

# MIKROENKAPSULASI EKSTRAK FORMULA PEGAGAN-KUMIS KUCING-SAMBILOTO SEBAGAI INHIBITOR *Angiotensin I Converting Enzyme* SECARA *In Vitro*

Ismarani<sup>1</sup>, Dyah Iswanti Pradono<sup>2</sup>, Latifah K Darusman<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Pertanian Universitas Islam "45" Bekasi

<sup>2</sup>Program Studi Kimia Pascasarjana Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup>Program Studi Kimia Pascasarjana Institut Pertanian Bogor

## Abstract

*Chitosan microencapsulation contained extract formula pegagan-kumis kucing-sambiloto was resulted from ionic gelation process. Chitosan microencapsulation was resulted by cleaning bath type of ultrasonication and homogenization methods. Optimum condition obtained at 2% of chitosan concentration (w/v) and 50 mL (v/v) of extract formula. The yields of chitosan microparticles was 64.24%. Characterization by SEM at 5000× magnification showed that the particle size of chitosan microparticles was not uniform. Chitosan microparticles without and contained extract formula had diameters between 0.40 μm-8.5 μm and 1 μm-6 μm, respectively. Each chitosan microparticles contained extract formula and extract formula had the ACE inhibitory activity of 78.41 %, and 75.73 %, respectively, while the captopryl as an positive control had ACE inhibitory activity of 75.24 %. Wave number peaks of chitosan spectrum was different with microparticles spectrum by using of FTIR analysis. Chitosan microparticles-sodium tripolyphosphate (STP) contained extract formula had absorbance bands of 1652.32 cm<sup>-1</sup> (C=O) and 1565.63 cm<sup>-1</sup> (C=C, aromatic group of benzene). New absorbance bands also appeared at wave numbers of 1153.82 cm<sup>-1</sup> and 1154.66 cm<sup>-1</sup> which showed absorbance band of P=O group from STP compound.*

*Keywords: chitosan-STP, microencapsulation*

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Hipertensi atau yang lebih dikenal penyakit darah tinggi adalah suatu keadaan dimana seseorang mengalami peningkatan tekanan darah di atas normal, kondisi ini dapat mengakibatkan peningkatan angka kesakitan (morbiditas), dan angka kematian (mortalitas) (McPhee *et al.* 1995, Sherwood 2007). Hal ini diperkirakan telah menyebabkan 4.5% dari beban penyakit secara global, dan prevalensinya hampir sama besar di negara berkembang maupun di negara maju (WHO 2003). Menurut Depkes (2006), hipertensi adalah penyebab kematian terbanyak kedua (6.8%) setelah stroke (15.4%). Salah satu cara untuk menangani hipertensi adalah dengan menggunakan obat atau tanaman obat yang berfungsi sebagai inhibitor ACE (*Angiotensin I Converting Enzyme*), karena ACE diketahui memegang peranan penting dalam pembentukan angiotensin II yang merupakan salah satu penyebab hipertensi. Angiotensin II menyebabkan pembuluh darah menyempit, yang dapat menaikkan tekanan darah. ACE

inhibitor membiarkan pembuluh darah melebar dan membiarkan lebih banyak darah mengalir ke jantung, sehingga menurunkan tekanan darah (Depkes 2006).

Obat antihipertensi sintetis telah banyak digunakan saat ini seperti captopril (Cushman *et al.* 1975), enalapril, benazepril, dan lainnya (Depkes 2006). Penggunaan obat sintetis secara terus menerus memberikan efek yang kurang baik bagi tubuh, sehingga penelitian untuk mencari obat alternatif yang lebih aman terus ditingkatkan. Pada umumnya senyawa bioaktif tanaman obat yang memiliki kemampuan penghambatan aktivitas ACE adalah senyawa golongan flavonoid. Kelemahan penggunaan tanaman obat adalah rasanya yang pahit dengan bau aromatik yang tajam. Salah satu cara untuk mengatasinya adalah dengan penyalutan dalam bentuk mikroenkapsulasi. Dalam bidang farmasi pembuatan obat dalam bentuk mikroenkapsulasi bertujuan mengubah bentuk zat aktif, dan usaha melindungi, menutupi rasa, melepaskan partikel zat aktif secara terkendali, serta untuk meningkatkan potensinya dibanding ekstrak biasa.

Hansen *et al.* (1995) telah mempelajari kemampuan penghambatan aktivitas ACE dari tanaman yang berasal dari India, China dan Chili. Penelitiannya menunjukkan bahwa pegagan mempunyai kemampuan penghambatan yang paling baik. Selain itu Tsutsumi *et al.* (2000), telah melakukan penelitian penapisan tanaman obat Indonesia dan Peru yang memiliki kemampuan penghambatan terhadap aktivitas ACE secara *in vitro*, di antaranya adalah tanaman tempuyung. Selain komponen bioaktif dari bahan alam, peptida sintetis dari protein makanan yang dimikroenkapsulasi dan dimodifikasi ternyata mampu menurunkan tekanan darah tikus yang hipertensi spontan (Chen *et al.* 2003).

Dalam penelitian sebelumnya, formulasi pegagan dan tempuyung menunjukkan kemampuan antihipertensi tetapi daya inhibisi formula ekstraknya terhadap aktivitas ACE masih rendah (51.27%) (Darusman *et al.* 2009). Pada penelitian ini, formulasi gabungan ekstrak pegagan, kumis kucing, dan sambiloto diproses menjadi mikroenkapsulasi. Formulasi ekstrak diharapkan setelah menjadi mikropartikel akan meningkatkan potensinya dibanding ekstrak biasa.

