

## **KARATERISTIK ENKAPSULASI LIPOSOM EKSTRAK SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) *Bacillus altitudinis***

**Nurfitriyawatie<sup>1\*</sup>, Ana Indrayati<sup>1</sup>, Rizal Maarif R.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi

<sup>2</sup>Research Center for Pharmaceutical Ingredients and Traditional Medicine,  
Nation Research and Innovation Agency

<sup>3</sup>Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Setia Budi

\*Email: [nurfitriyawatie@gmail.com](mailto:nurfitriyawatie@gmail.com)

Artikel diterima: 16 September 2023; Disetujui: 27 Maret 2023

DOI: <https://doi.org/10.36387/jiis.v8i1.1078>

### **ABSTRAK**

Fotoaging menyebabkan dermis dan serat kolagen mengalami penurunan yang mengakibatkan terjadinya penuaan kulit, Genus *Bacillus* memiliki aktivitas SOD sebagai antifotoaging yang mampu menetralkan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) akibat paparan sinar UV-A. Penelitian ini bertujuan melihat aktivitas ekstrak kasar SOD dan karakteristik enkapsulasi liposom dari *B. altitudinis*. Penelitian diawali dengan isolasi enzim SOD, penetapan kadar protein total ekstrak kasar enzim SOD dan enkapsulasi liposom, selanjutnya dilanjutkan uji karakterisasi liposom meliputi analisa ukuran partikel, efisiensi penjerapan dan zeta potensial. Hasil pengujian aktivitas ekstrak kasar sebesar 85,09 % ± 1,24 %. Uji karakteristik dihasilkan dengan ukuran 112,96 ± 17,3; efisiensi penjerapan 81,1% dan zeta potensial 7,0 ± 5,1 mV. Hasil menunjukkan partikel liposom SOD *B. altitudinis* berada di rentang nanopartikel.

**Kata kunci:** Karakteristik, Liposom, SOD, *Bacillus altitudinis*

### **ABSTRACT**

*Photoaging causes the dermis and collagen fibers to decrease which results in skin aging. Genus Bacillus has SOD activity as an anti-photoaging agent that can neutralize ROS (Reactive Oxygen Species) due to exposure to UV-A rays. This study aimed to examine the activity of crude extract and the encapsulation characteristics of liposomes from B. altitudinis. The study began with the isolation of the SOD enzyme, determination of the total protein content of the crude extract of the SOD enzyme and liposome encapsulation, then characterization liposome tes including particle size analysis, sorption efficiency and zeta potential. The results of the crude extract activity test were 85.09% ± 1.24%. The characteristic test was produced with a size of 112.96 ± 17.3; the adsorption efficiency was 81.1% and the zeta potential was 7.0 ± 5.1 mV. The results showed that the SOD B. altitudinis liposomes were in the nanoparticle range.*

**Keywords:** Characteristics, Liposomes, SOD, *Bacillus altitudinis*

## **PENDAHULUAN**

Antioksidan merupakan senyawa yang dibutuhkan tubuh untuk menetralkan dan mencegah kerusakan akibat radikal bebas dengan cara mencegah reaksi berantai pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif (Fatimah, N dan Sundu, R., 2020). Salah satu penyebab terjadinya penuaan dini adalah karena spesi oksigen reaktif (Roni A, dkk., 2022). Fotoaging merupakan proses penuaan kulit disebabkan adanya radiasi sinar UV. Paparan radiasi uv pada kulit selama bertahun-tahun akan menyebabkan dampak kronis antara lain kerusakan struktur kulit, penuaan kulit dan kanker kulit.. (Anshori *et al.* 2017). Fotoaging yang terjadi secara signifikan mempengaruhi kualitas hidup seseorang, oleh karena itu perawatan sangat diperlukan.

