

**PENGEMBANGAN SISTEM PEMBAWA ALBUMIN NANOPARTIKEL
UNTUK SILIMARIN DAN KAJIAN SIFAT FISIK SERTA PROFIL
PELEPASANNYA SECARA *IN VITRO***

Rini Ambarwati¹, Heni Rachmawati²

¹*Universitas Pakuan, Bogor*

²*Program Studi Magister Farmasetika, ITB, Bandung*

ABSTRAK

Silimarin merupakan senyawa flavonolignan yang berasal dari tumbuhan *Silybum marianum* (Asteraceae). Silimarin memiliki efek farmakologi sebagai antikanker dan hepatoprotektor, tetapi senyawa ini memiliki kelarutan yang rendah dalam air. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan formulasi silimarin dalam sistem pembawa nano dengan teknik desolvasi. Pembawa yang digunakan adalah serum albumin (bovine serum albumin/BSA). Kombinasi silimarin dalam BSA diharapkan dapat meningkatkan efikasi silimarin sebagai anti kanker karena permeabilitas BSA yang lebih baik pada sel kanker. Evaluasi standar terhadap nanopartikel silimarin-BSA meliputi ukuran dan distribusi ukuran partikel, zeta potensial, morfologi nanopartikel, kristalinitas, sifat termal, spektroskopi inframerah, efisiensi penjeratan serta profil pelepasan silimarin dari BSA nanopartikel pada 2 media berbeda (HCl 0,1 N & PBS pH 7,4). Nanopartikel BSA-silimarin memiliki ukuran partikel $174,23 \pm 13,94$ nm; distribusi ukuran partikel $0,185 \pm 0,052$; efisiensi penjeratan $90,54 \pm 0,098$ %; *loading capacity* $30,18 \pm 0,036$ % dan zeta potensial -1,62 mV. Hasil analisis menggunakan DSC (*differential scanning calorimetry*), XRD (*X-ray diffraction*) dan spektroskopi inframerah menunjukkan bahwa nanopartikel silimarin berhasil terenkapsulasi di dalam nanopartikel BSA, dan BSA-silimarin memiliki bentuk amorf. Setelah 1 jam uji pelepasan, terdapat sebanyak 21,89% silimarin terlepas dalam HCl 0,1 N dan 54,84% silimarin terlepas dalam PBS pH 7,4 sehingga dapat disimpulkan bahwa silimarin-BSA memiliki kelarutan yang baik dalam air. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian lebih lanjut untuk mengkaji aktivitas serta perilaku silimarin-BSA *in vivo* untuk mengkonfirmasi data *in vitro*.

Kata kunci: Nanopartikel, Silimarin, BSA, Desolvasi, Albumin, *Desolvating agent*

**DEVELOPMENT OF SILIMARIN NANOPARTICLES CARRYING SYSTEM
AND THE STUDY OF ITS PHYSICAL AND RELEASE PROFILE IN VITRO**

ABSTRACT

Silimarin is a flavonolignan compound derived from *Silybum marianum* (Asteraceae) plant. Silimarin has a pharmacological effects as an anticancer and hepatoprotector substance, but the solubility of this compound is very low in the water. The purpose of this study was to develop a silimarin formulation in bovine serum albumin (BSA) nano-carrying system using desolvation technique. Since the BSA was more permeable in the cancer cell, the combination of silimarin in BSA was expected to increase the efficacy of silimarin as an anti-cancer. Standard evaluations of BSA-silimarin nanoparticles include particle size and distribution, potential zeta, morphology of nanoparticles, crystallinity, thermal properties, infrared spectroscopy and efficiency of trapping and silimarin release profiles of BSA nanoparticles on 2 different media (HCl 0.1 N & PBS pH 7.4). BSA-silimarin nanoparticles have a particle size of 174.23 ± 13.94

nm; particle size distribution 0.185 ± 0.052 ; efficiency of snares $90.54 \pm 0.098\%$; loading capacity $30.18 \pm 0.036\%$ and zeta potential -1.62 mV. Results of analysis using DSC (differential scanning calorimetry), XRD (X-ray diffraction) and infrared spectroscopy showed that silimarin nanoparticles was successfully encapsulated in BSA nanoparticles whereas the BSA-silimarin have an amorphous form. After 1 hour of release test, there were 21.89% of silymarin released in 0.1 N HCl and 54.84% of silymarin were released in PBS pH 7.4. It can be concluded that silimarin-BSA has good solubility in water. Therefore, further study is recommended to assess activity and *in vivo* behavior to confirm *in vitro* data.