## **1.2. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan meningkatkan efektivitas mikropartikel formula ekstrak pegagan-kumis kucing-sambiloto sebagai inhibitor *angiotensin I converting enzyme* (ACE) secara *in vitro*.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Tanaman Obat

Menurut Depkes RI, definisi obat tradisional adalah obat jadi atau ramuan bahan alam yang berasal dari tumbuhan, hewan, mineral, atau campuran bahan tersebut yang secara tradisional telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman. Menurut Depkes RI, definisi tanaman obat Indonesia sesuai yang tercantum dalam SK Menkes No.149/SK/Menkes/IV/1978 sebagai berikut: (1) Tanaman atau bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan obat tradisional atau jamu; (2) Tanaman atau bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan pemula bahan baku obat (prokusor); dan (3) Tanaman atau bagian tanaman yang diekstraksi dan ekstrak tanaman tersebut digunakan sebagai obat. Tanaman obat tradisional yang terkenal di Indonesia, antara lain: pegagan (*Centella asiatica* (Linn), kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* (Benth), dan sambiloto (*Andrographis paniculata* (Ness).

Pegagan (*Centella asiatica*) adalah tanaman liar yang banyak tumbuh di perkebunan, ladang, tepi jalan, serta pematang sawah. Tanaman ini berasal dari daerah Asia tropik, tersebar di Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Nama yang biasa dikenal untuk tanaman ini selain pegagan adalah pegaga (Aceh), daun kaki kuda (Melayu), ampagaga (Batak), antanan (Sunda), gagan-gagan, rendeng (Jawa), taidah (Bali), sandanan (Papua). Pegagan dalam etanol 30% memiliki kandungan flavonoid sebesar 2.293% (b/b) dan asiaticosida sebesar 0.94% (Darusman *et al.* 2009). Subban *et al.* (2008) dalam penelitiannya menemukan dua senyawa baru flavonoid dari pegagan, yaitu castilliferol dan castillicetin, yang keduanya memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa 3,5-di-O-caffeoylquinic acid dari pegagan memiliki aktivitas antitrombotik dan antikoagulasi (Satake *et al.* 2007).

Tanaman kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* Benth.) mudah sekali ditemukan di seluruh nusantara. Tanaman kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* (Benth) mengandung berbagai senyawa kimia, salah satunya adalah flavonoid. Kumis kucing sudah digunakan masyarakat untuk diuretik, pengobatan hipertensi, gout dan rematik (Barnes *et al.*, 1996). Penelitian terhadap flavonoid dari beberapa tanaman mempunyai efek farmakologis sebagai antiinflamasi (Narayana *et al.* 2001). Nama daerah tanaman kumis kucing di daerah antara lain remujung (Jawa), songot koceng, sesalaseyan (Madura), remukjung, kumis ucing (Sunda) (Heyne, 1987).

Tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* (Ness) merupakan salah satu bahan obat tradisional yang telah dikenal sejak abad 18 dan banyak dijumpai hampir di seluruh nusantara. Masyarakat memanfaatkan bagian tajuk (daun dan batang) tumbuhan

sambiloto sebagai bahan obat tradisional untuk obat penguat, demam, disentri, kolera, diabetes, sakit paru-paru, influenza dan bronchitis (Wijayakusumah 1997). Sambiloto dikenal dengan nama daerah, antara lain ki oray atau ki peurat (Jawa Barat), bidara, takilo, sambiloto (Jawa Tengah dan Jawa Timur), atau pepaitan atau ampadu (Sumatera) (Dalimunthe 2009).

## **2.2. Mikroenkapsulasi**

Mikroenkapsulasi adalah suatu proses penyalutan secara langsung terhadap zat aktif dalam bentuk partikel halus dari zat padat, tetesan cairan, dan bentuk terdispersi. Dalam bidang farmasi mikroenkapsulasi bertujuan mengubah bentuk zat aktif, melindungi, menutupi rasa dan melepaskan zat aktif secara terkendali. Proses mikroenkapsulasi dapat diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu metode fisika kimia, metode kimia, dan metode fisika. Evaluasi mikroenkapsulasi *in vitro* yang harus dilakukan meliputi morfologi mikrokapsul, sifat mikromeritik, kandungan mikrokapsul, faktor perolehan kembali, tebal dinding mikrokapsul dan profil disolusi dari mikrokapsul (Chaerunisaa 2004).

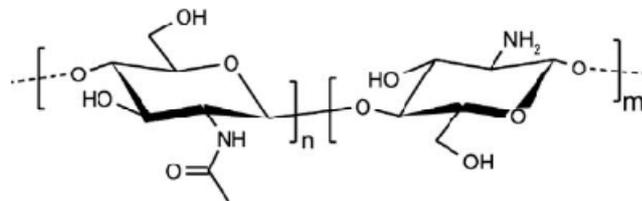
Mikropartikel merupakan hasil proses mikroenkapsulasi yang digunakan untuk menyalut suatu bahan dengan ukuran yang sangat kecil dengan diameter berkisar 15-20 mikron atau kurang dari setengah diameter rambut manusia (Yoshizawa 2004). Mikropartikel umumnya terdiri dari mikrokapsul dan mikrosfer. Secara garis besar, mikrokapsul dapat dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu tipe berinti tunggal, berinti lebih dari satu, dan tipe matriks (Herdini *et al.* 2008). Mikrokapsul adalah sistem vesikular di mana obat ini terbatas pada rongga dikelilingi oleh struktur batas, misalnya, polimer, sedangkan mikrosfer adalah sistem bola matriks di mana obat tersebar secara fisik dan merata.

