

EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI NANOPARTIKEL EKSTRAK SIRIH MERAH (*PIPER CROCATUM*)

Kun Tanti Dewandari¹, Sri Yuliani¹, Sedarnawati Yasni²

¹ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor

² Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB Bogor
email : kuntnd@yahoo.com

Sirih merah merupakan salah satu tanaman obat yang dapat dimanfaatkan sebagai minuman fungsional, karena mengandung senyawa fitokimia dari golongan alkaloid, flavonoid, dan tanin yang berkhasiat sebagai antihyperglykemik dan antioksidan. Salah satu kelemahan dalam penyerapan bahan aktif adalah bioavailabilitasnya yang rendah. Salah satu teknologi yang dapat digunakan adalah teknologi nano. Tujuan penelitian ini adalah melakukan ekstraksi sirih merah, sintesis nanopartikel dan karakterisasinya serta mengetahui stabilitasnya pada beberapa kondisi pH. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi etanol 96% dengan maserasi memberikan hasil yang terbaik dengan rendemen $7,2 \pm 0,25\%$, kapasitas antioksidan $10892,86 \pm 6,06$ AAE μ g/ml, IC₅₀ sebesar $46,51 \pm 0,05$ AAE μ g/ml serta total fenol $2388,37 \pm 0,3$ mg/100g dengan komponen volatil utama yaitu sabinen dan mirsen. Konsentrasi kitosan 0,2% dengan rata-rata diameter $197,20 \pm 11,68$ nm memberikan hasil yang terbaik dengan nilai IP $0,235 \pm 0,03$, zeta potensial $32,75 \pm 2,11$ mV, kapasitas antioksidan $5502,00 \pm 8,48$ AAE μ g/ml, nilai IC₅₀ yaitu $279,10 \pm 0,05$ AAE μ g/ml dan total fenol $568,76 \pm 3,0$ mg/100g. Enkapsulasi nanopartikel dengan penyalut campuran maltodekstrin dan isolat protein menunjukkan terjadi peningkatan ukuran partikel dimana dengan pengisi maltodekstrin (M) sebesar $8952,7 \pm 2598$ nm dan campuran maltodekstrin dan isolat protein kedelai sebesar $8266,9 \pm 1134,9$ nm. Stabilitas pada beberapa kondisi pH menunjukkan bahwa penurunan persentase total fenol terbesar pada pH basa (6,7, dan 8) dibandingkan pada kondisi pH asam (2,3 dan 4).

Kata kunci : ekstraksi, antioksidan, daun sirih merah, nanopartikel

ABSTRACT. Kun Tanti Dewandari, Sri Yuliani and Sedarnawati Yasni. 2013. Extraction and Characterization of Nanoparticles of Red Betel Leaves (*Piper crocatum*). Red betel, a medicinal plant containing alkaloids, flavonoids and tannins, has health beneficial effects as antihyperglycemics and antioxidants. However, its low bioavailability limit the applications of this extract for nutraceuticals. Transformation of extract into nanoparticles through ionic gelation process was done to enhance its bioavailability. This study is aimed at extracting the active ingredients of red betel leaves using organic solvent, preparing nanoparticles, and characterizing their properties including their stability at different pHs. The study showed the highest yield of red betel leaves extract was observed in the extraction using ethanol 96% ($7.2 \pm 0.25\%$) with the capacity of antioxidant of 10892.86 ± 6.06 AAE μ g/ml, the IC₅₀ of 46.51 ± 0.05 AAE μ g/ml, the total phenol of 2388.37 ± 0.3 mg/100g and the major volatile compounds of sabinene dan myrcene. Chitosan at a concentration of 0.2% produced nanoparticle size of 197.20 ± 11.68 nm with PDI 0.235 ± 0.03 , zeta potential 32.75 ± 2.11 mV, antioxidant capacity 5502.00 ± 8.48 AAE μ g/ml, nilai IC₅₀ yaitu 279.10 ± 0.05 AAE μ g/ml dan total fenol 568.76 ± 3.0 mg/100g. Encapsulation of nanoparticles using maltodextrin and protein isolates resulted in increases in particle size, in which maltodextrin gave slightly large particles (8952.7 ± 2598 nm) than did combination of maltodextrin and soy proten isolate (8266.9 ± 1134.9 nm). Nanoparticles at pHs of 6, 7 and 8 exhibited larger decreases in total phenol as compared to that at lower pHs (2, 3, and 4).

Keywords : extraction, antioxidant, red betel leaves, nanoparticles

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki sumber daya alam yang berlimpah, termasuk tanaman herbal, terutama yang bermanfaat bagi kesehatan. Salah satu tanaman herbal yang memiliki manfaat untuk kesehatan adalah sirih merah. Sirih merah diketahui dapat dimanfaatkan sebagai obat beberapa macam penyakit, diantaranya diabetes melitus¹. Saat ini ada kecenderungan penggunaan tanaman herbal untuk pengobatan terus meningkat. Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar menyatakan bahwa sebanyak 49,53 persen penduduk Indonesia berusia 45 tahun ke atas mengkonsumsi jamu².