Keywords: Nanoparticle, Silimarin, BSA, Desolvation, Albumine, Desolvating agent

PENDAHULUAN

Silimarin merupakan senyawa flavonolignan yang berasal dari tumbuhan *Silybum marianum* (Asteraceae) yang memiliki efek farmakologi sebagai antikanker, dan hepatoprotektor. Namun silimarin memiliki kelarutan yang rendah dalam air sekitar 0,04 mg/mL (Snima dkk., 2014). Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengatasi masalah silimarin sebagai obat. Pada penelitian ini perbaikan ketersediaan hayati silimarin dilakukan dengan pendekatan sistem pembawa berbasis teknologi nano untuk mengenkapsulasi silimarin.

Berbagai sistem pembawa tersedia untuk proses enkapsulasi suatu obat yang bermasalah baik dalam formulasi maupun penghantarannya. Pada penelitian ini, dipilih protein, yaitu serum albumin. Dasar pertimbangan pemilihan albumin sebagai sistem pembawa adalah: inert, biokompatibel, relatif murah, mempunyai kemampuan membentuk nanopartikel dengan berbagai teknik, serta yang terpenting adalah kemampuan terpenetrasi lebih baik dan lebih banyak ke sel kanker dibandingkan sel normal. Sehingga, pemilihan albumin sebagai sistem pembawa silimarin diharapkan dapat meningkatkan efek antikanker dari silimarin (*active targeting*) (Yuan dkk., 2013).

Banyak terapi kanker secara konvensional masih menghadapi

permasalahan yaitu akumulasi non spesifik dalam jaringan sel kanker. Dengan demikian, BSA sebagai pembawa diharapkan akan meningkatkan akumulasi silimarin ke sel kanker dan menekan distribusinya ke sel normal. Beberapa teknik pembuatan albumin nanopartikel, diantaranya teknik desolvasi dan emulsifikasi. Kekurangan dari metode emulsifikasi adalah penggunaan pelarut organik dan surfaktan sebagai penstabil sistem emulsi. Keduanya sangat sulit dihilangkan pada saat proses preparasi nanopartikel albumin (Langer, 2003). Maka dipilih menggunakan teknik desolvasi. Teknik desolvasi pada prinsipnya adalah mengubah kelarutan dari albumin di dalam air, dengan menambahkan faktor pendesolvasi. Kemudian ditambahkan *cross-link* untuk meningkatkan rigiditas dari nanopartikel yang terbentuk.

Pada penelitian ini, akan dikembangkan sistem pembawa nanopartikel berbasis albumin untuk silimarin, dengan teknik desolvasi. Karakterisasi kemudian dilakukan pada nanopartikel yang dibuat.

METODE PENELITIAN

Bahan

Silimarin (Sigma Aldrich), BSA (Sigma Aldrich), NaOH, Aseton, Glutaraldehyd (Merck), HCl, dapar fosfat

pH 7,4 (komponen penyusun dapar : KCl, NaH₂PO₄, NaCl, dan Na₂HPO₄)

analisis termal dengan DSC, dan difraktometri sinar-X.

Alat

Neraca Analitik (Mettler Toledo[®] XS205), pengaduk magnetic, *stirrer*, sonikator tipe *bath* (Krisbow ultrasonic Cleaner), alat analisis ukuran partikel dan zeta potensial (Delsa[™] Nano C Particle Analyzer, Beckman Coulter), pH meter (Mettler Toledo[®] S20), *Scanning Electron Microscope*, Difraktometer sinar-X (Bruker, 8D Advance), jarum suntik 1 mL (Terumo), Spektrometer inframerah (FTIR-Shimadzu 8501), Spektrofotometer UV (Beckman DU 7500i), Vortex Mixer (IKA[®] MS 3 digital), alat mikrosentrifuga (Hsiang Tai), tabung mikrosentrifuga, kuvet *disposable*, dan alat gelas lain yang umum digunakan di laboratorium.

