

# Perbandingan Stabilitas Nanopartikel Eritropoietin dalam Asam Klorida dan *Phosphate Buffer Saline*

Nuryanti<sup>1,3</sup>, Akmad Kharis Nugroho<sup>1\*</sup>, Ronny Martien<sup>1</sup>, Madarina Julia<sup>2</sup>

## Artikel Penelitian

**Abstract:** The erythropoietin nanoparticle system is formed from the interaction of the positive charge of chitosan and the negative charge of pectin under acidic conditions, so the stability of the nanoparticle system in hydrochloric acid and phosphate buffer Salin (PBS) is critical parameter in the choice of permeation medium. This study aimed to compare the stability of the erythropoietin nanoparticle system in HCl pH 1.2 and PBS pH 7.4. This research is an experimental laboratory study that analyzes includes the analysis of erythropoietin released from the nanoparticle system dissolved in HCl pH 1.2 and PBS pH 7.4 using spectrophotometric methods. Erythropoietin levels were calculated as free from the nanoparticle system at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, and 240 minutes. Erythropoietin levels released from the erythropoietin nanoparticle system at 15 minutes in HCl medium pH 1.2 lower at 33, 63%, compared to PBS medium at pH 7.4 with free erythropoietin content of 50.85%. However, after 240 minutes the concentration of free erythropoietin from the nanoparticle system was higher in the PBS medium at pH 7.4 (60.49%) than in HCl medium at pH 1.2 (57.85%). The results showed that the erythropoietin nanoparticle system was more stable in HCl medium pH 1.2 than in PBS pH 7.4.

**Keywords:** stability, nanoparticle, erythropoietin, chitosan, pectin.

**Abstrak:** Sistem nanopartikel eritropoietin terbentuk dari adanya interaksi muatan positif kitosan dan negatif pektin pada kondisi asam, sehingga stabilitas sistem nanopartikel pada asam klorida dan fosfat buffer adalah parameter penting dalam pilihan medium uji permeasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan stabilitas sistem nanopartikel eritropoietin dalam HCl pH 1,2 dan fosfat buffer salin (PBS) pH 7,4. Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian laboratorium eksperimental meliputi analisis eritropoietin yang dilepaskan dari sistem nanopartikel yang dilarutkan dalam HCl pH 1,2 dan PBS pH 7,4 menggunakan metode spektrofotometri. Kadar eritropoietin yang dihitung adalah kadar eritropoietin yang bebas dari sistem nanopartikel pada menit ke 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 dan 240. Kadar eritropoietin yang dilepaskan dari sistem nanopartikel eritropoietin pada menit ke 15 dalam medium HCl pH 1,2 lebih rendah yaitu 33, 63 %, dibandingkan dalam medium PBS pH 7,4 dengan kadar eritropoietin bebas 50,85%. Namun setelah waktu 240 menit, kadar eritropoietin bebas dari sistem nanopartikel lebih tinggi dalam medium PBS pH 7,4 (60,49%) dibandingkan medium HCl pH 1,2 (57, 85%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sistem nanopartikel eritropoietin lebih stabil di medium HCl pH 1,2 dibandingkan di PBS pH 7,4.

**Kata kunci:** stabilitas, nanopartikel, eritropoietin, kitosan, pectin.

<sup>1</sup> Program Doktor Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia

<sup>2</sup> Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia

<sup>3</sup> Jurusan Farmasi Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia

### Korespondensi:

Akmad Kharis Nugroho  
a.k.nugroho@ugm.ac.id



Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 International License

## Pendahuluan

Polimer kitosan dan pektin memiliki peranan penting dalam meningkatkan stabilitas obat dalam saluran cerna sehingga jumlah obat yang dilepaskan dapat diminimalisir (1). Kemampuan sistem matriks polimer kitosan dan pektin dalam mempertahankan stabilitas sistem nanopartikel eritropoietin diuji secara *in vitro* melalui uji pelepasan dalam media disolusi yang sesuai dengan kondisi lambung dan usus. Pada lambung disimulasikan dengan membuat medium dapar HCl pH 1,2. Pada usus disimulasikan menggunakan medium PBS pH 7,4. (2).

