

PENGEMBANGAN PREPARASI NANOPARTIKEL THYMOQUINONE-KITOSAN DENGAN METODE KOSOLVEN MENGGUNAKAN ISOPROPIL ALKOHOL

DEVELOPMENT OF COSOLVENT METHODE PREPARATION OF THYMOQUINONE-CHITOSAN NANOPARTICLE USING ISOPROPIL ALCOHOL

Tedjo Yuwono, Annas Binarjo, Renni Priyanti

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

Jln. Prof. Dr. Soepomo, Janturan, Yogyakarta, Telp. (0274) 379418

Email: annasbinarjo@yahoo.co.id

Submitted : 28-07-2015

Reviewed : 11-08-2015

Accepted: 24-11-2015

ABSTRAK

Thymoquinone, hasil isolasi dari biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) terbukti memiliki khasiat sebagai antikanker, antiinflamasi, dan immunodilator. *Thymoquinone* mudah menguap, mudah teroksidasi, titik lebur rendah, menyebabkan sulit diformulasi menjadi sediaan padat. Sifatnya yang tidak larut dalam air menyebabkan bioavailabilitasnya rendah. Untuk mengatasi dua masalah tersebut dilakukan pengembangan sistem penghantaran obat nanopartikel. Nanopartikel kitosan-*thymoquinone* dapat dibentuk dengan *cross-linker* natrium tripolifosfat dengan metode kosolven. Larutan *thymoquinone* dalam 75%, 50%, 100% isopropil alkohol dicampur dengan larutan kitosan dalam dapar asetat pH 4. Larutan Na-TPP dalam air ditambahkan sedikit demi sedikit dengan pengadukan pelan. Dilakukan karakterisasi terhadap nanopartikel meliputi *loading capacity* (LC), bentuk partikel, ukuran partikel, dan zeta potensial, dan karakterisasi proses preparasi yaitu nilai *loading efficiency* (LE). Optimasi *Factorial Design* menghasilkan kondisi terbaik yaitu dengan solven isopropil alkohol 75%, kadar *thymoquinone* 10 mg/mL, dan kadar kitosan 10 mg/mL menghasilkan nanopartikel dengan LC 8,71%, LE 76,29%, diameter rata-rata 609,8 nm dan zeta potensial rata-rata 137,9 mV, bentuk bulat. Isopropil alkohol dapat membantu pembentukan nanopartikel *thymoquinone*. Ukuran partikel dan zeta potensial yang dihasilkan besar, oleh karena itu diperlukan modifikasi kadar *thymoquinone*, kitosan, dan Na-TPP.

Keywords : Nanopartikel, thymoquinone, isopropil alkohol, polimer kitosan

ABSTRACT

Thymoquinone, an active compound isolated from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.), has pharmacological activity as anticancer, antiinflammatory, and immunomodulator. This compound has a volatile nature, easily oxidized, and low melting point, leading to difficulties in tablet formulation. Moreover, its low solubility in water leading to low bioavailability. Therefore, it is necessary to develop nanoparticle drug delivery systems to solve these problems. Chitosan-thymoquinone nanoparticles can be formed using sodium tripolyphosphate as cross linker by cosolven method. Chitosan solution in acetate buffer pH 4 was added to thymoquinone solution in 50%, 75%, 100% isopropyl alcohol, than sodium tripoliphosphate solution in water was added slowly in a gently stirrer. The nanoparticle produced was characterized in its loading capacity (LC), particle morphology, particle size, and zeta potential, as well as the loading efficiency (LE) of nanoparticle. Factorial Design Optimization resulted that the best condition is achieved by 75% isopropyl alcohol using thymoquinone level of 10 mg/mL and chitosan level of 10 mg/mL. In this condition, the nanoparticle has LC of 8.71%, LE of 76.29%, 609.8 nm in diameter and zeta potential of 137.9 mV. It can be concluded that isopropyl alcohol can help the formation of nanoparticles thymoquinone. The particle

size and zeta potential is too big, therefore it is craved to modify the process by variation in thymoquinone, chitosan, and sodium tripoliphosphat concentration.

Keywords: *Nanoparticles, thymoquinone, isopropyl alcohol, the polymer chitosan*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki biodiversitas terbesar setelah Brazil, dan juga dikenal sebagai gudangnya tumbuhan obat (herbal). Salah satu tanaman herbal yang dapat dimanfaatkan dalam teknologi biomedis adalah biji jinten hitam. Biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) adalah salah satu tanaman yang masuk dalam spesies tumbuhan family *Ranunculaleae*. Tanaman ini telah dibuktikan aktivitas farmakologisnya secara empiris maupun secara medis oleh para peneliti Timur Tengah, Afrika, Eropa, bahkan Amerika Serikat (Sufrida dan Edi, 2006).

