



Pengaruh Berat Molekul Kitosan terhadap Efisiensi Enkapsulasi BSA (*Bovine Serum Albumin*) Menggunakan Agen *Crosslink* Asam Sitrat

Bani Amanullah Prasojo^a, Parsaoran Siahaan^{a*}

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

* Corresponding author: siahaan.parsaoran@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:
chitosan, BSA,
molecular
interaction,
molecular weight,
encapsulation

Kata Kunci:
kitosan, BSA,
interaksi molekul,
berat molekul,
enkapsulasi

Abstract

The research about the effect of chitosan molecular weight on the encapsulation efficiency of BSA (*Bovine Serum Albumin*) using citric acid crosslink agent has been done. This study aims to determine the encapsulation efficiency (EE) BSA with the effect of chitosan molecular weight and crosslink citric acid and determine the energy of interaction between chitosan and BSA through *ab initio* methods and docking. The method used in this study were chitosan hydrolysis with HCl, BSA encapsulation and calculations of interaction energy with *ab initio* and docking. The results showed the encapsulation efficiency (EE) BSA by the initial chitosan and hydrolyzed chitosan was 52.06% and 66.63%. Citric acid as a crosslink agent could also increase the efficiency of encapsulation. Encapsulation efficiency of chitosan and chitosan plus citric acid was 52.06%, and 52.79%. The results showed the molecular weight and crosslink agent might affect the efficiency of encapsulation. The results of *ab initio* calculations showed that the interaction between chitosan trimer segments with the amino acids aspartic acid on the BSA with the interaction energy $-91.3871 \text{ kJmol}^{-1}$ with an optimum distance of 1.799 \AA , while docking showed the interaction energy was $-18,244 \text{ kJmol}^{-1}$. The interaction was also conducted between chitosan trimer segments with A chain of BSA result energy $-5,565 \text{ kJmol}^{-1}$ and interaction energy between chitosan trimer segments with B chain BSA is $-18,704 \text{ kJmol}^{-1}$.

Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh berat molekul kitosan terhadap efisiensi enkapsulasi BSA (*Bovine Serum Albumin*) menggunakan agen *crosslink* asam sitrat. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efisiensi enkapsulasi (EE) BSA dengan pengaruh berat molekul kitosan dan *crosslink* asam sitrat dan menentukan energi interaksi antara kitosan dengan BSA melalui metode *ab initio* dan *docking*. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah hidrolisis kitosan dengan HCl, enkapsulasi BSA, dan perhitungan energi interaksi secara *ab initio* dan *docking*. Hasil penelitian menunjukkan Efisiensi enkapsulasi (EE) BSA oleh kitosan awal dan kitosan terhidrolisis yaitu 52,06% dan 66,63%. Asam sitrat sebagai agen *crosslink* juga dapat memperbesar efisiensi enkapsulasi. Efisiensi enkapsulasi kitosan awal dan kitosan awal ditambah asam sitrat yaitu 52,06% dan 52,79%. Hasil perhitungan *ab initio* menunjukkan bahwa terjadi interaksi antara segmen trimer kitosan dengan asam amino asam aspartat pada BSA dengan energi interaksi sebesar $-91,3871 \text{ kJ mol}^{-1}$ dengan jarak optimum $1,799 \text{ \AA}$, sedangkan *docking* menghasilkan energi interaksi $-18,244 \text{ kJmol}^{-1}$. Interaksi juga dilakukan antara segmen trimer kitosan dengan rantai A BSA menghasilkan energi $-5,565 \text{ kJmol}^{-1}$ dan energi antara segmen trimer kitosan dengan rantai B BSA $-18,704 \text{ kJmol}^{-1}$.

1. Pendahuluan

Kitosan merupakan polisakarida kationik yang diperoleh dari deasetilasi alkalin kitin. Kitosan telah banyak digunakan di berbagai bidang, seperti farmasi dan medis, biokompatibilitas, dan anti kanker [1].