Enzim yang ditemukan dalam hati dan paling banyak berfungsi antioksidan adalah Superoksida dismutase (SOD). Kemampuan dari enzim SOD dalam menetralkan radikal bebas dimanfaatkan tidak hanya untuk pengobatan tetapi juga

dimanfaatkan dalam bidang kosmetik sebagai antifotoaging (Rahman et al. 2012). Krim kulit yang mengandung SOD berfungsi untuk pencegahan penuaan dini merupakan fungsi dari antioksidan (Santos *et al.*, 2011).

Mikropartikel yang berukuran 1-1000  $\mu\text{m}$  saat ini sering digunakan dalam penghantaran sediaan obat (Pradana, A.T., dkk 2022). Melalui sistem enkapsulasi, Liposom dapat meningkatkan efikasi dan indeks terapeutik serta stabilitas obat (Akbarzadeh et al., 2013). Berdasarkan sistem penghantaran obat, liposom dapat melarutkan atau enkapsulasi untuk obat berifat hidrofobik dan hidrofilik. Ini merupakan keunggulan obat topikal karena memiliki sistem penghantaran yang terbaik sehingga banyak yang menggunakan (Purwanto 2019). Liposom secara fisika dan kimia merupakan satu kesatuan yang terkarakterisasi dengan baik, bersifat biokompatibel sehingga toksisitasnya rendah, dan dapat digunakan pada kebanyakan cara pemberian obat meliputi ocular, paru-paru, nasal, intramuscular, subkutan, topikal dan intravena (Karina 2009).

## **METODE PENELITIAN**

### **Alat dan Bahan**

Bakteri *Bacillus altitudinis*, Nutrient Agar (NA), Brain Heart Infusion (BHI), NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Coomassie Brilliant Blue, Bovine Serum Albumin (BSA), Blood Agar Plate (BAP), Water For Injection (WFI), larutan WST-1, buffer fosfat, pereaksi Bradford, Pewarnaan Gram *Bacillus altitudinis* Agar (BCA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Brain Heart Infusion Broth (BHIB), etanol P.A, fosfolipid (Phospolipon 90 G), kolesterol (Sigma), aquadest steril.

### **Identifikasi Bakteri**

Dengan menggunakan jarum Ose, Biakan bakteri *Bacillus altitudinis* diambil lalu digoreskan pada cawan petri yang berisi media BAP dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, diamati koloni bakteri yang terbentuk.. Biakan bakteri *Bacillus altitudinis* juga dilakukan identifikasi pewarnaan Gram, uji katalase dan uji koagulase.

### **Isolasi Enzim**

Suspensi bakteri *Bacillus altitudinis* diinokulasi sebanyak 2% suspensi ke dalam 300 mL media

produksi BHI, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah dinkubasi dilakukan kultur bakteri pada media BHI dengan cara disentrifugasi. Pelet yang diperoleh ditambah buffer PBS selanjutnya disonikasi dengan amplitudo 50 selama 5 menit dalam suhu dingin. Supernatan hasil sentrifugasi ditempatkan dalam *microtube* serta disimpan pada alat pendingin bersuhu 4°C.

### **Penetapan Protein Total**

Penetapan kadar protein total ekstrak kasar enzim SOD dengan metode Bradford yaitu mengambil 4 µL sampel ditambah 200 µL reagen Bradford dan dicukupkan hingga volume 1 mL dengan aquades. Selanjutnya diukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometri uv-vis.

### **Uji Aktivitas Sod Bakteri**

Pengukuran aktivitas SOD dilakukan dengan menggunakan kit WST-1 dari Biovision yang menghasilkan perwarna formazan larut air pada saat mereduksi anion superoksida. Nilai absorbansi ekstrak kasar enzim SOD bakteri dan nilai absorbansi blanko 1, 2, dan 3 yang

diperoleh lalu dihitung. Aktivitas SOD diukur melalui derajat penghambatan pembentukan warna pada panjang gelombang 450 nm.