Berdasarkan penelitian, jintan hitam bermanfaat sebagai antioksidan, antikanker, antikolesterol, antihistamin, analgesik, antibiotik, imunomodulator, dan sebagainya (Randhawa and Al-Ghamdi, 2002), antimikroba dan antimikotik (Hendrik, 2007). Salah satu kandungan jintan hitam adalah minyak volatil. Komponen utama minyak volatil, adalah *thymoquinone*, timohidrokuinon, ditimokuinon, timol, dan tannin, terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan fungi, meskipun mekanisme aksi antimikroba dari senyawa-senyawa ini belum jelas (Mashhadian and Rakhshandeh, 2005). Menurut Abu-Khader (2013) *thymoquinone* telah terbukti memiliki potensi terapi menguntungkan sebagai antikanker. Hal ini terbukti efektif terhadap beberapa jenis selkanker melalui mekanisme apoptosis kromatin kondensasi, translokasi fosfatidilserin melintasi membranplasma, dan fragmentasi DNA. Selain efek apoptosis, penelitian yang dipublikasikan baru-baru ini mengungkapkan mekanisme penghambatan *thymoquinone* pada sel kanker payudara yaitu menghambat MCF-7, MDA-MB-231, dan BT-474.

Thymoquinone merupakan senyawa terpenoid atau minyak atsiri, memiliki sifat mudah menguap, titik lebur rendah (Alamet *et al*, 2011), dan mudah teroksidasi (Salmani dkk, 2014), sehingga akan mengalami kesulitan untuk memformulasinya menjadi sediaan padat. Selain itu *thymoquinone* juga sulit larut dalam air (Salmani *et al*, 2014), sehingga diduga mempunyai bioavailabilitas yang kecil (Tubesha *et al*, 2013). Untuk mengatasi dua masalah tersebut dikembangkan preparat nanopartikel sebagai pembawa *thymoquinone*.

Polimer yang umum digunakan dalam sistem nanopartikel adalah biopolimer kitosan. Kitosan merupakan polisakarida alam [$\beta(1\rightarrow4)$ glukosamin (2-amino-2-deoksi-d-glukosa) N-asetil-d-glukosamin (2-asetamido-2-deoksi-dglukosa)] yang mulai banyak diaplikasikan dalam industri farmasi, pangan, dan kesehatan. Kitosan mempunyai beberapa sifat yang menguntungkan yaitu bersifat anti mikroba, *wound healing*, tidak beracun, murah, biokompatibel, dapat dibiodegradasi, serta larut air. Oleh karena itu kitosan berpotensi untuk digunakan sebagai bahan eksipien atau pembawa (Jin *et al*, 2007; Kato *et al*, 2003; Liu *et al*, 2007; Mao *et al*, 2001; Aranaz *et al*, 2009).

Kitosan dalam dapar asetat pH 4 akan bersifat kationik sehingga dapat berinteraksi dengan muatan parsial negatif dari senyawa *thymoquinone*. Amina primer terprotonasi dari kitosan akan mempengaruhi stabilitas kompleks nanopartikel yang terbentuk, sehingga diperlukan *counter ion* yang mampu mengikat sisa amina primer. Adanya interaksi antara muatan positif dari kitosan dan muatan parsial negatif *thymoquinone* menyebabkan pembentukan nanopartikel dapat terjadi secara mudah dan obat dapat terenkapsulasi, terjebak, terdisolusi, terdispersi pada material nanopartikel. Interaksi ionik antara kitosan dan *thymoquinone* dapat terjadi secara spontan, dan distabilkan oleh sodium tripolifosfat (Na-TPP) yang berperan sebagai *cross linker* (Bhumkar and Pokharkar, 2006)

Permasalahan yang dihadapi adalah *thymoquinone* lebih mudah larut dalam pelarut organik, sehingga sulit bercampur dengan larutan kitosan dalam air. Senyawa dengan sifat demikian biasanya direaksikan dengan polimer kitosan dengan metode emulsifikasi (Agnihotri *et al.*, 2004) dengan suatu surfaktan yang pada akhir preparasi surfaktan ini dapat masuk dalam system nanopartikel, atau jika surfaktan diendapkan terlebih dahulu berpeluang besar zat aktif menempel dalam endapan surfaktan tersebut. Pada penelitian ini dikembangkan preparasi nanopartikel kitosan-*thymoquinone* dengan metode kosolven. *Thymoquinone* dilarutkan dalam air dengan bantuan kosolven, sehingga dapat

bercampur dengan larutan kitosan dalam air. Kosolven yang dipakai dapat diuapkan di akhir preparasi. Sebagai tahap awal pengembangan metode kosolven ini dipilih kosolven isopropyl alcohol.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *thymoquinone*, *chitosan low molecular weight* dengan derajat deasetilasi 75 % (Sigma Alderich), *sodium tripolyphosphate technical grade 85 %* (Sigma Aldrich), asam asetat glasial (E Merk), NaOH (E Merk), *aquadest*, isopropil alkohol absolut (E Merk). Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik (OHAUS), alat gelas (Iwaki Pyrex), pH meter (WWT), *stopwatch*, *hot plate magnetic stirrer* (Cimarec), ultrasonikator, *sentrifuge refrigerator*, spektrofotometer (UV 1800, Shimadzu).

Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Dapar Asetat, Larutan Kitosan, dan Larutan Na-TPP

Dapar asetat pH 4 dibuat dengan konsentrasi menggunakan asam asetat glasial dan NaOH.

