

**PENGEMBANGAN METODE SINTESIS NANOPARTIKEL
Fe₃O₄ MELALUI MODIFIKASI PERMUKAAN BERBASIS
BIOKOMPATIBEL MOLEKUL SEBAGAI KANDIDAT AGEN
DRUG DELIVERY**

DISERTASI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor dalam Bidang Kimia**



Disusun oleh:

IKA OKTAVIA WULANDARI

167090400111001

Jurusan Kimia

Program Pascasarjana Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Brawijaya Malang

2019

**PENGEMBANGAN METODE SINTESIS NANOPARTIKEL Fe_3O_4
MELALUI MODIFIKASI PERMUKAAN BERBASIS
BIOKOMPATIBEL MOLEKUL SEBAGAI KANDIDAT AGEN
*DRUG DELIVERY***

DISERTASI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor dalam Bidang Kimia**



Disusun oleh:

IKA OKTAVIA WULANDARI

167090400111001

Jurusan Kimia

Program Pascasarjana Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Brawijaya Malang

2019

Pengembangan Metode Sintesis Nanopartikel Fe₃O₄ melalui Modifikasi Permukaan berbasis Biokompatibel Molekul sebagai Kandidat Agen Drug Delivery

DISERTASI

Oleh:
IKA OKTAVIA WULANDARI
167090400111001

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 24 Mei 2019
dan dinyatakan Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor dalam Bidang Kimia

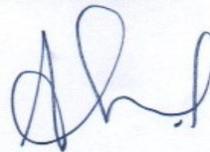
Menyetujui
Komisi Pembimbing,

Promotor



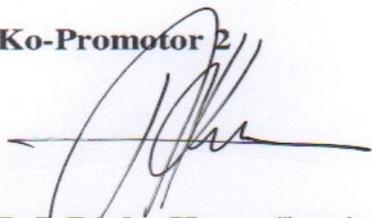
Dr. Hermin Sulistyarti.
NIP. 196405291988022001

Ko-Promotor 1



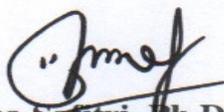
Akhmad Sabarudin, Dr.Sc.
NIP. 197404181997021001

Ko-Promotor 2



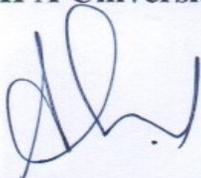
D.J. Djoko Herry Santjojo, Ph.D.
NIP. 196601311990021001

Ko-Promotor 3



Anna Safitri, Ph.D.
NIP. 198008132005022008

Mengetahui,
Ketua Program Studi S3 Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya



Akhmad Sabarudin, Dr.Sc.
NIP. 197404181997021001

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Ika Oktavia Wulandari

NIM : 167090400111001

Jurusan : Kimia

Penulis disertasi yang berjudul :

” Pengembangan Metode Sintesis Nanopartikel Fe₃O₄ melalui Modifikasi Permukaan berbasis Biokompatibel Molekul sebagai Kandidat Agen *Drug Delivery*”

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya di dalam Naskah Disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.
2. Apabila pernyataan di dalam Naskah Disertasis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia Disertasi ini digugurkan dan gelar akademik saya telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU.No 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 Mei 2019

Yang menyatakan,



(Ika Oktavia Wulandari)

NIM. 167090400111001

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

DATA PRIBADI

Nama Lengkap : Ika Oktavia Wulandari
 NIM : 16709040011001
 Tempat dan Tanggal lahir : Mataram, 7 Oktober 1992
 Alamat : Jl. Watuaji No. 6 Malang
 Email : ikaoktaviawulandari@gmail.com;

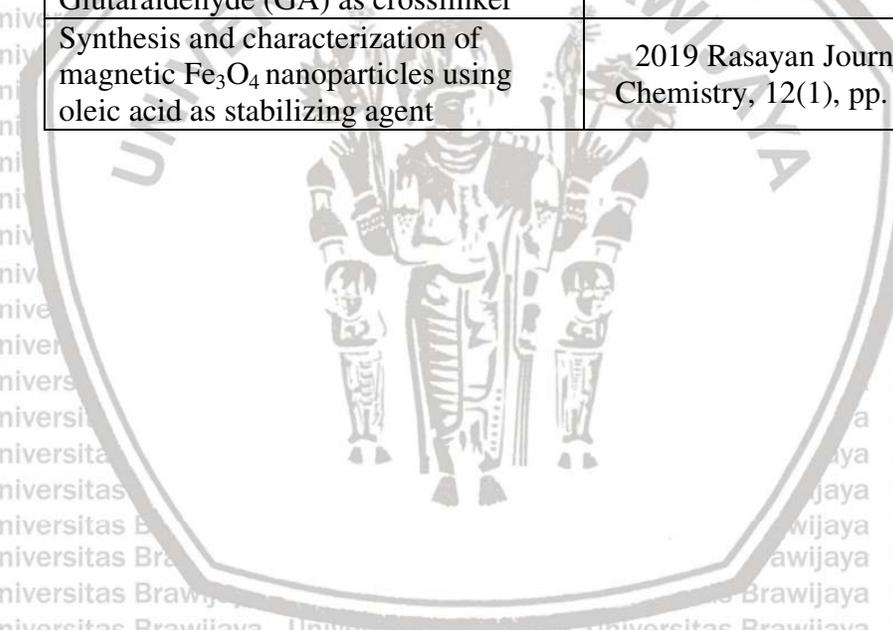
RIWAYAT PENDIDIKAN

- SDN 16 MATARAM (1998-2004)
- SMPN 2 MATARAM (2004-2007)
- SMAN 1 MATARAM (2007-2010)
- S1 Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang (2010-2014)
- S2 Program Studi Ilmu Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang (2014-2015)

PENELITIAN / PUBLIKASI

Judul Artikel	Tahun/Jurnal Internasional/Author	Index
Characteristics and magnetic properties of chitosan-coated Fe ₃ O ₄ nanoparticles prepared by ex-situ co-precipitation method	2017 Rasayan Journal of Chemistry, 10(4), pp. 1348-1358	Scopus Q2
Preparation and characterization of chitosan-coated Fe ₃ O ₄ nanoparticles using ex-situ co-precipitation method and tripolyphosphate/sulfate as dual crosslinkers	2018 IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 299(1), 012064	Scopus Q3
Development of synthesis method of magnetic nanoparticles modified by	2019 Journal of Applied Pharmaceutical Science-	Scopus Q2

oleic acid and chitosan as a candidate for drug delivery agent	Accepted Manuscript (in-press)	
One pot synthesis and surface modification of Fe ₃ O ₄ nanoparticles using Polyvinyl Alcohol by co-precipitation and ultrasonication methods	2018 IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 299(1), 012066	Scopus Q3
Ex-situ synthesis of Polyvinyl Alcohol (PVA)-coated Fe ₃ O ₄ nanoparticles by co-precipitation-ultrasonication method	2018 IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 299(1), 012065	Scopus Q3
Synthesis and characterization of Fe ₃ O ₄ nanoparticles using Polyvinyl Alcohol (PVA) as capping agent and Glutaraldehyde (GA) as crosslinker	2018 IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 299(1), 012062	Scopus
Synthesis and characterization of magnetic Fe ₃ O ₄ nanoparticles using oleic acid as stabilizing agent	2019 Rasayan Journal of Chemistry, 12(1), pp. 14-21	Scopus Q2