Menurut Mundargi *et al.* (2008), mikroenkapsulasi biasanya menggunakan tiga metode: teknik emulsi air-minyak-air (w/o/w), metode pemisahan, dan pengering semprot (Gambar 2). Pada teknik pengering semprot, pembentukan partikel dicapai oleh emulsi atom dengan aliran udara panas di bawah penguapan pelarut yang kuat. Dari berbagai metode di atas, metode pengering semprot paling sederhana dan mudah untuk mengkapsulasi suatu bahan karena larutan suspensi yang dimikroenkapsulasi cukup dimasukkan ke dalam alat pengering semprot dan dihasilkan serbuk mikropartikel (Oliveira *et al.* 2005).

## **2.2. Kitosan**

Kitosan adalah biopoliaminosakarida linear alami yang diperoleh dari deasetilasi kitin. Kitin merupakan polimer kedua terbanyak di alam setelah selulosa, menjadi

komponen utama exoskeleton krustasea seperti kepiting, udang, udang, lobster dan beberapa jamur seperti *Aspergillus*, dan *Mucor Zygomycetes* (Sinha *et al.* 2004). Kitosan merupakan senyawa polisakarida  $\beta(1-4)$ -2-amino-2-deoksi-D-glukosa yang saling berikatan beta (Gambar 1). Kitosan larut pada kebanyakan larutan asam organik pada pH sekitar 4.0, tetapi tidak larut pada pH lebih besar dari 6.5, juga tidak larut dalam pelarut air, alkohol,  $H_2SO_4$ , dan aseton. Kitosan juga larut dalam asam mineral pekat seperti HCl dan  $HNO_3$  pada konsentrasi 0.15-1.1%, tetapi tidak larut pada konsentrasi 10% (Sugita *et al.* 2009). Sifat kelarutan kitosan ini dipengaruhi oleh bobot molekul dan derajat deasetilasi yang beragam bergantung pada sumber dan metode isolasi (Jamaludin 1994). Bobot molekul kitosan beragam, bergantung pada degradasi yang terjadi selama proses deasetilasi (Sugita 1992). Kitosan niaga memiliki derajat deasetilasi (DD) berkisar  $\geq 70\%$  dan bobot molekul (MW) berkisar antara  $1 \times 10^5 - 1.2 \times 10^6$  g/mol.



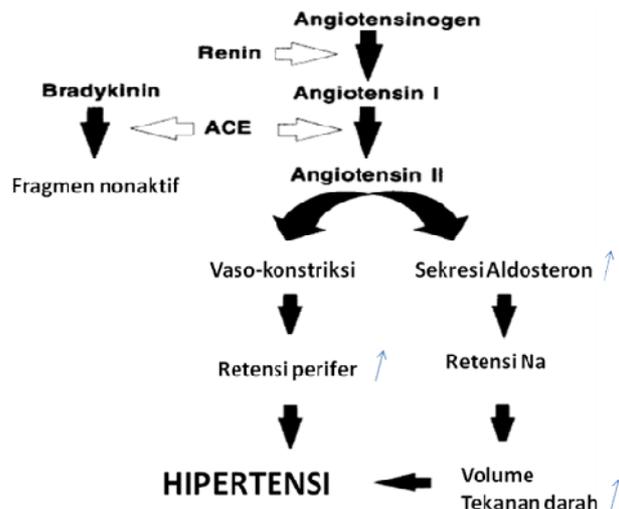
Gambar 1 Struktur kimia kitosan

Kitosan mengandung gugus amina dalam rantai karbonnya. Hal ini menyebabkan kitosan merupakan polimer alami berbentuk polielektrolit kationik yang berbeda dengan polisakarida lainnya (Ornum 1992). Kitosan memiliki bobot molekul tinggi, tidak bersifat racun, mudah didegradasi (biodegradable), dan mampu mengikat air untuk membentuk gel kitosan. Gel kitosan terjadi karena terbentuknya jaringan tiga dimensi antara molekul kitosan yang terentang pada seluruh volume gel dan menangkap sejumlah air di dalamnya. Sehingga terbentuk suatu jaringan struktur kaku dan tegar yang tahan terhadap gaya dan tekanan tertentu (Fardiaz 1989). Sifat jaringan serta interaksi molekul yang mengikat keseluruhan gel menentukan kekuatan, stabilitas, dan tekstur gel. Untuk memperkuat jaringan di dalam gel biasanya digunakan molekul lain sebagai pembentuk ikatan silang.

### 2.3. Inhibitor *Angiotensin I Converting Enzyme* (ACE)

*Angiotensin I converting enzyme* (ACE) inhibitor adalah obat yang digunakan untuk mengobati hipertensi dengan mencegah tubuh membuat hormon angiotensin II, hormon ini menyebabkan pembuluh darah menyempit, yang dapat menaikkan tekanan darah. ACE inhibitor membiarkan pembuluh darah melebar dan membiarkan lebih banyak darah mengalir ke jantung, sehingga menurunkan tekanan darah (Depkes 2006).

