

Nanopartikel ekstrak etil asetat daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dengan aktivitas antioksidan dan antibakteri terhadap *propionibacterium acnes*

Ranny Puspitasari^{1*}, Deni Rahmat², Ratna Djamil³

^{1,2,3}Universitas Pancasila, Indonesia, *rannypuspitasari4@gmail.com

Diterima 18 Februari 2023, disetujui 29 April 2023, diterbitkan 30 April 2023

Pengutipan: Puspitasari, R., Rahmat, D & Djamil, R. (2023). Nanopartikel ekstrak etil asetat daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dengan aktivitas antioksidan dan antibakteri terhadap *propionibacterium acnes*. *Gema Wiralodra*, 14(1), 554- 560

1. Pendahuluan

Nanopartikel adalah partikel berukuran 1-1000 nanometer dan kebanyakan metode menyarankan sebaiknya ukuran diameter partikel antara 200 dan 400 nm. Nanoenkapsulasi dapat dibentuk dengan berbagai polimer, salah satunya adalah kitosan. Nanopartikel dengan polimer kitosan diketahui dapat melindungi senyawa aktif dari degradasi (George & Abraham, 2006; Lin et al, 2008). Selain itu, nanopartikel kitosan juga memiliki stabilitas yang baik, toksisitas yang rendah dan metode preparasinya yang cukup sederhana (Tiyaboonchai, 2013). Beberapa kelebihan nanopartikel adalah kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang dapat ditembus oleh partikel koloidal. Selain itu, nanopartikel fleksibel untuk dikombinasikan dengan berbagai teknologi lain. Kemampuan ini membuka potensi luas untuk dikembangkan pada berbagai keperluan dan target. Kelebihan lain adalah adanya peningkatan afinitas dari sistem karena peningkatan luas permukaan kontak pada jumlah yang sama (Buzea et al, 2007).

Metode pembentukan nanopartikel salah satunya yaitu metode gelasi ionik. Metode gelasi ionik melibatkan proses sambung silang antara polielektrolit dengan adanya pasangan ion multivalennya. Gelasi ionik diikuti dengan kompleksasi polielektrolit dengan polielektrolit yang berlawanan. Pembentukan ikatan sambung silang ini akan memperkuat kekuatan mekanis dari partikel yang terbentuk (Hariyadi et al, 2022). Kitosan yang merupakan polimer kationik dapat bereaksi dengan anion multivalen seperti tripolifosfat

Salah satu tanaman yang digunakan sebagai alternatif pengobatan tradisional yaitu tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.). Salah satu bagian tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah daun *G. gnemon*. Secara tradisional daun melinjo digunakan untuk mengobati luka gigitan anjing, penyakit mata, anemia dan busung lapar. Selain itu, efek farmakologis lain yang sering dimanfaatkan sebagai peluruh kencing (diuretik). Daun melinjo memiliki kandungan kimia di dalamnya seperti tanin, saponin dan flavonoid (Raven, 2007).

Fraksi etil asetat daun *G. gnemon* sangat aktif sebagai antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 19,50 mg/L (6). Daun *G. gnemon* mengandung flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan yang diduga merupakan senyawa flavonoid golongan antosianin (7). Selain sebagai antioksidan, Ekstrak etanol 90% daun *G. gnemon* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* berada pada konsentrasi 10% dengan diameter zona hambat 10,94 mm dengan kategori sedang (Utama et al, 2019).

Berdasarkan latar belakang di atas penelitian ini bertujuan untuk melakukan pembentukan sediaan nanopartikel dengan polimer kitosan yang diharapkan dapat menjaga senyawa aktif daun *G. gnemon* dari degradasi. Konsentrasi polimer, ekstrak, maupun cross-linker harus memiliki komposisi yang tepat untuk memperoleh sediaan nanopartikel yang memiliki karakteristik yang baik. Serta melakukan uji aktivitas antioksidan dan antibakteri terhadap *P. acnes* dari nanopartikel ekstrak daun *G. gnemon*.

2. Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Daun *G. gnemon* yang berasal dari daerah Saketi, Pandeglang-Banten Banten. Pelarut etil asetat untuk ekstraksi. Bahan untuk pembuatan nanopartikel kitosan, bufer asetat pH 4, NaTPP, DMSO. Bahan penyusun masker gel *peel-off* yang digunakan adalah PVA, HPMC, profiliglikol, Phenoxietanol dan akuadest. Bahan uji penentuan aktivitas antioksidan menggunakan DPPH. Bakteri *Propionibacterium acnes*, berasal dari Laboratorium Biologi Universitas Indonesia. DMSO, MHB (*Mueller Hinton Broth*), nutrient agar (NA), Mc Farland, BaCl₂, H₂SO₄. Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat gelas laboratorium, *Magnetic Stirrers Hot Plate rotary evaporator, water bath*, spektrofotometer UV-Vis.

Maserasi Kinetik Daun *G.gnemon*

Daun *G. gnemon* yang telah dideterminasi di Pusat Biologi Bidang Botani LIPI Cibinong, dibuat simplisia, diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi kinetik selama 3 x 24 jam dengan menggunakan pelarut etil asetat, lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan rotasi 60 rpm hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat.

Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Daun *G. gnemon*

Pembuatan nanopartikel ekstrak dilakukan dengan perbandingan ekstrak: kitosan: NaTPP yaitu 2: 1: 35,6 µg/mL. Ekstrak dicampurkan dengan larutan kitosan dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* pada kecepatan 1000 rpm selama 30 menit. Larutan NaTPP ditambahkan dalam larutan kitosan ekstrak pada temperatur ruangan dengan putaran *magnetic stirrer* pada kecepatan 1000 rpm selama 1 jam hingga terbentuk koloid nanopartikel.

Evaluasi Ukuran dan Indeks Polidispersitas Nanopartikel

Pengukuran diameter partikel pada penelitian ini menggunakan alatparticle size analyzer (PSA) dengan teknik dynamic light scattering (DLS).

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Nanopartikel Ekstrak Daun *G. gnemon*

Ekstrak dan nanopartikel ekstrak daun *G. gnemon* dibuat konsentrasi larutan 0, 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm, kemudian dipipet sebanyak 2,4 mL, kemudian ditambahkan 0,6 mL larutan DPPH 0,002%. Campuran dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit, serapan diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimal 515 nm.

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Nanopartikel Ekstrak Daun *G.gnemon*

Sebanyak 0,3 mL suspensi bakteri uji 3×10^6 CFU/mL dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian ditambahkan 15 mL media NA ke dalam cawan petri, dihomogenkan lalu dibiarkan memadat. Media inokulum yang telah disiapkan, ditanami cakram dengan menggunakan pinset steril, masing- masing cakram direndam dengan larutan uji ekstrak dan nanopartikel ekstrak daun *G. gnemon*, cakram direndam DMSO sebagai kontrol negative dan masker gel merex x sebagai kontrol positif. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Pertumbuhan bakteri uji diamati, diukur diameter hambatan pertumbuhan yang terbentuk dengan jangka sorong.

Analisis Data

Analisis statistik dilakukan untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan dan antibakteri ekstrak dan nanopartikel ekstrak daun *G. gnemon*. Analisis data dilakukan dengan uji *Mann-Whitney* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

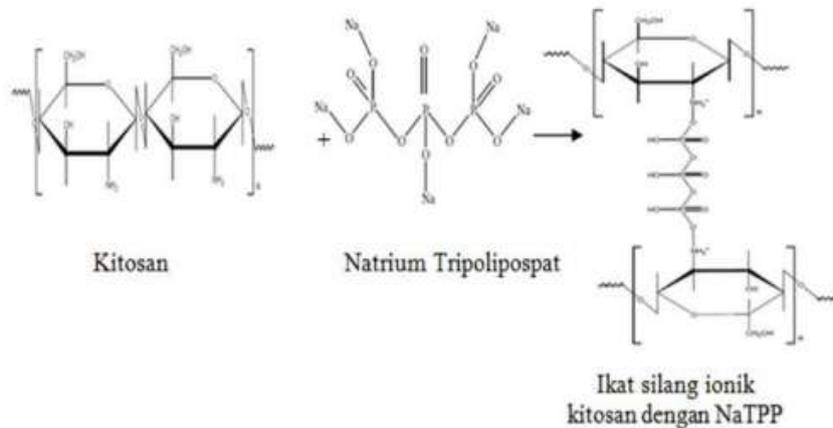
3. Hasil dan Pembahasan

Pembuatan nanopartikel ekstrak daun *G.gnemon* dilakukan dengan metode gelasi ionik, yakni dengan menambahkan NaTPP sebagai bahan pengikat silang dengan kitosan. Mekanisme pembentukan nanopartikel kitosan didasarkan pada interaksi elektrostatik antara