Sirih merah merupakan salah satu tanaman obat yang dapat dimanfaatkan sebagai minuman fungsional, karena mengandung senyawa fitokimia dari golongan alkaloid, flavonoid, dan tanin yang berkhasiat sebagai antihiperlipidemia dan antioksidan. Komponen utama dalam sirih merah adalah monoterpen dan sesquiterpen yang dapat meningkatkan aktivitas monofenolase dan difenolase pada enzim tirosinase³. Air rebusan sirih merah dosis 20 g/kg BB dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan cara memperbaiki kelenjar eksokrin pankreas tikus yang rusak akibat aloksan¹. Penelitian terhadap ekstrak etanol daun sirih menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memiliki aktivitas antioksidan, yaitu dapat menghambat oksidasi asam lemak dengan daya hambat terbesar 80,40% pada konsentrasi 200 ppm dan sebagai *radical scavenger* dengan nilai IC_{50} 85,82 ppm⁴. Salah satu yang menjadi kelemahan ekstrak senyawa aktif herbal adalah rendahnya kelarutan dalam air sehingga menurunkan bioavailabilitasnya. Aplikasi teknologi nano berpotensi mengatasi kelemahan tersebut. Aplikasi teknologi nano melalui sintesis partikel nano sebagai sistem pengantaran senyawa aktif memberikan sejumlah keuntungan yaitu : (1) ukuran partikel dan karakteristik permukaan partikel nano dapat dengan mudah dimodifikasi sesuai kebutuhan, (2) partikel nano dapat mengontrol dan mempertahankan pelepasan senyawa aktif selama transportasi sehingga mengurangi efek samping, (3) pelepasan senyawa aktif terkontrol dan karakteristik partikel dapat terdegradasi. Kandungan senyawa aktif dapat dimasukkan ke dalam sistem tanpa reaksi kimia, yang merupakan faktor penting untuk menjaga aktivitas senyawa⁵.

Aplikasi teknologi nano untuk pangan cenderung meningkat. Teknologi ini menawarkan keunggulan dalam meningkatkan bioavailabilitas bahan aktif, pengendalian pelepasan bahan aktif serta memperbaiki sifat sensoris. Dalam ukuran nano (50-500 nm), partikel bahan aktif lebih mudah diabsorpsi oleh dinding usus halus sehingga meningkatkan bioavailabilitasnya. Absorpsi bahan aktif meningkat karena kelarutan partikel meningkat dan luas

permukaan partikel yang besar. Dalam ukuran nano, partikel juga memiliki waktu tinggal yang lebih panjang karena terjebak dalam lapisan mukosa usus⁶.

Beberapa hasil penelitian nano partikel *nutraceutical*, seperti propolis, teh hijau maupun curcuma yang menunjukkan bahwa dalam bentuk nano partikel, bioavailabilitas dan sifat fungsional lainnya meningkat secara signifikan^{1,4}. Penerapan teknologi nano ini dimaksudkan untuk meningkatkan kemampuan aktivitas fungsional dan bioavailabilitas dari senyawa-senyawa fitokimia sirih merah. Pada nanoemulsi minyak dalam air (O/W) kurkumin menggunakan MCT sebagai fase minyak menunjukkan peningkatan kemampuannya sebagai antiradang⁷. Nanopartikel kuercetin dapat meningkatkan aktivitas antioksidan pelepasan obat 74 kali lebih tinggi⁸. Encapsulasi katekin dengan kitosan cukup memberikan perlindungan terhadap katekin yang diformulasi dalam nanopartikel CS-TPP dan dapat menstabilkan katekin dalam lingkungan alkali tetapi waktu yang diperlukan katekin bebas dari enkapsulat cukup lama yaitu 8 jam, pada kondisi yang sama epigallocatechin (EGCG) hanya membutuhkan waktu 10 menit⁹.

Tujuan penelitian ini adalah melakukan ekstraksi sirih merah, sintesis nanopartikel dan karakterisasi nanopartikel ekstrak sirih merah serta kestabilannya dalam penyimpanan selama 7 hari.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun sirih merah yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Bahan kimia untuk ekstraksi yaitu etanol 96% (Merck), bahan kimia untuk sintesis nanopartikel yaitu kitosan DD 85% diperoleh dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, natrium tripolifosfat/STPP (teknis), asam asetat (Merck, pa), aquades serta bahan kimia untuk analisis.

Metode Penelitian

Penelitian diawali dengan ekstraksi senyawa aktif sirih merah dengan cara maserasi (metode dingin) dan refluks (metode panas). Metode maserasi dilaksanakan dengan cara sebagai berikut : Bubuk daun sirih merah kering sebanyak 50 gram dengan ukuran 50 mesh, direndam menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:4. Campuran diaduk dengan bantuan *shaker* selama 6 jam, kemudian didiamkan selama 24 jam. Campuran disaring untuk mendapatkan filtrat. Pada metode refluks, bahan aktif diekstraksi, didinginkan dengan bantuan kondensor, disaring dan

filtratnya ditampung. Proses ini berlangsung secara berkesinambungan selama 3 jam, pada suhu 45°C. Filtrat yang diperoleh dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* (buchi rotavapor R-114) pada suhu 40-50°C sampai dihasilkan ekstrak kental dengan total padatan terlarut 30° brix.