*Angiotensin converting enzyme* inhibitor terutama mengurangi aktivitas sistem renin-angiotensin-aldosterone, ini dapat dilihat dari mekanisme hipertensi oleh angiotensin II (Hansen *et al.* 1995) (Gambar 2).



Gambar 2 Mekanisme hipertensi oleh Angiotensin II

Inhibitor ACE digunakan terutama dalam pengobatan hipertensi, walaupun kadang juga digunakan dalam pengobatan gangguan jantung, penyakit ginjal atau system sklerosis. Kontrol tekanan darah dapat dilakukan salah satunya dengan penghambat enzim pengubah angiotensin. Obat golongan ini bekerja dengan cara menghambat kerja enzim pengubah angiotensin sehingga perubahan angiotensin I menjadi angiotensin II dapat diblok. Angiotensin II merupakan vasokonstriktor kuat dan juga menstimulasi sekresi aldosteron. Jika pembentukan angiotensin II dihambat maka vasokonstriksi (pengecilan pembuluh darah) tidak terjadi dan tekanan darah tetap (tidak menjadi tinggi). Hal yang sama juga terjadi dalam pembuluh darah di ginjal. Degradasi bradikinin juga diblok oleh penghambat enzim pengubah angiotensin (Guang & Philips 2009).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Desain Eksperimen

Penelitian pendahuluan meliputi ekstraksi dan formulasi sampel yang dilanjutkan pengoptimuman konsentrasi kitosan dan jumlah sampel dalam pembuatan mikropartikel kitosan dengan desain eksperimen *Response Surface Methodology* (RSM) metode *central composite design* (CCD). Variabel-variabel proses, yaitu konsentrasi kitosan (KK), dan jumlah sampel (JS), dipelajari untuk memperoleh optimasi konsentrasi kitosan dan

optimasi jumlah sampel yang digunakan sehingga diperoleh hasil yang maksimal yang akan digunakan untuk analisis selanjutnya.

Pengolahan data hasil penelitian selanjutnya akan menggunakan metode *one-way analysis of variance* (ANOVA) dan perbandingan berganda Tukey test (uji-T) dilakukan untuk menguji setiap perbedaan yang signifikan. Setiap percobaan diulang tiga kali. Data tersebut dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  standard error (SE) dan dianalisa dengan menggunakan Minitab 15. Perbedaan rata-rata pada tingkat kepercayaan 5% dianggap signifikan. Koefisien korelasi ( $r$ ) untuk menentukan hubungan antara variabel dihitung dengan menggunakan fungsi statistik korelasi bivariat.

### **3.2. Persiapan Bahan Formula**

#### **3.2.1. Ekstraksi Sampel**

Proses ekstraksi sampel mengacu pada proses ekstraksi BPOM (2005) yaitu maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 30%. Serbuk kering simplisia pegagan, kumis kucing, dan sambiloto yang memiliki daya inhibisi terhadap aktivitas ACE tertinggi. Pegagan, kumis kucing, dan sambiloto yang terpilih ini memiliki kadar flavonoid masing-masing 0.1533, 0.2186, dan 0.0579 (% (b/b) (Iswantini *et al.* 2010). Pengujian kadar senyawa flavonoid simplisia pegagan, kumis kucing putih, dan sambiloto dilakukan dengan standar kuersetin menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 370.8 nm. Masing-masing sebanyak 1000 g dimaserasi sebanyak 2 kali (@ 24 jam) dengan pelarut etanol 30%, lalu disaring. Filtrat yang diperoleh, diuapkan pelarutnya atau dipekatkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Lalu dikeringkan dengan oven dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai dilakukan penelitian selanjutnya.

#### **3.2.2. Formulasi Sampel**

Formulasi ekstrak pegagan, kumis kucing, dan sambiloto dengan kombinasi masing-masing konsentrasi 100 ppm:50 ppm:100 ppm. Dalam penelitian ini formulasi diproses menjadi mikropartikel yang kemudian diuji daya inhibisi terhadap ACE.

#### **3.2.3. Mikropartikel Kitosan**

Pada proses pembuatan mikropartikel kitosan dilakukan pengoptimuman konsentrasi kitosan dan jumlah formula ekstrak. Formula ekstrak terdiri dari gabungan ekstrak pegagan, kumis kucing dan sambiloto dalam pelarut etanol 30%. Kitosan dengan konsentrasi 2%, 2.5%, dan 3% (b/v) dilarutkan dalam asam asetat 3.5 % (v/v). (Darusman *et al.* 2009). Larutan kitosan 100 mL ditambahkan formula ekstrak (25 mL, 50 mL, dan 75 mL). Kemudian campuran ditambahkan 40 mL larutan sodium tripolifosfat (STP) 1 % (v/v) dalam pelarut akuades. Campuran diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama

30 menit sampai homogen, kemudian disonikasi selama 30 menit menggunakan ultrasonikator Branson dan dihomogenisasi menggunakan alat homogenizer Armfield model L4R selama 10 menit pada 700 rpm. Campuran dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui kadar ekstrak dalam partikel sebelum dan setelah sonikasi. Panjang gelombang maksimum dicari terlebih dahulu pada kisaran 200-600 nm. Sampel yang digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimum adalah sampel sebelum sonikasi. Blanko yang digunakan adalah 10 mL larutan asam asetat 3.5 % ditambahkan 2 mL akuades dan 0.35 mL etanol 30 %. Setelah panjang gelombang maksimum diperoleh, kedua variasi sampel diukur absorbansnya pada panjang gelombang maksimum dimulai dari sampel yang disonikasi 30 menit. Selanjutnya semua sampel diubah menjadi mikropartikel menggunakan alat pengering semprot (Mini Spray Dryer Buchi 190). Hasil mikroenkapsulasi ini dikarakterisasi menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) di Laboratorium Pusat Teknologi Bahan Industri Nuklir (PTBIN), Badan Teknologi Nuklir Serpong Tangerang.