amin dari kitosan dan muatan negatif dari polyanion (Gambar 1). Kitosan dapat dilarutkan dengan asam asetat. Polianion kemudian ditambahkan, sehingga terbentuk nanopartikel secara spontan dengan pengadukan pada suhu kamar (Meinisasti et al, 2019).

Gambar 1

Reaksi kitosan dan natrium tripolifosfat



Konsep gelasi ionik atau kompleksasi ionik juga memungkinkan untuk penggunaan dua macam biopolimer dalam satu sistem formulasi. Kedua biopolimer yang digunakan harus memiliki muatan yang berlawanan, sehingga dapat membentuk matriks yang fleksibel untuk menyerap obat dengan sifat yang lebih luas. Kitosan dilarutkan pada larutan dengan pH asam untuk mengubah gugus amina ($-\text{NH}_2$) menjadi terionisasi positif ($-\text{NH}_3^+$). Gugus yang telah terionisasi positif ini selanjutnya mampu membentuk interaksi ionik dengan obat yang bermuatan negative (Meinisasti et al, 2019). Secara keseluruhan, sistem yang terbentuk cenderung menyisakan gugus amonium bebas yang akan saling tolak-menolak sehingga melemahkan kompleks nanopartikel yang telah terbentuk. Oleh karena itu, perlu ditambahkan adanya suatu pengikat silang (*cross linker*) yang mampu menstabilkan muatan positif yang tersisa. Pengikat silang ini harus berupa poli-anion, dan salah satu yang banyak digunakan adalah anion tripolifosfat (TPP) (Meinisasti et al, 2019). Meskipun demikian, sistem ini memiliki kelemahan yaitu stabilitasnya sangat dipengaruhi oleh tingkat keasaman, di mana variasi pH akan mempengaruhi ionisasi kitosan yang pada akhirnya mempengaruhi kekuatannya pada kompleks.

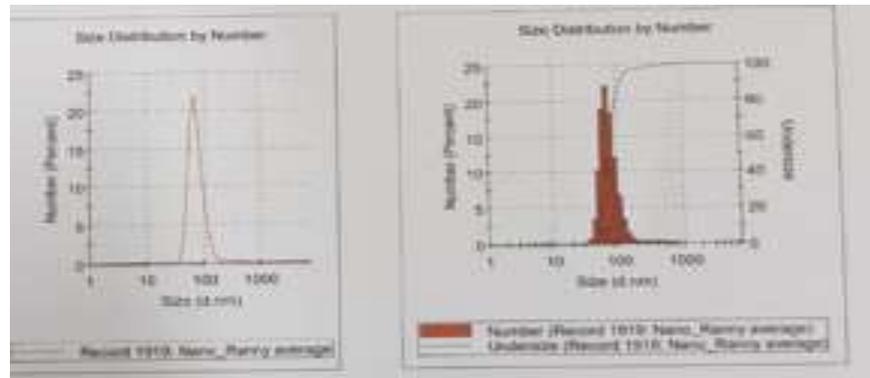
Kitosan memiliki kemampuan untuk membuka kait antar sel (*tight junction*) pada membran usus secara sementara melalui mekanisme translokasi protein Claudin-4 (Cldn4), Zonula occludens-1 (ZO-1), dan Occludin dari membran sel ke sitosol, sehingga sangat potensial untuk dikembangkan sebagai bahan utama pembuatan nanopartikel. Hal ini didukung kelebihan lain dari kitosan yaitu muatan pada gugus amonium yang positif dapat mengadakan interaksi ionik dengan asam sialat pada membran intestinal saluran cerna. Biokompatibilitas kitosan dikarenakan kitosan merupakan polimer yang diperoleh dari hidrolisis polimer kitin yang berasal sumber alam yang sudah menjadi konsumsi umum pada cangkang hewan laut, sehingga cenderung tidak menimbulkan ketoksikan pada dosis terapi, selain dari sifatnya yang sekaligus biodegradable (Sailaja et al, 2010).

