

Studi Pendahuluan tentang Enkapsulasi Vitamin C dalam Liposom Kelapa (*Cocos nucifera* L.)

Dwi Hudiyanti^{a,*}, Desita Triana^a, Parsaoran Siahaan^a

^a Physical Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: dwi.hudiyanti@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords:</p> <p>Coconut Liposomes, Cholesterol, Encapsulation efficiency and Leakage of liposome</p>	<p>The encapsulation of vitamin C in coconut liposomes (<i>Cocos nucifera</i> L.) was studied. The efficiency of encapsulation of coconut liposomes was 80.76%. The addition of cholesterol to the liposome membrane affects the amount of encapsulation efficiency. Addition of cholesterol by 30% increased the efficiency of encapsulation to 92.71%. Temperature affects the ability of coconut liposomes to store vitamin C in 8 days. Storage at 5°C lowers the leakage of coconut liposomes.</p>
<p>Kata kunci:</p> <p>Liposom kelapa, Kolesterol, Efisiensi Enkapsulasi, dan Kebocoran liposom</p>	<p>Abstrak</p> <p>Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari enkapsulasi vitamin C dalam liposom kelapa (<i>Cocos nucifera</i> L.). Efisiensi enkapsulasi liposom kelapa diperoleh sebesar 80,76%. Penambahan kolesterol pada membran liposom mempengaruhi besarnya efisiensi enkapsulasi. Penambahan kolesterol sebesar 30% meningkatkan efisiensi enkapsulasi menjadi sebesar 92,71%. Suhu mempengaruhi kemampuan liposom kelapa untuk menyimpan vitamin C dalam 8 hari. Penyimpanan pada suhu 5°C menurunkan kebocoran liposom kelapa.</p>

1. Pendahuluan

Liposom adalah struktur *self-assembly* yang saat ini banyak diteliti sebagai pembawa bahan aktif pada bidang farmasi dan pangan. Liposom tersusun dari fosfolipida baik alami maupun sintetik. Dalam penelitian terdahulu [1-3] liposom yang terbuat dari fosfolipida kelapa digunakan untuk mengenkapsulasi senyawa polar 5-*carboxyfluorescein* dan diketahui hanya mampu menyimpan 10% bahan aktifnya setelah 17 jam penyimpanan.

Efisiensi enkapsulasi dan kebocoran pada liposom dipengaruhi oleh komposisi penyusun pada membran bilayer fosfolipid. Komposisi membran ini akan mempengaruhi permeabilitas dan fluiditas membran. Penambahan zat aditif seperti kolesterol mampu meningkatkan efisiensi enkapsulasi dan menurunkan kebocoran [1, 4]. Penambahan kolesterol pada konsentrasi tertentu dapat mengurangi mobilitas

molekul sehingga membran menjadi rigid. Membran bilayer fosfolipid yang rigid menyebabkan permeabilitas serta fluiditas membran menurun sehingga efisiensi enkapsulasi meningkat dan kebocoran berkurang.

Vitamin C merupakan senyawa yang memiliki beragam manfaat bagi manusia, antara lain berperan dalam menghambat pembentukan senyawa karsinogenik, stimulan untuk sintesis kolagen, menghambat penuaan, antioksidan, dan berperan dalam imunitas tubuh terhadap penyakit berbahaya seperti kanker, penyakit jantung, dan penyakit lainnya [5]. Vitamin C mudah sekali teroksidasi akibat pengaruh suhu maupun logam berat, reaktif dalam dan berinteraksi dengan komponen makanan lainnya sehingga menyebabkan manfaat vitamin C menjadi berkurang [5-7].

Vitamin C perlu dienkapsulasi untuk melindunginya dari proses teroksidasi maupun interaksinya dengan senyawa lain selama waktu penyimpanan. Dalam

penelitian ini, akan dipelajari kemampuan liposom kelapa dalam mengenkapsulasi vitamin C. Liposom kelapa dimodifikasi dengan menambahkan kolesterol dengan konsentrasi 0%, 10%, 20%, 30%, dan 40% (w/w). Selain itu akan diamati pengaruh kolesterol terhadap efisiensi enkapsulasi dan kebocoran liposom kelapa setelah 8 hari penyimpanan dalam suhu 5°C, 25°C, dan 37°C. Sebagai pembandingan, digunakan fosfolipid kedelai yang telah banyak digunakan sebagai bahan dasar untuk membuat liposom dalam berbagai aplikasi [6, 7].

2. Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah fosfolipida kelapa (*Cocos nucifera L.*) hasil isolasi *in house*, Kloroform p.a, methanol p.a, NaCl p.a, n-Heksan, aquades, alkohol 96%, *DI water*, Na₂HPO₄·2H₂O, NaH₂PO₄·2H₂O, vitamin C (uncoated), kolesterol dari Sigma Aldrich, lesitin kedelai dari Sigma Aldrich, Fast Blue B Salt dari Sigma Aldrich, EDTA p.a, NaOH p.a dan Asam asetat 99 % dari Merck.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi blender Maspion MT-1206, corong pisah dengan kran teflon, timbangan (Kern ALS 220-4N), kertas saring whattman 1442-090 Grade No.42:90mm-100/pk, *magnetic stirrer* Thermolyne Cimarec, *rotary evaporator*, *shaker*, *ultrasonic cleaner* (Krisbow), timbangan, vortex mixer (VM-300), *centrifuge* (Hettich EBA 20). Instrumentasi untuk analisis adalah *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dengan merk prestige-21 Shimadzu, *Gas Chromatography-Mass Spectrometri* (GCMS) QP2010S-Shimadzu, dan Spektrometer UV-Vis Spectroquant Pharo 300.

Metode

Enkapsulasi Vitamin C dalam Liposom Kelapa

Campuran fosfolipid dan kolesterol diformulasikan dengan perbandingan sebagai berikut:

Tabel 1. Campuran fosfolipid dan kolesterol

Kadar kolesterol ($b_k/(b_r+b_k)$)	Massa bahan (mg)	
	Fosfolipid	Kolesterol
0	74	-
10	66,6	7,4
20	59,2	14,8
30	51,8	22,2
40	44,4	29,6

b_k : berat kolesterol, b_r : berat fosfolipida

Campuran fosfolipid dan kolesterol dilarutkan dalam 100 mL kloroform sehingga diperoleh larutan baku fosfolipid dengan konsentrasi kolesterol 0 %, 10%, 20 %, 30 %, dan 40 %. Kloroform merupakan pelarut semipolar sehingga dapat melarutkan fosfolipid dan kolesterol yang cenderung semipolar.

Pembuatan liposom dilakukan menurut metode yang diberikan oleh Hudiyanti, *dkk* [1, 2]. Larutan baku fosfolipida dengan konsentrasi 100 ppm sebanyak 75 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya dialiri gas nitrogen hingga terbentuk lapis tipis. Vitamin C 100 ppm dalam buffer fosfat ditambahkan ke dalam lapis tipis. Selanjutnya dilakukan *freeze thawing* (pendinginan pada suhu 5°C, pemanasan pada suhu 50°C dan pengocokan dengan vortex mixer) dan dilanjutkan dengan sonikasi.

Efisiensi Enkapsulasi

Penentuan efisiensi enkapsulasi dilakukan sesuai dengan metode Yang, *dkk* [7], sebanyak 4 mL larutan liposom yang telah siap dianalisis disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan larutan yang mengandung vitamin C bebas diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 0,3 mL EDTA (0,25 M), 0,5 mL asam asetat (0,5 M), dan 1,25 mL garam fast blue B (2 g/L) secara berurutan. Setelah itu campuran diencerkan sampai 10 mL dengan *DI water*. Larutan kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 420 nm. Nilai efisiensi enkapsulasi vitamin C ($EE_{vit.c}$) didapat dengan menghitung konsentrasi vitamin C tidak terenkapsulasi (C_{sisa}) dan dibandingkan dengan konsentrasi vitamin C sebelum dienkapsulasi (C_{awal}), sesuai dengan persamaan:

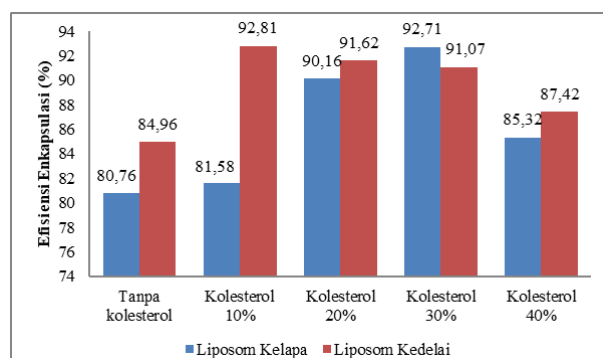
$$EE_{vit.c} = [1 - (C_{sisa}/C_{awal})] \times 100\%$$

Kebocoran Liposom

Untuk menentukan daya simpan liposom kelapa sebagai penghantar dalam sistem penghantaran obat, dilakukan analisis kebocoran. Sampel liposom yang telah siap dianalisis disimpan selama 8 hari dalam tiga suhu yang berbeda, yaitu suhu dingin (5°C), suhu ruang (25°C), dan suhu inkubator (37°C). Kebocoran pada liposom ditentukan dengan menghitung konsentrasi vitamin C yang terlepas dari sistem liposom setelah 8 hari penyimpanan. Pengujian kebocoran liposom sama dengan prosedur pengujian efisiensi enkapsulasi.