Evaluasi Pelepasan Silimarin dari Nanopartikel BSA-Silimarin secara *In vitro*

Uji pelepasan silimarin dari nanopartikel BSA-silimarin dilakukan pada dua medium yang berbeda PBS pH 7,4 (simulasi cairan darah) dan HCl 0,1 N (simulasi cairan lambung) pada suhu 37°C, kecepatan pengadukan 100 rpm, selama 1 jam. Pada interval waktu yang ditentukan (15; 30; 45;60 menit) diambil cuplikan sampel sebanyak 4 mL, dan ditambahkan medium kembali sebanyak 4 mL agar volume mediumnya tetap. Kadar silimarin ditentukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV pada panjang gelombang 288 nm.

Pembuatan Nanopartikel BSA mengandung Silimarin

Formula optimum pada pembuatan nanopartikel BSA digunakan untuk membuat nanopartikel BSA yang mengandung silimarin. Berbagai jumlah silimarin (7,5; 15; dan 30 mg) ditambahkan ke larutan BSA, selanjutnya dilakukan proses yang sama dengan proses pembentukan nanopartikel albumin blanko.

Karakterisasi Nanopartikel

Karakterisasi fisika nanopartikel meliputi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial, morfologi nanopartikel, spektroskopi inframerah,

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ukuran, Indeks Polidispersitas, Zeta Potensial, Efisiensi Penjeratan, dan *Loading Capacity*

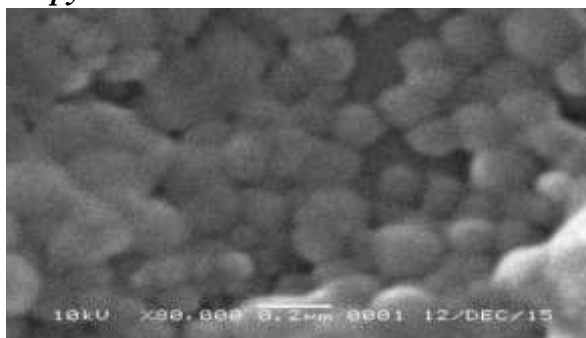
Pada tahapan optimasi pemuatan silimarin ke dalam nanopartikel albumin, semakin banyak jumlah silimarin yang ditambahkan menghasilkan ukuran nanopartikel yang lebih besar. Silimarin yang ditambahkan sebanyak 7,5 ;15 ;dan 30 mg memberikan efisiensi penjeratan berturut-turut $90,39 \pm 0,157$; $90,54 \pm 0,098$; dan $89,75 \pm 1,317$ %. *Loading Capacity* nya secara berturut-turut adalah $18,076 \pm 0,030$; $30,18 \pm 0,036$; dan $44,88 \pm 0,666$ %.

Tabel 1. Pengaruh Jumlah Silimarin terhadap Karakteristik Nanopartikel BSA-silimarin

Jumlah Zat Aktif (mg)	Ukuran Nanopartikel (nm)	Indeks Polidispersitas	Zeta potensial (mV)	Efisiensi Penjeratan (%)	<i>Loading Capacity</i> (%)
-	114,27± 11,24	0,269 ± 0,118	-0,10	-	-
7,5	121,47 ± 1,167	0,177 ± 0,069	-0,65	90,39 ± 0,157	18,076 ± 0,030
15	174,23 ± 13,94	0,185 ± 0,052	-1,62	90,54 ± 0,098	30,18 ± 0,036

30	$313,77 \pm 13,36$	$0,297 \pm 0,036$	-2,11	$89,75 \pm 1,317$	$44,88 \pm 0,666$
----	--------------------	-------------------	-------	-------------------	-------------------