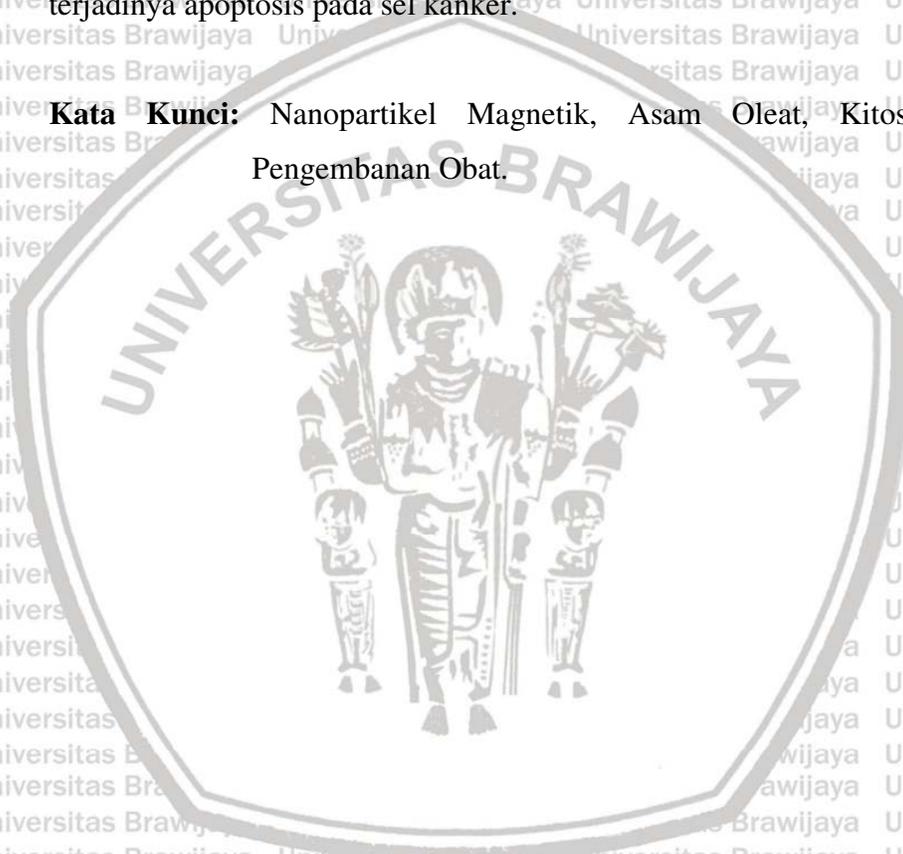


RINGKASAN

Dalam penelitian ini, nanopartikel magnetik (Fe_3O_4) yang permukaannya terlapisi dengan kombinasi asam oleat dan kitosan disintesis dengan mengembangkan dua metode kopresipitasi yaitu *ex-situ* dan *in-situ*. Morfologi dan ukuran partikel, struktur kristal, ukuran kristal, struktur kimia, dan saturasi magnetik masing-masing dikarakterisasi dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM), *X-Ray Diffraction* (XRD), *Fourrier Transform Infrared* (FTIR), dan *Vibrating Sample Magnetometry* (VSM). Gambar SEM menunjukkan bahwa morfologi *spherical* yang lebih baik diperoleh dengan metode kopresipitasi *ex-situ*. Berdasarkan pola difraksi sinar-X dapat diidentifikasi bahwa nanopartikel mengandung Fe_3O_4 dan $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Ukuran partikel serta ukuran kristal dari nanopartikel cenderung menurun dengan meningkatnya asam oleat sampai dengan komposisi optimal. Fungsionalisasi lebih lanjut pada permukaan Fe_3O_4 dilakukan melalui penambahan kitosan (yang terikat silang oleh tripolyphosphat/sulfat). Kitosan akan berkontribusi pada sifat hidrofilitas dari nanopartikel. Melalui analisis dengan VSM, Fe_3O_4 -asam oleat-kitosan menunjukkan perilaku superparamagnetik dengan saturasi magnetik mencapai 32,63 emu/g. Terdapat korelasi linear antara saturasi magnetik dan kandungan Fe_3O_4 dari nanopartikel. Selain itu keberhasilan pengembangan metode sintesis serta pengujian komposisi optimum dari nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan yang dihasilkan diuji berdasarkan kemampuan pengembangan dan pelepasan obat dilakukan dengan menggunakan model obat doxorubicin. Nanopartikel ini menunjukkan efisiensi pengembangan obat yang tinggi dengan komposisi kitosan yang lebih rendah. Efisiensi pengembangan obat doxorubicin terkait dengan konjugasi dengan gugus karboksilat dan situs hidrofobik dari asam oleat serta nanopartikel magnetik. Pelepasan obat dalam jumlah lebih besar terjadi pada pH yang asam dibandingkan pada kondisi pH netral. Hal tersebut dapat merepresentasikan bahwa nanopartikel tersebut memiliki respon lebih baik pada kondisi sel kanker dibandingkan sel normal. Selain itu pengujian secara *in-silico* dilakukan untuk menentukan interaksi antara reseptor sel dengan nanopartikel yang telah diembankan doxorubicin. Nilai *binding*

affinity yang rendah mencapai $-9,0$ kcal/mol pada interaksi antara nanopartikel-obat dengan reseptor transferin menunjukkan adanya *biological activity* pada interaksi tersebut. Selain itu, hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa nanopartikel-obat dapat menginduksi terjadinya proses apoptosis sehingga dapat berperan sebagai kandidat agen *drug delivery* melalui aktivasi jalur caspase-8 (caspase inisiator) yang akan mengaktivase *downstream* berupa caspase-3 yang menjadi efektor proses terjadinya apoptosis pada sel kanker.

Kata Kunci: Nanopartikel Magnetik, Asam Oleat, Kitosan, Doxorubicin, Pengembangan Obat.

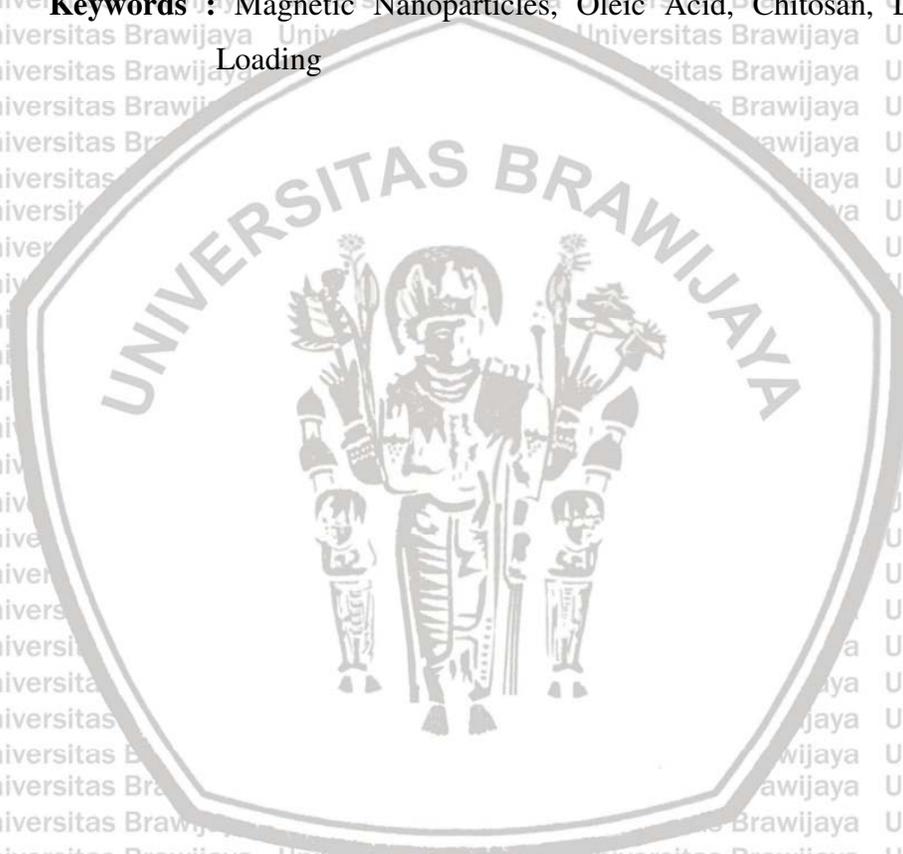


SUMMARY

In this study, magnetic nanoparticles (Fe_3O_4) coated with a combination of oleic acid and chitosan were synthesized by ex-situ and in-situ coprecipitation methods. Morphology and particle size, crystal structure and crystallite size, chemical structure, and magnetization were characterized by Scanning Electron Microscope (SEM), X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared (FTIR), and vibrating magnetometry samples (VSM), respectively. SEM images showed that better spherical morphology is obtained by ex-situ co-precipitation method. The X-ray diffraction pattern identified that nanoparticles containing Fe_3O_4 and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. The particles and crystal size of the nanoparticles tended to decrease with increasing oleic acid to the optimum composition. Further functionalization on the surface of Fe_3O_4 was conducted through the chitosan addition (crosslinked by tripolyphosphate/sulfate). Chitosan will contribute to the hydrophilicity properties of nanoparticles. Through VSM analysis, Fe_3O_4 -oleic acid-chitosan showed superparamagnetic behavior with magnetic saturation reaching 32.63 emu/g. There was a linear correlation between magnetic saturation and Fe_3O_4 content of nanoparticles. Besides, the successful development of synthesis method along with optimum composition of resulted nanoparticles of Fe_3O_4 -AO-chitosan, were examined by using doxorubicin model according to its capability to carry and release the drug. Drug loading and drug release were carried out by using doxorubicin. These nanoparticles showed a high drug loading efficiency with lower chitosan composition. Loading efficiency of doxorubicin is related to the conjugation with carboxylic groups and hydrophobic sites from oleic acid and magnetic nanoparticles. More drug emission occurred at the lower pH or acidic condition rather than at neutral pH condition. Thus representing that nanoparticles has a better response to cancer cell compared to normal cell. In addition, an *in-silico* was also conducted to determine the interaction between nanoparticles carrying doxorubicin with receptor cell. The result generated a low binding affinity value -9.0 kcal/mol, leading to conclusion of the existence of interaction from drug-nanoparticles and transferrin

receptor, justifying that there is a biological activity was absolutely present. The molecular docking was also give an illustration that drug-nanoparticles induced an apoptosis, hence it can be a drug delivery agent by activating a caspase-8 way (caspase initiator) whom activating downstream in the form of caspase-3 to begin cancer cell's apoptosis.

Keywords : Magnetic Nanoparticles, Oleic Acid, Chitosan, Doxorubicin, Drug Loading



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyajikan tulisan Disertasi yang berjudul

“Pengembangan Metode Sintesis Nanopartikel Fe₃O₄ melalui Modifikasi Permukaan berbasis Biokompatibel Molekul sebagai Kandidat Agen *Drug*

***Delivery*”**. Sholawat serta salam semoga tetap dicurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Naskah Disertasi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Doktor Sains dalam bidang Kimia.

Dalam penyusunan disertasi ini penulis mendapatkan bantuan dari berbagai pihak.

Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu Hermin Sulistyarti, Ph.D., Bapak Akhmad Sabarudin, Dr.Sc., Bapak D.J. Djoko Herry Santjojo, Ph.D., dan Ibu Anna Safitri, PhD., selaku Promotor dan Co-Promotor yang telah memberikan ilmu, bimbingan, fasilitas, saran serta nasihat kepada penulis hingga disertasi ini selesai.
2. Ibu Dr. Tutik Setianingsih,, dan Bapak Prof. Muh. Amin, selaku penguji atas nasihat, ilmu dan motivasinya untuk menjadi lebih baik;
3. Bapak Akhmad Sabarudin, Dr.Sc., sebagai Ketua Program Studi S3 Jurusan Kimia, Bapak Masruri, Ph.D., sebagai Ketua Jurusan Kimia, serta dosen-dosen beserta staf Jurusan Kimia;
4. Keluarga, Ayah Bapak Achmad Rido'i, SH., Ibu Sri Wahyuni, dan Adik Dwi Prasetyo, S.Kom., terima kasih sebesar-besarnya atas cinta, kasih sayang, doa dan pengorbanan moril dan materiil.
5. Seluruh teman seperjuangan S3 dan S2 Kimia UB atas bantuan, saran, dan diskusi selama ini.

