan akan memperbesar intensitas molekul pelarut untuk bersentuhan dengan kitosan sehingga ukuran partikel yang dihasilkan semakin kecil (Chang, 2005). Partikel dengan ukuran lebih dari 100 nm tidak dapat mencapai sumsum tulang belakang serta lebih sedikit diabsorpsi dibandingkan dengan partikel berukuran kurang dari 100 nm (Gupta, 2006). Berdasarkan hasil optimasi tersebut, dipilih kecepatan pengadukan 1000 rpm dan lama pengadukan selama 3 jam sebagai kondisi optimum yang selanjutnya dikarakterisasi lebih lanjut meliputi penentuan zeta potensial dan efisiensi penjerapan.

Nilai zeta potensial digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan partikel yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Nilai zeta potensial yang diperoleh pada penelitian ini yaitu + 32.37 mV. Nanopartikel dengan nilai zeta potensial diatas ± 30 mV memiliki sifat yang stabil dalam suspensi dan dapat mencegah agregasi dari partikel (Singh, 2009).

Penentuan efisiensi penjerapan digunakan untuk mengetahui kemampuan suatu polimer (kitosan) dalam melindungi zat aktif yang membentuk nanopartikel. Efisiensi penjerapan yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 87.12 %. Semakin besar nilai efisiensi penjerapan maka semakin besar kemampuan kitosan dalam melindungi zat aktif dari pengaruh luar yang dapat merusak zat aktif, sehingga bioavailabilitas zat aktif juga akan meningkat.

KESIMPULAN

Ukuran partikel optimum yang diperoleh dari kecepatan pengadukan 1000 rpm dengan lama pengadukan 3 jam yaitu 85.3 nm dengan nilai indeks polidispers 0.287, nilai zeta potensial +32.37 mV dan efisiensi penjerapan 87.12%.

TERIMAKASIH

Terimakasih kepada pemberi dana Risbin Iptekdok Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Jakarta, serta kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura Pontianak.

DAFTAR PUSTAKA

Avadi, M. 2010. Preparation and Characterization Of Insulin Nanoparticles Using Chitosan and Arabic Gum With Ionic Gelation Method. *Nanomed: Nanotech, Biol Med.* 6 : 58-63.
Bhardwaj, V., and Kumar, M. 2006. Chapter 9. *Polymeric nanoparticles for oral drug delivery* on Nanoparticle technology for drug delivery: Drug and the pharmaceutical

science, Taylor dan Francis Group, New York, USA. pp. 231-262.

- Calvo, P., Lopez, C., Villa-Jato, Alonso, M. 1997. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carrier. *J App Poly Sci.* 63: 125-132.
Chang, R. 2005. Kimia Dasar : Konsep-konsep Inti Jilid 2. Erlangga, Jakarta.
Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C. 2002. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 19:99-134.
Dangi, R., Shakya, S. 2013. Preparation, Optimization and Characterization of PLGA Nanoparticle. *Int J of Pharm & Life Sci.* 4(7): 2810-2818.
Desai, M., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R., Amidon, G. 1997. The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticle in Caco-2 Cells Is Size Dependent. *Pharm Res.* 14(11): 1568-1573.
Dewandari, K., Yuliani, S., Yasni, S. 2013. Ekstraksi dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Sirih Merah (*Piper crocatum*). *J Pascapanen.* 10(2): 58-65.
Dounighi, M., Eskandari, R., Avadi, M., Zolfagharian, H., Sedagi, M., Rezayat, M. 2012. Preparation and In Vitro Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing Mesobuthus Eupeus Scorpion Venom as an Antigen Delivery System. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 18(1): 44-52.
Gupta, R.B and Kompella, U.B. 2006. Nanoparticle Technology for Drug Delivery. Vol 159. Taylor and Francis Group, New York, USA. pp.3.
Gupta V, Karar PK. Optimization of Process Variables for the Preparation of Chitosan-Alginate Nanoparticle. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011; 3(2): 78-80.
Martien, R., Loretz, B., Sandbichler, A.M., Bernkop-Schnürch, A. 2008. Thiolated chitosan nanoparticles: transfection study in the Caco-2 differentiated cell culture. *Nanotech.* 19: 1-9.
Rahmawanty, D., Effionora, A., Anton, B. 2014. Formulasi Gel Menggunakan Ikan Haruan (*Channa striatus*) Sebagai Penyembuh Luka. *Media Farmasi.* 11(1): 29-40.
Ruby, J.J., Pandey, V.P. 2015. Chitosan Nanoparticles as a Nasal Drug Delivery for Memantine Hydrochloride. *Int J Pharm Pharm Sci.* 7(1): 34-37.
Sanjaya, Y.A and Surakusumah, W. 2008. Potensi Ekstrak Daun Pinus (*Pinus merkusii* Jungh) sebagai Bioherbisida Penghambat

- Perkecambahan *Echinochloa colonum L.* dan *Amaranthus viridis*. *Jurnal Perennial*. 4(1) : 1-5.
- Septiani, I. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Kulit Jeruk Siam (*Citrus nobilis L. var Microcarpa*) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil, *Thesis*, Pontianak: The University of Tanjungpura.
- Singh, R., Lillard, J.W. 2009. Review Nanoparticle Based Targeted Drug Delivery. *Exp Mol Pathol*. 86(3): 215-223.
- Thatipamula, R.P., Palem, C.R., Gannu, R., Mudragada, S., Yamsani, M.R. 2011. Formulation and *Invitro* Characterization of Domperidone Loades Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. *Daru*. 19(1): 23-32.
- Tiyaboonthai, W. 2003. Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery. *Nareusan Univ J*. 11(3): 51-66.
- Wilcox, L.J., Borradaile, N.M., Huff, M.W. 1999. Antiatherogenic Properties of Naringenin, A citrus Flavonoid. *Cardiovaskular Drug: Reviews*. 17(2): 160-178.