#### **3.2.4. Uji Daya Inhibisi Formula Ekstrak terhadap Aktivitas ACE secara *In Vitro* (Chusman & Cheung 1971)**

Daya penghambatan ACE diukur dengan metode Chusman & Cheung (1971) yang mengkondisikan ACE dan substrat pada pH 8.3. Larutan sampel sebanyak 50  $\mu$ L ditambahkan 50  $\mu$ L larutan ACE (25 mU/mL) di pre-inkubasi pada suhu 32°C selama 10 menit, kemudian campuran ditambahkan 50  $\mu$ L substrat (8 mM Hip-His-Leu dalam 50 mM buffer HEPES mengandung 300 mM NaCl pada pH 8.3) dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu yang sama. Reaksi diakhiri dengan penambahan 1.0 M HCl (200  $\mu$ L). Asam hipurat yang dihasilkan dari reaksi diekstraksi dengan 1.5 mL etil asetat. Setelah sentrifugasi (4000 g, 15 menit), 1 mL supernatan dipindahkan ke dalam tabung reaksi lain, dan diuapkan pada suhu ruang selama 2 jam dalam vakum atau pengering oven. Kadar asam hipurat dilarutkan dalam 3.0 mL akuades, lalu dianalisis dengan menentukan serapannya pada 228 nm menggunakan spektrofotometer.

## **IV. HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **4.1. Bahan Formula**

Proses ekstraksi pegagan, kumis kucing, dan sambiloto dilakukan dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 30%. Hasil ekstraksi pegagan, kumis kucing, dan sambiloto diperoleh rendemen: 5.96%, 6.82%, dan 7.12%. Formulasi ekstrak diperoleh dari gabungan ekstrak pegagan, kumis kucing dan sambiloto.

## 4.2. Mikropartikel Kitosan

Kombinasi konsentrasi kitosan dan jumlah sampel dihasilkan dari metode *central composite design* (CCD) program minitab 15. Metode CCD ini (Tabel 1) meliputi variabel-variabel proses, yaitu konsentrasi kitosan (KK): 2.0 %, 2.5%, 3.0% (b/v), dan jumlah sampel (JS): 25 ml, 50 ml, dan 75 ml yang selanjutnya akan dihasilkan konsentrasi kitosan dan jumlah sampel optimum.

Tabel 1 Hasil pengoptimuman kombinasi konsentrasi kitosan (KS) dan jumlah sampel formula (JS)

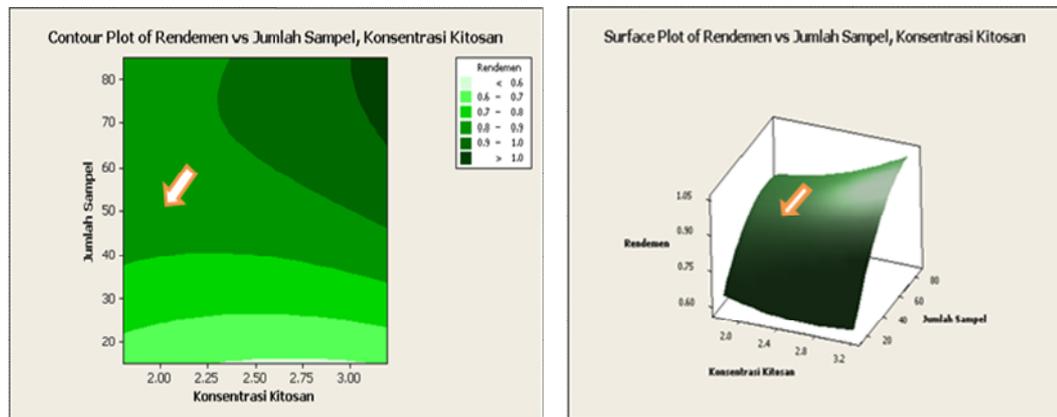
Run	Parameter		$\lambda_{max}$ ( nm)	$A_0$ ( $cm^{-1}$ )	$A_1$ ( $cm^{-1}$ )	Rendemen (%)
	KK (%)*	JS (ml)				
1	3	75	241	2.678	1.936	33.57
2	2.5	50	237	2.377	2.721	31.55
3	1.8	50	238	2.347	2.468	42.97
4	2.5	50	228	2.481	2.523	42.51
5	2.5	15	238	2.347	2.468	27.56
6	2	75	237.5	2.328	2.456	40.86
7	2.5	85	236	2.347	2.553	37.08
8	2	50	236.5	2.538	2.658	64.24
9	2.5	50	234.5	2.602	2.602	22.20
10	2	50	234.5	2.377	2.602	35.76
11	2	25	367	1.479	0.035	28.88
12	3.2	50	371	1.428	0.013	29.83
13	3	25	235	2.495	2.658	21.79

\*KK: konsentrasi kitosan, JS: jumlah sampel,  $A_0$ : Absorbansi sebelum sonikasi,  $A_1$ : Absorbansi sesudah sonikasi.