3. Hasil dan Pembahasan

Enkapsulasi Vitamin C dalam Liposom



Gambar 1. Nilai Efisiensi Enkapsulasi liposom kelapa dan kedelai

Enkapsulasi vitamin C dalam liposom dilakukan dalam medium buffer fosfat pH 7,4. Penggunaan *buffer*

fosfat pH 7,4 sesuai dengan pH fisiologis dalam tubuh. Proses enkapsulasi dilakukan melalui proses pendinginan, kemudian pemanasan pada suhu 50°C, dan pengadukan dengan *vortex mixer*. Pada proses ini lapis tipis pada dinding tabung akan terangkat dan terdispersi sempurna sebagai liposom [3]. Saat lapis tipis telah terdispersi seluruhnya, dispersi akan menjadi keruh. Keruhnya dispersi ini menandakan liposom yang terbentuk termasuk dalam kategori *Multilamellar Vesicle* (MLV) [1, 8]. Dispersi liposom selanjutnya disonikasi untuk memperkecil ukuran partikelnya. Semakin lama disonikasi, maka partikel yang terbentuk akan semakin kecil yang ditandai dengan dispersi yang menjadi lebih jernih.

Analisis Efisiensi Enkapsulasi Vitamin C

Sruktur liposom yang tersusun oleh membran fosfolipida dalam bentuk bola (*sphere*) memungkinkan liposom untuk mengenkapsulasi bahan aktif bersifat polar di dalam rongga (*core*) strukturnya [3]. Dalam penelitian ini vitamin C yang bersifat polar dienkapsulasi dalam liposom dari fosfolipida kelapa. Analisis efisiensi enkapsulasi bertujuan untuk mengetahui kemampuan liposom kelapa dalam mengenkapsulasi vitamin C pada berbagai konsentrasi kolesterol. Sebagai pembanding, dilakukan analisa efisiensi enkapsulasi pada liposom dari fosfolipid kedelai karena liposom kedelai telah banyak digunakan dalam bidang farmasi.

Nilai efisiensi enkapsulasi keduanya disajikan dalam gambar 1. Secara keseluruhan efisiensi enkapsulasi pada liposom kelapa lebih rendah dibandingkan efisiensi enkapsulasi pada liposom kedelai. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan jenis rantai asam dalam fosfolipida penyusun liposomnya. Rantai asam lemak penyusun fosfolipid kelapa adalah C8:0 dan C12:0, sedangkan rantai asam lemak penyusun fosfolipid kedelai yaitu C16:0 dan C18:2 [1]. Menurut Maherani, *dkk.* [9] efisiensi enkapsulasi liposom bergantung pada kekakuan membran bilayer liposomnya. Panjang rantai asil akan mempengaruhi ketebalan dan interaksi antar rantai asil di dalam membran. Fosfolipida dengan rantai asil yang panjang akan memberikan interaksi yang lebih kuat serta menambah ketebalan, sehingga membran menjadi kurang cair atau kaku. Bilayer liposom kelapa tersusun atas rantai asil yang pendek, sehingga interaksi antar rantai asil kurang kuat dan membran menjadi kurang kaku dibandingkan liposom kedelai. Hal ini menyebabkan liposom kelapa lebih sulit mengenkapsulasi vitamin C dari pada liposom kedelai sehingga efisiensi enkapsulasinya menjadi lebih rendah.

Liposom kelapa menunjukkan nilai efisiensi enkapsulasi tertinggi pada konsentrasi kolesterol 30% yang bernilai 92,71%. Nilai efisiensi enkapsulasi ini meningkat sebanyak 11,95% dibandingkan liposom kelapa tanpa penambahan kolesterol. Sementara itu, nilai efisiensi enkapsulasi tertinggi pada liposom kedelai dengan konsentrasi kolesterol 10% yaitu bernilai 92,81%. Nilai efisiensi enkapsulasi ini meningkat sebanyak 7,85%. Penambahan kolesterol meningkatkan nilai efisiensi enkapsulasi pada liposom kelapa lebih besar dibandingkan liposom kedelai. Data ini menunjukkan