Tahapan selanjutnya adalah sintesis nanopartikel dengan modifikasi fisik menggunakan metode gelasi ionik untuk pembentukan oleh sodium tripolifosfat (TPP). Sintesis nanopartikel dilakukan pada beberapa konsentrasi kitosan dalam asam asetat yaitu 0,1%, 0,2%, 1% dan 2% (b/v). Larutan kitosan sebanyak 30 g diaduk dan ditambah dengan larutan STPP (6 g) secara bertahap. Pengadukan dilanjutkan hingga campuran homogen dan ditambahkan sirih merah sebanyak 1 g ditambahkan ke dalam campuran¹⁰.

Nanopartikel kemudian dienkapsulasi menggunakan *spray dryer* LabPlant SD-05 dengan bahan pengisi maltodekstrin dan isolat protein kedelai. Komposisi yang digunakan adalah 100% maltodekstrin (M) dan kombinasi 80% maltodekstrin, 20% isolat protein kedelai (MISP).

Metode Analisis

Analisis terhadap ekstrak sirih merah diawali dengan uji fitokimia secara kualitatif dan dilanjutkan dengan uji kuantitatif untuk menetapkan total fenol¹¹, menguji kapasitas antioksidan¹², dan penghitungan nilai IC₅₀. Selain itu, senyawa volatile ekstrak juga dianalisis dengan GC-MS Agilent 7890A¹³. Sebanyak 3,5 g sampel dimasukkan dalam vial SPME (*Solid Phase Microextraction*) yang dilengkapi dengan fiber DVB/PDMS. Sampel diekstrak pada 80°C selama 30 menit pada *headspace vial* dengan menggunakan fiber SPME jenis. Sampel kemudian diinjeksikan ke GCMS dengan kondisi berikut: suhu injektor 250°C; jenis injektor adalah *splitless*, gas pembawa adalah gas helium (He) dengan laju alir 1 ml/menit. Kondisi suhu MS adalah 250°C. Kondisi oven diatur dengan suhu awal 45 °C selama 1 menit kemudian meningkat 6°C/min sampai 250°C selama 25 menit. Kolom yang digunakan adalah DB-WAX (60 m x 250 µm x 0.25 µm) dengan menggunakan database NIST5a.

Karakterisasi nanopartikel menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) DelsaNano C Beckman Coulter. Karakterisasi meliputi ukuran partikel, distribusi ukuran nanopartikel yang dinyatakan sebagai indeks polidispersitas (IP) dan zeta potensial¹⁴. Selain itu, pada nanopartikel juga dilakukan uji sifat fungsional meliputi total fenol¹¹, pengujian kapasitas antioksidan (DPPH) dengan mengukur absorbansi serapan dari sampel dan blanko yang dikalikan 100%¹². Nilai IC₅₀ ditetapkan

untuk mengetahui konsentrasi sampel yang mampu memberikan persen penangkapan radikal sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin kuat daya antioksidannya. Perhitungan IC₅₀ dilakukan berdasarkan persamaan regresi linier % penghambatan radikal DPPH terhadap konsentrasi senyawa.

Produk nanoenkapsulasi yang diperoleh dianalisis morfologinya menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM-EDS JEOL-JSM 6510 AL). Sebelum dianalisis, sampel diberi lapisan emas menggunakan alat *gold sputter coater* pada kondisi vakum. Sampel tersebut ditempatkan pada mikroskop SEM dan diamati pada voltase akselerasi 20 Kv¹⁵. Gambar yang diperoleh kemudian direkam dan dicetak. Setelah itu dilakukan pengujian stabilitas pada beberapa kondisi pH selama 7 hari penyimpanan¹⁶. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan ANOVA pada tingkat kepercayaan 95% dengan uji lanjut Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Sirih Merah

Ekstraksi dilakukan untuk mendapatkan senyawa aktif yang terdapat dalam sirih merah. Senyawa aktif diekstrak dengan menggunakan etanol 96% sesuai dengan kepolaran senyawa aktif dalam sirih merah yang merupakan golongan senyawa fenol. Dengan pelarut tersebut senyawa aktif dapat diekstrak dengan baik¹⁷. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak sirih merah mengandung senyawa polifenol, flavonoid dan tanin (Tabel 1). Kadar polifenol dan tanin secara kualitatif tampak lebih baik pada ekstrak yang diperoleh dari metode maserasi dibanding ekstrak serupa hasil metode refluks.