Pelarut asam asetat 3.5 % (v/v) digunakan dalam penelitian ini berbeda dengan beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya karena sifat kelarutan kitosan sangat dipengaruhi oleh bobot molekul dan derajat deasetilasi yang beragam tergantung pada sumber dan metode isolasinya. Penggunaan konsentrasi asam asetat lebih tinggi 1.75 kali dari konsentrasi kitosan disarankan menurut Calvo (1997). Pemilihan STP sebagai penaut-silang polianion karena STP tidak toksik dan memiliki anion multivalent. STP dapat membentuk suatu gel dengan interaksi ionik antara grup amino kitosan yang bermuatan lebih positif dengan STP yang bermuatan negatif.

Pengaruh konsentrasi kitosan dan jumlah sampel dapat dilihat pada *contour plot* hubungan rendemen dan jumlah sampel, konsentrasi kitosan, dan *Surface plot* hubungan rendemen dan jumlah sampel, konsentrasi kitosan (Gambar 3). Kombinasi pada konsentrasi kitosan 2% dan jumlah sampel 50 mL mempunyai rendemen tertinggi yaitu 64.24%. Kombinasi ini memiliki kekentalan yang lebih rendah dibandingkan dengan

kombinasi konsentrasi kitosan dan jumlah sampel lain yang memiliki viskositas lebih besar dan lebih keruh karena terbentuknya penggumpalan molekul-molekul kitosan.



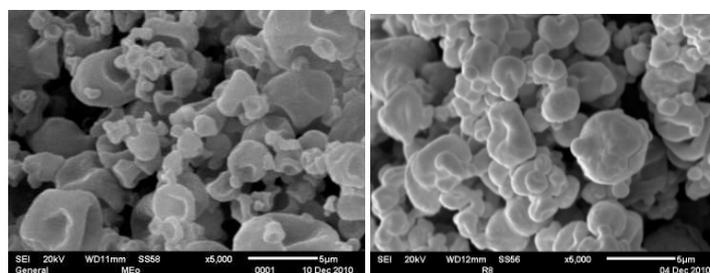
(a)

(b)

Gambar 3 Contour plot hubungan rendemen dan jumlah sampel, konsentrasi kitosan (a), Surface plot hubungan rendemen dan jumlah sampel, konsentrasi kitosan (b) (👉: kondisi optimum)

Gambar 3 menunjukkan konsentrasi kitosan dan jumlah sampel yang optimum berdasarkan rendemen dari mikropartikel (kurva diarsir lebih gelap, inset: tanda panah), sedangkan kurva yang diarsir lebih muda menunjukkan rendemen yang rendah. Kondisi rendemen yang rendah ini diperoleh saat jumlah sampel dibawah 40 ml (hijau muda) dan konsentrasi kitosan yang makin meningkat (hijau muda). Rendahnya rendemen mikropartikel diduga karena makin tingginya konsentrasi kitosan menyebabkan campuran menjadi kurang larut sehingga terjadi penggumpalan. Hal ini menguatkan bahwa konsentrasi kitosan yang rendah lebih efisien (Wu *et al.* 2005).

Hasil foto SEM kombinasi konsentrasi kitosan 2% dan jumlah sampel 50 mL menunjukkan partikel mikropartikel kitosan yang lebih seragam dan tidak terjadi penggumpalan dengan ukuran 1  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$ . (Gambar 4b).



(a)

(b)

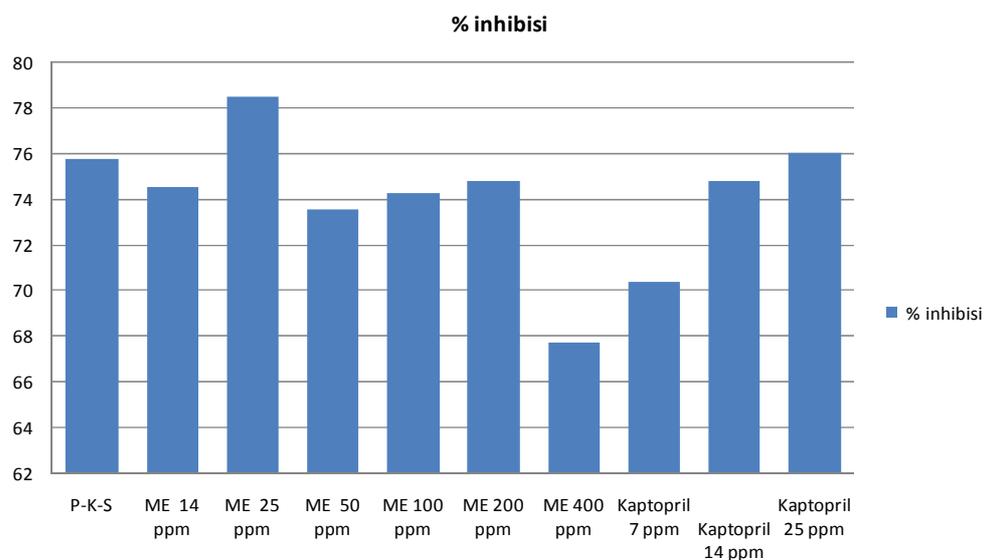
Gambar 4 Hasil foto SEM mikrokapsul kitosan kosong (a) dan terisi formula (b)

Jika dibandingkan dengan hasil foto SEM mikropartikel kosong atau tanpa penambahan formula ekstrak yang memiliki ukuran 0.45  $\mu\text{m}$  – 8.5  $\mu\text{m}$  (Gambar 4a),

mikropartikel ini berukuran lebih besar. Hal ini dikarenakan oleh terisinya ruang kosong di dalam mikropartikel oleh ekstrak. Rendemen mikropartikel kitosan tanpa dan terisi formula ekstrak masing-masing adalah 27.015 % dan 64.24 %.