Kitosan dilarutkan dalam dapar asetat pH 4 dengan beberapa konsentrasi yaitu 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL dan 10 mg/mL. Sedangkan larutan Na-TPP dalam air dibuat dengan konsentrasi 0,4 mg/mL.

2. Pembuatan *Thymoquinone* dalam Solven Isopropil Alkohol

Thymoquinone sukar larut dalam air, maka digunakan solven isopropil alkohol 100%, 75%, dan 50%. Larutan *thymoquinone* dibuat dalam ketiga solven tersebut dengan konsentrasi 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL, dan 10 mg/mL.

3. Preparasi Nanopartikel *Thymoquinone*

Preparasi nanopartikel *thymoquinone* dilakukan melalui dua tahap yaitu skrinning level (untuk penentuan level optimasi) dan optimasi

a. Skrinning level

Membuat dispersi nanopartikel *thymoquinone* dengan mencampurkan 1,0 mL kitosan, 1,0 mL *thymoquinone* dalam solven isopropil alkohol, dan 2,0 mL Na-TPP. Desain orientasi nanopartikel *thymoquinone* dapat dilihat pada Tabel I:

Tabel I. Matriks skrinning level preparasi nanopartikel kitosan-thymoquinone dengan metode kosolven

		Larutan <i>Thymoquinone</i> dalam Solven Isopropil Alkohol 100%, 75%, 50%			
		1 mg/mL	2 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
Larutan Kitosan	1 mg/mL	F1	F5	F9	F13
	2 mg/mL	F2	F6	F10	F14
	5 mg/mL	F3	F7	F11	F15
	10 mg/mL	F4	F8	F12	F16

Thymoquinone ditambahkan dengan kitosan disertai pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* 400 rpm selama 30 menit. Na-TPP ditambahkan sebanyak 2 mL menggunakan pipet tetes, tetes demi tetes selama 10 menit. Dispersi nanopartikel ditunjukkan dengan terbentuknya dispersi koloid (opalesensi). Dispersi yang menunjukkan opalesensi dipilih sebagai batas bawah dan batas atas untuk dilakukan optimasi.

b. Optimasi Nanopartikel Thymoquinone dengan Menggunakan Metode Factorial Design

Kadar *thymoquinone* dan kadar kitosan yang dapat membentuk dispersi nanopartikel pada tahap skrining dijadikan batas bawah dan batas atas dari *thymoquinone* dan kitosan pada tahap optimasi. Tabel II menunjukkan kondisi pada proses optimasi ini.

Tabel II. Optimasi desain factorial preparasi nanopartikel kitosan-thymoquinone dengan metode kosolven

Run	Solven isopropyl alcohol 100%			Solven isopropyl alcohol 75%		
	Kadar <i>Thymoquinone</i> (mg/mL)	Kadar Kitosan (mg/mL)	Kadar Na TPP (mg/mL)	Kadar <i>Thymoquinone</i> e (mg/mL)	Kadar Kitosan (mg/mL)	Kadar Na TPP (mg/mL)
1	5	2	0,4	5	5	0,4
a	5	5	0,4	5	10	0,4
b	10	2	0,4	10	5	0,4
ab	10	5	0,4	10	10	0,4

4. Karakterisasi Nanopartikel *Thymoquinone*

a. Loading Capacity dan Loading Efficiency

Untuk mendapatkan nilai *loading capacity* dan *loading efficiency* terlebih dahulu dilakukan analisis *thymoquinone* bebas yang bercampur dengan dispersi nanopartikel. Analisis ini dilakukan dengan metode spektrofotometri UV dengan persamaan regresi linier kadar (mg/ml) versus absorbansi (pada panjang gelombang 327,0 nm) $y = 1,404x + 0,0276$ dengan $R^2=0,994$. Persamaan ini diperoleh dengan mengukur absorbansi larutan *thymoquinone* dalam campuran solven air-dapar asetat pH 4-isopropyl alcohol dengan perbandingan 2:1:1 dengan kadar 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, dan 0,6 mg/mL.

Dispersi nanopartikel terlebih dahulu disentrifugasi menggunakan refrigotor sentrifuge 15.000 rpm, selama 60 menit. Filtrat diambil dan digunakan untuk menganalisis kadar *thymoquinone* bebas, kadar yang didapatkan digunakan untuk menghitung jumlah *thymoquinone* yang terjerap dalam nanopartikel sehingga dapat digunakan untuk menghitung nilai *loading capacity* bersama dengan bobot nanopartikel dan *loading efficiency*. *Thymoquinone* bebas yang masih terlarut dalam solven yang tertinggal dalam endapan nanopartikel yang sudah ditiriskan diabaikan, dan solvennya diuapkan dalam oven pada suhu 40°C. Respon *loading capacity* dan *loading efficiency* dari masing – masing dispersi nanopartikel dianalisis menggunakan perangkat lunak *Design Expert 7 (DX 7)* sehingga diperoleh kondisi proses preparasi nanopartikel yang optimal.

b. Morfologi Nanopartikel

Dispersi nanopartikel optimal yang dihasilkan dari analisis *Design Expert 7 (DX 7)* dilakukan identifikasi morfologi nanopartikel menggunakan TEM (*Transmission Electron Microscope*). Dilakukan di Laboratorium Fakultas MIPA UGM.