Tabel 1 Uji fitokimia ekstrak sirih merah

Table 1. Phytochemical analysis of red betel extract

Parameter / Parametre	Metode Ekstraksi/ Extraction Method	
	Maserasi/ Maceration	Refluks/ Reflux
Polifenol / Polyphenol	+++	++
Saponin /Saponine	-	-
Tanin /Tanine	+	+
Flavonoid / Flavonoid	++	+

Keterangan : +/positif : senyawa teridentifikasi , -/negatif : senyawa tidak teridentifikasi

Remarks : +/positive : identified compound, -/negative : unidentified compound

Metode maserasi memberikan rendemen ekstrak lebih rendah dibandingkan dengan metode refluks. Pemanasan dapat meningkatkan jumlah rendemen oleoresin karena suhu yang dibutuhkan oleh suatu pelarut untuk mencapai titik didihnya dapat melarutkan komponen oleoresin yang tidak terekstrak dengan perlakuan tanpa pemanasan. Pemanasan yang lama dapat menyebabkan sejumlah komponen oleoresin rusak dan menguap, sehingga jumlahnya lebih rendah dibandingkan dengan tanpa pemanasan. Hal ini menyebabkan kapasitas antioksidan dan nilai IC_{50} nya lebih rendah dibandingkan metode maserasi (Tabel 2).

Komponen-komponen yang teridentifikasi dari minyak atsiri sirih merah dengan analisis GC-MS, terdiri dari 2 golongan terpena yaitu monoterpena (sabinena, mirsena, alpha tuhyena, alpha terpinena) dan monoterpena alkohol (linalool)¹⁸. Dari luas area yang teridentifikasi menunjukkan bahwa ekstrak sirih merah paling banyak mengandung sabinen dan mirsen (Tabel 3). Sabinen dan mirsen merupakan monoterpen yaitu golongan alkohol primer pada tanaman yang berperan dalam pengurangan kolesterol dan merangsang terjadinya apoptosis. Monoterpen dapat meningkatkan kadar enzim hati yang berperan dalam mendetoksifikasi karsinogen. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak sirih merah mempunyai potensi sebagai antioksidan¹⁸.

Tabel 2. Rendemen, kapasitas antioksidan dan total fenol ekstrak sirih merah pada metode ekstraksi maserasi dan refluks

Table 2. Yield, antioxidant capacity and phenol of red betel extract of maceration and reflux

Parameter/Parameter	Metode Ekstraksi/ Extraction method	
	Maserasi / Maceration	Refluks/ Reflux
Rendemen/Yield (%)	7,2 ± 0,25 a	9,8 ± 0,35 b
Kapasitas antioksidan (AAE μ g/ml)	10892,86 ± 6,06 a	9971,43 ± 6,06 b
Antioxidant capacity		
IC_{50} / Inhibitor Concentration (AAE μ g/ml)	46,51 ± 0,05 a	49,57 ± 0,27 b
Total fenol/Phenolic compound (mg/100g)	2388,37 ± 0,3 a	2257,22 ± 0,9 a

Keterangan : data merupakan rerata dari 3 kali ulangan (rata-rata \pm STD) huruf pada baris sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Remarks : number from 3 replication (average \pm STD letter on the same row show no significance difference on 5% level

Sintesis dan Karakteristik Nanopartikel Ekstrak Sirih Merah

Sifat fisik nanopartikel (ukuran, indeks polidispersitas (IP) serta zeta potensial)

Nanopartikel ekstrak sirih merah disintesis dengan modifikasi fisik menggunakan metode gelasi ionik memanfaatkan sodium tripolifosfat (STPP) untuk membentuk ikatan silang. Metode gelasi ionik sangat sederhana, mudah dilakukan dan banyak digunakan untuk membuat nanopartikel¹⁹. Proses taut silang secara fisik dengan interaksi elektrostatis lebih mungkin digunakan dengan toksisitas dan pengaruh lain yang lebih rendah bila dibandingkan taut silang dengan proses kimia²⁰. Metode ini juga telah digunakan untuk sintesis nanopartikel pada katekin teh²¹. Nanopartikel dapat disintesis secara spontan dengan cara mengontrol titik kritis diantaranya konsentrasi kitosan dan rasio kitosan serta TPP²¹.

Semakin tinggi konsentrasi kitosan yang ditambahkan menunjukkan peningkatan ukuran partikel karena hal ini dapat menimbulkan gumpalan (*aglomerasi*) pada molekul kitosan²². Semakin besar konsentrasi kitosan dengan jumlah STPP yang tetap juga akan memperbesar ukuran nanopartikel karena adanya kecenderungan untuk beraglomerasi²³. Pada konsentrasi yang tinggi, partikel-partikel yang terbentuk dari reaksi antara kitosan dan TPP sangat banyak dan padat, sehingga bergerombol membentuk agregat menjadi partikel berukuran mikro¹⁴.

Konsentrasi kitosan 0,2% memberikan ukuran partikel yang paling kecil, sedangkan pada konsentrasi 0,1% tidak terdeteksi adanya partikel. Pada konsentrasi rendah (0,1%) semua kitosan diduga larut sempurna sehingga tidak mampu membentuk partikel. Tidak terdapat perbedaan nyata ukuran partikel yang dihasilkan dari kitosan 0,2% dan 1% (Tabel 4).