#### 4.3. Uji Daya Inhibisi Formula Ekstrak terhadap Aktivitas ACE secara *in vitro*

Mikropartikel kitosan terisi formula ekstrak memiliki aktivitas inhibisi ACE sebesar 78.41 % pada konsentrasi 25 ppm dan formula ekstrak mempunyai aktivitas inhibisi ACE sebesar 75.73 %. Kontrol positif kaptopril pada konsentrasi 25 ppm memiliki aktivitas inhibisi ACE sebesar 75.98 % (Gambar 5). Daya inhibisi ACE mikropartikel kitosan terisi formula ekstrak meningkat terhadap daya inhibisi formula ekstrak kasarnya. Formulasi ekstrak pegagan-kumis kucing-sambiloto (P-K-S) ini menunjukkan kemampuan penghambatan yang lebih baik dari formulasi ekstrak pegagan dan tempuyung yang memiliki aktivitas inhibisi ACE sebesar 51.27% (Darusman *et al.* 2009).



Gambar 5 Grafik Aktivitas inhibisi mikrokapsul formula P-K-S dan kontrol positif kaptopril

Daya inhibisi mikropartikel terisi formula ekstrak terhadap aktivitas ACE ini, juga lebih tinggi dibandingkan dengan *Trichoderma giganteum* yang memiliki daya hambat terhadap ACE (61.3%) (Lee *et al.* 2004), dan ekstrak air *Pleurotus cornucopiae* (78.0%), serta ekstrak methanol *Pleurotus cornucopiae* (55.0%) (Jang *et al.* 2011).

Formula ekstrak pegagan- kumis kucing sambiloto setelah diproses menjadi mikropartikel memiliki nilai  $IC_{50}$  yang rendah. Nilai  $IC_{50}$  yang rendah menunjukkan bahwa aktivitas penghambat ACE yang tinggi (Ambarsari 2009). Nilai  $IC_{50}$  mikropartikel formula ekstrak memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $27.61 \pm 3.48$ . Nilai  $IC_{50}$  mikropartikel

formula ekstrak pegagan-kumis kucing-sambiloto ini masih lebih tinggi dari nilai  $IC_{50}$  tripeptida dari kacang tanah (*Arachis hypogaea*) yang memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $7 \pm 1 \times 10^{-6} M$  (Jimsheena & Gowda 2010).

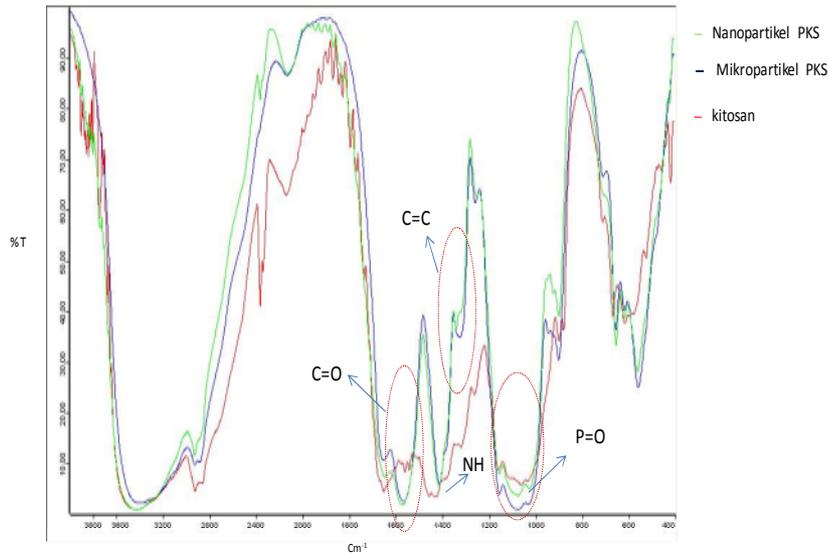
Penelitian menunjukkan formula gabungan ekstrak pegagan, kumis kucing dan sambiloto yang belum maupun telah diproses menjadi mikropartikel mempunyai daya inhibisi terhadap aktivitas ACE sebanding dengan kontrol positif kaptopril. Kaptopril merupakan obat ACE inhibitor sintetis yang jika digunakan secara terus menerus memberikan efek yang kurang baik bagi tubuh sehingga dengan penelitian ini dapat menjadi solusi dalam memanfaatkan obat alternatif alamiah yang lebih aman.

#### **4.4. Analisis Spektrofotometri FTIR**

Analisis FTIR (Fourier Transform Infrared) dilakukan untuk mengetahui perubahan gugus fungsi dari kitosan, mikropartikel dan nanopartikel kitosan terisi ekstrak. Setiap ikatan mempunyai frekuensi vibrasi yang khas sehingga absorpsi inframerah dapat digunakan untuk identifikasi gugus-gugus yang ada dalam suatu senyawa.