Berat molekul kitosan dapat dikelompokkan menjadi tiga macam, yaitu berat molekul rendah (*low*), medium (*med*), dan tinggi (*high*). Kitosan *low* lebih menguntungkan daripada kitosan *high* dari segi biodegradasi. Efisiensi transfer substrat oleh kitosan *low* lebih tinggi dibandingkan dengan kitosan *high*. Kitosan *low* juga lebih banyak digunakan dibidang *drug delivery* [2]. Peran kitosan dalam sistem *drug delivery* ini yaitu untuk mengirimkan ke tempat sasaran lalu mengontrol pelepasan dari obat khususnya gen atau protein [3]. Bovine Serum Albumin (BSA) merupakan polipeptida yang mudah tersedia dan sering digunakan sebagai model peptida pada studi sifat-sifat kimia fisik. BSA mengandung kedua puluh asam amino esensial [4], yang tersusun atas 585 residu asam amino, termasuk 35 sistein (17 jembatan disulfida), yang memberikan stabilitas yang relatif kuat untuk protein [5]. Protein dapat dienkapsulasi kedalam matriks polimer *biodegradable* [6].

Enkapsulasi merupakan teknik penyalutan suatu bahan sehingga bahan yang disalut dapat dilindungi dari pengaruh lingkungan. Bahan penyalut disebut enkapsulan sedangkan yang disalut/dilindungi disebut *core* [7]. Enkapsulasi dapat dilakukan oleh kitosan melalui situs aktifnya. Situs aktif kitosan terletak pada permukaan polimer, tepatnya pada gugus amina [8]. Pada proses enkapsulasi, berat molekul kitosan juga berpengaruh. Efisiensi enkapsulasi dari kitosan *low* lebih tinggi dibandingkan dengan kitosan *med* dan kitosan *high* [2].

Selain berat molekul rendah, enkapsulasi kitosan dapat ditingkatkan dengan memodifikasinya menggunakan agen *crosslink* [9]. Asam sitrat dapat digunakan sebagai agen *crosslink*. Peran dari asam sitrat ini untuk menggabungkan kelompok -COOH reaktif asam sitrat ke rantai polimer kitosan. Substitusi ini diharapkan dapat meningkatkan situs aktif pada permukaan polimer tersebut [8].

Kitosan dapat mengenkapsulasi obat atau protein karena adanya interaksi diantara keduanya. Interaksi ini dapat dimodelkan secara komputasi. Molekul-molekul kecil biasanya diinteraksikan secara *ab initio* [10] sedangkan untuk molekul biasanya diinteraksikan secara *docking*. Hasil yang akan diperoleh dari kedua metode diatas yaitu berupa energi interaksi dari kedua molekul.

2. Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan dari IPB (DD=85%), asam sitrat p.a dari Sigma-Aldrich, NaOH p.a dari Sigma-Aldrich, HCl p.a, asam asetat glasial p.a, BSA dari Sigma-Aldrich, kitosan *low* dari Merck. Peralatan yang digunakan dalam penelitian

ini adalah peralatan gelas laboratorium kimia, *magnetic stirrer*, viskometer Ostwald, sentrifus (*Centrifug-228*), Spektrofotometer UV-Vis T60U PG Instrument, FTIR Shimadzu, neraca analitik, seperangkat komputer berbasis linux dan windows

Hidrolisis Kitosan

Larutan kitosan dari IPB (awal) 2% (w/v) dibuat menggunakan pelarut asam asetat glasial 1%. Proses hidrolisis menggunakan asam klorida (HCl) 1N dengan waktu hidrolisis selama 1 jam. Penambahan larutan NaOH 1N sampai pH larutan menjadi 7 dan dilakukan proses dekantasi dan pengukuran konduktivitas sampai konduktivitas larutan mendekati konduktivitas aquades.

Penentuan berat molekul kitosan dengan mengukur viskositas menggunakan viskometer oswald. Kitosan yang akan diukur viskositas dilarutkan dalam pelarut campuran antara asam asetat glasial 1% dan NaCl 2M (3:1)

Enkapsulasi BSA

Proses ekapsulasi BSA ini dilakukan dengan perbandingan volume larutan BSA dan kitosan adalah 1:1, dan larutan campuran diaduk selama 10 menit dengan kecepatan 600rpm. Penambahan NaOH sampai pH menjadi 7 untuk mendapatkan kitosan yang telah mengenkapsulasi molekul BSA dan dilakukan sentrifuse selama 30 menit dengan kecepatan 6000rpm. Dan dilakukan proses enkapsulasi BSA 2000ppm dengan menambahkan asam sitrat 0,4% sebagai agen *crosslink* pada larutan kitosan. Efisiensi enkapsulasi di hitung dengan:

$$EE = \frac{C_{awal} - C_{sisa}}{C_{awal}} \times 100\%$$

Dimana konsentrasi/banyaknya BSA sisa ini diperoleh dengan mengukur banyaknya BSA yang ada di filtrat hasil pemisahan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 278nm.