Pemilihan medium permeasi dipengaruhi oleh pengaruh pH terhadap kelarutan dan stabilitas obat. Kitosan dengan pKa 6,5 memiliki gugus amin yang cenderung larut dalam pH asam. Namun kitosan memiliki kelarutan yang rendah dalam medium

PBS sehingga proses difusi medium ke dalam sistem matriks nanopartikel akan berjalan lambat dan jumlah eritropoietin yang akan dilepaskan diduga juga akan ikut mengecil (3–5). Dengan demikian stabilitas sistem nanopartikel eritropoietin dalam asam lambung dan cairan usus merupakan parameter penentu pemilihan medium uji permeasi.

Perlu dilakukan perbandingan stabilitas sistem nanopartikel eritropoietin dalam asam lambung dan cairan usus buatan sebagai parameter penentu medium uji permeasi yang tepat sehingga pemantauan permeasi obat secara *in vitro* dapat menggambarkan kondisi *in vivo* obat tersebut.

## Bahan dan Metode

### Bahan

Eritropoietin (PT. Kalbio Global Medika), Kitosan (Sigma Aldrich), Pektin (Sigma Aldrich), Asam Hidroklorida (Merck, Jerman), Dapar Fosfat pH 7,4 (Merck, Jerman), Waterone (Onelab), Pereaksi Bradford (Himedia, India).

### Alat

Spektrofotometer UV-Vis (Drawel), Neraca analitik (Ohaus), Magnetic stirrer (Cimarec), pH meter (Hanna), Vortex mixer (K-VM 300), Particle Size and Zeta Potential Analyzer (Malvern),

Transmission Electron Microscopy (JOEL-JEM 1400), Sentrifius (Kitman), *shaking thermostatic waterbath* (Julabo U3).

### Cara Kerja

Penentuan panjang gelombang maksimal eritropoietin dimulai dengan membuat larutan induk eritropoietin dengan konsentrasi 166,8 ppm. Selanjutnya, larutan baku eritropoietin dibuat dalam berbagai konsentrasi 8,34; 4,17; 2,78; 2,09; dan 0,69 ppm dengan cara mengambil larutan induk eritropoietin masing-masing sebanyak 83,4; 41,7; 27,8; 20,9 dan 6,9  $\mu\text{L}$  dan diencerkan dengan penambahan akuadeion hingga volume 800  $\mu\text{L}$ . Pereaksi *Bradford* ditambahkan sebanyak 200  $\mu\text{L}$ , kemudian dihomogenkan dan diukur absorbansi menggunakan alat spektrofotometer visibel pada rentang panjang gelombang 400 hingga 800 nm (6).

Penentuan waktu operasional eritropoietin dilakukan dengan mengencerkan sebanyak 2,78  $\mu\text{L}$  larutan induk eritropoietin dengan akuadeion hingga volume 800  $\mu\text{L}$ . Pereaksi *Bradford* ditambahkan sebanyak 200  $\mu\text{L}$ , kemudian dihomogenkan dan diukur absorbansinya menggunakan alat spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimal selama 30 menit (6).

Validasi metode analisis eritropoietin diawali dengan pembuatan seri larutan eritropoietin dalam berbagai konsentrasi dengan cara mengencerkan larutan induk eritropoietin masing-masing 0,69; 2,09; 2,78; 4,17 dan 8,43  $\mu\text{L}$  menggunakan akuadeion hingga volume 800  $\mu\text{L}$ . Pereaksi *Bradford* ditambahkan sebanyak 200  $\mu\text{L}$ , kemudian dihomogenkan dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 595 nm (6,7).

Verifikasi dilakukan dengan menghitung akurasi (kecermatan), presisi (keseksamaan), batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ) dari metode analisis yang digunakan. Pengujian akurasi dan presisi dilakukan dengan membuat seri konsentrasi larutan eritropoietin 0,69; 2,09 dan 4,17 ppm. Analisis menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 595 nm dengan melakukan replikasi

sebanyak tiga kali untuk masing-masing konsentrasi larutan (6,7).

Preparasi sistem nanopartikel eritropoietin dilakukan dengan cara mencampur 1,0 mL larutan kitosan 0,1% dengan 1,0 mL larutan eritropoietin 8,43% dalam tabung mikro 3 mL, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex *mixer* selama 60 detik. Selanjutnya ditambahkan 1,0 mL larutan pektin 0,01% dan dihomogenkan lagi menggunakan vortex *mixer* selama 60 detik. Setelah didiamkan selama 24 jam, dilakukan evaluasi karakteristik ukuran partikel, indeks polidispersitas dan zeta potensial nanopartikel menggunakan alat *Particle Size and Zeta Potential Analyzer*. Evaluasi karakteristik bentuk partikel nanopartikel menggunakan alat *Transmission electron microscope* (6,8).