Pengukuran diameter partikel pada penelitian ini menggunakan alat partikel size analyzer (PSA) dengan teknik dynamic light scattering (DLS). Hasil dapat dilihat pada (Gambar 2). Teknik tersebut dinilai lebih akurat jika dibandingkan dengan metode Analisa gambar (mikrografi) dengan menggunakan SEM dan TEM terutama untuk sampel-sampel dalam ukuran nanometer dan submikron yang biasanya memiliki kecenderungan aglomerasi yang tinggi. Hal ini dikarenakan pada PSA partikel didispersikan ke dalam media sehingga

partikel tidak saling beraglomerasi, dengan demikian ukuran partikel yang terukur adalah ukuran dari single particle. Hasil pengukuran menggunakan PSA dalam bentuk distribusi, sehingga hasil pengukuran dapat diasumsikan sudah menggambarkan keseluruhan kondisi sampel.

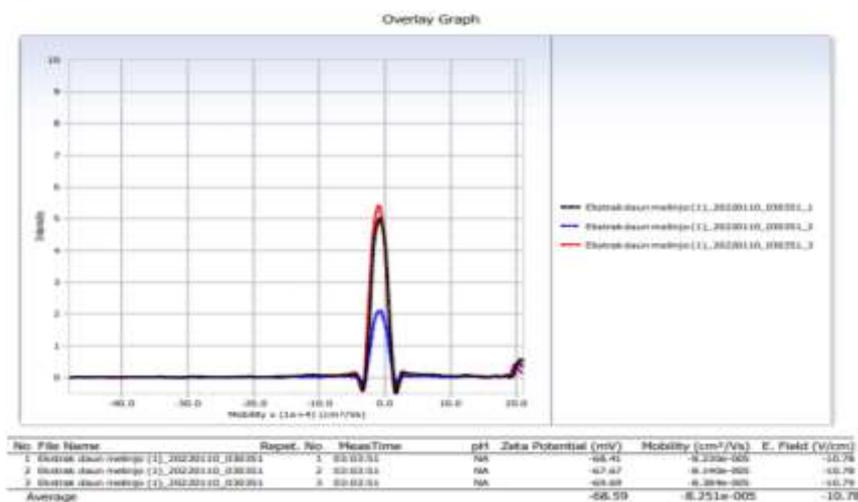
Gambar 2

Grafik hasil uji ukuran partikel nanopartikel ekstrak daun *G.gnemon*



Gambar 3

Grafik hasil zeta potensial nanopartikel ekstrak daun *G.gnemon*



Penentuan nilai indeks polidispersitas digunakan untuk melihat persebaran ukuran partikel yang terjadi dalam nanopartikel ekstrak daun *G. gnemon*. Zeta potensial diukur untuk mengetahui kestabilan dari koloid. Zetapotensial merupakan ukuran kekuatan tolak menolak antarpartikel. Sebagian besar sistem koloid dalam air distabilkan oleh gaya tolak elektrostatis, semakin besar kekuatan tolak menolak antara partikel maka semakin kecil kemungkinan partikel untuk bergabung dan membentuk agregat. Data ukuran partikel, indeks polidispersitas dihasilkan tergolong masuk ke dalam ukuran nanopartikel karena berukuran di bawah 1000 nm. Hasil nanopartikel dengan nilai zeta potensial lebih dari ± 30 mV telah terbukti stabil dalam suspensi sebagai muatan permukaan yang mencegah agregasi (Tabel 1).