Pemodelan Molekul

Pemodelan molekul dilakukan dengan software gaussian (QM) dan autodock (MM), yang dihitung adalah energi interaksi antara trimerkitosan dengan asam amino asam aspartat (salah satu penyusun BSA). Basis set yang digunakan pada software gaussian adalah RHF 6-31G(d,p) dan dengan software autodock asam aspartat berperan sebagai ligan dan trimer kitosan sebagai makromolekul, *running* dilakukan 150x.

3. Hasil dan Pembahasan

Hidrolisis Kitosan

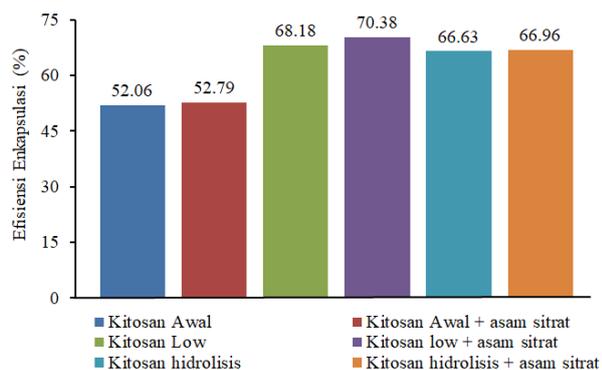
Kitosan merupakan polisakarida yang sukar larut dalam air. Kitosan ini mudah larut dalam asam lemah seperti asam asetat. Larutan kitosan kemudian dihidrolisis atau diputus ikatan polimernya dengan tujuan agar mendapatkan kitosan dengan rantai polimer yang lebih pendek. Hidrolisis ini menggunakan HCl 1N. Berat molekul kitosan awal yaitu $1,67 \times 10^5$ g/mol,

sedangkan kitosan yang sudah dihidrolisis berat molekulnya 1130 g/mol. Sebagai pembandingan dilakukan juga pengukuran berat molekul kitosan *low* (Merck) 1081 gram/mol. Penurunan berat molekul ini menunjukkan bahwa HCl dapat menghidrolisis atau memutus ikatan glikosida dari kitosan sehingga rantainya memendek.

Enkapsulasi BSA

Enkapsulasi BSA dilakukan dengan variasi berat molekul kitosan, yaitu kitosan awal dengan berat molekul $1,67 \cdot 10^5$ gram/mol, kitosan *low* (Merck) 1081 gram/mol dan kitosan hidrolisis dengan berat molekul 1130 gram/mol. Tujuannya agar diperoleh perbedaan efisiensi enkapsulasi dari kedua jenis kitosan tersebut.

Interaksi antara kitosan dengan asam sitrat maupun BSA dapat diketahui dari perubahan konduktivitasnya. Konduktivitas dari kitosan hidrolisis, asam sitrat, dan BSA yaitu 629 μ S, 1243 μ S, dan 3345 μ S. Setelah penambahan asam sitrat, konduktivitas kitosan hidrolisis menjadi 623 μ S, dan setelah ditambahkan BSA menjadi 439 μ S. Menurunnya konduktivitas dari kitosan menandakan adanya interaksi antara kitosan dengan senyawa yang ditambahkan.



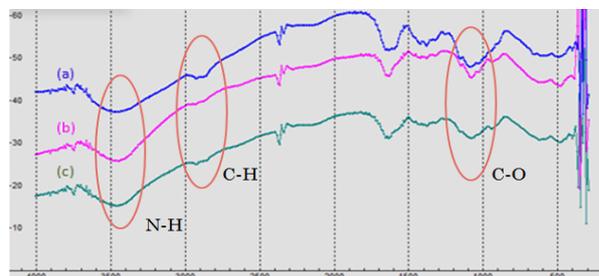
Gambar 1. Efisiensi enkapsulasi kitosan

Setelah enkapsulasi dilakukan, kemudian dipisahkan endapan kitosan dengan filtratnya dengan sentrifus. Filtrat tersebut kemudian diukur konsentrasi sisa BSA yang masih terkandung dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi sisa BSA didapatkan dari substitusi nilai absorbansi ke persamaan yang telah didapat dari kurva standar BSA.