Uji stabilitas nanopartikel eritropoietin menggunakan media simulasi lambung dan usus. Pada lambung disimulasikan dengan membuat medium dapar HCl pH 1,2. Medium usus disimulasikan menggunakan medium PBS pH 7,4. Sistem nanopartikel eritropoietin sebanyak 3 mL diinkubasi dalam 6 mL HCl pH 1,2 dan PBS pH 7,4, kemudian ditempatkan pada *shaking thermostatic waterbath* yang dijalankan dengan kecepatan goyangan 50 rpm pada suhu 37°C selama 4 jam. Pada interval waktu tertentu (menit ke- 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, dan 240), diambil 0,5 mL sampel menggunakan mikropipet dan diganti dengan medium fresh dalam volume yang sama. Sampel yang didapat disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm, selama 50 menit pada suhu 4°C. Kadar eritropoietin dalam supernatan

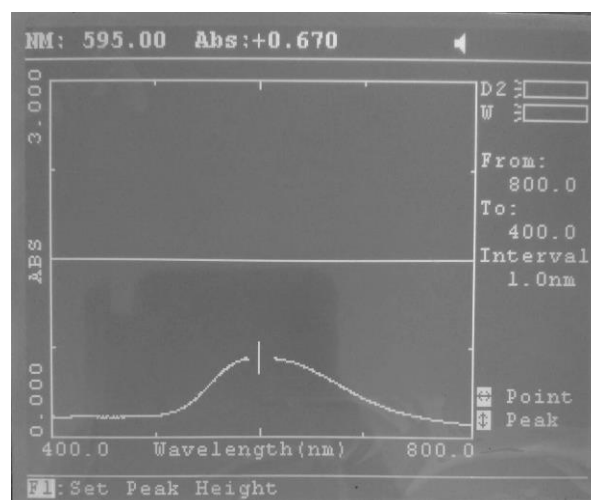
diukur dengan alat Spektrofotometer dengan metode *Bradford* (6,9).

## Hasil dan Diskusi

Pengukuran panjang gelombang maksimum eritropoietin dengan metode *Bradford* hanya menghasilkan satu puncak serapan yaitu  $595 \pm 1$  nm (**Gambar 1**). Panjang gelombang maksimal dari hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan Fayed, 2012. Prinsip dari metode ini, yaitu absorbansi maksimum larutan pereaksi *Bradford* akan bergeser dari 465 ke 595nm jika berikatan dengan protein eritropoietin (6).

Penentuan waktu operasional eritropoietin dengan metode *Bradford* pada panjang gelombang 595 nm dilakukan dengan tujuan untuk memastikan waktu yang dibutuhkan eritropoietin untuk selesai berinkubasi dengan pereaksi *Bradford*, sehingga akan didapatkan serapan yang maksimal. Waktu operasional yang dihasilkan yaitu 10 – 15 menit (**Tabel 1**).

Linieritas suatu metode analisis dapat diketahui dengan koefisien korelasi ( $r$ ). Nilai koefisien korelasi yang menunjukkan hubungan yang kuat antara dua variabel yaitu yang mendekati +1 atau -1 (7). Pengukuran serapan pada seri konsentrasi eritropoietin menghasilkan persamaan serapan sebagai fungsi konsentrasi  $Y = 0.0316x + 0.3713$  dengan nilai  $r^2$  0,9998, maka hasil analisis menunjukkan hubungan linier positif yang kuat antara perubahan konsentrasi eritropoietin dengan absorbansi.