Tabel 1

Hasi Uji Karakteristin Nanopartikel Ekstrak Daun G.gnemon

Ukuran partikel (mm)	Indeks pendispersi (%)	Potensi zeta (mV)
419,4	0,572	-68,5 9

Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Nanopartikel Daun G.gnemon

Uji aktivitas antioksidan nanopartikel ekstrak daun *G.gnemon* dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Metode DPPH mempunyai prinsip kerja yaitu adanya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang berikatan dengan elektron bebas pada senyawa radikal sehingga menyebabkan perubahan dari radikal bebas menjadi senyawa non-radikal(11). DPPH merupakan suatu uji yang dapat menangkal radikal bebas untuk menentukan aktivitas antioksidan(Pratiwi et al, 2016).

Hasil menunjukkan ekstrak etil asetat daun *G. gnemon* memmberikan aktivitas antioksidan lebih baik dibandingkan dengan nanopartikel ekstrak (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa ada kandungan senyawa flavonoid yang tidak terserap pada proses nanopartikel diduga karena terjadi kerusakan pada saat enkapsulasi,terutama karena oksidasi panas, oksigen, dan mekanis (Setiawan et al, 2018).

Tabel 2

Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Nanopartikel Ekstrak daun G. gnemon

Sampel	Nilai IC50 (ppm)	Aktivitas Antioksidan
Ekstrak Daun Melinjo (EDM)	35.602	Sangat kuat
Nanopartikel Ekstrak Daun Melinjo (NEDM)	55.105	Kuat

Analisis data aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat dan naopartikel ekstrak daun *G. gnemon* menggunakan uji *Mann-Whitney* dengan SPSS. Hasil analisis statistik menunjukkan nilai *Asymp Sig (2-tailed)* sebesar $< 0,05$. Hasil analisis data menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara hasil aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat dan nanopartikel ekstrak daun *G.gnemon*. Ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan lebih baik dibandingkan dengan nanopartikel ekstrak daun *G. gnemon*

Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Nanopartikel daun G.gnemon

Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa daun *G. gnemon* yang di ekstrak dengan etanol 90% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* berada pada konsentrasi 10% dengan diameter zona hambat 10,94 mm dengan kategori sedang (Meinisasti et al, 2019).

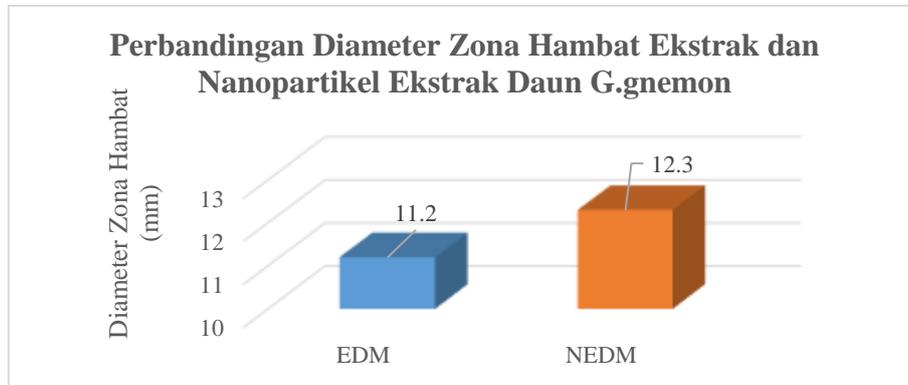
Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun *G.gnemon* dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram kertas, dimana metode ini memiliki kelebihan yaitu cepat, mudah dan murah karena tidak memiliki alat khusus. Hasil dari uji aktivitas antibakteri pada nanopartikel ekstrak kental daun *G.gnemon* mendapatkan nilai hambat rata-rata sebesar 12.4 mm, 12.5 mm dan 12,1 mm, sehingga mendapatkan nilai hambat rata-rata sebesar 12,3 mm dengan kategori kuat (Gambar 4).

Flavonoid membunuh bakteri dengan menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri. Tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri, akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat. Saponin menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler keluar. Steroid adalah senyawa organik lemak sterol tidak terhidrolisis yang dapat dihasilkan dari reaksi penurunan dari

terpena atau skualena steroid membunuh bakteri dengan cara merusak membran sel bakteri (Robinson, 1995).