c. Pengukuran Ukuran Partikel dan zeta Potensial Dispersi Nanopartikel

Dispersi nanopartikel optimal yang dihasilkan dari analisis *design expert 7 (DX 7)* dilakukan pengukuran ukuran partikel dan zeta potensial. Ukuran partikel ditentukan dengan *Particle Size Analyzer (PSA)* sedangkan zeta potensial ditentukan dengan *zeta siter*. Keduanya dilakukan di Laboratorium FMIPA UII.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Skrining factor untuk penentuan batas optimasi pada kosolven isopropyl alcohol

Batas atas dan batas bawah factor yang dioptimasi ditentukan agar setiap formula Faktorial design menunjukkan hasil partikulat berukuran nanometer. Untuk kosolven isopropyl alcohol hasilnya ditunjukkan pada Tabel III.

Tabel III. Hasil Orientasi Nanopartikel Thymoquinone dalam Solven Isopropil Alkohol 100 %, 75 % dan 50 %

Formula	Kadar			Isopropil alkohol 100 %	Hasil	
	<i>Thymoquinone</i> (mg/mL)	Kitosan (mg/mL)	TPP (mg/mL)		Isopropil alkohol 75 %	Isopropil alkohol 50 %
1	1	1	0,4	Jernih	Jernih	Jernih
2	1	2	0,4	Jernih	Jernih	Jernih
3	1	5	0,4	Jernih	Jernih	Jernih
4	1	10	0,4	Jernih	Jernih	Jernih
5	2	1	0,4	Jernih	Jernih	Jernih
6	2	2	0,4	Jernih	Jernih	Jernih
7	2	5	0,4	Jernih	Jernih	Jernih
8	2	10	0,4	Jernih	Jernih	Jernih
9	5	1	0,4	Jernih	Jernih	Jernih
10	5	2	0,4	Opalesensi	Jernih	Jernih
11	5	5	0,4	Opalesensi	Opalesensi	Jernih
12	5	10	0,4	Opalesensi	Opalesensi	Jernih
13	10	1	0,4	Jernih	Jernih	Mengendap
14	10	2	0,4	Opalesensi	Opalesensi	Mengendap
15	10	5	0,4	Opalesensi	Opalesensi	Mengendap
16	10	10	0,4	Mengendap	Opalesensi	Mengendap

Pada Tabel III dapat diketahui bahwa nanopartikel *thymoquinone* dengan solven isopropil alkohol 100% dapat terbentuk pada formula 10, 11, 12, 14 dan 15. Yaitu pada kadar *thymoquinone* 5 dan 10 mg/mL dan kadar kitosan 2, 5, dan 10 mg/mL. Perbedaan pembentukan nanopartikel dapat disebabkan oleh adanya perbedaan konsentrasi kitosan dan zat aktif *thymoquinone*.

Pada isopropil alkohol 75 % nanopartikel *thymoquinone* dapat terbentuk pada formula 11, 12, 14, 15, dan 16. Nanopartikel *thymoquinone* dengan solven isopropil alkohol 75 % dapat terbentuk pada kadar *thymoquinone* 5, dan 10 mg/mL, kadar ini dijadikan batas bawah dan batas atas untuk optimasi. Sedangkan kadar kitosan yang digunakan untuk batas atas yaitu 10 mg/mL dan batas bawah 5 mg/mL. Berbeda dengan isopropil alkohol 100% ketika kadar *thymoquinone* 10 mg/mL dan kitosan 10 mg/mL terjadi endapan. Hal ini dapat disebabkan besarnya kadar zat aktif sehingga tidak mampu berikatan dengan kitosan dan Na-TPP.

Berbeda dengan isopropil alkohol 100% dan 75 %, isopropil alkohol 50% tidak dapat membentuk nanopartikel *thymoquinone*. Dari ketiga kadar solven isopropil alkohol yang digunakan, isopropil alkohol 100% dan 75% dapat membentuk nanopartikel *thymoquinone* sedangkan isopropil alkohol 50% tidak dapat membentuk nanopartikel *thymoquinone* hal ini disebabkan karena kelarutan *thymoquinone* dalam air kecil, sehingga semakin banyak air yang terkandung dalam isopropil alkohol maka kelarutan *thymoquinone* akan semakin rendah dan menyebabkan zat aktif tidak dapat berinteraksi secara spontan dengan polimer kitosan dan Na-TPP.

