FORMULASI, EVALUASI, SERTA UJI SITOTOKSIK TERHADAP SEL KANKER MCF-7 DARI SISTEM NANOPARTIKEL POLIMERIK POLYVINYL PYRROLIDONE DENGAN ZAT AKTIF KURKUMIN

*Formulation of Polymeric Nanoparticles
System Polyvinyl Pyrrolidone Containing Curcumin as Active Ingredient,
Its Evaluation and Cytotoxicity Test on MCF-7 Cancer Cells*

Yenni Puspita Tanjung
Universitas Padjadjaran
Email Korespondensi : yenni_ap@yahoo.com

Abstrak

Dalam beberapa tahun terakhir pengembangan sistem pembawa obat inovatif telah banyak dilakukan untuk mengatasi buruknya kelarutan suatu zat aktif. Salah satu contoh yang banyak mendapat perhatian adalah sistem pembawa obat berbasis nanopartikel. Pada penelitian ini dibuat suatu sistem nanopartikel dengan menggunakan pembawa polimer polyvinyl pyrrolidone (PVP). Polyvinyl pyrrolidone dapat digunakan sebagai solubilizer dan telah terbukti kemampuannya dalam meningkatkan disolusi dari obat yang memiliki kelarutan rendah. Zat aktif yang digunakan adalah kurkumin. Kurkumin penerapannya terbatas karena tidak larut dalam air, sedangkan potensinya sangat baik sebagai obat pada beberapa penyakit termasuk kanker. Formula dibuat dengan memvariasikan jumlah PVP dimana kurkumin banding PVP adalah (1:2), (1:6), dan (1:10). Prosedur pembuatan sistem nanopartikelnya adalah dengan melarutkan PVP ke dalam larutan PVA 0,1% sedangkan kurkumin dilarutkan dengan etanol. Selanjutnya dilakukan proses homogenisasi, sonikasi, dan pengadukan mekanik serta penguapan pelarut. Sistem nanopartikel ini dikarakterisasi ukuran partikelnya dengan alat PSA. Persentase enkapsulasi ditetapkan dengan HPLC. Formulasi yang menghasilkan sistem nanopartikel polimerik dengan ukuran partikel terkecil yaitu 31,6 nm adalah formula X (Kurkumin 50 mg, PVP 500 mg, etanol 25 ml, dan larutan PVA 0,1% 75 ml) dengan proses homogenisasi kecepatan 17.000 rpm selama 12 menit 30 detik, sonikasi selama 30 menit, pengadukan mekanik selama 2 jam dan penguapan pelarut. Persen enkapsulasi kurkumin dari formula X adalah 98%. Pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksik menggunakan sel kanker MCF-7 dimana hasilnya adalah kurkumin nanopartikel (IC_{50} 1,7 ppm) memiliki efek sitotoksik yang lebih baik dibandingkan dengan kurkumin non nanopartikel (IC_{50} 11,7 ppm). Untuk pengujian cellular uptake menghasilkan kurkumin nanopartikel memiliki kemampuan cellular uptake yang lebih baik dibandingkan dengan kurkumin non nanopartikel.

Kata kunci : nanopartikel, kurkumin, ukuran partikel, sitotoksik.

Abstract

In the last few years, an innovative development of drug carrier system has been done to overcome poor solubility of active ingredients. An interesting example of it is drug delivery system based nanoparticle. In this research a nanoparticle system was made by using a polymers polyvinyl pyrrolidone (PVP), which can be used as solubilizer and has proven its ability to improve dissolution of low solubility drugs. Curcumin is used as active ingredient. This compound is not dissolved in water, while its potential is very good as medicine in some diseases including cancer. The formula were prepared with various amount of PVP where curcumin comparison PVP were (1:2), (1:6), and (1:10). Nanoparticle system was created by dissolving PVP into PVA 0.1% solution, while curcumin was dissolved in ethanol. The procedure was continued with homogenizing, sonicating, mechanical stirring and solvent evaporating. Particle size the system were characterized by PSA. Encapsulation efficiency of curcumin was measured by HPLC. The best nanoparticle formula with (particle size 31.6 nm) was formula X (contained curcumin 50 mg, PVP 500 mg, ethanol 25 ml, and solution PVA 0.1 % 75 ml) which was made by homogenization speed 17,000 rpm for 12 minutes 30 seconds, sonication 30 minutes, stirring mechanics 2 hours, percent encapsulation of curcumin 98%. Both the cellular uptake ability and the cytotoxicity of this nanoparticle curcumin on MCF-7 cancer cells was better than non-nanoparticle system, with IC_{50} 1.7 ppm and IC_{50} 11.7 ppm, respectively.

Key words : nanoparticle, curcumin, Polyvinyl Pyrrolidone (PVP), cytotoxic.

Pendahuluan

Hampir 40 persen senyawa aktif farmasi yang sedang atau baru saja disintesa merupakan senyawa yang sangat sukar larut dalam air. Hal tersebut menjadi suatu tantangan farmasis dalam pengembangan bentuk sediaan yang memiliki senyawa aktif dengan kelarutan kecil dalam air (Stegemann, 2007).