Sintesis nanopartikel dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya komposisi material dan metode yang digunakan. Komposisi material yang sesuai mampu menghasilkan nanopartikel dengan ukuran kecil dan morfologi seragam. Nanopartikel akan terbentuk pada komposisi tertentu antara kitosan dan TPP dimana terbentuk nanopartikel dengan ukuran 20-200 nm dengan konsentrasi kitosan 1,5mg/ml dan TPP 0,7mg/ml²⁴. Penggunaan TPP pada penelitian ini adalah untuk mencampurkan polimer kitosan dengan polianion sodium tripolifosfat yang menghasilkan interaksi antara muatan positif pada gugus amino kitosan dengan muatan negatif tripolifosfat²⁵. Keberadaan TPP akan memberikan efek *crosslinking* dimana akan terjadi beberapa perubahan karakteristik nanopartikel yang terbentuk²⁶.

Tabel 3. Senyawa volatile ekstrak sirih merah hasil analisis dengan GC-MS

Table 3. Component volatile of red betel extract from GC-MS analysis

Senyawa /Component	Metode Maserasi/Maseration Method		Metode Refluks/Reflux Method	
	Waktu retensi (menit)/ Retention time (minute)	Area(%)/ Area	Waktu retensi (menit)/ Retention time (minute)	Area (%)/ Area
Alpha Tujena	4,10	1,28	-	-
Sabinen	4,74	35,08	4,73	21,4
Beta pinena	4,81	1,28	4,80	1,87
Mirsena	4,93	9,33	4,92	6,58
L Linalool	6,94	3,07	6,93	2,71
Alpha terpineol	9,01	1,30	-	-
Beta Caryopilena	14,54	1,80	14,53	1,54
Germacrena D	16,01	2,06	16,01	1,01
Delta Guaien	16,59	0,83	16,58	2,35
Sesquisabinena	18,54	2,03	18,53	1,73

Nilai indeks polidispersitas (IP) merupakan ukuran lebarnya distribusi ukuran partikel dengan nilai lebih kecil dari 0,3 menunjukkan sampel memiliki distribusi sempit dan formula nanopartikel yang seragam²⁷. Semakin kecil nilai indeks polidispersitas menunjukkan distribusi ukuran nanopartikel semakin sempit, yang berarti ukuran diameter nanopartikel semakin homogen²⁸. Dari keempat konsentrasi yang dilakukan, menunjukkan bahwa semua konsentrasi memiliki nilai dibawah 0,3 sehingga dikatakan masih seragam dan homogen.

Suatu partikel dinyatakan stabil bila memiliki nilai zeta potensial diluar rentang -30mV hingga 30mV. Dari hasil pengukuran menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan 0,2% dan 1% memiliki rentang nilai yang menunjukkan kestabilan dibanding konsentrasi 0,1% dan 2% (Tabel 4). Konsentrasi kitosan dapat mempengaruhi kestabilan suatu partikel, dimana dengan konsentrasi yang tinggi menyebabkan NH₃ ternetralkan pada permukaan sehingga mengakibatkan kekuatan elektrostatis meningkat diantara partikel sehingga menjadi tidak stabil²⁹.

Selain itu, nilai positif pada zeta potensial

menunjukkan bahwa nanopartikel banyak berada pada sekeliling permukaan. Hal ini menunjukkan bahwa nanopartikel yang terbentuk banyak dipengaruhi oleh gugus amino bebas yang akan meningkatkan muatan pada permukaan dan nilai zeta potensial nanopartikel. Hal ini menunjukkan bahwa berat molekul yang tepat pada kitosan akan memberikan kestabilan yang optimal¹⁴.

Sifat fungsional nanopartikel

Hasil pengujian kapasitas antioksidan menunjukkan bahwa diantara konsentrasi yang lain, nanopartikel dengan perlakuan konsentrasi kitosan 0,2% memberikan nilai yang tertinggi, yaitu sebesar 560,00±5,65 ppm. Tingginya nilai aktivitas antioksidan pada konsentrasi 0,2% karena ukuran partikel yang kecil dapat meningkatkan sifat mukoadhesif dan permeabilitas sehingga ketersediaannya di dalam tubuh meningkat²⁰. Dengan semakin meningkatnya jumlah antioksidan maka semakin banyak radikal DPPH yang tereduksi. Secara umum, aktivitas antioksidan suatu senyawa berkaitan dengan kandungan total fenol karena antioksidan alami pada tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik termasuk di dalamnya golongan flavonoid¹⁷.