2. Optimasi factorial design dengan kosolven isopropyl alcohol

Optimasi nanopartikel *thymoquinone* dilakukan dengan membuat formula berdasarkan batas atas dan bawah kadar *thymoquinone* dan kitosan yang didapatkan dari tahap orientasi. Tujuan tahap optimasi ini untuk mendapatkan formula nanopartikel optimal berdasarkan respon yang dihasilkan. Salah satu yang dapat digunakan dalam optimasi adalah *factorial design*. *Factorial design* merupakan suatu metode yang digunakan untuk menghasilkan sampel optimal berdasarkan respon beberapa

faktor. Pada analisis *design factorial* ini menggunakan analisis dua faktor karena pada optimasi ini melibatkan dua faktor yang dioptimasi yaitu kadar *thymoquinone* dan rasio kitosan Na-TPP. Hasil optimasi nanopartikel *thymoquinone* dengan solven isopropil alkohol 100 % dan 75 % dapat dilihat pada Tabel IV dan V :

Tabel IV. Optimasi preparasi nanopartikel kitosan-thymoquinone dengan solven isopropil alkohol 100%

Run	Kadar <i>Thymoquinone</i> (mg/mL)	Kadar Kitosan (mg/mL)	Kadar Na TPP (mg/mL)	<i>Loading Capacity</i> (%)	<i>Loading Efficiency</i> (%)	mg Thymo termuat
1	5	2	0,4	23,08+9,27	9,14+2,87	0,46+0.14
A	5	5	0,4	49,51+24,32	7,08+2,35	0.35+0.12
B	10	2	0,4	100 (Undefined)	12,91+2,52	1.29+0.25
Ab	10	5	0,4	100 (Undefined)	13,06+5,53	1.31+0.55

Tabel V. Optimasi preparasi nanopartikel kitosan-thymoquinone dengan solven isopropil alkohol 75%

Run	Kadar <i>Thymoquinone</i> (mg/mL)	Kadar Kitosan (mg/mL)	Kadar Na TPP (mg/mL)	<i>Loading Capacity</i> (%)	<i>Loading Efficiency</i> (%)	Mg Thymo termuat
1	5	5	0,4	6,03+0,59	88,36+0,90	4,42+0,04
A	5	10	0,4	6,77+1,35	93,23+0,30	9,32+0,03
B	10	5	0,4	3,57+0,11	21,52+0,40	3,81+0,01
AB	10	10	0,4	8,71+2,50	76,29+0,13	8,70+0,03

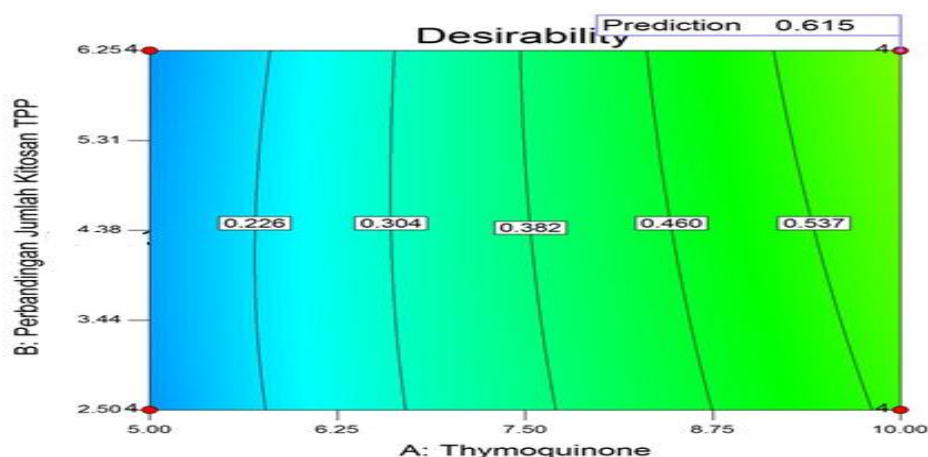
Tabel VI. Persamaan *Factorial Design* preparasi nanopartikel dengan metode kosolven Isopropyl alkohol

Respon	Solven	
	isopropyl alkohol 100 %	isopropyl alkohol 75%
<i>Loading Efficiency</i>	$Y = 8,82 + 0,463 [A] - 1,132 [B] + 0,117 [A] [B]$	$Y = 201,44 - 13,587 [A] - 16,159 [B] + 1,787 [A] [B]$
<i>Loading Capacity</i>	tidak dapat dilakukan	$Y = 19,41 - 2,097 [A] - 1,747 [B] + 0,257 [A] [B]$
Jumlah nanopartikel	$Y = -0,23 + 0,151 [A] - 0,059 [B] + 6,223 [A] [B]$	$Y = 10,09 - 1,117 [A] - 1,818 [B] + 0,159 [A] [B]$

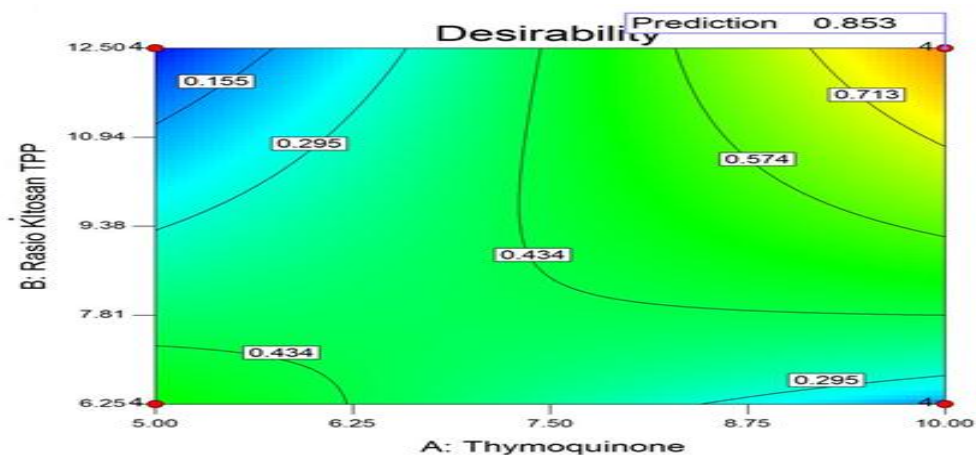
Uji ANOVA selain menunjukkan persamaan *factorial design* juga digunakan untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat. Dari hasil uji ANOVA menggunakan DX 7 untuk solven isopropil alkohol 100 % kadar *thymoquinone* dan perbandingan