Penulis menyadari bahwa terdapat banyak kekurangan dan keterbatasan dalam penyusunan naskah Disertasi ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Mei 2019

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI	iii
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	iv
RINGKASAN	vi
SUMMARY	viii
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	8
1.3 Batasan Masalah.....	9
1.4 Tujuan Penelitian.....	9
1.5 Manfaat Penelitian.....	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	12
2.1 Nanoteknologi dan Nanopartikel.....	12
2.2 Nanopartikel Magnetik Besi Oksida.....	14
2.3 Asam Oleat.....	23
2.4 Polimer Kitosan.....	24
2.5 Agen Pengikat Silang (<i>Crosslinker</i>).....	28
2.6 Agen <i>Drug Delivery</i>	31
2.7 <i>Freeze Drying</i>	33
2.8 <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	34
2.9 <i>Fourrier Transform Infra-Red</i> (FTIR).....	37
2.10 Difraksi Sinar-X.....	40
2.11 Doxorubicin.....	43
BAB III KONSEP PENELITIAN	46
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	46

3.2 Skema Konsep Penelitian.....	50
3.3 Hipotesis Penelitian	50
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	52
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	52
4.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	52
4.2.1 Bahan Penelitian	52
4.2.2 Alat Penelitian.....	53
4.3 Tahapan Penelitian.....	53
4.4 Prosedur Kerja	54
4.4.1 Pembuatan Nanopartikel Fe ₃ O ₄	54
4.4.2 Modifikasi Permukaan Nanopartikel Fe ₃ O ₄ dengan Surfaktan Asam oleat dan Polimer Kitosan.....	55
4.4.2.1 Metode In-situ.....	55
4.4.2.2 Metode Ex-situ.....	56
4.4.3 Pembuatan Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -AO-Kitosan dengan Variasi Volume Asam Oleat.....	57
4.4.4 Pembuatan Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -AO-Kitosan dengan Variasi Konsentrasi Kitosan	58
4.4.5 Pembuatan Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -AO-Kitosan dengan Variasi Rasio Konsentrasi Tripolyphosphate dan Sulfat.....	59
4.4.6 Pengeringan Sampel Nanopartikel dengan <i>Freeze Dryer</i>	59
4.4.7 Karakterisasi Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -AO-Kitosan.....	60
4.4.7.1 <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	60
4.4.7.2 <i>Fourrier Transform Infra-Red</i> (FTIR).....	60
4.4.7.3 <i>X-Ray Diffraction</i> (XRD).....	61
4.4.7.4 <i>Vibrating Sample Magnetometer</i> (VSM).....	61
4.4.8 Pengujian Efisiensi <i>Loading</i> Obat pada Sampel Nanopartikel.....	61
4.4.9 Pengujian Pelepasan Obat (<i>Drug Release</i>).....	62
4.4.10 Pengujian Interaksi antara Nanopartikel dengan Reseptor Sel secara <i>In-Silico</i>	63

4.4.11 Pengujian Interaksi antara Nanopartikel dengan dan tanpa Obat dalam Menginduksi Terjadinya Apoptosis	63
4.5 Analisa Data	64
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	66
5.1 Sintesis Nanopartikel Fe ₃ O ₄	66
5.1.1 Sintesis Nanopartikel Fe ₃ O ₄ secara Kopresipitasi	67
5.1.2 Sintesis Nanopartikel Fe ₃ O ₄ secara Kopresipitasi dengan Ultrasonikasi (<i>Coprecipitation assisted Ultrasonication</i>)	69
5.2 Modifikasi Permukaan Nanopartikel Fe ₃ O ₄ dengan Polimer dan Asam Oleat	71
5.5.1 Modifikasi Permukaan Nanopartikel Fe ₃ O ₄ dengan Polimer	71
5.5.1 Modifikasi Permukaan Nanopartikel Fe ₃ O ₄ dengan Asam Oleat	74
5.3 Pengaruh Metode Kopresipitasi Ex-Situ dan In-Situ terhadap Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -Asam Oleat-Kitosan	76
5.4 Pengaruh Komposisi Asam Oleat terhadap Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -Asam Oleat-Kitosan	86
5.5 Pengaruh Konsentrasi Kitosan terhadap Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -Asam Oleat-Kitosan	97
5.6 Pengaruh Konsentrasi TPP:Sulfat terhadap Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -Asam Oleat-Kitosan	104
5.7 Analisis Karakteristik <i>Drug Delivery</i> Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -AO-Kitosan	110
5.7.1 <i>Drug Loading</i> pada Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -AO-Kitosan	111
5.7.2 <i>Drug Release</i> Nanopartikel Fe ₃ O ₄ -AO-Kitosan	112
5.8 Analisis Interaksi antara Nanopartikel dengan Obat Doxorubicin secara <i>In-Silico</i>	114
5.9 Analisis Interaksi antara Nanopartikel dengan Reseptor Sel secara <i>In-Silico</i>	116
5.10 Peran Nanopartikel dan Doxorubicin sebagai Agen <i>Drug Delivery</i> dalam Menginduksi terjadinya Proses Apoptosis	119



BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	128
6.1 Kesimpulan.....	128
6.2 Saran.....	129
DAFTAR PUSTAKA	131
LAMPIRAN	143



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1. Roadmap penelitian Fe₃O₄ sebagai kandidat agen *drug delivery* 6

Gambar 2.1. Tipe *loop hysteresis* untuk material superparamagnetik dan ferromagnetik..... 16

Gambar 2.2. Struktur Kristal Fe₃O₄ 18

Gambar 2.3. Pergerakan Nanopartikel Magnetik mengarah pada Sel Tumor akibat Pengaruh Medan Magnet Eksternal 18

Gambar 2.4. Struktur asam oleat..... 23

Gambar 2.5. Asam Oleat di permukaan Nanopartikel (Fe₃O₄) 24

Gambar 2.6. (a) Struktur Kitin dan (b) Struktur Kitosan 25

Gambar 2.7. (a) Struktur Fe₃O₄, dan (b) Pelapisan permukaan Fe₃O₄ dengan kitosan 27

Gambar 2.8. Ilustrasi kitosan *nanocarrier* pada (a) sel normal dan (b) sel tumor 28

Gambar 2.9. Interaksi elektrostatik antara kitosan dengan TPP 29

Gambar 2.10. Struktur *Crosslinker* Anionik : ion (a) sulfat, (b) sitrat, dan (c) TPP 31

Gambar 2.11. (a) *Passive Targeting*, (b) *Active Targeting Drug Delivery System* 32

Gambar 2.12. Penghantaran Agen *Drug Delivery* Nanopartikel Magnetik secara *Active Targeting* 33

Gambar 2.13. Diagram Skematik SEM 34

Gambar 2.14. (a) Ilustrasi beberapa sinyal yang dihasilkan oleh interaksi *electron Beam* dengan specimen pada SEM; (b) Gambar SEM Fe₃O₄-kitosan pada perbesaran 200.000 kali. 36

Gambar 2.15. Spektra FTIR pada sampel (a) Fe₃O₄ tanpa lapisan kitosan, (b) Fe₃O₄ kitosan, (c) Curcumin@ Fe₃O₄-kitosan (Pham, et al., 2017). Spektra FTIR Fe₃O₄ dengan modifikasi Asam Oleat (AO) dalam penelitian Zhang, et al. (2006). 39

Gambar 2.16. Difraksi Sinar-X pada Bidang Kristal 41

Gambar 2.17. Plot Persamaan *Debye Scherrer* Termodifikasi 42

Gambar 2.18. Difraktogram XRD Fe_3O_4	43
Gambar 2.19. Struktur doxorubicin	44
Gambar 5.1. Tahapan perubahan warna larutan selama proses sintesis Fe_3O_4 secara kopresipitasi	33
Gambar 5.2. Skema jalur pembentukan nanopartikel magnetit dengan metode kopresipitasi	34
Gambar 5.3. SEM nanopartikel Fe_3O_4 -kitosan dengan penambahan <i>surface modifier</i> (a) selama proses pembentukan Fe_3O_4 , (b) setelah Fe_3O_4 terbentuk sampai dihasilkan Fe_3O_4 -kitosan	37
Gambar 5.4. SEM nanopartikel Fe_3O_4 -PVA dengan penambahan <i>surface modifier</i> setelah Fe_3O_4 terbentuk sampai dihasilkan Fe_3O_4 -PVA (cara kedua) ...	40
Gambar 5.5. Difraktogram XRD pada sampel Fe_3O_4 -Asam Oleat dengan Variasi asam oleat 25-150 μL	40
Gambar 5.6. Hasil SEM Morfologi permukaan pada sampel nanopartikel (a) <i>bare</i> Fe_3O_4 , dan Fe_3O_4 -AO kitosan yang disintesis secara (b) kopresipitasi ex-situ (komposisi AO 1 mL), dan kopresipitasi in-situ dengan komposisi AO (c) 1 mL, (d) 0,1 mL masing-masing dengan perbesaran 3000x	31
Gambar 5.7. Perubahan fasa asam oleat pada kondisi pH rendah hingga pH tinggi. Vesikel terbentuk pada range pH 7,5 sampai 9,6 dengan beberapa perbedaan konformasi dari tipe <i>cubosome</i> hingga menjadi <i>cylindrical</i>	33
Gambar 5.8. Mekanisme reaksi yang mungkin terjadi dengan proses kopresipitasi in-situ dan ex-situ	34
Gambar 5.9. Spektra FTIR pada sampel nanopartikel (a) <i>bare</i> Fe_3O_4 , dan Fe_3O_4 -AO-kitosan yang disintesis secara (b) kopresipitasi ex-situ, (c) kopresipitasi in-situ	37
Gambar 5.10. Pola difraksi sinar-X pada sampel Fe_3O_4 tanpa dan dengan <i>coating</i> asam oleat-kitosan yang disintesis secara kopresipitasi in-situ dan ex-situ	40
Gambar 5.11. Morfologi permukaan nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan	



Penambahan asam oleat (a) 0,5 mL, (b) 1 mL, dan (c) 1,5 mL masing-masing dengan perbesaran 3000x.....12

Gambar 5.12. Spektra FTIR pada sampel nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan penambahan volume asam oleat yang berbeda.....89

Gambar 5.13. Asam oleat dipermukaan Fe₃O₄ dapat membentuk struktur *bilayer*.....92

Gambar 5.14. Interaksi elektrostatik antara asam oleat dengan kitosan.....92

Gambar 5.15. Pola difraksi sinar-X pada nanopartikel dengan variasi komposisi asam oleat.....93