### **Enkapsulasi Liposom**

Larutan fosfatidilkolin 50  $\mu\text{M}/\text{mL}$  dan larutan kolesterol 25  $\mu\text{M}/\text{mL}$  dilarutkan dalam 5 mL etanol dimasukkan ke dalam labu alas bulat 300 mL sampai homogen. Selanjutnya pelarut diuapkan *rotary evaporator* sampai terjadi pembentukan lapisan tipis lipid pada permukaan labu. Proses Hidrasi lapisan tipis film dilakukan dengan masing-masing 5 mL ekstrak enzim SOD *Bacillus altitudinis* dengan konsentrasi 0,5 mg/mL dalam larutan buffer fosfat (PBS) dengan *rotary evaporator* selama 15 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. Dispersi liposom yang dihasilkan dipertahankan selama 1 jam pada suhu 4<sup>0</sup>C. Liposom yang terbentuk dengan sonikator bertujuan menyeragamkan ukuran lalu diujikan atau disimpan ke dalam lemari es.

### **Ukuran Partikel Liposom**

Pengukuran ukuran partikel menggunakan alat *particle size analyzer* (Horiba Scientific, Nano Particle Analyzer SZ-100).

Pembacaan PSA dapat dilakukan menggunakan sediaan yang telah di *top down* ukuran oleh alat sonikator yang telah dilakukan pada PBS (Loquercio et al, 2015).

### **Zeta Potensial Liposom**

Sampel liposom diencerkan dengan pengenceran 1 tetes dalam 10 mL larutan pendispersi, yaitu dapar fosfat 7,4. Liposom diencerkan dengan larutan PBS sebelum pengukuran kemudian, sampel dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisis pada suhu 25<sup>0</sup>C dan dianalisis menggunakan *zeta-sizer*.

### **Effiseinsi Penjerapan Liposom**

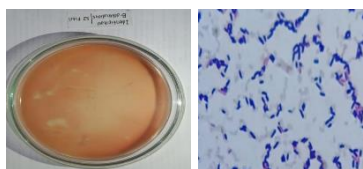
Sebanyak 5 mL sampel ditambahkan 5 mL buffer kalium fosfat 0,05 M, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit, supernatan diambil sebanyak 1 mL dan diencerkan dalam labu takar menggunakan aquadest hingga 25 mL, kemudian 1,0 mL dari larutan sebelumnya diencerkan kembali dengan aquadest hingga 25,0 mL. Dilakukan pembacaan serapan larutan dengan spektrofotometer UV-Vis. Hitung kadarnya dengan menggunakan persamaan kurva

kalibrasi dan diperoleh kadar obat bebas (FD).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Identifikasi Bakteri

Hasil identifikasi bakteri *B. altitudinis* menunjukkan koloni warna biru dikelilingi endapan telur pada media *B. altitudinis* Agar (BCA). Hasil pengujian secara pengecatan gram tampak menunjukkan hasil berwarna ungu atau violet, berbentuk batang (*bacil*) dan tunggal. Hasil uji katalase bakteri *B. altitudinis* menunjukkan hasil positif dibuktikan adanya buih atau gelembung gas setelah ditambah hidrogen peroksida 3%. Pada pengujian koagulase memberikan hasil negatif yang berarti bakteri *B. altitudinis* tidak memiliki enzim koagulase.



**Gambar 1.** Hasil identifikasi Bakteri

### Isolasi Enzim Sod

Hasil sentrifugasi ini diperoleh supernatan yang berisi ekstrak kasar enzim SOD *B. altitudinis* dengan

rata-rata sebanyak 13,3 mL dan diperoleh rendemen ekstrak kasar enzim SOD yaitu 4,36 % v/v. Tahap isolasi protein merupakan tahap awal dalam pemurnian protein sehingga menghasilkan protein dalam bentuk ekstrak kasar (Koolman & Roehm, 2005).