Perbedaan berat molekul menyebabkan efisiensi enkapsulasi yang berbeda pula. Gambar 1. menunjukkan bahwa kitosan awal dengan berat molekul besar memiliki efisiensi enkapsulasi lebih rendah dibandingkan dengan kitosan dengan berat molekul rendah. Gambar 1. juga menunjukkan efisiensi enkapsulasi dari kitosan yang tanpa asam sitrat dengan yang menggunakan asam sitrat. Efisiensi enkapsulasi dari kitosan dengan menggunakan agen *crosslink* yang berupa asam sitrat lebih tinggi dibandingkan dengan kitosan tanpa asam sitrat. Hal ini dikarenakan efek dari *crosslinker* yang dapat membuka interaksi antar rantai kitosan sehingga terdapat ruang yang lebih besar agar BSA dapat masuk lebih banyak dan berinteraksi dengan rantai kitosan tersebut.

Analisis FTIR

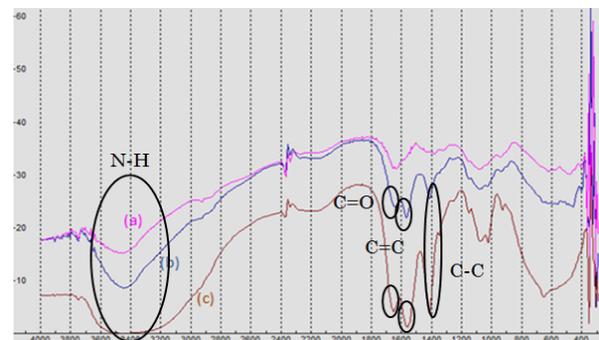
Kitosan yang telah dihidrolisis maupun kitosan awal memiliki struktur yang sama. Hal ini dapat ditunjukkan dari hasil FTIR beberapa sampel kitosan, baik yang tanpa hidrolisis, terhidrolisis, dan berat molekul rendah. Hasil analisis FTIR terdapat pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil FTIR (a) Kitosan *Low*, (b) Kitosan tanpa Hidrolisis, (c) Kitosan terhidrolisis

Terdapat puncak pada bilangan gelombang antara 3300–3500 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan N-H pada kitosan. Puncak selanjutnya ada pada bilangan gelombang 3000–2850 cm^{-1} yang menunjukkan ikatan C-H. Selain itu terlihat puncak pada 1120–1140 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan antara C-O. Hasil FTIR diatas menunjukkan bahwa sampel kitosan yang terhidrolisis memiliki struktur yang masih sama dengan kitosan yang lainnya.

Keberadaan BSA dan asam sitrat pada kitosan juga dapat diketahui dari analisis FTIR, sesuai gambar 3.



Gambar 3. Hasil FTIR (a) Kitosan Terhidrolisis, (b) Kitosan Terhidrolisis ditambah BSA, (c) Kitosan Terhidrolisis ditambah Asam Sitrat dan BSA

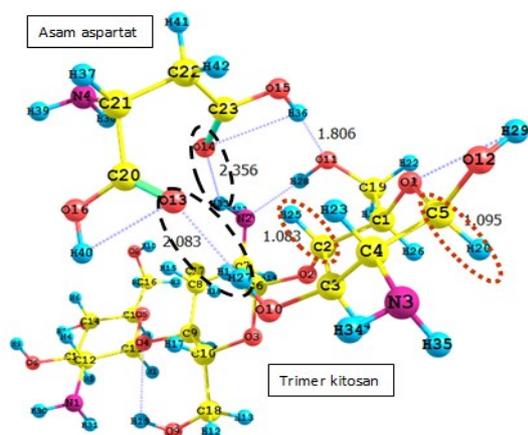
Grafik (a) menunjukkan bahwa kitosan yang belum tercampur apa-apa, hanya kitosan hasil hidrolisis HCl 1N. Pada kitosan yang sudah tercampur dengan BSA (b), terlihat muncul puncak baru pada 1500–1600 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan C=C aromatis dan sekitar 1400 cm^{-1} yang menunjukkan ikatan C-C aromatis. BSA terdiri dari banyak asam amino dan terdapat asam amino yang memiliki struktur cincin aromatis sehingga terlihat pada puncak yang menunjukkan cincin aromatis tersebut.