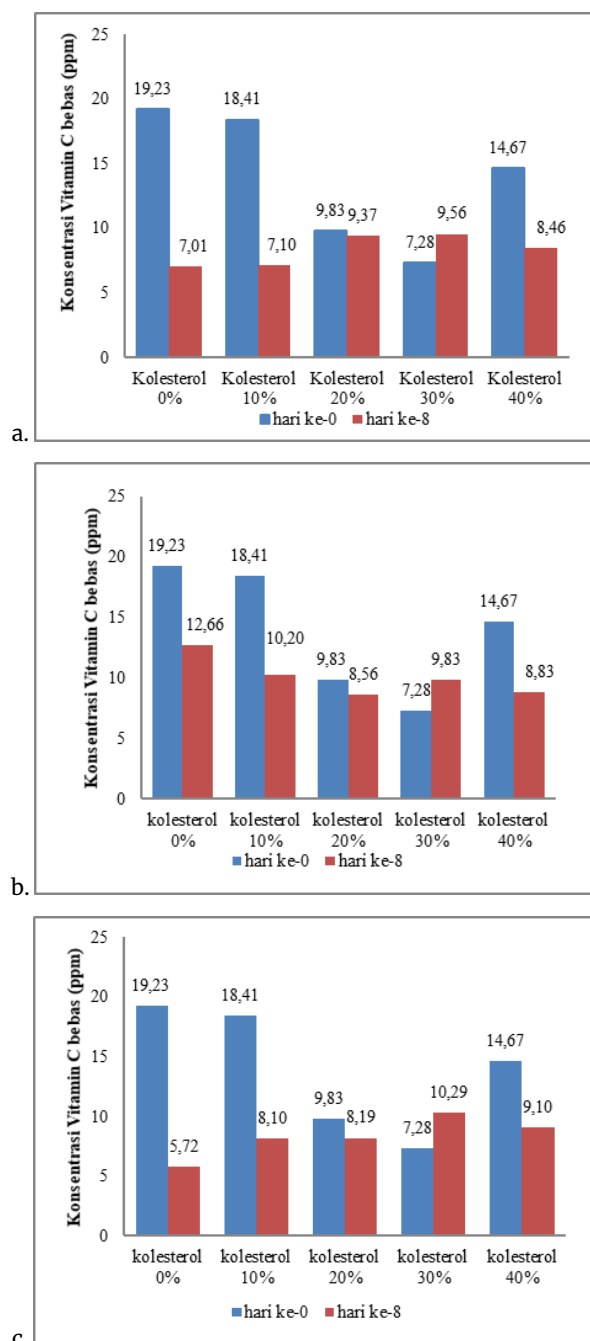
bahwa kolesterol berinteraksi lebih baik pada bilayer fosfolipida kelapa dibandingkan dengan fosfolipida kedelai. Fosfolipida kelapa memiliki rantai asil pendek dengan interaksi antar rantai yang kurang kuat sehingga kolesterol lebih mudah menempatkan dirinya di dalam membran fosfolipida tersebut. Akibatnya kolesterol akan memperkuat interaksi antar rantai asilnya sehingga enkapsulasi vitamin C dalam liposom kelapa menjadi lebih maksimal.

Analisis Kebocoran pada Liposom

Pada penelitiannya Hudiyanti, *dkk.* [1] telah mengetahui bahwa liposom kelapa mengalami kebocoran ketika digunakan untuk menyimpan senyawa polar 5-carboxyfluorescein selama 17 jam. Dalam penelitian itu pula diketahui bahwa kolesterol secara efektif dapat mengurangi kebocoran tersebut. Pada penelitian ini liposom digunakan untuk menyimpan vitamin C dalam 3 suhu yang berbeda yaitu suhu 5°C, 25°C, dan 37°C selama 8 hari. Secara keseluruhan pengujian kebocoran pada liposom kelapa dilakukan dengan menghitung konsentrasi vitamin C bebas pada setiap supernatannya. Profil kebocoran liposom kelapa dapat dilihat pada gambar 2. Profil tersebut menggambarkan bahwa suhu penyimpanan mempengaruhi kebocoran liposom kelapa. Pada suhu penyimpanan 5°C kebocoran liposom kelapa terlihat paling rendah.

Konsentrasi vitamin C dalam supernatan dipengaruhi oleh adanya kebocoran dari dalam liposom serta proses degradasi dari vitamin C karena adanya reaksi oksidasi [10]. Proses kebocoran akan menambah jumlah vitamin C pada supernatan sedangkan proses degradasi akan menurunkan konsentrasinya. Oleh karenanya apabila konsentrasi vitamin C bebas yang diperoleh menunjukkan peningkatan maka artinya proses kebocoran lebih dominan. Sementara itu apabila konsentrasi yang diperoleh menurun maka proses degradasi lebih menentukan.