Gambar 4

Grafik Perbandingan Diameter Zona Hambat Antara Ekstrak dan Nanopartikel Daun *G.gnemon*



Ket:

EDM : Ekstrak Daun Melinjo

NEDM : Nanopartikel Ekstrak Daun *G.gnemon*

Analisis data aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat dan nanopartikel ekstrak daun *G. gnemon* menggunakan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan antara dua kelompok rata-rata yang tidak berpasangan. Hasil analisis data menunjukkan nilai *Asymp Sig (2-tailed) < 0,05*. Hasil analisis data menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara hasil aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat dan nanopartikel ekstrak daun *G.gnemon*. Nanopartikel ekstrak memiliki aktivitas antioksidan lebih baik dibandingkan dengan ekstrak daun *G. gnemon*.

4. Kesimpulan

Ekstrak daun *G gnemon* memiliki aktivitas antioksidan lebih baik dibandingkan nanopartikel ekstrak daun *G gnemon* dimana nilai IC_{50} masing-masing sebesar 35,602 dan 55,105 ppm. Sedangkan untuk aktivitas antibakteri nanopartikel ekstrak *G gnemon* lebih kuat dibandingkan masker ekstrak daun *G gnemon* dimana zona hambat sebesar 12,3 mm. Ukuran partikel (419,4 nm), indeks pendispersi (0,572%) dan potensi zeta (-68,5 mV).

5. Daftar Pustaka

- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.
- George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *Journal of controlled release*, 114(1), 1-14.
- Hariyadi, D. M., Prestisya, I., Suhariyono, G., Miatmoko, A., Rosita, N., & Rahmadi, M. (2022). Characterization of dry powder inhaler quercetin solid lipid microparticle (SLM) as lung delivery system: effect of polymer concentration. *Egyptian journal of chemistry*, 65(11).

- Lin, Y. H., Sonaje, K., Lin, K. M., Juang, J. H., Mi, F. L., Yang, H. W., & Sung, H. W. (2008). Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *Journal of Controlled Release*, 132(2), 141-149.
- Meinisasti, R., Puspita, W., & Sunita, R. (2019, April). Test effectiveness antimicrobial extract etanol leaves melinjo (*Gnetum gnemon L.*) on growth of bacteria propionibacterium acnes. In *1st International Conference on Inter-Professional Health Collaboration (ICIHC 2018)* (pp. 99-102). Atlantis Press.
- Pratiwi, L., Fudholi, A., Martien, R., & Pramono, S. (2016). Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) of ethyl acetate fraction from mangosteen peel (*Garcinia mangostana, L.*). *Int J PharmTech Res*, 9(6), 380-387.
- Prasetyo, E., Kiromah, N. Z. W., & Rahayu, T. P. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil) Terhadap Ekstrak Etanol Kulit Buah Durian (*Durio zibethinnus L.*) dari Desa Alasmalang Kabupaten Banyumas. *Jurnal Pharmascience*, 8(1), 75-82. Tripolifosfat Sebagai Kandidat Antioksidan. *Chem Prog*. 2020;13(2):77-85.
- Robinson T. (1995). Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. ke-4. Terjemahan Kosasih Padmawinata., editor. Bnadung: ITB Press. Bandung.
- Raven, R. R. (2017). *Aktivitas Antioksidan Dan Kandungan Fenolik Total Berbagai Fraksi Dari Ekstrak Metanol Daun Melinjo (Gnetum gnemon L.)* (Doctoral dissertation, Universitas Andalas).
- Sailaja, A. K., Amareshwar, P., & Chakravarty, P. (2010). Chitosan nanoparticles as a drug delivery system. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, 1(3), 474-484
- Setiawan, F., Yunita, O., & Kurniawan, A. (2018). Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan*) menggunakan metode DPPH, ABTS, dan FRAP. *Media Pharmaceutica Indonesiana*, 2(2), 82-89.
- Tiyaboonchai, W. (2013). Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST)*, 11(3), 51-66
- Utama, S. S., Mulkiya, K., & Syafnir, L. (2019). Isolasi Senyawa Flavonoid yang Berpotensi sebagai Antioksidan pada Ekstraksi Bertingkat Daun Melinjo (*Gnetum gnemon L.*). *Prosiding Farmasi*, 717-725.