### Penetapan Protein Total Ekstrak Kasar

Ekstrak kasar enzim SOD bakteri *B. altitudinis* dilakukan penetapan kadar protein total dengan metode Bradford. Kadar protein dilakukan melihat perbandingan absorbansi ekstrak kasar enzim SOD bakteri dengan persamaan linier kurva baku,  $y = 0,0292 x + 0,1075$  menjadi dasar penentuan kadar protein dalam sampel. Rata-rata nilai absorbansi ekstrak kasar enzim SOD *B. altitudinis* didapat 0,1340 kemudian dimasukkan dalam persamaan maka didapat kadar protein 2,27 mg/mL. Pengukuran kadar protein total dilakukan untuk melihat efek ekstrak terhadap produksi enzim atau terhadap aktivitas enzim. Enzim dalam tubuh antara lain enzim CAT (katalase). GSH-Px (glutathion peroksidase).

SOD (superoksida dismutase) merupakan suatu antioksidan metalloenzim yang mengandung enzim berfungsi untuk pencegahan fotoaging dengan mekanisme kerja dengan cara mengkonversi anion superoksida untuk melindungi kerusakan sel. Prinsip metode Bradford adalah zat warna Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) yang terkandung dalam pereaksi Bradford akan berikatan dengan protein yang mengandung residu asam amino dengan rantai samping aromatik (tirosin, triptofan, fenilalanin) sehingga terbentuk warna biru yang kompleks (Fahmi, Winni, & Saibun, 2017).

#### **Uji Aktivitas SOD**

Hasil pengujian aktivitas ekstrak kasar SOD diperoleh dengan perhitungan rerata persen inhibisi SOD *Bacillus altitudinis* sebesar 85,09 %  $\pm$  1,24 %. Hasil pengukuran aktivitas SOD pada ekstrak kasar enzim SOD bakteri *B. altitudinis* diperoleh hasil yang tinggi yaitu >50%, hasil uji aktivitas SOD pada penelitian ini, diperoleh hasil 85,09 %. Aktivitas SOD memiliki kriteria aktivitas tinggi jika mempunyai

persen inhibisi >50% dan aktivitas rendah apabila persen inhibisinya <50%. Berdasarkan (Panji, Suharyanto, & Marini, 2009) perbandingan aktivitas SOD dalam sampel ekstrak kasar dengan aktivitas SOD dalam sampel yang dimurnikan dengan amonium sulfat memberikan hasil yang lebih tinggi. Hal ini disebabkan karena protein dalam ekstrak kasar enzim SOD masih dalam keadaan utuh mengakibatkan aktivitas katalitiknya tidak terganggu, sedangkan penggunaan fraksinasi amonium sulfat untuk pemisahan protein tidak dapat memisahkan seluruh enzim SOD dalam biomassa sel *S. platensis*.

#### **Enkapsulasi Liposom Ekstrak SOD**

Hasil pembuatan liposom pada penelitian ini menggunakan metode hidrasi lapis tipis yang dimodifikasi dengan sonikasi, Fosfatidilkolin (Phospholipon 90 G) dan kolesterol diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator*. Lapisan tipis yang terbentuk pada dinding labu, selanjutnya dihidrasi dengan larutan dapar fosfat pH 7,6 yang mengandung ekstrak SOD sampai terbentuk lapisan liposom.

Lapisan liposom berwarna putih agak terang. Tujuan hidrasi untuk mengetahui penyerapan zat aktif yang optimal dan pengembangan vesikel. Lipomer yang terdapat zat aktif yang terjerap berasal dari obat yang memiliki berat molekul tinggi atau rendah. Proses lanjutan dari cairan dispersi dihasilkan adalah dilakukan sonifikasi dengan tujuan untuk mengoptimalkan penyerapan serta ukuran partikel diperkecil.