Pemodelan Molekul

Senyawa yang akan diinteraksikan yaitu trimer kitosan dengan salah satu asam amino yaitu asam aspartat. Trimer kitosan merupakan model kitosan dengan rantai polimer yang terdiri dari 3 senyawa

glukosamin. Sedangkan asam aspartat merupakan asam amino yang terdapat pada BSA dan posisinya pada rantai luar BSA.

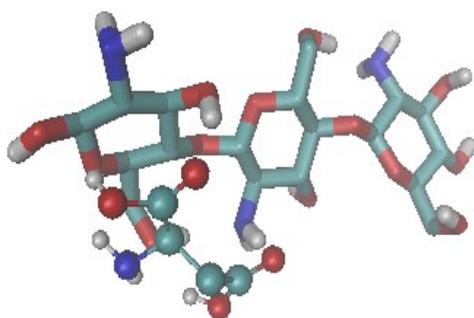
Secara *ab initio* didapatkan energy interaksi dan jarak interaksi dari kedua senyawa tersebut.



Gambar 4. Hasil interaksi trimer kitosan dan asam aspartate secara *ab initio*

Energi yang diperoleh yaitu $-91,3871 \text{ kJ mol}^{-1}$ dengan jarak interaksi antara O13-H27 sebesar $2,083 \text{ \AA}$ dan O14-H33 sebesar $2,356 \text{ \AA}$.

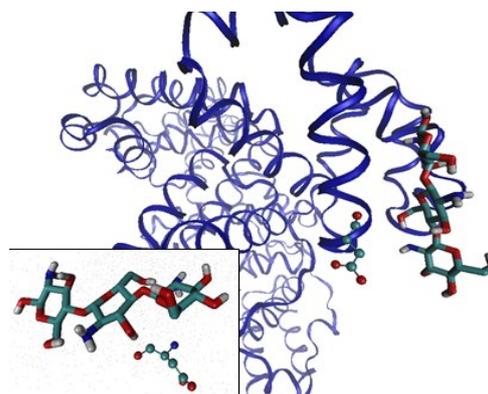
Perhitungan energi interaksi antara trimer kitosan dengan asam aspartat juga dilakukan secara *docking*. Segmen trimer kitosan berlaku sebagai makromolekul dan asam aspartat sebagai ligan nya. Interaksi ditunjukkan pada gambar 5.



Gambar 5. Hasil interaksi trimer kitosan dan asam aspartate secara *docking*

Hasil energi interaksi yang didapat yaitu $-18,244 \text{ kJmol}^{-1}$. Energi yang dihasilkan dari perhitungan *Autodock* ini lebih kecil jika dibandingkan dengan *Gaussian*. Hal ini terjadi karena pada *Autodock* tidak memperhitungkan setiap elektron yang ada, tidak seperti pada *Gaussian* yang memperhitungkan semua elektron, sehingga energi yang dihasilkan lebih negatif.

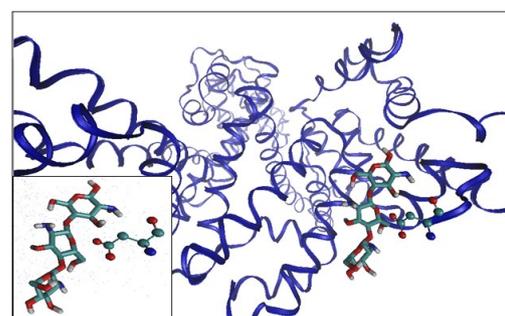
Interaksi antara rantai A dan trimer kitosan kemudian dilakukan, dimana rantai A berlaku sebagai makromolekul dan trimerkitosan sebagai ligan. Interaksi ini difokuskan ke tempat dimana asam aspartat itu berada. Hasil interaksi terlihat pada gambar 6.



Gambar 6. Hasil interaksi trimer kitosan dan asam aspartate pada rantai A BSA secara *docking*

Hasil energi interaksi yang didapat yaitu $-5,565 \text{ kJ mol}^{-1}$. Interaksi ini dilakukan pada asam aspartat urutan ke 37 dan didapatkan energi paling negatif berada pada perhitungan ke-97. Sehingga pada konfigurasi 97 trimer kitosan memiliki kestabilan paling tinggi.