Gambar 5.16. (A) *Loop hysteresis* pada sampel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan penambahan AO yang bervariasi. (B) Grafik hubungan antara nilai saturasi magnetik dan persen Fe₃O₄ pada sampel nanopartikel dengan komposisi AO yang berbeda.....95

Gambar 5.17. Hasil SEM Morfologi permukaan Nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan konsentrasi komposisi OA 1 mL, rasio TPP:Sulfat 7,5%:7,5% dan konsentrasi kitosan berbeda (a) 1%, (b) 0,5% masing-masing dengan perbesaran 3000x.....99

Gambar 5.18. Pola difraksi sinar-X pada nanopartikel (a) *bare* Fe₃O₄, dan nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan (b) 0,5%, (c) 1%100

Gambar 5.19. Spektra FTIR nanopartikel (a) *bare* Fe₃O₄, dan nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan (b) 0,5%, (c) 1%.....102

Gambar 5.20. Morfologi permukaan Nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan konsentrasi kitosan 1% dan komposisi OA 1 mL, namun rasio TPP:Sulfat berbeda (a) 2,5%:7,5%, (b) 5%:7,5%, dan (c) 7,5%:7,5% masing-masing dengan perbesaran 3000x104

Gambar 5.21. (a) Spektra FTIR nanopartikel *bare* Fe₃O₄ serta Spektra FTIR nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan komposisi AO 1 mL, kitosan 1%, dan rasio konsentrasi TPP:Sulfat (b) 7,5:7,5% (c) 5:7,5%, dan (d) 2,5:7,5%.....106

Gambar 5.22. (A) Pola difraksi nanopartikel (a) *bare* Fe₃O₄, dan nanopartikel Fe₃O₄-AO-Kitosan dengan rasio konsentrasi TPP:Sulfat (b) 7,5:7,5% (c) 5:7,5%, dan (d) 2,5:7,5%. (B) Grafik korelasi antara konsentrasi TPP dengan ukuran kristalit dan parameter kisi 109

Gambar 5.23. Profil pelepasan doxorubicin (DOX) dari nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan 113

Gambar 5.24. (A) Prediksi interaksi nanopartikel dengan DOX, (B) Prediksi interaksi kitosan dan asam oleat sebagai *surface modifier* pada struktur nanopartikel 116

Gambar 5.25. Interaksi antara kitosan dengan transferin reseptor di permukaan sel 117

Gambar 5.26. Jalur apoptosis yang terjadi melalui sinyal penginduksi caspase 121

Gambar 5.27. (a) Representasi 3D pada interaksi antara caspase-8 (berwarna hijau) dengan NPsDOX (berwarna biru), (b) Posisi interaksi antara NPsDOX dengan caspase-8 pada residu asam amino tertentu 122

Gambar 5.28. Interaksi antara inhibitor dengan caspase-8 dalam menginhibisi aktivitas caspase-8 padasisi triad katalitik dan sisi antara S4 dan S2.... 122

Gambar 5.29. (a) Representasi 3D pada interaksi antara caspase-8 (berwarna hijau) dengan Nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan (berwarna biru), (b) Posisi interaksi antara nanopartikel dengan caspase-8 pada residu asam amino tertentu 125

Gambar 5.30. (a) Representasi 3D pada interaksi antara Topoisomerase II (berwarna kuning) dengan doxorubicin (berwarna biru), (b) Posisi interaksi antara Topoisomerase II dengan doxorubicin pada residu asam amino tertentu 126

Gambar 5.31. Interaksi antara NPsDOX dengan DNA Topoisomerase II 127

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Ukuran dan persentase besi oksida pada nanopartikel dengan metode berbeda.....85

Tabel 2. Ukuran Partikel Fe₃O₄-AO-Kitosan dengan variasi komposisi asam oleat.....88

Tabel 3. Ukuran dan komposisi besi oksida pada nanopartikel dengan variasi asam oleat.....94

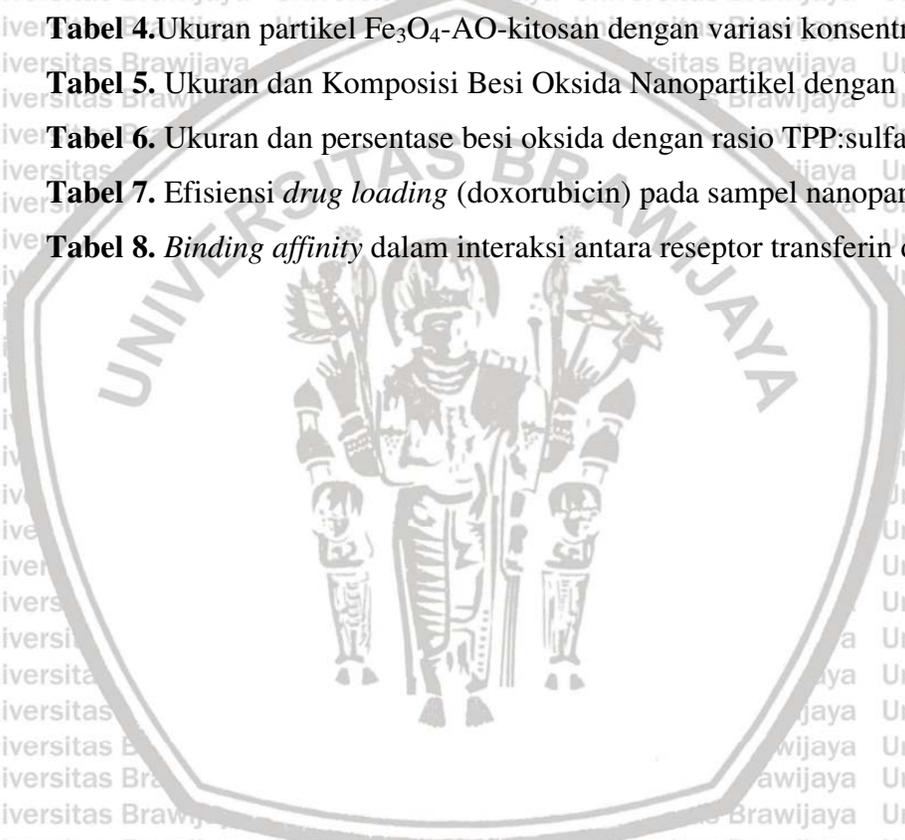
Tabel 4. Ukuran partikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan.....99

Tabel 5. Ukuran dan Komposisi Besi Oksida Nanopartikel dengan Variasi Kitosan.101

Tabel 6. Ukuran dan persentase besi oksida dengan rasio TPP:sulfat bervariasi.....107

Tabel 7. Efisiensi *drug loading* (doxorubicin) pada sampel nanopartikel.....112

Tabel 8. *Binding affinity* dalam interaksi antara reseptor transferin dan kitosan.....118



DAFTAR LAMPIRAN

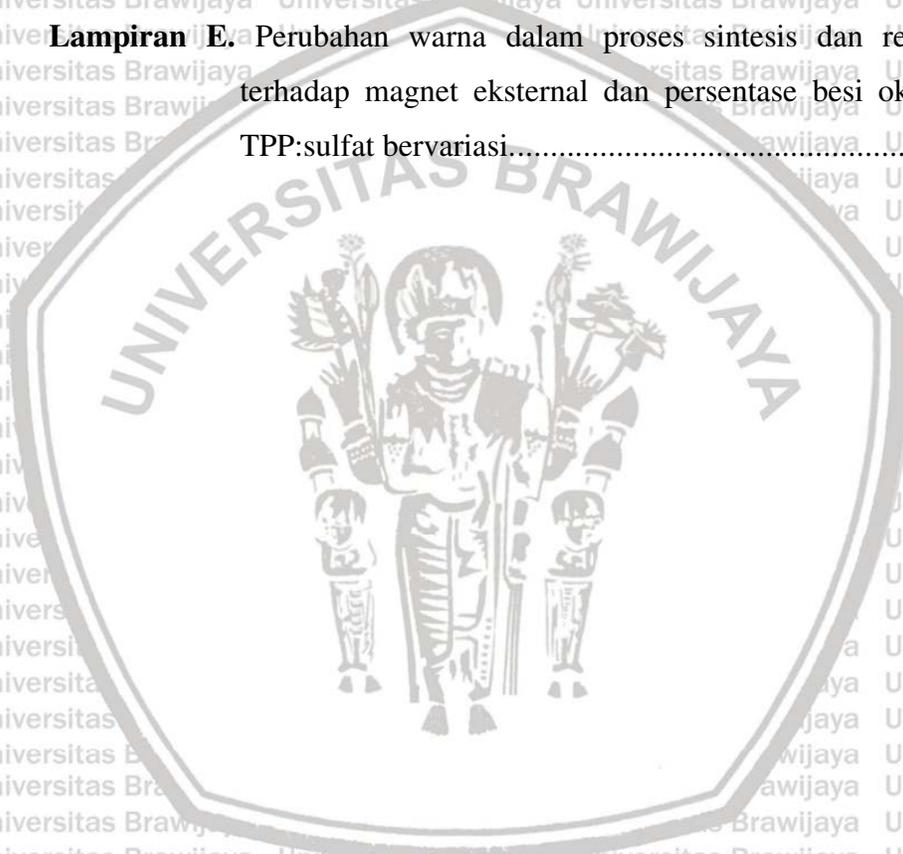
Lampiran A. Beberapa penelitian terkait modifikasi permukaan Fe₃O₄ sejak Tahun 2011-2016.....143

Lampiran B. Diagram Kerja.....147

Lampiran C. Perhitungan.....149

Lampiran D. Kumpulan Data.....151

Lampiran E. Perubahan warna dalam proses sintesis dan respon nanopartikel terhadap magnet eksternal dan persentase besi oksida dengan rasio TPP:sulfat bervariasi.....158



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu permasalahan yang cukup serius dalam bidang kesehatan. Hingga saat ini teknik pengobatan dan terapi untuk penderita kanker pada umumnya masih dilakukan dengan metode kemoterapi dan pemberian obat secara konvensional. Secara umum obat yang digunakan dalam terapi kanker diklasifikasikan menjadi tiga katagori. Ketiga katagori tersebut meliputi agen sitotoksik, agen biologis, dan agen hormonal. Agen sitotoksik bekerja dengan menghambat pembelahan sel melalui interferensi DNA. Namun agen sitotoksik cenderung memberikan dampak negatif, diantaranya tidak hanya membunuh sel kanker secara spesifik tetapi juga memberikan efek toksik terhadap jaringan yang normal. Hal ini akan menyebabkan pemberian terapi menjadi tidak efektif dan efisien (Snipstad, *et al.*, 2014 ; Cho, *et al.*, 2008 ; Voicu, *et al.*, 2016).