Dalam beberapa tahun terakhir pengembangan sistem pembawa obat inovatif telah banyak dilakukan untuk mengatasi buruknya kelarutan suatu zat aktif. Salah satu contoh yang banyak mendapat perhatian adalah sistem pembawa obat berbasis nanopartikel. Ukuran partikel yang kecil yaitu di bawah rentang submikron (1000 nm) membuat kelarutan dari zat aktif meningkat. Pada beberapa zat aktif peningkatan ini terbukti dapat meningkatkan kemampuan distribusi

obat dalam membran biologis sehingga ketersediaan hayati akan menjadi lebih baik (Stegemann, 2007).

Upaya untuk menghasilkan suatu partikel berukuran nanometer, maka dilakukan formulasi sistem nanopartikel polimerik melalui suatu variasi konsentrasi polimer. Untuk pemilihan model digunakan kurkumin yang merupakan senyawa polifenol dengan pemerian berupa serbuk berwarna kuning dan memiliki penerapan yang terbatas karena ketidaklarutannya dalam air, sedangkan potensinya sangat baik sebagai obat pada beberapa penyakit termasuk kanker (Shangpeng, *et al.*, 2011).

Polimer banyak digunakan dalam formulasi nanopartikel dan telah terbukti berhasil meningkatkan kelarutan tanpa mengganggu aktivitas farmakologisnya

farmakologisnya (Mohanty and Sahoo, 2010). Salah satu contoh polimer sintetis yang banyak digunakan sebagai *carrier* dalam sistem pembawa adalah polyvinil pyrrolidone atau PVP (Shengpeng et al, 2011). Polyvinil pyrrolidone dapat digunakan sebagai solubilizer dan telah terbukti kemampuannya dalam meningkatkan disolusi dari obat yang memiliki kelarutan rendah. Polyvinil pyrrolidone juga dapat digunakan sebagai agen *coating* dan bisa juga digunakan sebagai peningkat stabilitas suatu zat (Rowe et al, 2006). Dalam pembuatan nanopartikel biasanya juga ditambahkan stabilizer, misalnya saja polyvinil alcohol (PVA). PVA digunakan sebagai penstabil sehingga tidak terjadi penambahan aglomerasi dari partikel dan akhirnya partikel tidak akan bertambah besar ukurannya (Rowe et al, 2009).

Formulasi nanopartikel dengan zat aktif kurkumin ini dilakukan untuk mengembangkan penelitian sebelumnya yaitu menggunakan polimer PVP dan zat aktif kurkumin dengan metode *bottom up* melalui proses homogenisasi dan metode penguapan pelarut (Feng-Lin Yen et al., 2010). Pada penelitian ini terdapat beberapa formula dengan variasi jumlah polimer dan penambahan proses yaitu sonikasi dan penambahan PVA sebagai stabilizer. Selain itu juga dilakukan pengujian tambahan yaitu uji sitotoksik serta cellular uptake terhadap sel kanker MCF-7 (Chabib et al, 2012).

Metode

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah homogenizer (Daihan Wizer Widz), *particle size analyzer* (Beckham Coulter Delsa nano C), sonikator (Branson 5200), pengaduk mekanis (Heidolph R&R 2021), pengaduk magnetik (Yellow MAAG HS7), *High Pressure Liquid Chromatography* (Waters), pH *spear* (Oakton), *viskometer brookfield* (Brookfield Syndroelectric), timbangan analitik (Sartorius), makropipet, 96-well plate, ELISA reader, mikroskop *fluorescent* (Zeiss), dan peralatan gelas yang biasa digunakan dalam laboratorium.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kurkumin (Lansida), povidone K-30 (BASF), polyvinil alcohol (Brataco Chemica), etanol 95% (Brataco Chemica), aquades, asetonitril (JT BAKER), larutan penyangga fosfat (Merck), sel kanker MCF-7 (Laboratorium Kultur Sel dan Sitogenetik RSP Universitas Padjadjaran), medium RPMI-1640 (Sigma), Phosphate Buffer Saline (PBS) (Gibco), dan metanol (Merck).

Pada penelitian ini beberapa tahapan antara lain formulasi nanopartikel polimerik Polyvinil Pyrrolidone (PVP) dengan zat aktif kurkumin, karakterisasi serta uji sitotoksik dan cellular uptake terhadap sel kanker MCF-7.

Formulasi Sistem Nanopartikel

Formulasi sistem nanopartikel dengan zat aktif kurkumin ini dilakukan dengan memvariasikan jumlah polimer PVP. Formula ditunjukkan pada tabel 1

Pembuatannya diawali dengan pembuatan larutan PVA dengan konsentrasi 0,1% b/v. Kemudian PVP 100 mg dilarutkan ke dalam masing-masing larutan PVA 0,1% b/v sebanyak 75 ml (fasa air). Kurkumin sebanyak 50 mg dilarutkan ke dalam etanol 96% sebanyak 25 ml

Tabel 1. Formula Sistem Nanopartikel Polimer PVP dengan zat aktif Kurkumin

Komposisi	Formula A	Formula B	Formula C
Kurkumin (mg)	50	50	50
PVP (mg)	100	300	500
Etanol 96% (mL)	25	25	25
Larutan PVA 0.1 % b/v (mL)	75	75	75

(fasa organik). Fasa air dan fasa organik dicampurkan dan langsung diaduk menggunakan *high pressure homogenizer* dengan kecepatan 22000 rpm selama 25 menit (Feng Lin Yen et al., 2010). Selanjutnya disonikasi selama 30 menit lalu diaduk kembali dengan menggunakan pengaduk mekanik selama 2 jam (Perdana, 2007). Kemudian dilakukan proses penguapan pelarut dengan menggunakan alat vakum evaporator hingga formula sediaan berjumlah ± 75 ml (Feng Lin Yen et al, 2010). Hal yang sama juga dilakukan untuk formula dengan jumlah PVP 300 mg dan 500 mg.