### **Karakteristik Liposom**

Pengukuran partikel liposom dilakukan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA). Alat ini memiliki sensitivitas 3-10,000 nm dan mampu mengukur partikel dan molekul yang berada pada rentang 0,15-10  $\mu\text{m}$ . Hasil uji ukuran partikel sebagai berikut:

**Tabel 1.** Hasil Ukuran Partikel

	<i>B. altitudinis</i>	Kolagen
Repitasi 1	93,8	122
Repitasi 2	117,8	128,4
Repitasi 3	127,3	129,8
Rata - rata	112,96 $\pm$ 17,3 <sup>a</sup>	126,7 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>

a = tidak berbeda signifikan antar kelompok

Hasil penelitian menunjukkan liposom SOD *B. altitudinis* memiliki ukuran partikel sebesar 112,97 $\pm$ 17,3 nm. Hasil ini memenuhi standar ukuran nanopartikel, berdasarkan

(Jonassen, 2014) suatu partikel dengan ukuran kisaran 10-1000 nm dapat disebut nanopartikel. Partikel nano dengan rata rata ukuran 50 hingga 500 nm dapat digunakan sebagai pembawa obat (nanokarier) untuk keperluan penghantaran obat (*drug delivery*) (Angelia F, *et al* 2019).

Hasil pengukuran zeta potensial menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) diperoleh nilai zeta potensial liposom SOD *B. altitudinis* sebesar +7,0  $\pm$ 5,1 mV. Menurut (Ronson, 2012) nanopartikel dengan nilai potensial zeta lebih besar dari +25 mV atau kurang dari -25 mV memiliki derajat stabilitas tinggi, sedangkan menurut Murdock *et al* (2008) nanopartikel dengan nilai potensial zeta lebih besar dari  $\pm$ 30mV memiliki stabilitas lebih tinggi.

**Tabel 2.** Hasil Zeta potensial

	<i>B. altitudinis</i>	Kolagen
Repitasi 1	10,5	52,1
Repitasi 2	1,2	45,1
Repitasi 3	9,3	53,3
Rata - rata	7,0 $\pm$ 5,1 <sup>b</sup>	50,17 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>

b = Ada beda signifikan

Akumulasi dari jumlah muatan pada permukaan partikel sampai lapisan terluar pada partikel disebut Zeta potensial. Pada umumnya

rentang potensial yang digunakan  $\pm$  30 mV dengan menentukan pada tepi buble. Pencegahan terjadinya flokulasi/peristiwa penggabungan koloid dari yang kecil besar kemungkinan terjadi apabila tingginya nilai zeta potensialnya. Apabila nilai zeta potensial kecil berakibat terjadinya flokulasi karena saling tarik menarik pada partikel. (Prakash et al 2014).

Efisiensi penjerapan dalam penelitian ini dilakukan secara tidak langsung dengan cara kuantifikasi obat bebas dalam sistem yang diperoleh berdasarkan perbandingan jumlah ekstrak kasar enzim SOD total dalam larutan dengan ekstrak kasar enzim SOD dalam liposom dengan dinyatakan dalam bentuk persen. Dari hasil analisa bahwa efisiensi penjerapan liposom *B. Altitudinis* masih tinggi. Hal ini dikarenakan adanya kolesterol berfungsi sebagai penstabil liposom yang menurunkan permeabilitas sehingga mencegah kebocoran obat (Halim, 2016).

**Tabel 3.** Kadar Protein dan Effisiensi Penjerapan

Kadar Protein (mg/mL)	Effiseinsi Penjerapan
2,27	81,1 %

Berdasarkan hasil tersebut, maka efisiensi penjerapan dikatakan baik karena memiliki rentang  $>80\%$ . Komponen utama pembentuk gelembung (vesicles) pada sistem liposom yang bertugas menjerap ekstrak kasar SOD adalah Fosfatidilkolin. Pada saat hidrasi secara spontan akan terbentuk nanolipomer dimana yang gelembung menjadi renggang sehingga ekstrak kasar SOD yang terlarut dapat masuk ke vesikel dan terjadi penjerapan optimal. Proses ini terjadi karena masuknya fase air pada fosfolipid yang menyebabkan lipid bilayer akan melekok secara spontan.