Terapi dengan agen biologis dilakukan dengan memanfaatkan sistem imun tubuh penderita untuk melawan penyakit kanker, sehingga secara umum disebut sebagai *immunotherapy*. Kekurangan terapi dengan agen biologis yaitu membutuhkan biaya yang tinggi dan untuk mencapai kondisi optimum, *immunotherapy* tetap perlu dikombinasikan dengan perlakuan lain yang dapat mempengaruhi respon imun tubuh (Vanneman dan Dranoff, 2012). Pilihan terapi yang terakhir adalah agen hormonal yang dilakukan melalui injeksi atau pemberian obat tablet yang mengandung anti hormon. Agen hormonal bekerja melalui interferensi hormon yang berperan dalam

pertumbuhan sel kanker, tetapi dapat memberikan efek samping tertentu pada pasien (Voicu, *et al.*, 2016).

Untuk mengatasi permasalahan tersebut, maka dibuatlah suatu agen penghantar obat (*drug delivery agent*) yang diformulasi untuk menghantarkan substansi obat dalam sistem biologis sehingga dapat sampai ke sel target yang spesifik. Sistem ini mengatur efektivitas dan stabilitas distribusi obat di dalam tubuh melalui kontrol laju pelepasan obat (*drug release control*), serta waktu dan tempat obat tersebut dilepaskan. Selain memiliki kemampuan menghantarkan obat secara spesifik, keuntungan lain dari adanya agen *drug delivery* adalah meminimalisir pemberian dosis obat pada pasien penderita kanker. Melalui agen *drug delivery*, obat dapat diserap lebih konsisten oleh sel target sehingga mengurangi keberadaan zat metabolit beracun di dalam tubuh (Jain, 2008 ; Dumitriu dan Dumitriu, 1996 ; Ulbrich dan Lamprecht, 2010 ; De Jong dan Borm, 2008).

Agen *drug delivery* dapat diposisikan langsung pada sel target (*implanted drug delivery*) ataupun diarahkan pergerakannya ke sel target dengan stimulasi eksternal.

Agen *drug delivery* yang diimplant pada target tertentu umumnya digunakan dalam aplikasi biomedis yang terkait dengan bidang ortopedi dan stomatologi. Dalam perkembangannya, *implanted drug delivery* dapat dibuat dari bahan dasar material berpori (Voicu, *et al.*, 2016 ; Zaki, *et al.*, 2012). Polimer merupakan salah satu jenis material yang dapat dimodifikasi menjadi material berpori melalui penambahan agen pembentuk pori (porogen) (Cai, *et al.*, 2013 ; Mane, 2016)

Namun, material tersebut memiliki kekurangan dalam hal distribusi obat di dalam tubuh. Pada umumnya aktivitas obat dengan *implanted drug delivery* menjadi lebih

rendah akibat degradasi obat yang lebih cepat dibandingkan degradasi material *drug delivery* yang digunakan, selain itu dibutuhkan proses operasi untuk pemasangannya dalam tubuh (Voicu, *et al.*, 2016 ; Zaki, *et al.*, 2012).

Berbeda dengan *implanted drug delivery*, terdapat juga agen *drug delivery* yang pergerakannya dapat diarahkan menuju ke sel target. Biodistribusi dari agen *drug delivery* dapat terjadi dengan stimulasi eksternal seperti pengaruh medan magnet (McBain, *et al.* 2008). Pada dasarnya, agen *drug delivery* seperti ini setidaknya harus memiliki dua karakteristik utama. Karakteristik tersebut yaitu dapat mempertahankan stabilitasnya di dalam sirkulasi darah untuk dapat sampai ke sel target yang spesifik dan dapat mengatur mekanisme pengeluaran obat di dalam tubuh (Cho, *et al.*, 2008).

Perkembangan teknologi yang ada saat ini telah mampu menghasilkan suatu agen *drug delivery* berbasis material nanopartikel. Material nanopartikel banyak menarik perhatian untuk dikembangkan dan memiliki potensi untuk diaplikasikan dalam berbagai bidang. Hal ini dikarenakan material tersebut memiliki sifat dan karakteristik yang unik dibandingkan material ruahnya. Dalam bidang biomedis, material nanopartikel ini harus bersifat biokompatibel dan memiliki sitotoksitas yang rendah (Wu, *et al.*, 2008 ; Singh dan Lillard, 2009).

Terdapat beberapa karakteristik lain yang perlu diperhatikan untuk mempertahankan efektivitas dan stabilitas dari nanopartikel sebagai agen *drug delivery*. Karakteristik tersebut meliputi ukuran, morfologi, dan efek fungsional permukaan dari nanopartikel. Pembentukan nanopartikel dengan karakteristik ini dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya adalah rasio komposisi, temperatur, pH, jenis pelarut, lama/waktu reaksi, serta sifat material yang digunakan. Menurut

Blanco, *et al* (2015), ukuran partikel dan bentuk partikel yang efektif untuk ekstravasasi melalui penetrasi *vascular* tumor yaitu <200 nm dengan morfologi *spherical*. Oleh sebab itu pemilihan material dan metode sintesis yang tepat sangat diperlukan untuk menghasilkan material nanopartikel sebagai kandidat agen *drug delivery* dengan karakteristik yang sesuai.

Pada agen *drug delivery* yang pergerakannya diarahkan dengan medan magnet eksternal, maka karakter magnetik dari material juga perlu diperhatikan (Kolhatkar, *et al.*, 2013). Material nanopartikel magnetik memiliki karakteristik superparamagnetik, sehingga mudah diarahkan pergerakannya melalui medan magnet eksternal. Apabila pengaruh medan magnet dihilangkan, material akan kehilangan karakter magnetiknya tanpa meninggalkan residu medan magnet (Vicky, *et al.*, 2013). Hal ini penting untuk menunjang biodistribusi dari agen tersebut di dalam sistem *in vivo*. Menurut Wu, *et al.* (2008), dari beberapa jenis nanopartikel magnetik, hanya nanopartikel oksida besi (IONPs) Fe_3O_4 (magnetit) dan $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) yang memenuhi karakteristik untuk digunakan dalam bidang biomedis. Hal ini dikarenakan nanopartikel magnetite dan maghemite memiliki karakter superparamagnetik, toksisitas yang rendah dan bersifat biokompatibel dengan tubuh. (Sheng-nan, *et al.*, 2014 ; Wahajuddin dan Arora, 2012).

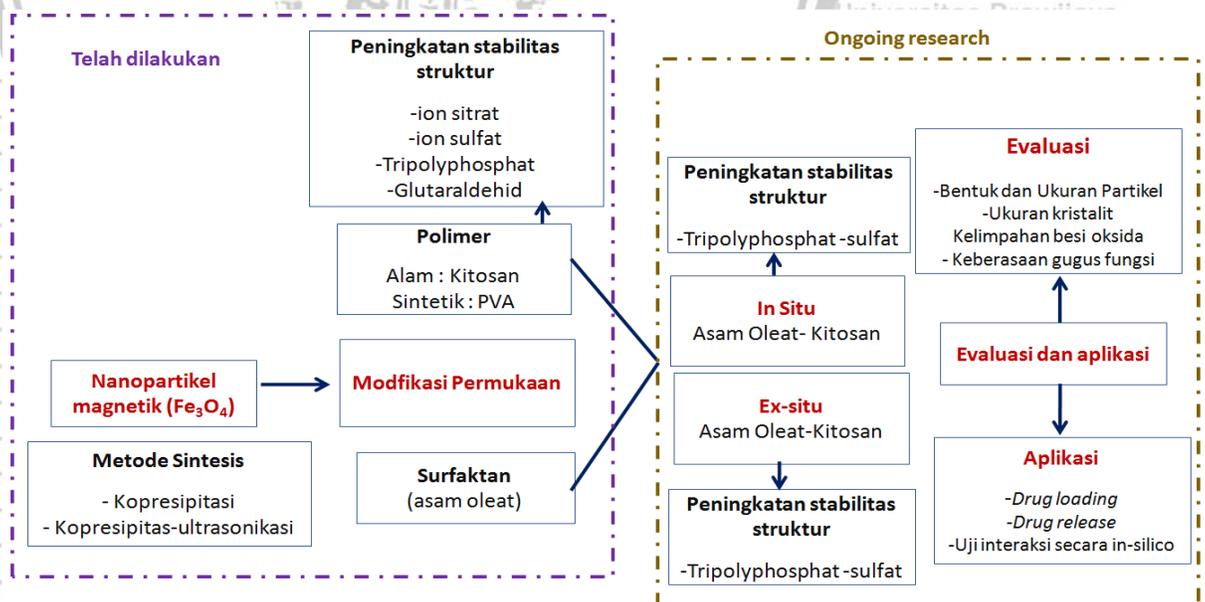
Permasalahan yang timbul dari aplikasi nanopartikel sebagai *drug delivery* adalah kecenderungan material ini untuk mengalami proses oksidasi dalam medium air dan udara serta mudah mengalami aglomerasi. Proses ini terjadi akibat ukuran nanopartikel yang kecil dan energi permukaannya yang besar. Aglomerasi akan memicu terbentuknya material nanopartikel dengan ukuran yang lebih besar dan tidak

seragam. Apabila hal ini terjadi maka dapat menyebabkan kinerja agen *drug delivery* menjadi tidak efektif (Tran, *et al.*, 2015 ; Mansouri, *et al.*, 2017 ; Qu, *et al.*, 2010).