kadar kitosan Na-TPP berpengaruh terhadap nilai *loading efficiency* dan jumlah thymoquinone yang termuat dalam nanopartikel ($p < 0,05$), sedangkan untuk *loading capacity* tidak dapat dilakukan analisis *Factorial Design* karena nilainya tidak logis ($> 100\%$) untuk percobaan B dan AB. Uji ANOVA untuk solven isopropil alkohol 75% menunjukkan hasil yang signifikan untuk nilai *loading capacity*, *loading efficiency*, dan jumlah *thymoquinone* yang termuat dalam nanopartikel artinya kadar *thymoquinone* dan perbandingan kadar kitosan Na-TPP berpengaruh terhadap nilai *loading capacity*, *loading efficiency*, dan jumlah *thymoquinone* yang termuat dalam nanopartikel ($p < 0,05$).

Persamaan dalam table VI dapat digunakan untuk memprediksi kondisi optimum proses preparasi. Software DX 7 menggambarkan grafik kondisi proses *versus* respon total yang dihasilkan (sebagai *desirability*). Nilai *desirability* berkisar antara 0 sampai 1, semakin besar nilai *desirability*, artinya respon totalnya semakin baik. Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan kurva *desirability* tersebut.



Gambar 1. Kurva *desirability* proses optimasi preparasi nanopartikel dengan metode kosolven dengan solven isopropil alkohol 100%

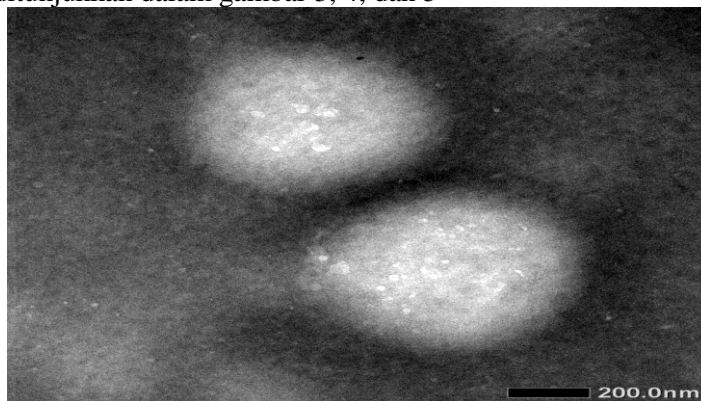


Gambar 2. Kurva *desirability* proses optimasi preparasi nanopartikel dengan metode kosolven dengan solven isopropil alkohol 75%

Hasil analisis DX 7 diperoleh formula optimal terbentuknya nanopartikel *thymoquinone* dengan solven isopropil alkohol 100% yaitu pada konsentrasi *thymoquinone* 10 mg/mL dan kitosan 5 mg/mL. Sedangkan dengan solven isopropil alcohol 75% optimal pada kadar *thymoquinone* 10 mg/mL dan kitosan 10 mg/mL. Perbedaan kadar kitosan pada solven isopropil alkohol 100% dan 75% disebabkan oleh *thymoquinone* dalam solven isopropil alkohol 75% banyak dalam bentuk parsial negatif daripada dalam solven isopropyl alcohol 100%, oleh karena itu membutuhkan banyak kitosan agar dapat

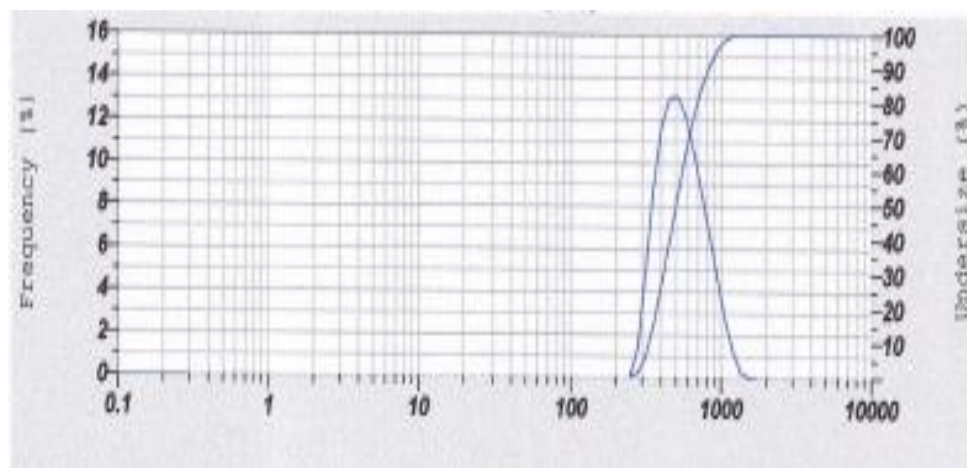
bereaksi secara spontan. Nilai *desirability* mendekati 1 artinya hasil optimasi semakin baik. Untuk solven isopropil alkohol 100 % nilai *desirability* 0,615 sedangkan solven isopropil alkohol 75 % nilai *desirability* 0,853, sehingga hasil dengan solven isopropyl alcohol 75% dikatakan lebih baik dari pada 100%.