Tabel 4. Ukuran partikel nanopartikel ekstrak sirih merah pada beberapa konsentrasi larutan kitosan

Table 4. Nanoparticle size of red betel extract in various concentration of chitosan

Konsentrasi larutan kitosan/ Concentration of chitosan (%)	Indek Polidispersitas/ Polidispersity Index	Ukuran partikel/ Particle size (nm)	Nilai Zeta Potensial/ Zeta potential value (mV)
0,1	ttd	ttd	19,99 ± 0,06 a
0,2	0,141 ± 0.15 a	197,20 ± 11,68 a	32,75 ± 2,11 c
1	0,185 ± 0.05 a	467,17 ± 101,17 a	34,51 ± 0,17 c
2	0,235 ± 0.03 a	1148,03 ± 481,78 b	27,57 ± 0,65 b

Keterangan : data merupakan rerata dari 3 kali ulangan (rata-rata ± STD) huruf pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Remark : number from 3 replication (average ± STD) letter on the same column show no significance difference on 5% level

Tabel 5. Hasil pengujian kapasitas antioksidan dan IC50 pada beberapa konsentrasi kitosan

Table 5. Analysis antioxidant capacity and IC50 of different concentration of chitosan

Konsentrasi Kitosan /Chitosan concentration (%)	Aktivitas antioksidan/ Antioxidant activity (AAE μ g/ml)	Nilai IC50/ IC50 value (AAE μ g/ml)	Total fenol/ Phenolic compound (mg/100gr)
0,1	365,36 \pm 5,05 a	934,98 \pm 4,68 d	399, 87 \pm 0.03 a
0,2	560,00 \pm 5,65 d	676,84 \pm 3,20 a	568,76 \pm 3,0 d
1	471,43 \pm 0,25 b	862,61 \pm 5.55 c	437,188 \pm 3,0 b
2	532,77 \pm 0,37 c	780,67 \pm 1,88 b	470,18 \pm 0,6 c

Keterangan= data merupakan rerata dari 3 kali ulangan (rata-rata \pm STD) huruf pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Remark : number from 3 replication (average \pm STD) letter on the same column show no significance difference on 5% level

Nilai IC₅₀ paling rendah terdapat pada perlakuan konsentrasi kitosan 0,2%. IC₅₀ merupakan konsentrasi sampel yang mampu memberikan persen penangkapan radikal sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis. Sehingga semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin kuat daya antioksidannya. Hal ini mempunyai makna bahwa dibandingkan sampel yang lain ekstrak etanol mempunyai aktivitas penangkapan radikal bebas paling tinggi. Semakin kecil nilai IC₅₀, maka semakin besar aktivitas penangkal radikal bebas DPPH³⁰. Konsentrasi kitosan 0,2% dipilih untuk proses enkapsulasi menggunakan *spray dryer* karena pertimbangan ukuran yang lebih kecil, efisiensi proses serta berdasarkan nilai IC₅₀.

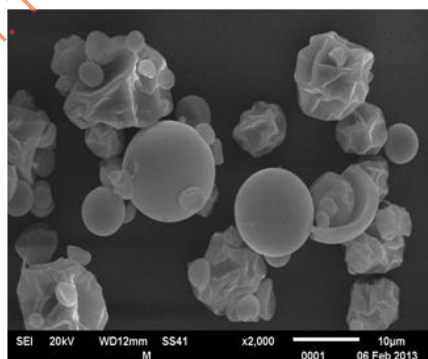
Enkapsulasi nanopartikel ekstrak sirih merah

Dari hasil pengeringan semprot menunjukkan bahwa rendemen yang diperoleh untuk sampel MISP (maltodekstrin 80%, isolat protein kedelai 20%) dan M (maltodekstrin 100%) berturut-turut adalah 8,8% dan 10,05%. Protein merupakan salah satu bahan yang sangat potensial digunakan sebagai enkapsulan serta pembawa senyawa aktif dan obat, dimana dapat mengoptimalkan penghantaran yang spesifik dan sesuai target³¹.

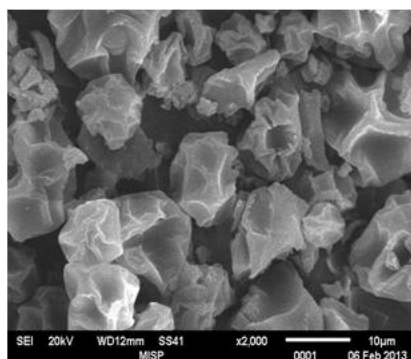
Hasil foto SEM dengan perbesaran 2000x menunjukkan bahwa nanopartikel memiliki bentuk bola dengan permukaan kasar dan berkerut. Pengkerutan terjadi karena adanya efek *ballooning* akibat adanya penggunaan panas pada proses *spray drying* serta pengaruh komposisi penyalut yang digunakan yang mungkin tidak optimal. Kemungkinan lain, senyawa fenolik yang terperangkap di dalamnya terlepas oleh panas. Hal ini sejalan dengan laporan yang dikemukakan oleh Peres³². Penambahan TPP pada kitosan tidak akan mempengaruhi morfologi permukaan nanopartikel yang dihasilkan karena TPP hanya membentuk ikatan ionik antar molekul kitosan³³. Pada Gambar 1, terlihat bahwa ukuran nanopartikel mengalami peningkatan dengan nilai hingga rentang 10 μ m.