Scanning Electron Microscopy

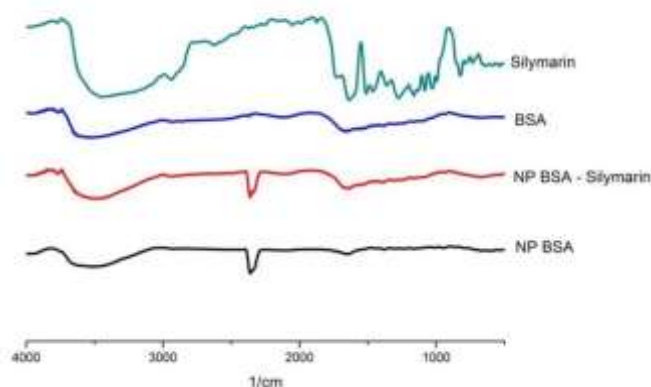


Gambar 1. Pengamatan SEM nanopartikel BSA-silimaritin perbesaran 80.000x (C)Fotomikrograf SEM di atas menunjukkan bahwa nanopartikel BSA-silimaritin memiliki bentuk morfologi berupa partikel sferis, walaupun terlihat kohesif karena sifat adesif dari BSA.

Spektroskopi Inframerah

Prosedur pengujian analisis spektroskopi inframerah untuk nanopartikel BSA, nanopartikel BSA-Silimaritin, BSA dan silimaritin tidak dilakukan penggerusan, hal ini bertujuan untuk menjaga keutuhan sistem. Dari hasil *overlay* menunjukkan bahwa pita-pita spektrum antara Nanopartikel BSA-

Silimaritin mirip dari nanopartikel BSA, dan tidak terlihat lagi puncak dari silimaritin. Hal ini menunjukkan bahwa silimaritin berada dalam nanopartikel sehingga tidak terdeteksi. Untuk memastikan hasil tersebut, maka dilakukan karakteristik selanjutnya yaitu Difraktometri Sinar-X, dan Analisis Termal DSC.



Gambar 2. Spektrum Inframerah Nanopartikel BSA, Nanopartikel BSA-Silimaritin, BSA, & Silimaritin

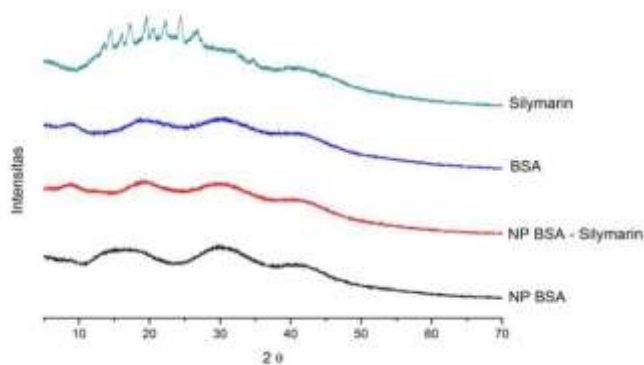
Difraktometri Sinar-X

Difraktogram dari Silimaritin terlihat puncak-puncak difraksi yang tajam dan kuat, dan juga terdapat puncak-puncak dengan intensitas yang rendah. Difraktogram nanopartikel BSA-silimaritin

terlihat puncak difraksi sinar-X yang lebar, ini menunjukkan bahwa nanopartikel BSA-silimaritin bersifat amorf (77,3%). Difraktogram nanopartikel BSA-silimaritin menunjukkan adanya peningkatan puncak difraksi pada θ yang ke 10, dibandingkan

dari difraktogram nanopartikel BSA. Dari hasil *overlay*, difraktogram nanopartikel BSA-silimarin menunjukkan pola yang sama dengan difraktogram dari BSA dan nanopartikel BSA dibandingkan

difraktogram dari silimarin, hal ini menunjukkan bahwa silimarin berada di dalam sistem nanopartikel BSA (Ding dkk., 2013).