Analisis dengan FTIR menghasilkan puncak-puncak bilangan gelombang yang berbeda antara spektrum kitosan dengan spektrum mikropartikel. Pada gambar 6, dapat dilihat adanya perubahan intensitas transmitansi di beberapa daerah pita serapan. Perubahan pita serapan ini menunjukkan adanya interaksi antara kitosan, STP, formula ekstrak pegagan-kumis kucing-sambiloto yang digunakan. Pita serapan kitosan mempunyai karakteristik intensitas pita absorpsi pada bilangan gelombang  $3400 \text{ cm}^{-1}$  (-OH),  $1700 \text{ cm}^{-1}$  (C=O), dan  $1586.59 \text{ cm}^{-1}$  (N-H tekuk pada amina primer) (Wu *et al.* 2005, Lawrie *et al.* 2007), sedangkan untuk mikropartikel kitosan-sodium tripolifosfat (STP) yang terisi formula ekstrak memiliki puncak-puncak spesifik pada bilangan gelombang  $3375.73 \text{ cm}^{-1}$  (gugus O-H),  $1257.17 \text{ cm}^{-1}$  (C-O-C),  $1652.32 \text{ cm}^{-1}$  (gugus C=O),  $1565.63 \text{ cm}^{-1}$  (C=C, gugus aromatik benzena) (Gambar 6).

Spektrum FTIR mikropartikel kitosan terisi ekstrak pegagan-kumis kucing-sambiloto juga memiliki perbedaan dengan spektrum kitosan, antara lain munculnya puncak serapan baru pada bilangan gelombang  $1652.32 \text{ cm}^{-1}$  dan  $1565.63 \text{ cm}^{-1}$  yang berasal dari ekstrak pegagan-kumis kucing-sambiloto (memiliki senyawa aktif group flavonoid) menunjukkan adanya gugus C=C group flavonoid cincin aromatik.



Gambar 6 Spektrum FTIR dari kitosan, mikropartikel kitosan-STP terisi ekstrak, dan nanopartikel kitosan-STP terisi ekstrak

Pita serapan baru juga muncul di bilangan gelombang  $1153.82\text{ cm}^{-1}$  dan  $1154.66\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan pita serapan gugus P=O dari senyawa sodium tripolifosfat. Hal ini menunjukkan mikropartikel telah terisi formula ekstrak pegagan-kumis kucing-sambiloto (PKS), dan telah terjadi ikatan kitosan dengan senyawa STP, karena adanya interaksi elektrostatik antara kelompok fosfat STP dengan kelompok amino dari kitosan (Lou *et al.* 2010, Wu *et al.* 2005).

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Mikropartikel kitosan yang diperoleh dengan metode ultrasonikasi tipe *cleaning bath* dan homogenisasi menghasilkan rendemen 64.24 %. Mikropartikel kitosan tanpa dan terisi formula ekstrak menunjukkan kisaran diameter antara  $0.40\text{--}8.5\text{ }\mu\text{m}$  dan  $1\text{--}6\text{ }\mu\text{m}$ . Mikropartikel kitosan terisi formula ekstrak masing-masing memiliki daya inhibisi terhadap ACE sebesar 78.41 % pada konsentrasi 25 ppm, sedangkan formula ekstrak mempunyai daya inhibisi terhadap ACE sebesar 75.73%. Kontrol positif kaptopril pada konsentrasi 50 ppm memiliki daya inhibisi terhadap ACE sebesar 75.98%. Daya inhibisi mikropartikel meningkat dibanding daya inhibisi formula ekstrak.

### 5.2. Saran

Penelitian yang perlu dilakukan selanjutnya pada formula ekstrak adalah penentuan senyawa aktif formula, perbaikan metode pembuatan mikroenkapsulasi agar diperoleh ukuran partikel yang seragam, dan uji *in vivo* dengan pendekatan mekanisme kerja sebagai inhibitor ACE.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76: 965-977.
- Chen TI, Lo YC, Hu WT, Wu MC, Chen ST, Chang HM. 2003. Microencapsulation and modification of synthetic peptides food proteins reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 51: 1671-1675.
- Chusman DW, Cheung HW. 1971. Spectrophotometric Assay and Properties of The Angiotensin Converting Enzyme of The Rabbit Lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
- Hansen K, Nyman U, Smitt UW, Adsersen A, Gudiksen L, Rajasekharan S, Pushpangadan P. 1995. In vitro screening of traditional medicines for antihypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). *J Ethnopharmacol* 48:43-51.
- Iswantini D, Darusman LK, Trisilawati O, Yulinda L, Rahminiwati, Trivadila. 2010. Formula Antihipertensi Berbasis Bahan Aktif dan Budidaya Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban. Prosiding Seminar Nasional Sains III FMIPA IPB. Bogor-Indonesia: 154-162.
- Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release* 125: 193–209.
- Saenz C, Tapia S, Chavez J, Robert P. 2009. Microencapsulation by Spray Drying of Bioactive Compounds from Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem* 114: 616-622.
- Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. 2005. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics* 295: 235-245.
- Yen FL, Wu TH, Lin LT, Cham TM, Lin CC. 2008. Nanoparticles Formulation of *Cuscuta chinensis* Prevent Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Food and Chemical Toxicology* 26: 1771-1777.
- Zhao Y. 2009. A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioides* hydrolysate. *Peptides* 30:1028-1033.