**Gambar 1.** Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum eritropoietin dengan metode Bradford.

**Tabel 1.** Hasil optimasi waktu operasional eritropoietin dengan metode *Bradford*.

Waktu (menit)	Absorbansi
0	0,437
5	0,439
10	0,440
15	0,440
20	0,436
25	0,431
30	0,429

**Tabel 2.** Nilai recovery dan CV pengukuran eritropoietin

Kadar Sampel (µL/mL)	Kadar Terukur (µL/mL)	Recovery (%)	CV (%)	Syarat	
				Recovery (%)	CV (%)
0,69	0,69 ± 0,03	99,52 ± 4,59	4,61	95 - 105	5
2,09	2,10 ± 0,02	100,49 ± 0,87	0,87	97 - 103	5
4,17	4,15 ± 0,08	99,4 ± 1,91	1,92	97 - 103	5

Akurasi dan presisi suatu metode analisis dinyatakan sebagai nilai perolehan kembali (%) dan perolehan kembali (%). Hasil percobaan menunjukkan nilai persen recovery berada dalam rentang 99,40 - 100,49% dan nilai CV yang dihasilkan tidak lebih besar dari 7,3% (**Tabel 2**). Hasil percobaan yang didapatkan menunjukkan hasil uji yang diperoleh telah mendekati nilai yang sebenarnya. Metode analisis yang digunakan akurat karena nilai recoveri berada dalam rentang 97 - 103% untuk konsentrasi analit lebih dari 1% dan 95 - 105% untuk konsentrasi analit lebih dari 0,1% [7]. Sedangkan nilai CV yang dihasilkan dapat dikatakan presisi dengan nilai CV semua analit berada pada nilai tidak lebih dari 5% [7]. Nilai ini menggambarkan hasil uji yang mirip atau seragam antara satu dengan pengujian lainnya.

*Limit of Detection (LoD)* adalah jumlah atau konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi, sedangkan *Limit of Quantification (LoQ)* merupakan jumlah analit terkecil dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif pada tingkat ketelitian dan ketepatan yang baik. Nilai *LOD* yang didapatkan dari hasil penelitian adalah 0,569 ppm dan *LOQ* 1,899 ppm (**Tabel 3**).

Evaluasi karakteristik sistem sediaan nanopartikel eritropoietin menggunakan alat *Particle Size and Zeta Potential Analyzer* yaitu ukuran partikel 359 ± 3,37 nm, index

polidispersitas 0,45 ± 0,14 dan potensial zeta 27,3 ± 1,86 mv.

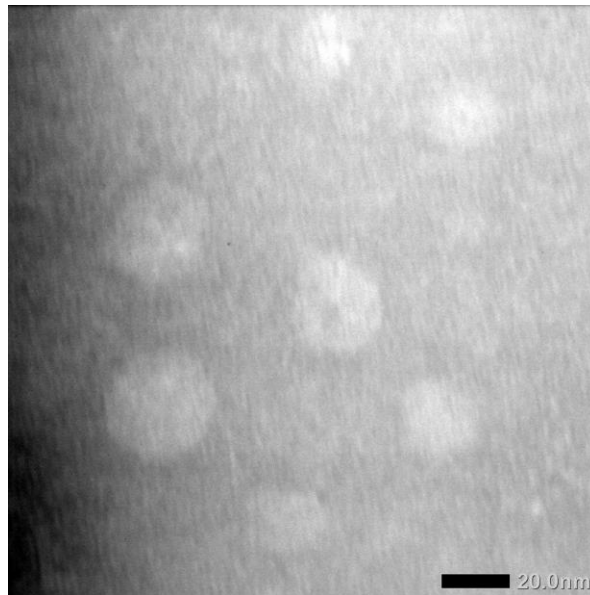
Ukuran dan bentuk partikel adalah karakteristik paling penting dalam sistem nanopartikel karena mempengaruhi *drug loading*, *drug release*, dan stabilitas sistem nanopartikel (8). Ukuran partikel yang didapatkan masih masuk dalam kategori nanopartikel karena ukuran partikel berada pada rentang 1-1000 nm (9,10). Pembuatan nanopartikel dengan zat aktif berupa protein memang sulit untuk mendapatkan ukuran yang kecil. Hal ini dikarenakan bobot molekul dari protein cukup besar sehingga ketika protein dijerap dalam suatu matriks maka menghasilkan ukuran yang besar (11,12).

Karakteristik morfologi nano-partikel menggunakan *Transmission electron microscope* menunjukkan bentuk nanopartikel adalah bulat (*sferis*) (**Gambar 2**). Partikel yang berbentuk sferis menunjukkan bahwa kitosan menjerap eritropoietin dan membentuk tautan silang dengan pektin melalui ikatan elektrostatisnya (13).