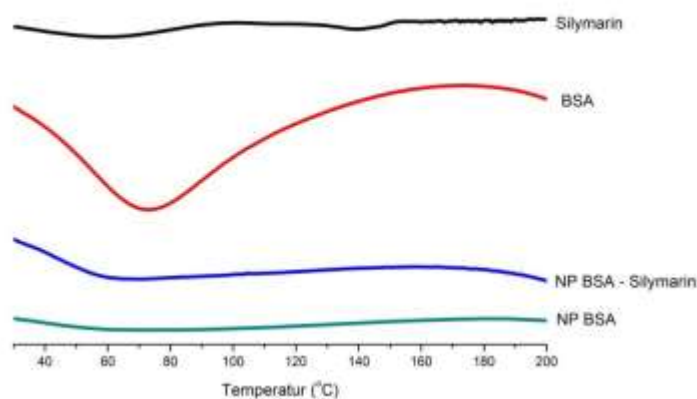


Gambar 3. X-ray difraktogram Nanopartikel BSA, Nanopartikel BSA-Silimarin, BSA, & Silimarin

Analisis termal (DSC)

Pada nanopartikel BSA-silimarin terdeteksi adanya Tg pada temperatur 28,25°C, puncak endotermik pada 62,32°C. Sedangkan pada BSA terdeteksi adanya Tg pada temperatur 34,51°C dan puncak endoterm pada temperatur 71,86°C. Menurut Lai dkk. (2000), Tg pada suhu sekitar 30°C adalah sub Tg sedangkan pada temperatur yang lebih tinggi disebut Tg. Nilai sub Tg dapat berhubungan dengan kandungan lembab dari sampel yang dianalisis dimana penurunan nilai tersebut berhubungan

dengan peningkatan aktivitas air pada sampel. Terjadi penurunan Tg pada nanopartikel BSA dan Nanopartikel BSA-silimarin dibandingkan dengan Tg BSA nya. Hal ini menunjukkan kelembaban dari Nanopartikel yang terbentuk lebih tinggi karena pada pembuatan nanopartikel dengan teknik desolvasi menggunakan air sebagai pelarut dari BSA. Puncak endotermik dari Silimarin tertutupi oleh BSA dalam Nanopartikel BSA-Silimarin, hal ini mengindikasikan bahwa Silimarin terenkapsulasi oleh BSA.



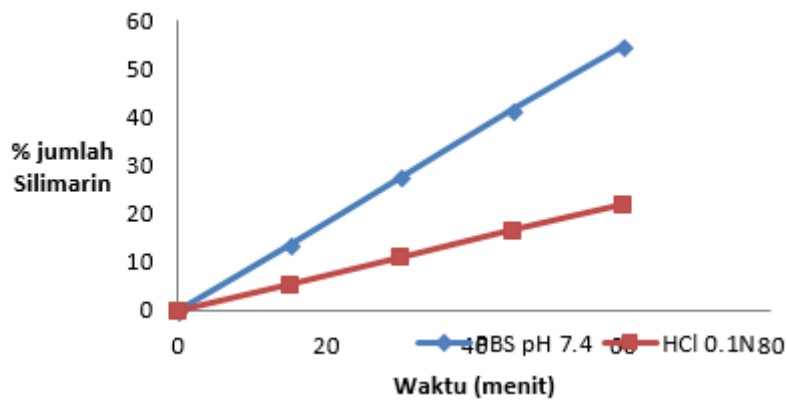
Gambar 4. Profil DSC dari Nanopartikel BSA, Nanopartikel BSA-Silimarin, BSA,

& Silimarin

Evaluasi Pelepasan Zat Aktif Secara *In Vitro*

Pada umumnya, kecepatan pelepasan obat bergantung pada kelarutan, desorpsi permukaan, difusi melalui matriks polimer dan degradasi matriks nanopartikel (Mahapatro dan Singh, 2011). Dari Gambar 5 dapat dilihat jumlah Silimarin yang terlepas pada medium HCl (mensimulasikan cairan lambung) pada 15 menit pertama terlepas sebesar 5,40%; kemudian berlanjut 30 menit 10,96%; 45

menit terlepas 16,63%; dan pada menit ke 60 terlepas sebesar 21,89 %. Diharapkan silimarin tidak terlepas dalam cairan lambung. Hasil uji menunjukkan bahwa silimarin terlepas, meskipun <25% setelah 1 jam. Sistem nanopartikel BSA-silimarin diharapkan terabsorpsi secara utuh. Akan tetapi jika diperhatikan dari ukurannya (>100 nm), sulit sistem ini bisa terabsorpsi melalui jalur paraseluler, sehingga pemberian oral perlu dipertimbangkan.