Karakterisasi dilakukan terhadap formula optimum yang diusulkan oleh desain Expert yaitu Run ab untuk kadar kosolven 75%. Karakter yang dievaluasi adalah foto TEM, PSA, dan zeta potensial. Hasilnya ditunjukkan dalam gambar 3, 4, dan 5



Gambar 3. Hasil foto TEM nanopartikel kitosan-thymoquinone menunjukkan bentuk bulat

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Alam *et al.*, (2012) nanopartikel *thymoquinone* berbentuk bulat dan memiliki permukaan yang halus. Ukuran partikel berkisar antara 150-200 nm. Dari gambar di atas dapat diketahui bahwa nanopartikel yang terbentuk berbentuk bulat. Untuk membuktikan tekstur permukaan halus maka harus diuji lebih lanjut menggunakan alat SEM (*Scanning Electron Microscopy*).



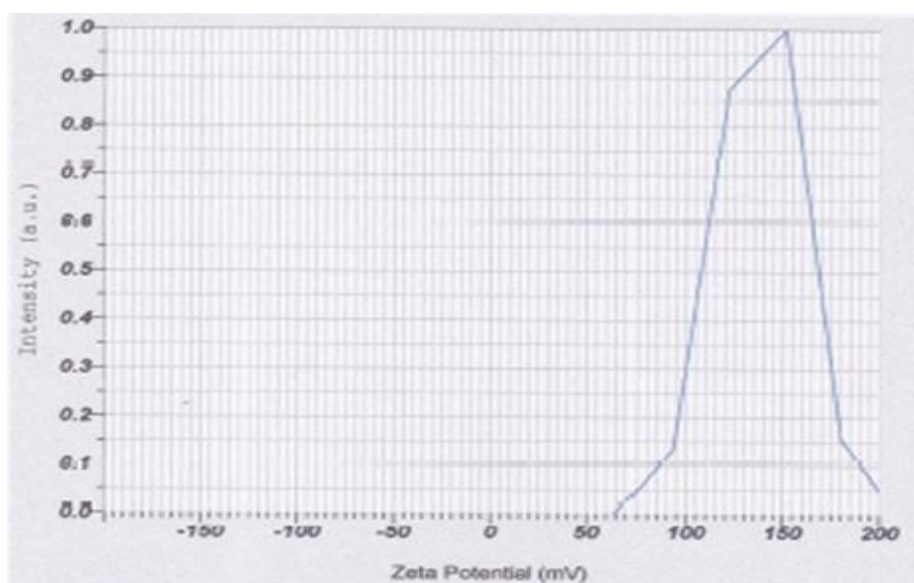
Gambar 4. Hasil pengukuran diameter partikel menunjukkan diameter rata-rata 609,8 nm dengan polidispersi index 0,45 dengan satu kali pengukuran

Ukuran partikel yang besar dapat disebabkan oleh sedikitnya jumlah zat aktif yang bereaksi dengan kitosan, sehingga sisa zat aktif yang tidak bereaksi akan mengikat kembali zat aktif lain dan menyebabkan ukuran partikel yang dihasilkan menjadi lebih besar. Selain itu juga dapat disebabkan oleh besarnya kadar Na-TPP. Banyaknya gugus fosfat yang ditambahkan akan berpengaruh terhadap ikatan ionik antara kitosan dengan Na-TPP. Semakin banyak gugus amin yang terprotonasi maka

untuk berikatan ionik dengan fosfat akan lebih banyak sehingga partikel yang terbentuk juga semakin besar dan akan menghasilkan struktur partikel yang lebih kompak (Liu *et al.*, 2007)

Calvo *et al.*, (1997) menjelaskan bahwa pada konsentrasi kitosan lebih tinggi, ukuran partikel yang dihasilkan akan lebih besar. Hal ini disebabkan oleh daya gabung dari kitosan semakin meningkat, sehingga agregat yang terbentuk saling bergabung, menyebabkan ukuran partikel menjadi lebih besar. Fan *et al.*, (2012) kecepatan pengadukan juga mempengaruhi ukuran partikel. Meningkatnya kecepatan pengadukan akan mempercepat penyebaran Na-TPP sehingga mempengaruhi gaya geser dari kitosan dan menyebabkan terjadinya agregasi.

Polydispersity index (PI) digunakan untuk memperkirakan rentang distribusi ukuran partikel yang ada dalam suatu sampel serta mengetahui ada tidaknya agregasi. Distribusi ukuran partikel dinyatakan sebagai monodispersi jika PI berada pada rentang 0,01-0,7. Pada penelitian ini diperoleh IP 0,449 artinya tingkat keseragaman distribusi ukuran nanopartikel *thymoquinone* cukup baik.