Stabilitas selama penyimpanan

Parameter yang menjadi tolok ukur kestabilan nanopartikel selama penyimpanan adalah jumlah total fenol yang terlepas dari matrik nanopartikel. Semakin banyak total fenol yang terdeteksi menunjukkan kestabilan yang rendah karena bahan penyalut tidak dapat melindungi senyawa aktif. Pengujian total fenol



Maltodekstrin (M)



Maltodekstrin+isolat protein kedelai (MISP)

Gambar 1. Struktur nanopartikel hasil foto SEM dengan perbesaran 2000x
Picture 1. Nanoparticle structure from SEM with magnification 2000x

dilakukan pada medium penyimpanan pada akhir penyimpanan hari ke 7 dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 6.

Secara umum, nanopartikel kitosan yang berisi ekstrak sirih merah lebih stabil pada pH asam dibandingkan pada pH basa. Tsai melaporkan bahwa stabilitas nanopartikel kitosan termodifikasi tripolipospat dipengaruhi oleh pH lingkungan dan kekuatan ionik larutan. Ukuran nanopartikel kitosan termodifikasi tripolipospat meningkat pada penyimpanan selama 97 hari bila pH nya berubah dari 5,5 menjadi 7,5 dan 9¹⁶.

Tabel 6. Konsentrasi total fenol produk nanoenkapsulasi (mg/100g) pada berbagai pH selama penyimpanan 7 hari

Table 6. Concentration of phenol (mg/100g) from various pH during 7 days storage

pH	Perlakuan/Treatment		
	NP	M	MISP
2	52,01 jk	43,82 g	52,80 k
3	51,43 ij	47,28 h	52,52 jk
4	50,65 i	46,36 h	50,30 i
6	31,73 d	29,09 c	33,87 e
7	31,60 d	26,25 b	36,08 f
8	32,43 d	24,76 a	34,58 e

Keterangan= data merupakan rerata dari 3 kali ulangan (rata-rata \pm STD) huruf pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%. NP=nanopartikel, M =100% maltodekstrin, MISP =kombinasi 80% maltodekstrin, 20% isolat protein kedelai

Remark : number from 3 replication (average \pm STD) letter on the same column show no significance difference on 5% level.

NP = nanoparticle, M = 100% maltodextrin, MISP = combination of 80% maltodextrin, 20% soy protein isolate

Nanopartikel mengalami penurunan persentase total fenol terbesar pada pH tinggi dibandingkan pada pH rendah. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada pH yang semakin meningkat, nanopartikel cenderung mengalami kerusakan dimana senyawa fenol yang terkandung di dalam sirih merah juga akan mengalami kerusakan. Hal ini kemungkinan disebabkan nanopartikel kitosan merupakan gel yang metastabil, selain itu struktur mudah berubah akibat perubahan pH dan kekuatan ionik larutan. Fenomena ini tergantung pada polikation dari nanopartikel kitosan¹⁶. Stabilitas polifenol yang dienkapsulasi dengan kitosan dan alginate menunjukkan bahwa 50% polifenol terlepas setelah 3,5 jam¹⁵.

KESIMPULAN

Ekstraksi etanol 96% dengan maserasi memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan metode refluks dengan rendemen $7,2 \pm 0,25\%$, kapasitas antioksidan $10892,86 \pm 6,06$ (AAE μ g/ml), IC₅₀ sebesar $46,51 \pm 0,05$ (AAE μ g/ml) serta total fenol $2388,37 \pm 0,3$ mg/100g dengan komponen utama yaitu sabinen dan mirsen. Konsentrasi kitosan 0,2% dengan rata-rata diameter $197,20 \pm 11,68$ nm memberikan hasil yang terbaik dengan nilai IP $0,235 \pm 0,03$, zeta potensial kestabilan $32,75 \pm 2,11$ mV, kapasitas antioksidan $5502,00 \pm 8,48$ AAE μ g/ml, nilai IC₅₀ yaitu $279,10 \pm 0,05$ AAE μ g/ml dan total fenol $568,76 \pm 3,0$ mg/100g. Enkapsulasi nanopartikel dengan penyalut campuran maltodekstrin dan isolat protein menunjukkan terjadi peningkatan ukuran partikel hingga rentang 10 μ m. Stabilitas pada beberapa kondisi pH menunjukkan bahwa penurunan persentase total fenol terbesar pada pH basa (6,7,8) dibandingkan pada pH asam (2,3,4).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan pada program KKP3T T.A 2012 Badan Litbang Pertanian atas pemberian dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Safithri M, Fahma F. Potency of *Piper crocatum* decoction as an antihyperglycemia in rat strain *Sprague dawley*. Hayati Journal of Biosciences. 2007; 15(1):45-48. ISSN:1978-3019.
2. Departemen Kesehatan RI. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar. Badan Litbang Kesehatan. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta: 2010.
3. Batubara I, Rahminiwati M, Darusman LK, Mitsunaga T. Tyrosinase activity of piper beetle and *piper crocatum* essential oil. Proceeding of International Conference on Basic Science. Malang : Faculty of Science, University of Brawijaya. 2011; 50-53.
4. Alfarabi M. Kajian antidiabetogenik ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) in vitro [Tesis]. Bogor : Institut Pertanian Bogor. 2010.
5. Hirano S, Seino H, Akiyama saya, Nonaka I. Chitosan: bahan biokompatibel untuk pemberian oral dan intravena. Gebelein CG Dunn RL eds. Kemajuan polimer biomedis. New York: Pleno Tekan. 2010; 283-289.
6. Kammona O, Costas K. Recent advances in nanocarrier-based mucosal delivery of biomolecules. Journal of Controlled Release. 2012; 161: 781-794.