Gambar 5. Profil pelepasan *in vitro* dari Nanopartikel BSA-Silimarin

Tabel 2. Hasil Uji Pelepasan Silimarin

Waktu (menit)	Jumlah Silimarin yang terlepas (%)	
	PBS pH 7,4	HCl 0,1 N
15	13,54 ± 1,326	5,4 ± 3,239
30	27,55 ± 2,39	10,96 ± 6,838
45	41,59 ± 4,427	16,93 ± 8,052
60	54,84 ± 5,916	21,89 ± 10,722

Alternatifnya adalah melalui rute intramuskular. Oleh karena itu, dilakukan juga uji pelepasan dalam medium PBS pH7,4 (simulasi dalam darah). Pada medium PBS pH 7,4 jumlah Silimarin yang terlepas pada menit ke 15 pertama adalah sebesar 13,54%; 30 menit sebesar 27,55%; pada menit ke 45 terlepas sebesar 41,59%; dan pada menit ke 60 terlepas sebesar 54,84 %. Setelah 1 jam pemberian, Silimarin yang lepas sebesar 54,84%, jumlah yang cukup besar jika sistem nanopartikel BSA-silimarin diinginkan

untuk tujuan bertarget ke sel kanker. Jika waktu distribusi nanopartikel BSA-silimarin menuju ke sasaran kurang dari 30 menit, maka tujuan akumulasi sistem ini akan tercapai dan diharapkan setelah mencapai sel kanker, sistem akan mengalami endositosis diperantarai oleh reseptor spesifik BSA dan melepaskan silimarin intraseluler. Untuk membuktikan dugaan ini, perlu dilakukan kajian yang lebih mendalam.

SIMPULAN

Nanopartikel BSA dengan teknik desolvasi menggunakan aseton berhasil mengenkapsulasi silimarín. Karakteristik sistem ini adalah memiliki ukuran partikel $174,23 \pm 13,94$ nm; indeks polidispersitas $0,185 \pm 0,052$; efisiensi penjeratan $90,54 \pm 0,098$ %; *loading capacity* $30,18 \pm 0,036$ % dan zeta potensial $-1,62$ mV. Hasil analisis menggunakan DSC, Difraktometri sinar-x, dan spektroskopi inframerah menunjukkan bahwa silimarín berada di dalam sistem nanopartikel BSA.

DAFTAR PUSTAKA

- Ding, D., X. Tang, X. Cao, J. Wu, A. Yuan Q. Qiao, J. Pan, J. Hu. 2014. Novel Self-assembly endows human serum albumin nanoparticles with an enhanced antitumor efficacy. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 5(1): 213-22.
- Lai, Y.C., P.H. Sung dan J.T. Chen, J.T. 2000. Evaluation of compability of rice strach and pectins by glass transition and sub-tg endotherms and the effect of compability on gel viscosity and water loss. *Cereal Chem*. 77(5): 544-550.
- Langer, K., S. Balthasar, V. Vogel, N. Dinauer, H. Von Briesen dan Schubert, D. 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 257. 169–180.
- Mahapatro, A. dan D.K. Singh. 2011. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vitro delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*. 9(55): 1-11.
- Snima, K.S., P. Arunkumar, R. Jayakumar, V.K. Lakshmanan. 2014. *Silymarin encapsulated poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: a prospective candidate for prostate cancer therapy*. J. Biomed. Nanotechnol. 10: 559-570.
- Yuan, A., J. Wu, C. Song, X. Tang, Q. Qiao, L. Zhao, G. Gong dan Y. Hu. 2013. A Novel Self-Assembly Albumin Nanocarrier for Reducing Doxorubicin-Mediated Cardiotoxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 102(5): 1626-1635.