Selanjutnya dilakukan formulasi nanopartikel polimerik PVP dengan variasi kecepatan homogenisasi, yaitu 17000 rpm (FP), 22000 rpm (FQ), dan 27000 rpm (FR) menggunakan formula dengan ukuran partikel terkecil yang dihasilkan pada tahapan sebelumnya. Kemudian juga dilakukan formulasi dengan memvariasikan lama waktu proses homogenisasi yaitu 12 menit 30 detik (FX), 25 menit (FY), dan 50 menit (FZ) dengan menggunakan formula dengan ukuran partikel terkecil dari tahapan sebelumnya.

Pengamatan Fisik Nanopartikel

Pengamatan fisik yang dilakukan meliputi sifat organoleptik berupa warna, kejernihan, nilai pH dan viskositas. Kejernihan dan warna diamati secara visual dengan kasat mata, nilai pH diukur dari setiap formula menggunakan alat pH meter sedangkan viskositas dari setiap formula diukur menggunakan alat *viscometer brookfield*.

Determinasi Ukuran dan Distribusi Ukuran Nanopartikel

Teknik pengukuran distribusi ukuran partikel dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 2 mL dan memasukkannya ke dalam kuvet kemudian diukur dengan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) Delsa Nano C dengan metode *photon correlation spectroscopy* (PCS).

Penentuan Nilai Indeks Polidispersitas Nanopartikel

Nilai indeks polidispersitas dari sistem nanopartikel polimerik PVP dengan zat aktif kurkumin ditentukan oleh *photon correlation spectroscopy* (PCS) dengan menggunakan alat Particle Size Analyzer Delsa Nano C dengan prosedur yang sama seperti pengukuran ukuran partikel.

Penentuan Nilai Zeta Potensial Nanopartikel

Penentuan nilai zeta potensial dari sistem nanopartikel polimerik PVP dengan zat aktif kurkumin menggunakan metode *electrophoretic light scattering* (ELS) menggunakan alat *Particle Size Analyzer Delsa Nano C*

Determinasi Persen Enkapsulasi Kurkumin

Perhitungan persen jeratan dilakukan dengan mengukur konsentrasi kurkumin yang masih terjerat di dalam polimer setelah dilakukan proses sentrifugasi yang kemudian kadarnya diukur dengan menggunakan alat *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC). Sistem HPLC tersebut menggunakan Kolom C18 (250 x 4.6 mm, ukuran partikel 5 μ m), dengan fasa gerak mengandung larutan dapar KH_2PO_4 0,01 M pH 4,5 : Asetonitril (55:45). Fasa gerak disaring melalui membran filter nilon 0.22 μ m dan gas dikeluarkan melalui proses ultrasonikasi sebelum digunakan. Sistem dijalankan dengan laju alir 1 mL/menit, dan kurkumin dideteksi pada panjang gelombang 425 nm. Volume yang diinjeksikan 50 μ L.

Secara singkat penentuan persen jeratan kurkumin dilakukan dengan cara sebanyak 500 μ L kurkumin yang sudah berukuran nanometer dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan kemudian di sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 30 menit (Feng Lin Yen *et al.*, 2010). Selanjutnya, supernatan (nanokurkumin) dan endapan (kurkumin bebas) dipisahkan. Supernatan kemudian diukur konsentrasi kurkuminnya menggunakan alat HPLC dengan prosedur yang sama. Pengukuran persen enkapsulasi dari kurkumin adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ enkapsulasi} = \frac{C_{\text{cur}}}{F_{\text{cur}}} \times 100\%$$

Keterangan:

C_{cur} = Konsentrasi kurkumin dalam supernatan

F_{cur} = Konsentrasi kurkumin awal

Uji Stabilitas Sistem Nanopartikel

Sistem nanopartikel polimerik PVP yang mengandung kurkumin dari formula X dimasukkan ke dalam botol coklat yang dilapisi aluminium foil dan disimpan pada suhu 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C, dan 25 ± 2 °C dengan pengadukan dengan masing-masing RH $75 \pm 5\%$. Selanjutnya stabilitas dari sistem nanopartikel tersebut dilihat dengan cara memeriksa fisiknya yang terdiri dari pH, viskositas, ukuran dan distribusi ukuran partikelnya, serta nilai indeks polidispersitas dengan menggunakan alat *particle size analyzer* pada hari ke-0, 15, dan 30 (Pardeike Jana *et al.*, 2011).