Dalam mengatasi permasalahan aglomerasi tersebut maka diperlukan adanya modifikasi pada permukaan nanopartikel. Beberapa metode telah dilaporkan untuk memodifikasi nanopartikel. Dalam *preliminary research* yang dilakukan, nanopartikel magnetik sebagai kandidat *agen drug delivery* berhasil disintesis melalui metode kopresipitasi dan kopresipitasi dengan ultrasonikasi. Modifikasi permukaan nanopartikel dengan menggunakan 1 jenis *surface modifier* juga telah dilakukan, baik dengan polimer maupun surfaktan. Namun, dalam penelitian ini proses modifikasi dilakukan dengan kombinasi antara surfaktan (asam oleat) dan polimer alam (kitosan) sebagai *surface modifier* pada permukaan magnetik nanopartikel. Pemilihan jenis *surface modifier* ini bertujuan selain dapat mempertahankan stabilitas nanopartikel, juga berperan untuk mengembankan obat-obat kanker yang bersifat hidrofobik. Tambahan polimer hidrofilik (kitosan) diprediksi dapat meningkatkan biokompatibilitasnya dengan sistem *in-vivo*. Selain itu polimer kitosan juga dimodifikasi lebih lanjut dengan penambahan agen pengikat silang yang bersifat ionik dengan tujuan untuk mempertahankan stabilitas kitosan dalam media asam. Pemilihan kedua jenis *agen crosslinking* ini dikarenakan keduanya bersifat biokompatibel dengan sistem *in-vivo*.

Sejauh ini belum banyak penelitian yang mencoba menggabungkan potensi surfaktan asam oleat dan polimer kitosan sebagai *surface modifier*. Penelitian terkait modifikasi permukaan Fe_3O_4 yang telah dilakukan beberapa tahun terakhir disajikan pada Gambar 1.1 Dalam pembuatan material, metode sintesis juga merupakan salah

satu aspek penting yang perlu diperhatikan. Perbedaan dalam proses sintesis diprediksi akan memberikan struktur elektronik yang berbeda sehingga menunjukkan karakter yang berbeda. Dalam penelitian ini, dilakukan pengembangan metode sintesis 2 tipe kopresipitasi yaitu kopresipitasi ex-situ dan in-situ. Metode ex-situ dilakukan dengan tahapan proses meliputi pembuatan nanopartikel Fe_3O_4 dari garam $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dalam suasana alkali diikuti dengan proses penambahan asam oleat (AO), dan terakhir dilakukan pelapisan dengan kitosan serta penambahan agen *crosslinker*. Sedangkan dalam metode in-situ, asam oleat ditambahkan selama pembentukan Fe_3O_4 . Setelah nanopartikel Fe_3O_4 -AO terbentuk, kemudian dilakukan pelapisan dengan kitosan dan agen *crosslinker*. Perbedaan metode tersebut diharapkan akan mempengaruhi bentuk/morfologi, ukuran nanopartikel, serta karakter magnetik.



Gambar 1.1 Roadmap penelitian Fe_3O_4 sebagai kandidat agen *drug delivery*.

Oleh karena itu, perlu dilakukan juga pengujian terhadap pengaruh volume penambahan asam oleat, konsentrasi kitosan, serta rasio konsentrasi *crosslinker* tripolyphosphate (TPP) dan sulfat. Asam oleat dan kitosan yang ditambahkan pada permukaan Fe_3O_4 diharapkan mampu mencegah terjadinya aglomerasi, namun dapat mengakibatkan terbentuknya lapisan (*layer*) non-magnetik dipermukaan. Oleh sebab itu perlu dilakukan investigasi terhadap variasi komposisi asam oleat untuk mengetahui komposisi optimal dalam mencegah aglomerasi dengan mempertahankan sifat superparamagnetik dari material. Konsentrasi kitosan divariasi untuk melihat pengaruh konsentrasi terhadap ukuran nanopartikel serta kemampuannya dalam pengembunan dan pelepasan obat. Selain itu pengujian variasi rasio konsentrasi TPP:sulfat perlu dilakukan dengan tujuan untuk menentukan pengaruh konsentrasi *crosslinker* terhadap morfologi/bentuk nanopartikel..

Untuk mengidentifikasi sifat fisik dan karakteristik magnetik dari material yang dihasilkan masing-masing material hasil sintesis kemudian dikarakterisasi dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM), *Fourier Transform Infra Red* (FTIR), X-ray diffraction (XRD), dan *Vibrating Sample Magnetometry* (VSM). Selanjutnya, untuk mengetahui kemampuan nanopartikel yang dibuat sebagai agen *drug delivey* maka perlu dilakukan uji *drug loading* pada material nanopartikel serta pengujian pelepasan obat dengan doxorubicin sebagai model obat. Pemilihan doxorubicin di dalam penelitian ini dikarenakan obat tersebut merupakan salah satu jenis obat yang banyak digunakan dalam terapi penyakit kanker. Interaksi antara nanopartikel dengan obat dan reseptor sel dikaji secara *in-silico* (secara *molecular docking*) untuk mengetahui kemampuan agen *drug delivery* dalam menghantarkan obat sampai pada sel target

dan memberikan informasi bagaimana obat dapat memicu terjadi proses apoptosis pada sel kanker.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dalam penelitian ini permasalahan yang akan dikaji adalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah pengaruh metode kopresipitasi *ex-situ* dan *in-situ* yang digunakan dalam pembuatan material Fe_3O_4 -AO-kitosan terhadap sifat fisik yang meliputi ukuran kristalit, ukuran partikel, dan morfologi, serta karakteristik magnetik material yang dihasilkan?
2. Bagaimanakah korelasi antara volume asam oleat pada permukaan Fe_3O_4 terhadap ukuran partikel, ukuran kristalit, persentase fasa besi oksida, serta karakteristik magnetik, dari material Fe_3O_4 -AO-kitosan?
3. Bagaimanakah korelasi konsentrasi antara kitosan terhadap ukuran partikel, ukuran kristalit, serta persentase fasa besi oksida dari material Fe_3O_4 -AO-kitosan?
4. Bagaimanakah korelasi antara rasio konsentrasi TPP dan sulfat sebagai *crosslinker* terhadap ukuran partikel, ukuran kristalit, morfologi, dan persentase fasa besi oksida dari material Fe_3O_4 -AO-kitosan?
5. Bagaimanakah kemampuan *drug loading* dan profil *drug release* dari material yang dihasilkan?
6. Bagaimanakah interaksi yang terjadi antara nanopartikel dan obat, serta nanopartikel dengan reseptor di permukaan sel melalui pengujian secara *in-silico* dengan *molecular docking*?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah yang ditetapkan pada penelitian ini meliputi:

1. Jenis kitosan yang digunakan adalah kitosan berat molekul rendah (*low molecular weight chitosan*) dengan drajat deasetilasi 75-85%.
2. Modifikasi permukaan nanopartikel Fe_3O_4 dengan kombinasi asam oleat dan kitosan.
3. Variasi volume asam oleat yaitu 0,5; 1; dan 1,5 mL
4. Variasi konsentrasi kitosan yaitu 0,5% dan 1%.
5. Variasi rasio konsentrasi TPP:sulfat yaitu 2,5:7,5% ; 5:7,5% ; dan 7,5:7,5%..
6. Karakterisasi nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan menggunakan SEM, FTIR, XRD, dan VSM.
7. Model obat anti kanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah doxorubicin.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mengkaji pengaruh metode kopresipitasi ex-situ dan in-situ yang digunakan dalam pembuatan material Fe_3O_4 -AO-kitosan terhadap sifat fisik material serta karakteristik magnetik material yang dihasilkan.
2. Menentukan korelasi antara volume asam oleat pada permukaan Fe_3O_4 terhadap ukuran partikel, ukuran kristalit, persentase fasa besi oksida, serta karakteristik magnetik, dari material Fe_3O_4 -AO-kitosan.
3. Menentukan korelasi konsentrasi antara kitosan terhadap ukuran partikel, ukuran kristalit, serta persentase fasa besi oksida dari material Fe_3O_4 -AO-kitosan.

4. Menentukan korelasi antara rasio konsentrasi TPP dan sulfat sebagai *crosslinker* terhadap ukuran partikel, ukuran kristalit, morfologi, dan persentase fasa besi oksida dari material Fe₃O₄-AO-kitosan.

5. Mampu membuktikan bahwa agen *drug delivery* berbasis Fe₃O₄-AO-kitosan memiliki efisiensi *loading* obat, dan kemampuan melakukan pelepasan obat (*drug release*) yang terkontrol.

6. Mampu membuktikan interaksi yang terjadi antara nanopartikel dan obat, serta nanopartikel dengan reseptor di permukaan sel melalui kajian secara *in-silico* dengan *molecular docking*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu :

1. Menghasilkan material nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan sifat fisik yang sesuai untuk aplikasi *drug delivery* serta memiliki kemampuan *drug loading* dan *drug release* yang baik untuk dapat diaplikasikan.

2. Menentukan hubungan korelasi antara parameter kajian berupa pengaruh metode sintesis, volume asam oleat, konsentrasi kitosan, dan konsentrasi *crosslinker* dengan karakteristik produk nanopartikel. Karakteristik tersebut diantaranya meliputi ukuran partikel, bentuk partikel, ukuran kristalit, persentase fasa besi oksida, karakter magnetik, dan karakter *drug delivery* nanopartikel kitosan-Fe₃O₄.

3. Membuktikan bahwa agen *drug delivery* berbasis Fe₃O₄-AO-kitosan memiliki efisiensi *loading* obat dan kemampuan pelepasan obat (*drug release*) yang terkontrol.

4. Dengan mengetahui karakteristik material yang dihasilkan, maka diharapkan untuk selanjutnya material ini dapat dikembangkan serta diaplikasikan dalam bidang biomedis (khususnya sebagai agen *drug delivery*).