Secara keseluruhan data pada gambar 2 menunjukkan bahwa pada umumnya konsentrasi vitamin C bebas pada supernatan mengalami penurunan setelah 8 hari penyimpanan. Sehingga dapat diartikan proses degradasi vitamin C dalam sampel lebih dominan daripada proses kebocoran dari dalam liposom. Selanjutnya jika diasumsikan bahwa kecepatan degradasi pada suhu yang sama adalah konstan maka besarnya perubahan konsentrasi vitamin C setelah penyimpanan (8 hari) terhadap konsentrasi awal (0 hari) sebanding dengan besarnya kebocoran. Dengan demikian maka dapat diketahui dari data tersebut bahwa perubahan konsentrasi kolesterol mempengaruhi kebocoran vitamin C.



Gambar 2. Kebocoran Vitamin C pada penyimpanan (a) 5°C, (b) 25°C, dan (c) 37°C

4. Kesimpulan

Efisiensi enkapsulasi liposom kelapa diperoleh sebesar 80,76%. Penambahan kolesterol pada membran liposom mempengaruhi besarnya efisiensi enkapsulasi. Penambahan kolesterol sebesar 30% meningkatkan efisiensi enkapsulasi menjadi sebesar 92,71%. Suhu mempengaruhi kemampuan liposom kelapa untuk menyimpan vitamin C. Penyimpanan pada suhu 5°C menurunkan kebocoran liposom kelapa.

5. Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dana dari Hibah Penelitian Fundamental PNPB Undip 2015

6. Daftar Pustaka

- [1] Dwi Hudyanti, Tri Joko Raharjo, Narsito, Sri Noegrohati, Study on Leakage of Sesame (*Sesamum indicum* L.) and Coconut (*Cocos nucifera* L.) Liposomes, *Oriental Journal of Chemistry*, 31, 1, (2015) 435-439 <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/310152>
- [2] Dwi Hudyanti, Tri Joko Raharjo, Narsito Narsito, Sri Noegrohati, Isolasi dan Karakterisasi Lesitin Kelapa dan Wijen, *Agritech*, 32, 1, (2012) 23-26 <https://doi.org/10.22146/agritech.9652>
- [3] Dwi Hudyanti, Tri Joko Raharjo, Narsito Narsito, Sri Noegrohati, Investigation on the morphology and properties of aggregate structures of natural phospholipids in aqueous system using cryo-tem, *Indonesian Journal of Chemistry*, 12, 1, (2012) 57-61
- [4] Maria-Lucia Briuglia, Chiara Rotella, Amber McFarlane, Dimitrios A. Lamprou, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, *Drug Delivery and Translational Research*, 5, 3, (2015) 231-242 [10.1007/s13346-015-0220-8](https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8)
- [5] Shabbar Abbas, Chang Da Wei, Khizar Hayat, Zhang Xiaoming, Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review, *Food Reviews International*, 28, 4, (2012) 343-374 [10.1080/87559129.2011.635390](https://doi.org/10.1080/87559129.2011.635390)
- [6] Lan Chang, Yongsheng Zhao, Studies on Preparation and Properties of Vc Nano Liposomes, *Journal of Applied Science and Engineering Innovation*, 1, 4, (2014) 234-240
- [7] Shuibing Yang, Wei Liu, Chengmei Liu, Weilin Liu, Guihong Tong, Huijuan Zheng, Wei Zhou, Characterization and Bioavailability of Vitamin C Nanoliposomes Prepared by Film Evaporation-Dynamic High Pressure Microfluidization, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33, 11, (2012) 1608-1614 [10.1080/01932691.2011.629511](https://doi.org/10.1080/01932691.2011.629511)
- [8] Arkadiusz Kozubek, Jerzy Gubernator, Ewa Przeworska, Maria Stasiuk, Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes, *Acta Biochimica Polonica*, 47, 3, (2000) 639-649
- [9] B. Maherani, E. Arab-Tehrany, M. R. Mozafari, C. Gaiani, M. Linder, Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies, *Current Nanoscience*, 7, 3, (2011) 436-452 [10.2174/157341311795542453](https://doi.org/10.2174/157341311795542453)
- [10] Gerald F. Combs Jr, James P. McClung, Chapter 10 - Vitamin C, in: *The Vitamins (Fifth Edition)*, Academic Press, 2017, pp. 267-295.