Uji Sitotoksik Terhadap Sel Kanker MCF-7

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) dan menggunakan sel kanker MCF-7 sebagai modelnya. Suspensi sel kanker payudara (MCF-7) dengan kepadatan 8×10^4 sel/50 μ L didistribusikan ke dalam masing-masing lubang pada 96- *plate well* dan diinkubasikan dalam inkubator CO_2 selama 24 jam untuk adaptasi hingga sel tersebut siap untuk diuji. Nanopartikel kurkumin dengan berbagai konsentrasi yang telah ditentukan dimasukkan ke dalam lubang pada baris A, B, dan C sebanyak 50 μ L. Larutan kurkumin non nanopartikel dengan berbagai konsentrasi yang sama dengan larutan kurkumin nanopartikel dimasukkan ke dalam lubang pada baris D, E, dan F sebanyak 50 μ L. Kemudian diinkubasi ke dalam inkubator CO_2 selama 24 jam. Setelah inkubasi ditambahkan 10 μ L larutan WST-8 *cell counting solution*

ke dalam masing-masing lubang. Kemudian sampel diinkubasi dalam inkubator CO_2 selama 3 jam. Enzim yang dimiliki oleh sel-sel hidup akan bereaksi dengan MTT dengan membentuk warna kuning. Setelah inkubasi, kemudian absorbansi dapat dibaca menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm (Chabib *et al.*, 2012).

Tingkat inhibisi proliferasi sel (CPI : *Cell Proliferation Inhibition rate*) dihitung dengan rumus :

$$1 - \frac{\text{Optical density of treated cells}}{\text{Optical density of control}} \times 100$$

Dari pengujian sitotoksitas diperoleh IC_{50} dari sediaan kurkumin nanopartikel dan juga IC_{50} dari sediaan kurkumin non nanopartikel.

Observasi Cellular Uptake Terhadap Sel Kanker MCF-7

Sel MCF-7 (1×10^4 sel/mL/sumuran) didistribusikan ke dalam 24-*plate well* yang telah dilapisi *coverslip* pada bagian dasarnya, sel diinkubasi dalam inkubator CO_2 sampai sel tersebut siap untuk digunakan. Media sel diganti dengan media yang baru kemudian diberi larutan uji kurkumin nanopartikel dengan konsentrasi 1,7 ppm sebanyak 10 μ L kurkumin/lubang. Hal yang sama juga dilakukan untuk larutan uji kurkumin non nanopartikel. Setelah 24 jam inkubasi, kemudian media dibuang, kemudian ditambahkan metanol selama 30 detik lalu segera dibuang. *Coverslip* yang mengandung sel diletakkan pada kaca objek yang akan diamati dengan mikroskop fluorescent (Chabib *et al.*, 2012).

Hasil dan Pembahasan

Formulasi Sistem Nanopartikel

Dalam penelitian ini dilakukan beberapa tahapan untuk mendapatkan formula dengan ukuran partikel terkecil. Tahapan pertama yang dilakukan adalah membuat formula dengan mengacu kepada penelitian sebelumnya (Feng Lin Yen *et al.*, 2010), namun ditambahkan 2 variasi jumlah PVP. Tahapan ini dilakukan untuk melihat tingkat kejernihan dari sediaan, dimana semakin jernih cairan maka semakin kecil ukuran partikelnya dan cairan yang jernih merupakan karakteristik dari sistem dispersi koloid nanopartikel. Partikel-partikel kurkumin yang berukuran sangat kecil terdispersi dalam medium dan tidak dapat dilihat secara langsung oleh mata sehingga sediaan akan terlihat cairan jernih dan tidak mengendap.

Tahapan kedua dilakukan dengan memvariasikan kecepatan homogenisasi berdasarkan formula terbaik dari tahapan pertama. Salah satu parameter yang mempengaruhi ukuran partikel adalah intensitas dan durasi homogenisasi (Gupta, 2006). Semakin tinggi kecepatan homogenisasi membuat ukuran partikel semakin kecil. Namun, penggunaan kecepatan homogenisasi terlalu tinggi akan mempercepat penguapan pelarut sehingga terjadi peningkatan konsentrasi polimer di fasa dalam yang mengakibatkan viskositas partikel meningkat. Hal tersebut dapat menjadikan partikel-partikel tersebut saling menempel sehingga menimbulkan aglomerasi dan ukuran partikel menjadi lebih besar (Gupta, 2006).

Tahapan ketiga dilakukan dengan memvariasikan waktu homogenisasi berdasarkan formula terbaik dari tahap pertama dan berdasarkan kecepatan homogenisasi terbaik yang dihasilkan dari tahapan kedua. Semakin lama waktu homogenisasi membuat ukuran partikel semakin kecil. Namun, waktu homogenisasi yang terlalu lama dapat menjadikan partikel-partikel tersebut saling menempel sehingga menimbulkan aglomerasi dan ukuran partikel menjadi lebih besar (Gupta, 2006).

Pengamatan Fisik Nanopartikel

Pengamatan fisik yang dilakukan meliputi sifat organoleptik berupa warna kejernihan, nilai pH, dan viskositas. Hasil pengamatan fisik tersebut dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Fisik Sistem Nanopartikel

Formula	Tingkat Kejernihan	pH	Viskositas (cp)
FA	Kuning jingga keruh	5,46	1024
FB	Kuning jingga keruh	5,41	1024
FC	Kuning jingga jernih	5,39	1024
FP	Kuning jingga jernih	5,42	1014
FQ	Kuning jingga jernih	5,43	1024
FR	Kuning jingga jernih	5,43	1036
FX	Kuning jingga jernih	5,39	1010
FY	Kuning jingga jernih	5,42	1022
FZ	Kuning jingga jernih	5,40	1038
Kurkumin Non Nanopartikel	Kuning dengan endapan	5,46	1020

Hasil pengamatan kejernihan dari formulasi dapat dilihat pada gambar 1. Pada gambar tersebut terlihat hasil formulasi sistem nanopartikel polimerik dengan zat aktif kurkumin menggunakan variasi jumlah PVP. Formula C memberikan tingkat kejernihan yang paling baik dibandingkan dengan formula A dan B. Hal ini disebabkan oleh penggunaan polimer pada formula C yang paling banyak dibandingkan dengan formula A dan B, dimana semakin banyak jumlah polimer yang digunakan maka semakin banyak partikel kurkumin yang berukuran sangat kecil terdispersi dalam medium dan terkapsulasi sehingga cairan akan menjadi lebih jernih. Warna kuning jingga merupakan warna yang disebabkan oleh warna dari zat aktif kurkumin.