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Nanoteknologi dan Nanopartikel

Nanoteknologi secara harfiah memiliki arti segala macam teknologi dalam skala nanometer yang memiliki aplikasi di dunia nyata. Nanoteknologi meliputi produksi dan aplikasi sistem fisika, kimia, dan biologi mulai dari skala atom atau molekul dalam dimensi submikron, serta integrasinya dalam suatu struktur yang lebih besar (nanostruktur). Sedangkan nanopartikel sendiri dapat didefinisikan sebagai gabungan atom-atom yang terikat bersama dengan ukuran berkisar antara 1-100 nm (Bhusnan, 2004). Pada prinsipnya sejarah nanoteknologi telah dimulai sejak tahun 1959. Seorang ahli fisika yang saat itu terpilih sebagai pemenang Nobel bernama Richard Feynmann mengatakan bahwa, "*There is a plenty of room at the bottom*". Namun, kata nanoteknologi baru pertama kali dicetuskan oleh seorang peneliti dari Jepang bernama Norio Tanaguchi pada tahun 1974. Hingga saat ini nanoteknologi masih tetap menjadi topik yang menarik untuk terus dipelajari dan dikembangkan (Kreuter, 2007).

Kajian terkait bidang nanoteknologi pada dasarnya meliputi proses investigasi dan manipulasi material dalam skala nanometer (nanopartikel). Konsep terkait nanopartikel (produk nanoteknologi) yang disebut sebagai "*Magic bullet*" diperkenalkan pertama kali oleh seorang dokter medis bernama Paul Ehrlich yang tertarik untuk mempelajari tentang bakteri dan imunologi. Pada awalnya Paul Elhrich bekerja dengan bakteri dan jaringan, namun pada akhirnya timbul suatu konsep untuk memanfaatkan suatu nanopartikel sebagai pengarah obat dan mampu membunuh

bakteri patogen dengan suatu perlakuan tertentu. Pada akhir tahun 1960, Peter Paul Speiser juga mulai mengembangkan nanopartikel yang dapat digunakan dalam terapi obat yang terarahkan. Sampai saat ini penelitian berbasis nanopartikel sebagai pengarah obat mampu memberikan perubahan terhadap konsep pemberian obat konvensional (Krukemeyer, *et al.*, 2015 ; Kreuter, 2007).

Teknik sintesis material nanopartikel dapat dilakukan dengan dua pendekatan yang terdiri dari pendekatan *top down* maupun *bottom up*. Pendekatan *top down* pada prinsipnya adalah menghasilkan suatu produk nanopartikel dari material ruah (*bulk material*) dengan mereduksi ukurannya hingga menjadi berukuran nanometer. Pendekatan *top down* ini merupakan salah satu teknik dalam sintesis nanopartikel yang bersifat dapat diulang dengan hasil yang sama (*reproducible*). Namun metode *top down* terkadang dapat menyebabkan kerusakan pada material jika kontrol metode tidak dilakukan dengan baik (Iqbal, *et al.*, 2012 ; Li dan Zhong, 2012).

Sedangkan dengan pendekatan *bottom up*, struktur nanopartikel dapat dihasilkan dari unit kecil molekul atau atom, selanjutnya diikuti dengan reaksi kimia, pembentukan inti (nukleasi) dan pertumbuhan inti, sehingga akan diperoleh suatu nanopartikel. Keuntungan dari pendekatan *bottom up* adalah prosesnya lebih sederhana dan cepat karena pembentukan nanopartikel terjadi secara *self assembly*.

Selain itu dari segi biaya, teknik pendekatan ini lebih bernilai ekonomis. Namun karena prosesnya terjadi secara *self assembly*, maka kontrol proses akan lebih sulit dilakukan. Oleh sebab itu sedikit perbedaan pada kondisi reaksi dapat menghasilkan nanopartikel dengan karakteristik yang berbeda pula (Iqbal, *et al.*, 2012; Li dan Zhong, 2012).

2.2 Nanopartikel Magnetik Besi Oksida

Pada prinsipnya nanopartikel merupakan material yang memiliki ukuran dalam skala nanometer (1-100 nm). Material nanopartikel ini sangat menarik perhatian untuk dikembangkan karena sifatnya yang berbeda dari material ruahnya. Nanopartikel dapat disintesis dari bahan organik maupun anorganik. Terdapat beberapa jenis material nanopartikel anorganik yang banyak dikembangkan dalam berbagai aplikasi diantaranya adalah nanopartikel perak yang digunakan pada industri tekstil untuk pemurnian air karena memiliki sifat antimikroba. Selain itu nanopartikel emas juga dapat digunakan dalam bidang imunokimia untuk identifikasi interaksi protein, serta nanopartikel magnetik yang digunakan dalam bidang biomedis sebagai terapi gen, *magnetic resonance imaging* (MRI), dan *drug delivery*. Nanopartikel magnetik memiliki manfaat yang sangat beragam dan banyak menarik perhatian dikarenakan karakter magnetiknya yang khas (Panta dan Bergmann, 2015; Hasan, 2015)

Pada skala atomik, sifat magnetik suatu material timbul karena adanya pergerakan elektron (*electron motion*). Terdapat dua tipe *electron motion* yaitu (1) rotasi orbital dari elektron pada atom-atom inti, dan (2) pergerakan spin dari elektron pada sumbunya. Kedua jenis pergerakan elektron ini akan menghasilkan medan magnet. Sifat magnetik dapat dikelompokkan menjadi beberapa jenis yaitu :

1. Diamagnetik.

Diamagnetik merupakan sifat magnet yang timbul dari interaksi antara medan magnet eksternal dengan pergerakan elektron dalam orbital yang menghasilkan magnetisasi negatif yang sangat lemah. Sifat magnetik akan hilang dengan cepat

ketika pengaruh magnet eksternal dihilangkan. Terkadang sifat diamagnetik digunakan untuk mencirikan material yang tidak bersifat magnet/bersifat magnet namun sangat lemah.

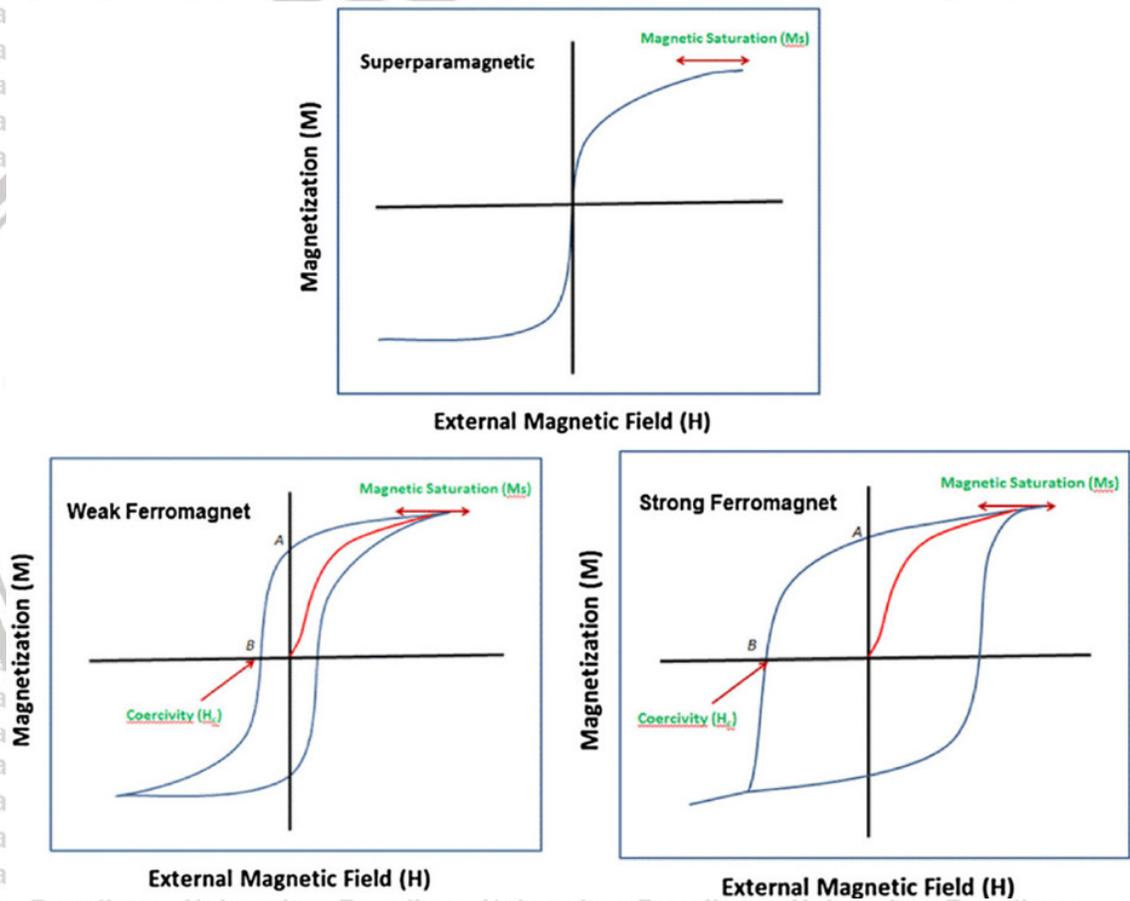
2. Paramagnetik.

Sifat paramagnetik akan muncul ketika satu atom, ion atau molekul memiliki momen dipole magnet permanen. Kutub magnet cenderung akan mengarah secara paralel dengan medan magnet eksternal yang diaplikasikan dan menghasilkan magnetisasi positif yang lemah. Apabila tidak terdapat medan magnet eksternal, momen magnetik akan berada pada orientasi yang acak akibat efek termal. Ketika dipengaruhi oleh medan magnet eksternal, material yang bersifat paramagnetik berkebalikan dengan material diamagnetik, dimana material ini cenderung tertarik pada daerah dengan medan magnet yang kuat. Magnetisasi pada material paramagnetik umumnya lebih lemah dibandingkan ferromagnetik, namun dominan lebih kuat dibandingkan diamagnetik.

3. Ferromagnetik

Ferromagnetik merupakan sifat dari material yang memiliki nilai magnetisasi positif, yang sangat tinggi. Pengaruh kecil dari medan magnetik luar sudah mampu menyebabkan momen dipol magnetik atom berorientasi searah dengan medan magnet eksternal. Bahkan dalam beberapa kasus, penyearahan momen dipol ini dapat bertahan sekalipun pengaruh medan magnet eksternal telah dihilangkan. Hal ini terjadi karena momen dipol magnetik atom dari material ferromagnetik ini dapat mengerahkan gaya-gaya yang kuat pada atom tetangganya. Namun material yang bersifat ferromagnetik dapat berubah menjadi bahan paramagnetik di atas temperature

transisi yang dikenal sebagai temperatur curie. Diatas temperatur curie orientasi momen magnetik akan berubah menjadi acak akibat keteraturan momen magnet yang terganggu dari adanya pengaruh energi termal. Loop hysteresis material ferromagnetik (yang dibandingkan dengan loop hysteresis superparamagnetik) disajikan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Tipe *loop hysteresis* untuk material superparamagnetik dan ferromagnetik.