7. Ahmed K, Yan L, David Julian M, Hang X. Nanoemulsion and emulsion based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chemistry*. 2012; 132:799-807.
8. Yu Hailong, Qingrong H. Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. *Food Chemistry*. 2010; 119 (2):669-674.
9. Eugene Leo Prakash, R. Manavalan development, characterisation and toxicity evaluation of nanoparticles of andrographolide. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. 2012; 4(1). ISSN- 0975-1491.
10. Alishahi A, Mirvaghefi A, Tehrani MR, Farahmand H, Shojaosadati, SA, Dorkoosh, FA, Elsabee, MZ. Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. *Food Chem*. 2011; 126:935-940.
11. Atanassova M, Georgieva K, Ivancheva. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 2011; 46(1): 81-88.
12. Kubo IN, Mastuda P, Xiao, Haraguchi H. Antioxidant activity of *Deodecyl Gallate*. *J. Agr Food Chem*. 2002; 50: 3533-3539.
13. Suratmo. Potensi ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai antioksidan [Tesis]. Malang: Jurusan Kimia Universitas Brawijaya. 2008.
14. Mardiyati E, Sjaikhurrizal EM, Damai RS, Idah R, Sriningsih. Preparasi dan aplikasi nanopartikel kitosan sebagai sistem penghantaran insulin secara oral. Pusat Teknologi Farmasi dan Medika BPPT [Internet]. 2012. Tersedia di : <http://insentif.ristek.go.id/PROSIDING/RT-2012-0071.htm>.
15. Deladino L, Anbinder PS, Navarro AS, Martino MN. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydr Polym*. 2008; 71 (1):126-134.
16. Tsai ML, Rong HC, Shi WB, Wei YC. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. *Carb Polymers*. 2001; 84:756-761.
17. Prasad KN, En Y, Chun Y, Mouming Z, Yueming J. Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Inn Food Sci Emer Tech*. 2009;10:155-159.
18. Utami MR. Fraksinasi senyawa aktif minyak atsiri daun sirih merah (*Piper cf. fragile. Benth*) sebagai pelangsing aromaterapi secara *in vivo* [Tesis]. Bogor: Program studi Kimia. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor; 2011.
19. Mohanraj YJ, Chen Y. Nanoparticle – A Review. *Trop J Pharm Res*. 2006; 5(1):561-573.
20. Shu XZ, Zhu KJ. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *Int J Pharm*. 2008; 201:51-58.
21. Hu B, Chenliang P, Sun Y, Zhiyun H, Hong Y, Bing Hu, Xiaoxiong Z. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. *J Agric Food Chem*. 2008; 56:7451-7458.
22. Wahyono D. Ciri nanopartikel kitosan dan pengaruhnya pada ukuran partikel dan efisiensi penyalutan ketoprofen [Tesis]. Bogor: Program studi Kimia. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. 2010.
23. Grenha A, Seijo B, Remunan-Lopez C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2005; 25:427-437.
24. Xu Yongmai, Du Yumin. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003; 250:215-226.
25. Chattopadhyay DP, Inamdar MS. Aqueous behavior of chitosan. *Int J Poly Sci*. 2010. ID 939536:1-7.
26. Rodrigues S, Ana M. Rosa da Costa, Ana Grenha. Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydr Polym*. 2012; 89 : 282-289.
27. Yen FL, Wu TH, Lin LT, Cham TM, Lin CC. Nanoparticle formulation of cuscutea chinensis prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Tox*. 2008; 46:1771-1777.
28. Yuan Y, Gao Y, Zhao J, Mao L. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Res Intl*. 2008; 41:61-68.
29. Li Ji, Qingrong Y. Rheological properties of chitosan-tripolyphosphate complexes: From suspensions to microgels. *Carbohydr Polym*. 2012; 87:1670- 1677.
30. Dungir SG, Dewa GK, Vanda SK. Aktivitas antioksidan ekstrak fenolik dari kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal MIPA Unsrat Online*. 2012; 1(1):11-15.
31. Gunasekaran S, Sanghoon Ko, Lan Xiao. Use of whey protein for encapsulation and controlled delivery applications. *J Food Eng*. 2007; 83:31-40.
32. Peres I, Rocha S, Gomes J, Morais S, Pereira MC, Coelho M. Preservation of catechin antioxidant properties loaded in carbohydrate nanoparticles. *Journal Carbohydrate Polymers*. 2011; 86:147-153.
33. Desai KGH, Park HJ. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Dry Tech*. 2005; 23:1361-1394.