Penentuan distribusi ukuran partikel menunjukkan pola persebaran ukuran partikel yang berukuran sama untuk ditentukan jumlahnya pada sampel sistem nanopartikel eritropoietin. Setiap kumpulan partikel berupa polidispersi.

**Tabel 3.** Nilai LOD dan LOQ pengukuran eritropoietin (18)

Replikasi Blanko	Absorbansi	Slope	SD
1	0,437	0,0381	0,007
2	0,425		
3	0,438		
4	0,445		
5	0,429		
6	0,454		
7	0,439		
8	0,45		
9	0,427		
10	0,459		
LOD = $3,3 \times \text{SD}/\text{Slope} = 0,569 \text{ ppm}$			
LOQ = $10 \times \text{SD}/\text{Slope} = 1,899 \text{ ppm}$			



**Gambar 2.** Bentuk partikel dari sistem nanopartikel eritropoietin dengan pengujian *Transmission electron microscope*

Nilai indeks polidispersitas ini menggambarkan homogenitas suatu dispersi. Nilai indeks polidispersitas mendekati 1 mengindikasikan heterogenitas, sedangkan nilai di bawah 0,5 menunjukkan homogenitas (14).

Potensial zeta digunakan untuk memprediksi kestabilan suatu formula sistem nanopartikel dan menunjukkan sifat muatan permukaan partikel. Formula nanopartikel eritropoietin yang diperoleh memiliki muatan yang bersifat positif. Permukaan partikel didominasi oleh muatan positif yang berasal dari kitosan yang diharapkan menjerap eritropoietin dan pektin dengan ikatan

ioniknya. Muatan permukaan partikel yang bernilai positif dalam sistem nanopartikel akan meningkatkan *uptake* eritropoietin dengan mekanisme pembukaan *tight junction* sel yang bermuatan negative (15).

Hasil pengujian stabilitas nanopartikel eritropoietin dalam HCl pH 1,2 dan PBS pH 7,4 dilakukan dengan mengukur kadar eritropoietin yang dilepaskan dari sistem nanopartikel. Hasil penelitian menunjukkan kadar eritropoietin yang dilepaskan meningkat seiring meningkatnya waktu (**Tabel 4**). Pada waktu 15 menit sistem nanopartikel eritropoietin lebih stabil dalam

medium HCl pH 1,2 dengan kadar eritropoietin bebas 33,63 %, dibandingkan dalam medium PBS pH 7,4 dengan kadar eritropoietin bebas 50,85%. Namun setelah waktu 240 menit kadar eritropoietin bebas dari sistem nanopartikel lebih tinggi dalam media dalam PBS pH 7,4 (60,49%) dibandingkan media HCl pH 1,2 (57,85%). Kitosan dengan pKa 6,5 memiliki gugus amin yang cenderung larut dalam pH asam (4). Sedangkan eritropoietin dengan titik isoelektrik 4,42 - 5,11 bila dimasukkan dalam media dapar HCl pH 1,2 memiliki kelarutan yang tinggi (16). Pada media PBS jumlah eritropoietin bebas terukur lebih kecil karena kitosan yang diharapkan sebagai pembungkus eritropoietin dalam sistem matriks polimer memiliki kelarutan yang rendah dalam media PBS, sehingga proses difusi media ke dalam sistem matriks berjalan lambat dan jumlah eritropoietin yang dilepaskan ikut melambat.

**Tabel 4.** Kadar eritropoietin yang bebas dari sistem nanopartikel dalam media HCl pH 1,2 dan PBS pH 7,4

Waktu (menit)	Eritropoietin bebas (%)	
	HCL pH 1,2	PBS pH 7,4
15	33,63	50,85
30	45,25	51,65
45	49,38	52,42
60	53,82	53,90
90	54,99	54,50
120	55,53	56,76
180	57,05	57,71
240	57,85	60,49

Pelepasan eritropoietin dari matriks kitosan dan pektin tergantung dari seberapa kuat ikatan silang yang terjadi, morfologi, dan ukuran partikel dalam sistem nanopartikel. Pelepasan eritropoietin dari matriks polimer kitosan dan pektin diduga melibatkan mekanisme difusi melalui *swollen ruberrymatrix* yang menyebabkan pelepasan obat menjadi besar (> 60%) (9,17). Namun demikian, sistem nanopartikel menggunakan matriks kitosan dan pektin diduga mampu meningkatkan ketersediaan hayati eritropoietin secara per oral (17).