Gambar 1. Foto Formula Nanopartikel Kurkumin dengan Variasi Jumlah PVP

Gambar 2. Foto Formula Kurkumin Nanopartikel dan Kurkumin Non Nanopartikel

Pengamatan kejernihan juga dibandingkan terhadap formula X yang merupakan formula dengan ukuran partikel terkecil dan juga terhadap formula kurkumin yang tidak dalam bentuk sistem nanopartikel (gambar 2).

Pada gambar tersebut terlihat bahwa formulasi sistem nanopartikel dengan zat aktif kurkumin menghasilkan sediaan berupa larutan jernih, sedangkan formulasi kurkumin yang tidak dalam bentuk sistem nanopartikel menghasilkan sediaan berupa larutan dengan endapan kurkumin pada bagian bawah wadah.

Berdasarkan hasil pengamatan didapatkan nilai pH dari setiap formula adalah kurang dari 7 dan tidak ada perbedaan yang signifikan antara masing-masing formula. Hal ini menunjukkan bahwa variasi polimer, variasi kecepatan homogenisasi, dan variasi lama waktu homogenisasi tidak mempengaruhi nilai pH. Nilai pH yang diinginkan dalam sistem pembawa polimerik dengan zat aktif kurkumin ini adalah kurang dari 7 atau bersifat asam. Hal ini dikarenakan sifat dari kurkumin yang tidak stabil pada pH basa dan mudah terdegradasi.

Hasil dari pengamatan viskositas dari masing-masing formula menunjukkan nilai yang hampir sama. Hal ini dikarenakan konsentrasi zat-zat yang terkandung dalam sediaan ini jumlahnya sangat sedikit dan variasi penggunaan polimernya tidak mempengaruhi nilai viskositas dari sediaan. Selain itu variasi kecepatan homogenisasi dan variasi lama waktu homogenisasi juga tidak mempengaruhi nilai viskositas dari sediaan. Viskositas dari suatu sistem nanopartikel tidak boleh terlalu tinggi karena jika viskositasnya tinggi dapat menyebabkan partikel yang terdapat di dalamnya akan saling menempel sehingga mengakibatkan terjadinya aglomerasi (Gupta, 2006).

Determinasi Ukuran dan Distribusi Ukuran Partikel

Berdasarkan tabel 3 dapat dilihat bahwa sistem nanopartikel dengan zat aktif kurkumin yang divariasikan jumlah penggunaan polimernya menghasilkan ukuran yang berbeda signifikan, namun tetap pada ukuran di bawah 1000 nm. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa polimer PVP merupakan polimer yang efektif yang dapat dimanfaatkan sebagai pembawa sistem nanopartikel

dimana PVP tersebut akan menyalut partikel-partikel kurkumin yang berukuran sangat kecil yang terdispersi dalam medium hingga membentuk suatu sistem nanokapsul. Melalui proses penyalutan tersebut, maka PVP akan menghambat proses rekristalisasi dari bahan aktif sehingga pada akhirnya kelarutan dari zat aktif akan meningkat (Feng Lin Yen *et al.*, 2010).

Tabel 3. Ukuran dan Distribusi Ukuran Partikel Sistem Nanopartikel dengan Variasi Jumlah PVP

Formula	Jumlah Kur:PVP	Ukuran (nm)	Distribusi Ukuran Partikel (nm)		
			D (10%)	D (50%)	D (90%)
FA	1:2	150,4±37,2	109,7	135,4	190,3
FB	1:6	130,1±35,7	93,4	115,4	167,6
FC	1:10	64,8±19	47,1	56,7	83,4

Dalam penelitian ini didapatkan bahwa semakin banyak jumlah polimer yang digunakan maka semakin kecil ukuran partikel. Hal tersebut dikarenakan semakin banyak jumlah polimer yang digunakan maka semakin sedikit kurkumin yang tidak terlarut dalam air, dimana polimer akan menyalut partikel-partikel kurkumin kecil yang terdispersi tersebut. Semakin sedikitnya partikel yang tidak larut dalam air maka semakin berkurang kecenderungan penggabungan antar partikel kurkumin sehingga ukuran partikel menjadi kecil.