## KESIMPULAN

Hasil pengujian aktivitas ekstrak kasar SOD diperoleh dengan persen inhibisi SOD *Bacillus altitudinis* sebesar  $85,09\% \pm 1,24\%$ . Hasil uji kateristik liposom *Bacillus altitudinis* dengan ukuran  $112,96 \pm 17,3$ ; efisiensi penjerapan  $81,1\%$  dan zeta potensial  $7,0 \pm 5,1$  mV. Hasil menunjukkan partikel liposom SOD *B. altitudinis* berada di rentang nanopartikel.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada hibah pendidikan tinggi (DIKTI), Penelitian Tesis Magister (PTM), tahun 2020.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akbarzadeh, A., Sadabady, R.R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi M & Koshki K.N., 2013, Liposome: classification, preparation, and applications, *Nano scale Research Letters*, 8:102
- Anshori, AM., Wiraguna A.A.G.P., Pangkahila W., 2017, Pemberian oral ekstrak kulit buah lemon (*Citrus limon*) menghambat peningkatan ekspresi MMP-1 (matrix metaloproteinase-1) dan penurunan jumlah kolagen pada tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dipajan sinar UV-B *Jurnal e-Biomedik (eBm)*, Volume 5, Nomor 1
- Babazadeh, A., Zeinali, M., Hamishehkar, H., 2018, Nano-Phytosome: A Developing Platform for Herbal Anti-Cancer Agents in Cancer Therapy, *Current Drug Targets*, 19, 170-180
- Fahmi, I., Winni, A., & Saibun, S., 2017, Isolasi amilase dari kecambah biji nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam*). *Jurnal Atomik*, 2:140-142
- Fatimah, N dan Sundu, R., 2020, Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Daun Afrika (*Vernonia Amygdalinadel.*) Dengan Metode DPPH, *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 5(2), Oktober 2020, 250-257
- Halim, 2016, Efektivitas Sistem Penghantaran Liposom pada Katekin Sebagai Antioksidan, 2(May). 176–182,
- Jonassen, H, 2014. Polysaccharide based nanoparticles for drug delivery application.
- Loquercio et al, 2015, Preparation of Chitosan-Alginate Nanoparticles for Trans -cinnamaldehyde Entrapment: Chitosan alginate nanoparticle synthesis, *J, Food Sci*, 80, N2305–N2315
- Panji, T., Suharyanto, & Marini, W., 2009, Produksi, Isolasi, dan Karakterisasi Superoksida Dismutase dari *Spirulina platensis* yang dibiarkan dalam serum lateks, *Menara Perkebunan*, 77:23-35
- Pradana, A.T., dkk 2022, Karakteristik Fisik Mikropartikel kuersetin Dengan Kombinasi Kitosan-Natrium Tripolifosfat Menggunakan Metode Orifice Ionic Gelation, *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 7(1), Maret 2022, 133-142
- Prakash, S., Mishra, R., Malviya, R., & Sharma, P. K., 2014, Measurement techniques and pharmaceutical applications of zeta potential: a review. *Journal of Chronotherapy and Drug Delivery*, 5(2), 33-40

- Purwanto, M., 2014, Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan Berbagai Metode Spektroskopi UV-Visible, *Jurnal Ilmiah Sains & Ternologi*, 7: 64-71
- Roni A, dkk, 2022, Penetapan Kadar Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Batang Brotowali (*Tinospora Crispal.*) dengan Metode Cuprac, *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 7(1), 165-173
- Ronson, 2012, *Zeta Potensial Analysis of Nanoparticles, Nano Composix*, San Diego
- Rahman, H., Tutus, G.K., Elin. J., 2012, Uji aktivitas enzim superoksida dismutase dalam ekstrak mesokarp buah merah (*Pandanus conoideus Lamarck*) menggunakan densitometri citra elektrogram, *Acta Pharmaceutica Indonesia* 37: 43 - 44