Hasil penelitian menunjukkan medium PBS pH 7,4 dapat direkomendasikan sebagai medium

uji permeasi sistem nanopartikel eritropoietin. Untuk memastikan ketepatan pemilihan medium perlu dilakukan perbandingan profil permeasi eritropoietin dalam medium HCl pH 1,2 dan PBS pH 7,4.

### Kesimpulan

Nanopartikel eritropoietin lebih stabil dalam medium HCl pH 1,2 dibandingkan PBS pH 7,4, sehingga PBS pH 7,4 dapat direkomendasikan sebagai medium permeasi sistem nanopartikel eritropoietin. Untuk memastikan ketepatan pemilihan medium perlu dilakukan perbandingan profil permeasi eritropoietin dalam medium HCl pH 1,2 dan PBS pH 7,4.

### Referensi

- Hajrin W, Budastra WCG, Juliantoni Y, Subaidah WA. Formulasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan Ekstrak Sari Buah Juwet (*Syzygium cumini*) menggunakan metode Gelasi Ionik: Formulation and characterization of Chitosan Nanoparticle of Juwet (*Syzygium cumini*) Fruit Extract Using Ionic Gelation Method. *J Sains Kes.* 2021 Oct 31;3(5):742-9.
- Zalte HD, Saudagar RB. Review on sustained release matrix tablet. *Int J Pharm Biol Sci.* 2013;3(4):17-29.
- Mohammed MA, Syeda JT, Wasan KM, Wasan EK. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics.* 2017;9(4):1-26.
- Saeed RM, Dmour I, Taha MO. Stable chitosan-based nanoparticles using polyphosphoric acid or hexametaphosphate for tandem ionotropic/covalent crosslinking and subsequent investigation as novel vehicles for drug delivery. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(2):1-21.
- Bhumkar DR, Pokharkar VB. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *Aaps Pharmscitech.* 2006;7:E138-43.
- Fayed BE, Tawfik AF, Yassin AEB. Novel erythropoietin-loaded nanoparticles with prolonged in vivo response. *J Microencapsul.* 2012;29(7):650-656.

7. Harmita H. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan Cara Perhitungannya. *Maj Ilmu Kefarmasian*. 2004;1(3):1-20.
8. Bagherpour Zarchi M, Divsalar A, Purhosseini PS, Abrari K. Design and Characterization of New Nano System for Delivery of Erythropoietin. *Biomacromolecular J*. 2017;3(2):133-140.
9. Bulmer C, Margaritis A, Xenocostas A. Encapsulation and controlled release of recombinant human erythropoietin from chitosan-carrageenan nanoparticles. *Curr Drug Deliv*. 2012;9(5):527-537.
10. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles-a review. *Trop J Pharm Res*. 2006;5(1):561-573.
11. Bhatia A, Shard P, Chopra D, Mishra T. Chitosan nanoparticles as carrier of immunorestoratory plant extract: synthesis, characterization and immunorestoratory efficacy. *Int J Drug Deliv*. 2011;3(2):381-385.
12. Tiyaboonchai W. Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. *Naresuan Univ J Sci Technol NUJST*. 2013;11(3):51-66.
13. Oliveira GF, Ferrari PC, Carvalho LQ, Evangelista RC. Chitosan-pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. *Carbohydr Polym*. 2010;82(3):1004-1009.
14. Kouchak M, Avadi M, Abbaspour M, Jahangiri A, Boldaji SK. Effect of different molecular weights of chitosan on preparation and characterization of insulin loaded nanoparticles by ion gelation method. *Int J Drug Dev Res*. 2012;4(2):271-277.
15. Yeh TH, Hsu LW, Tseng MT, Lee PL, Sonjae K, Ho YC, et al. Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. *Biomaterials*. 2011;32(26):6164-6173.
16. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*. 2000 Jun;405(6787):1-3.
17. Kumar MNR. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*. 2000;46(1):1-27.
18. Ermer J, Miller H. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. | Luis Esteban Castillo Palacios - Academia.edu [Internet]. Weinheim: Willey-VCH Verlag GmbH&Co KGaA.; 2005 ; 3-5,16.