Tabel 4. Ukuran dan Distribusi Ukuran Partikel Sistem Nanopartikel dengan Variasi Kecepatan Homogenisasi

Formula	Jumlah Kur:PVP	Ukuran (nm)	Distribusi Ukuran Partikel (nm)		
			D (10%)	D (50%)	D (90%)
FP	1:10	54,2±15,7	39,7	47,5	69,3
FQ	1:10	64,6±18,3	47,9	56,5	82,2
FR	1:10	76,8±21,6	56,7	67,3	97,7

Pada Tabel 4 terlihat bahwa semakin besar kecepatan homogenisasi maka semakin besar ukuran partikelnya. Kecepatan homogenisasi mempengaruhi ukuran partikel. *Proses homogenisasi* dapat menghasilkan energi yang dapat digunakan untuk menurunkan tegangan permukaan dan membantu memperbesar luas permukaan partikel sehingga didapatkan ukuran partikel yang lebih kecil. Akan tetapi masalah yang timbul akibat pengecilan ukuran partikel dengan kecepatan homogenisasi yang tinggi adalah terjadinya aglomerasi. Hal ini disebabkan karena proses homogenisasi dengan kecepatan tinggi akan mempercepat penguapan pelarut hingga konsentrasi polimer akan meningkat yang menyebabkan viskositas meningkat. Dalam keadaan ini partikel yang satu dengan yang lain akan mudah menempel sehingga ukuran partikel menjadi lebih besar (Gupta, 2006).

Tabel 5. Ukuran dan Distribusi Ukuran Partikel Sistem Nanopartikel dengan Variasi Waktu Homogenisasi

Formula	Jumlah Kur:PVP	Ukuran (nm)	Distribusi Ukuran Partikel (nm)		
			D (10%)	D (50%)	D (90%)
FX	1:10	31,6±8,8	23,7	27,6	39,6
FY	1:10	57,8±16,5	42,9	50,5	73,6
FZ	1:10	88,4±24,9	65,6	77,0	111,6

Pada Tabel 5 terlihat bahwa semakin lama proses homogenisasi maka semakin besar ukuran partikelnya. Lama proses homogenisasi mempengaruhi ukuran partikel. Proses homogenisasi dapat menghasilkan energi yang dapat digunakan untuk menurunkan

tegangan permukaan dan membantu memperbesar luas permukaan partikel sehingga didapatkan ukuran partikel yang lebih kecil. Akan tetapi masalah yang timbul akibat pengecilan ukuran partikel dengan proses homogenisasi yang terlalu lama adalah terjadinya aglomerasi. Hal ini disebabkan karena proses homogenisasi dengan rentang waktu yang lama akan menyebabkan viskositas meningkat. Dalam keadaan ini partikel yang satu dengan yang lain akan mudah menempel sehingga ukuran partikel menjadi lebih besar (Gupta, 2006).

Tabel 6. Ukuran dan Distribusi Ukuran Partikel Kurkumin Nanopartikel dan Kurkumin Non Nanopartikel

Formula	Jumlah Kur:PVP	Ukuran (nm)	Distribusi Ukuran Partikel (nm)		
			D (10%)	D (50%)	D (90%)
Kurkumin Nanopartikel	1:10	31,6±8,8	23,7	27,6	39,6
Kurkumin Non Nanopartikel	1:10	999,2±264,8	767,7	876,5	1235,6

Pada Tabel 6 terlihat perbandingan ukuran partikel yang cukup jauh antara formula kurkumin yang dibuat sistem nanopartikel dengan perlakuan homogenisasi dan ultrasonikasi terhadap formula kurkumin yang tidak dibentuk dalam sistem nanopartikel dengan tidak diberi perlakuan homogenisasi dan ultrasonikasi.

Nilai Indeks Polidispersitas Nanopartikel

Nilai indeks polidispersitas dari setiap formula ditentukan dengan alat *Particle Size Analyzer*. Nilai indeks polidispersitas dari masing-masing formula dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Nilai Indeks Polidispersitas

Formula	Nilai Indeks Polidispersitas
FA	0,282
FB	0,177
FC	0,126
FP	0,286
FQ	0,449
FR	0,426
FX	0,286
FY	0,474
FZ	0,443
Kurkumin Non Nanopartikel	1,392

Indeks polidispersitas merupakan parameter yang menyatakan distribusi ukuran partikel dari suatu sistem nanopartikel. Nilai indeks polidispersitas yang kurang dari 0,3 menunjukkan bahwa distribusi ukuran partikel yang sempit. Hal ini dapat dilihat dari ukuran partikel yang kecil dan distribusi ukuran partikel yang homogen. Sedangkan nilai polidispersitas lebih dari 0,3 ($PI > 0,3$) menunjukkan bahwa distribusi ukuran partikel yang sangat luas. Nilai indeks polidispersitas menyatakan kestabilan dari suatu sistem nanopartikel, semakin besar nilai indeks polidispersitas menunjukkan semakin banyak partikel yang beragregasi sehingga sediaan semakin tidak stabil (Feng Lin Yen *et al.*, 2010).

Nilai Zeta Potensial Nanopartikel

Nilai zeta potensial sistem nanopartikel ini ditentukan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* dengan metode *Electrophoretic Light Scattering* (ELS).

Nilai zeta potensial dari nanopartikel ini secara umum digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan nanopartikel tersebut. Karakteristik permukaan partikel dari sistem nanopartikel mempengaruhi stabilitas nanopartikel. Partikel dengan nilai zeta potensial lebih positif dari +30 mV atau lebih negatif dari -30 mV diprediksi stabil selama penyimpanan dan tidak terjadi agregasi antar partikel (Mohanraj dan Y Chen, 2006).