Gambar 5. Hasil pengukuran zeta potensial menunjukkan nanopartikel kitosan-thymoquinone mempunyai zeta potensial rata-rata 137,9 mV dengan satu kali pengukuran

Zeta potensial menggambarkan potensial elektrik dari partikel dan medium tempat partikel tersebut terdispersi. Nanopartikel yang memiliki zeta potensial diatas ± 40 mV menunjukkan suspensi yang stabil, hal ini dikarenakan muatan permukaan akan mencegah agregasi antar partikel (Avadi *et al.*, 2010). Zeta potensial juga dapat digunakan untuk menentukan apakah muatan zat aktif telah terenkapsulasi didalam *nanocapsule* atau teradsorpsi ke dalam permukaan (Couvreur *et al.*, 2002). Dari hasil pengukuran besarnya zeta potensial yaitu 137,9 mV.

KESIMPULAN

Metode kosolven dengan solven isopropyl alkohol 75% dapat digunakan untuk mempreparasi nanopartikel kitosan-thymoquinone. Nanopartikel yang diperoleh memenuhi persyaratan zeta potensial untuk menjamin stabilitas (>40 mV), tetapi diameternya masih terlalu besar (> 500 nm).

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada DIKTI yang telah membiayai penelitian ini pada skim hibah fundamental tahun 2014.

DAFTAR PUSTAKA

Abu-Khader, M.M, 2013, Thymoquinone in the clinical treatment of cancer: Fact or Fiction, *Pharmacognosy Review*, 7(14), 117-120

- Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., and Aminabhavi, T.M, 2004, Recent advances on chitosan-based microand nanoparticles in drug delivery. *J. of ControlledRelease* 100: 5–28.
- Alam, S., Khan, Z.I., Mustafa, G., Kumar, M., Islam, F., Bhatnagar, A., Ahmad, F.J, 2012, Development and evaluation of thymoquinone encapsulated chitosan nanoparticles for nose-to-brain targeting: a pharmacoscintigraphic study. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 5705-5718.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., and Acosta, N., 2009, Functional Characterization of Chitin and Chitosan, *Curr Chem Biol*, 3 : 203-230.
- Avadi, M.R., Sadeghi, A.M.M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., and Rafiee-Tehrani, M., 2010, Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 6:58-63.
- Bhumkar, D.R. and Pokharkar, V.B., 2006, Studies on Effect of pH on Cross – Linking of Chitosan With Sodium Trypolyphosphate : A Technical Note, *AAPS PharmSciTech*, 138 – 143.
- Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, and Alonso MJ, 1997, Novel hydrophilic chitosanpolyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci*, 63:125-132.
- Couvreur, P., Kante, B., Lenaerts, V., Scailteur, V., Roland, M., and Speiser P., 2002, Tissue Distribution of Antitumor Drugs Associated with Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles, *J. Pharm. Sci.*, 69: 199-202.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., and Ni, H., 2012, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 90, 21-27.
- Hendrik, 2007, *Habbatus sauda'.Thibbun Nabawiy Dalam Menangani Berbagai Penyakit dan Memelihara Kesehatan tubuh*.Surakarta: Pustaka Al-Ummat.
- Jin, Y., Ling, P.X., He, Y.L., and Zhang, T.M., 2007, Effects of chitosan and heparin on early extension of burns, *Burns* 33:1027–1031.
- Kato, Y., Onishi, H., and Machida, Y., 2003, Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Curr.Pharm. Biotechnol.* 4:303–309.
- Liu, H., Chen, B., Mao, Z., and Gao, C., 2007, Chitosan nanoparticles for loading of toothpaste actives and adhesion on tooth analogs, *J Appl Polym Sci*, 106:4248-4256.
- Mao, H.Q., Roy, K., Troung – Le, V.L., Janes, K.A., Lin, K., Wang, Y., August, J.T., and Leong, K.w., 2001, Chitosan – DNA nanoparticle as gene carrier : synthesis, characterization and transfection efficiency, *J Control Release*, 70 (3) 399 – 421.
- Mashhadian, N.V. and Rakhshandeh, H., 2005, Antibacterial and anti-fungaleffects of *Nigella sativa* extract against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. *Pak J Med Sci.* 21:47-52.
- Randhawa, M.A., and Alghamdi, M.S., Maulik, S.K., 2002, The effect of thymoquinone, an active component of *Nigella sativa*, on isoproterenol induced myocardial injury. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.26, 1215-1219.
- Salmani, J.M., Asghar, S., and Zhou, J., 2014, Aquous solubility and degradation kinetics of the Phytochemical Anticancer Thymoquinone; Probing the Effects of splvents, pH, and Light, *Molecules*, 19(5), 5925-39.
- Sufrida, Y., Edi, J, 2006, *Sembuhkan Penyakit dengan Habbatus Sauda'*. Jakarta: Agro Media Pustaka: 11-5.
- Tubasha, Z., Abu Bakar, Z., and Ismail, M., 2013, Characterization and Stability Evaluation of Thymoquinone Nanoemulsion Prepared by High Pressure Homogenization, *Journal of Nanomaterials*, 2013: 1 – 6.