Interaksi yang selanjutnya yaitu antara rantai B pada BSA dengan trimer kitosan, dimana rantai B berlaku sebagai makromolekul dan trimerkitosan sebagai ligan. Hasil interaksi terlihat pada gambar 7.



Gambar 7. Hasil interaksi trimer kitosan dan asam aspartate pada rantai B BSA secara *docking*

Hasil energi interaksi yang didapat yaitu $-18,704 \text{ kJ mol}^{-1}$. Interaksi ini dilakukan pada asam aspartat urutan ke 1 dan didapatkan energi paling negatif berada pada perhitungan ke-4. Sehingga pada konfigurasi 4 trimer kitosan memiliki kestabilan paling tinggi.

4. Kesimpulan

Berdasarkan serangkaian penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa kitosan dapat mengenkapsulasi BSA dan asam sitrat dapat bertindak sebagai agen *crosslink*. Berat molekul dan agen *crosslink* berpengaruh terhadap efisiensi enkapsulasi. Efisiensi enkapsulasi dari kitosan awal dan kitosan terhidrolisis yaitu $52,06\%$ dan $66,63\%$. Sedangkan kitosan awal dan kitosan awal dengan penambahan *crosslink* asam sitrat $52,06\%$ dan $52,79\%$. Trimer kitosan diinteraksikan dengan asam aspartate yang merupakan asam amino penyusun BSA dengan menggunakan *ab initio* menghasilkan energi interaksi sebesar $-91,3871 \text{ kJ mol}^{-1}$, sedangkan dengan menggunakan *docking* $-18,244 \text{ kJmol}^{-1}$. Interaksi antara rantai A dengan trimerkitosan menggunakan *software Autodock* menghasilkan energy -

5,565 kJmol⁻¹ sedangkan interaksi antara rantai B dengan trimerkitosan menggunakan *software Autodock* menghasilkan energy -18,704 kJ mol⁻¹.

5. Daftar Pustaka

- [1] Jae Hyung Park, Gurusamy Saravanakumar, Kwangmeyung Kim, Ick Chan Kwon, Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 1, (2010) 28-41
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.10.003>
- [2] Hui-Chia Yang, Min-Hsiung Hon, The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery, *Microchemical Journal*, 92, 1, (2009) 87-91
<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2009.02.001>
- [3] Quan Gan, Tao Wang, Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59, 1, (2007) 24-34
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.04.009>
- [4] Rolando Antonio Curvale, Buffer capacity of bovine serum albumin (BSA), *J. Argent. Chem. Soc.*, 97, 1, (2009) 174-180
- [5] Leandro R. S. Barbosa, Maria Grazia Ortore, Francesco Spinozzi, Paolo Mariani, Sigrid Bernstorff, Rosangela Itri, The Importance of Protein-Protein Interactions on the pH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin: A Small-Angle X-Ray Scattering Study, *Biophysical Journal*, 98, 1, (2010) 147-157
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.056>
- [6] Xinjian Cheng, Ruilan Liu, Yinghe He, A simple method for the preparation of monodisperse protein-loaded microspheres with high encapsulation efficiencies, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76, 3, (2010) 336-341
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.07.013>
- [7] E Triana, E Yulianto, N Nurhidayat, Uji viabilitas *Lactobacillus* sp. Mar 8 terenkapsulasi, *Biodiversitas*, 7, 2, (2006) 114-117
- [8] Retno Ariadi Lusiana, Dwi Siswanta, Mudasir, Takashi Hayashita, The Influence of Pva.Cl.Citric Acid/Chitosan Membrane Hydrophobicity on The Transport of Creatinine and Urea, *Indonesian Journal of Chemistry*, 13, 3, (2013) 262-270
- [9] Devika R. Bhumkar, Varsha B. Pokharkar, Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note, *AAPS PharmSciTech*, 7, 2, (2006) E138-E143
<http://dx.doi.org/10.1208/pt070250>
- [10] A. White, F. J. Zerilli, H. D. Jones, Ab initio calculation of intermolecular potential parameters for gaseous decomposition products of energetic materials, in, DSTO Aeronautical and Maritime Research Laboratory, Melbourne, Victoria, Australia, 2000.