Nilai zeta potensial yang diperoleh dari masing-masing formula A, B, dan C berturut-turut adalah -50,43 mV, -58,62 mV, dan -59,49 mV yang dapat dilihat pada lampiran 4. Ketiga formula tersebut memiliki nilai zeta potensial lebih negatif dari -30 mV, sehingga dapat diprediksi bahwa sistem nanopartikel tersebut cenderung stabil. Pengukuran zeta potensial juga dilakukan kepada formula X yaitu formula yang menghasilkan ukuran partikel terkecil, dimana zeta potensial untuk formula X adalah -59,53 mV sehingga dapat dikatakan bahwa kecepatan dan lama waktu homogenisasi tidak mempengaruhi nilai zeta potensial.

Persen Enkapsulasi Kurkumin

Perhitungan persen enkapsulasi kurkumin dilakukan dengan membandingkan konsentrasi kurkumin yang terenkapsulasi ke dalam polimer dibandingkan dengan konsentrasi awal kurkumin dalam sistem nanopartikel.

Persentase enkapsulasi kurkumin dalam sistem nanopartikel kurkumin-PVP untuk formula A, B, dan C berturut-turut adalah 45%, 83%, dan 97%. Dari hasil ini terlihat bahwa persentase enkapsulasi kurkumin pada formula C adalah paling besar dibandingkan dengan formula A dan B. Hal ini disebabkan karena jumlah polimer yang digunakan pada formula C lebih banyak dibandingkan dengan formula A dan B. Secara umum dapat disimpulkan bahwa jumlah polimer PVP yang digunakan akan mempengaruhi persentase enkapsulasi sistem nanopartikel, semakin banyak jumlah polimer PVP yang digunakan maka semakin besar persen enkapsulasinya dan semakin baik sistem nanopartikel yang terbentuk.

Pengukuran persen enkapsulasi kurkumin ini juga dilakukan terhadap formula X yang merupakan formula dengan ukuran partikel terkecil. Hasil persen enkapsulasi dari formula X adalah 98% yang membuktikan bahwa variasi kecepatan dan lama waktu homogenisasi tidak mempengaruhi besar persen enkapsulasinya. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa formula X merupakan formula yang baik karena persen enkapsulasi kurkuminnya mendekati 100%.

Stabilitas Sistem Nanopartikel

Pengujian stabilitas dari sistem nanopartikel ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat stabilitas fisik dari sistem nanopartikel yang terdiri dari pH, viskositas, dan terutama dalam hal ukuran dan distribusi ukuran partikelnya.

Berdasarkan data yang terdapat pada tabel 8 dapat dilihat bahwa selama penyimpanan 30 hari dengan tiga

kondisi yang berbeda pH serta viskositas dari sediaan nanopartikel polimerik ini tidak mengalami perubahan yang signifikan.

Tabel 8. Hasil Stabilitas pH dan Viskositas Sistem Nanopartikel Kurkumin

No	Kondisi Penyimpanan	pH		Viskositas	
		Hari ke-15	Hari ke-30	Hari ke-15	Hari ke-30
1	25 ± 2 °C RH 75%	5,36	5,30	1022	1026
2	25 ± 2 °C RH 75% dan Pengadukan	5,35	5,37	1018	1014
3	5 ± 3 °C	5,37	5,35	1026	1028

Gambar 3. Grafik Stabilitas Ukuran Partikel Sistem Nanopartikel Kurkumin

Berdasarkan hasil pengujian stabilitas fisik sistem nanopartikel yang dapat dilihat pada gambar 3 maka dapat diketahui bahwa tidak terjadi perubahan ukuran partikel yang signifikan terutama pada kondisi penyimpanan suhu ruang yaitu 25±2 °C dengan RH 75±5%. Untuk kondisi penyimpanan 25±2 °C dan RH 75±5% dengan pengadukan yang konstan terjadi sedikit perubahan ukuran partikel yang disebabkan oleh proses pengadukan. Proses pengadukan selama penyimpanan dapat menyebabkan timbulnya energi kinetik di dalam sistem nanopartikel, dimana dalam beberapa kasus hal tersebut dapat mengurangi stabilitas fisik suatu sediaan karena terjadinya aglomerasi. Sedangkan untuk kondisi penyimpanan pada suhu 5±3 °C terjadi perubahan ukuran partikel. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh ketidakstabilan sistem nanopartikel yang dipengaruhi oleh suhu, dimana suhu yang rendah dapat mengurangi kelarutan dan mendorong pertumbuhan partikel yang nantinya akan mengakibatkan terjadinya rekristalisasi (Pardeike *et al.*, 2011).

Uji Sitotoksik Terhadap Sel Kanker MCF-7

Uji sitotoksik ini dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan tingkat toksisitas dari kurkumin yang dibentuk dalam sistem nanopartikel terhadap kurkumin yang tidak dibentuk sistem nanopartikel. Uji sitotoksik ini dilakukan melalui MTT assay yang merupakan uji in vitro dengan menggunakan kultur sel untuk mendeteksi adanya efek sitotoksik dari suatu senyawa. Sel hidup akan membentuk kompleks formazan berwarna kuning akibat reaksi reduksi garam tetrazolium MTT pada rantai respirasi mitokondria sel hidup tersebut. Pengujian ini merupakan uji kualitatif dengan cara menetapkan kematian sel.

Tabel 9. Persen Penghambatan Kurkumin terhadap Proliferasi Sel Kanker MCF-7

Zat Uji	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)									IC ₅₀
	125	63	31	16	8	4	2	1	0,5	
Kurkumin Nanopartikel	0	0	0	62	56	55	52	43	33	1,7
Kurkumin Non Nanopartikel	0	0	0	59	42	38	37	37	36	11,7

Untuk data sitotoksitas dari kurkumin nanopartikel dan kurkumin yang tidak dibentuk dalam sistem nanopartikel dapat dilihat pada tabel 9.

Dari hasil perhitungan diketahui bahwa formula kurkumin yang dibentuk dalam sistem nanopartikel (formula X) memiliki nilai IC₅₀ yang lebih rendah dibandingkan dengan formula kurkumin yang tidak dibentuk sistem nanopartikel. Semakin rendah nilai IC₅₀, maka semakin baik dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7.

Observasi Cellular Uptake Terhadap Sel Kanker MCF-7

Pengujian cellular uptake merupakan uji kualitatif yaitu dengan melihat fluoresensi yang dapat diberikan oleh suatu senyawa ketika dilihat di bawah mikroskop fluoresens. Pengujian *cellular uptake* dilakukan untuk melihat kemampuan dari sediaan nanopartikel menembus membran dan masuk ke dalam sel.

Gambar 4. Hasil Pengamatan Uji Cellular Uptake dengan menggunakan mikroskop fluoresens perbesaran 40X (a,b) dan Perbesaran 200X (c,d)

Berdasarkan hasil pengamatan, maka dapat dilihat bahwa kurkumin yang dibentuk dalam sistem nanopartikel memberikan fluoresensi yang lebih banyak dibandingkan dengan kurkumin yang tidak dibentuk dalam sistem nanopartikel. Hal ini menunjukkan bahwa kurkumin yang dibentuk sistem nanopartikel memiliki kemampuan masuk ke dalam sel yang lebih baik dibandingkan dengan kurkumin yang tidak dibentuk dalam sistem nanopartikel.

Simpulan

Formulasi yang menghasilkan sistem nanopartikel polimerik dengan ukuran partikel terkecil yaitu 31,6 nm adalah formula X (Kurkumin 50 mg, PVP 500 mg, etanol 25 ml, dan larutan PVA 0,1% 75 ml) dengan proses homogenisasi kecepatan 17.000 rpm selama 12 menit 30 detik, sonikasi selama 30 menit, pengadukan mekanik selama 2 jam dan penguapan pelarut hingga

volume sediaan menjadi ± 75 ml.

Kurkumin yang dibuat dalam sistem nanopartikel (IC₅₀ 1,7 ppm) memberikan sitotoksitas terhadap sel kanker payudara MCF-7 yang lebih baik dibandingkan dengan kurkumin yang tidak dibentuk dalam sistem nanopartikel (IC₅₀ 11,7 ppm).

Kurkumin yang dibuat dalam sistem nanopartikel memiliki kemampuan cellular uptake yang lebih baik dibandingkan dengan kurkumin yang tidak dibuat dalam sistem nanopartikel terhadap sel kanker MCF-7.

Daftar Pustaka

- Chabib, Luthfi, Ronny Martien, and Hilda Ismail. 2012. *Formulation of Nanocurcumin Using Low Viscosity Chitosan Polymer and Its Cellular Uptake Study Into T47D Cells*. In: Indonesian J. Pharm. Vol 23 No. 1: 27-35.
- Feng Lin Yen, et al. 2010. *Curcumin Nanoparticle Improve the Physicochemical Properties of Curcumin and Effectively Enhance Its Antioxidant and Antihepatoma Activities*, In: Journal of Agricultural and Food Chemistry Article. Vol 58: 7376-7382. Taiwan.
- Gupta, R. B., U. B. Kompella (Eds). 2006. *Nanoparticles Technology for Drug Delivery*. Taylor & Francis Group. New York. 1-130.
- Mohanraj, VJ., and Y Chen. 2006. *Nanoparticles-A Review*. Nigeria. In: Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 5(1): 561-573
- Mohanty C and Sahoo SK. 2010. *The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticle formulation*. In: Biomaterials 31:6597-6611.
- Pardeike, Jana, Daniela M. Strohmeier, Nina Schrod, Christine Voura, Michael Gruber, Johannes G. Khinast, Andreas Zimmer. 2011. *Nanosuspensions as advanced printing ink for accurate dosing of poorly soluble drugs in personalized medicines*, In: International Journal of Pharmaceutics. Austria.
- Perdana, Dian. 2007. *Pengembangan Awal Sistem Pembawa Polimerik Berbasis Nanopartikel*. Sekolah Farmasi. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Rowe, R.C., P.J. Sheskey, and S. C. Owen (Eds). 2006. *Handbook of Excipients*. 5th edition. Pharmaceutical Press, London.
- Shangpeng, Wang., Miao Tan, Zhangfeng Zhong, Meiwang Chen, Yitao Wang. 2011. *Nanotechnologies of curcumin: an ancient puzzler meets modern solutions*. In: Journal of Nanomaterials. Volume 2011(2011), Article ID 723178, 8 Pages.
- Stegemann S, Leveiller F, Franchi D, de Jong H, Lindén H. 2007. *When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept*. In: Eur J Pharm Sci 31:249-61.