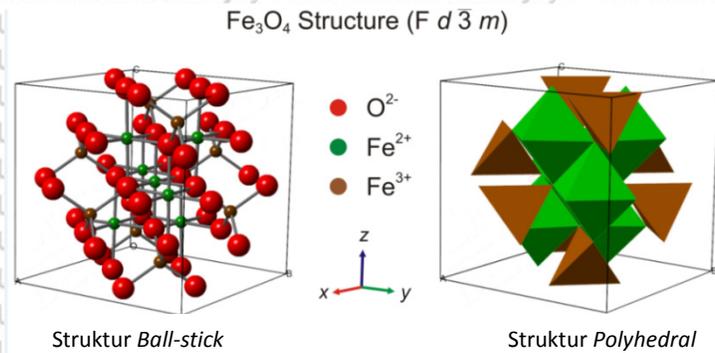
4. Superparamagnetik

Sifat superparamagnetik merupakan sifat material yang memiliki magnetisasi tinggi ketika diberi medan magnet eksternal, namun ketika tidak ada medan magnet

eksternal nilai magnetisasi rata-ratanya adalah nol. Namun sifat superparamagnetik ini juga bergantung pada temperatur, apabila material superparamagnetik yang pada temperature ruang didinginkan maka sifatnya dapat berubah kembali menjadi ferromagnetik. Bahan superparamagnetik ini timbul dari bahan ferromagnetik yang berukuran sangat kecil yaitu antara 0,001-0,01 mikrometer. Pada ukuran yang sangat kecil ini material akan memiliki koersivitas yang bernilai 0, akibatnya tanpa pengaruh medan magnet eksternal, material superparamagnetik akan bersifat non-magnetik.

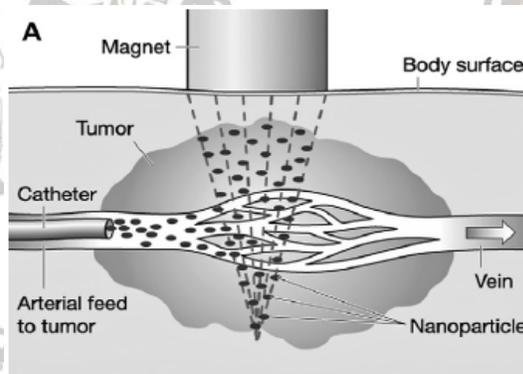
Dalam pemanfaatan magnetik nanopartikel untuk keperluan biomedis, faktor biokompatibilitas, biodegradabilitas, stabilitas, serta tingkat toksisitas perlu diperhatikan. Nanopartikel besi oksida (IONPs) merupakan salah satu jenis nanopartikel magnetik yang dapat diaplikasikan dalam bidang biomedis. Untuk keperluan biomedis, diantara beberapa jenis nanopartikel besi oksida, hanya Fe_3O_4 (magnetite) atau $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemite) yang memenuhi karakter biokompatibilitas untuk digunakan dalam sistem in-vivo (Wahajuddin dan Arora, 2012 ; Issa, *et al.*, 2013 ; Silva, *et al.*, 2013).

Magnetit merupakan mineral yang mengandung baik Fe(III) maupun Fe(II). Dalam kondisi *bulk*, Fe_3O_4 bersifat ferrimagnetik dan berwarna hitam (Cornell dan Schwertmann, 2003). Magnetit bersifat ferromagnetik pada temperatur ruang dengan temperatur *Curie* sebesar 858 K. Struktur kristalografik mineral ini yaitu *inverse spinel* dengan konstanta kisi sebesar 8,397 Å dan terdiri dari kisi oksigen *face-centered-cubic* (FCC) dengan ion Fe^{3+} mengisi sisi tetrahedral dan Fe^{2+} serta Fe^{3+} dengan jumlah yang sama mengisi sisi oktahedral (Fernandez, 2011). Struktur kital Fe_3O_4 dengan struktur *ball stick* dan polyhedral disajikan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur Kristal Fe_3O_4 .

Nanopartikel magnetik besi oksida (IONPs) dapat diarahkan pergerakannya oleh medan magnet eksternal. Kemampuan IONPs untuk diarahkan ke target tertentu sangat erat kaitannya dengan pemanfaatan material ini sebagai agen *drug delivery*. Ilustrasi penghantaran nanopartikel magnetik menuju ke sel target tertentu ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Pergerakan Nanopartikel Magnetik mengarah pada Sel Tumor akibat Pengaruh Medan Magnet Eksternal (Krukemeyer, *et al.*, 2012).

Sifat magnet dari nanopartikel ini dapat dihilangkan ketika material telah mencapai target tanpa meninggalkan residu magnetik dan koersivitas. Koersivitas merupakan suatu gaya yang diberikan untuk mengurangi residu medan magnet yang

tersisa pada suatu partikel magnetik agar nilainya menjadi nol setelah medan magnet dihilangkan (akibatnya material magnet menjadi bersifat non magnetik) (Mody, *et al.*, 2014 ; Scialabba, *et al.*, 2014 ; Vicky, *et al.*, 2013).

Sintesis IONPs dapat dilakukan dengan berbagai metode baik secara fisika, kimia, maupun biologi (dengan melibatkan mikroorganisme). Namun, diantara berbagai metode tersebut, metode kimia seperti kopresipitasi, dekomposisi termal, sonokimia, dan hidrotermal merupakan metode yang paling umum digunakan (Hasan, 2015 ; Wu, *et al.*, 2008 ; Xu, *et al.* 2014 ; Liang, *et al.*, 2011 ; Indira dan Lakshmi, 2010). Menurut Unsoy, *et al.* (2012), sintesis nanopartikel magnetik secara kopresipitasi dipandang lebih mudah prosesnya, hemat biaya (*cost effectiveness*), serta memberikan *yield* yang lebih banyak. Pemilihan metode sintesis yang tepat sangat diperlukan untuk menghasilkan material dengan karakter yang sesuai untuk aplikasinya.

Selain pemilihan metode sintesis, teknik modifikasi pada permukaan juga sangat diperlukan untuk menjaga stabilitas nanopartikel. Hal ini dikarenakan nanopartikel Fe_3O_4 memiliki stabilitas yang rendah sehingga mudah mengalami oksidasi baik di medium air maupun udara. Selain itu nanopartikel Fe_3O_4 juga cenderung mengalami aglomerasi akibat daya tarik magnetik dan gaya Van der Waals yang kuat antar partikelnya. Oleh sebab itu, teknik modifikasi yang tepat diperlukan untuk meningkatkan stabilitas, dispersitas, serta biokompatibilitas nanopartikel (Xu, *et al.*, 2014 ; Wu, *et al.*, 2008 ; Romberg, *et al.*, 2008).

Proses modifikasi juga dimaksudkan untuk memberikan suatu gugus fungsi baru pada permukaan nanopartikel sehingga dapat berikatan dengan molekul lain seperti

protein dan obat. Strategi modifikasi permukaan nanopartikel dapat dilakukan dengan metode *grafting* ataupun pelapisan (*coating*) berbasis molekul organik (seperti surfaktan, polimer, atau biomolekul) dan lapisan anorganik seperti silika dan logam (Scialabba, *et al.*, 2014 ; Wu, *et al.*, 2008 ; Christian, *et al.*, 2008). Pemilihan material dalam modifikasi permukaan perlu disesuaikan dengan tujuan aplikasi material tersebut. Untuk kebutuhan biomedis, diperlukan modifikasi permukaan dengan material yang juga aman diaplikasikan secara *in vivo*. Berikut ini beberapa penelitian terkait pelapisan permukaan Fe_3O_4 selama 6 tahun terakhir.

Penelitian Liu, *et al* (2011) melaporkan terkait sintesis Fe_3O_4 -kitosan secara kopresipitasi dengan menggunakan glutaraldehid sebagai agen crosslinking. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa bentuk partikel yang dihasilkan sangat beragam. Hasil yang diperoleh Liu *et al* memiliki kesamaan dengan penelitian yang dilakukan oleh Dorniani, *et al* (2012) yang juga melakukan modifikasi Fe_3O_4 dengan kitosan dan asam galat, dimana bentuk partikel yang dihasilkan adalah *irregular* karena masih mengalami agglomerasi. Selain itu kekurangan lain dari material carrier ini adalah bersifat sitotoksik pada sel yang diuji dan pelepasan obat yang terjadi sangat cepat (tidak terkontrol) yaitu mencapai 70% pada 150 menit awal.

Modifikasi Fe_3O_4 dengan kombinasi asam sitrat dan asam oleat juga telah dilakukan oleh Wei, *et al.* 2011 secara kopresipitasi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa nanopartikel memiliki kemampuan terdispersi dalam air serta ukuran yang dihasilkan cukup kecil yaitu 12-15 nm. Namun Mahdavi, *et al* (2013) juga melakukan modifikasi Fe_3O_4 hanya dengan menggunakan asam oleat saja

menyebutkan bahwa material yang dihasilkan memiliki keterbatasan untuk larut dalam pelarut polar.

Penelitian lain terkait modifikasi Fe_3O_4 dengan surfaktan jenis lain juga telah dilakukan oleh Salavati-Niasari (2012) yaitu dengan menggunakan asam oktanoat.

Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa ukuran partikel yang dihasilkan adalah 25 nm namun dengan bentuk *rod* (batang). Bentuk ini kurang disukai apabila material tersebut nantinya akan digunakan dalam aplikasi *drug delivery* di dalam sistem in-vivo. Pada tahun 2013, Liu, *et al* juga telah memodifikasi Fe_3O_4 dengan jenis surfaktan lain yaitu *cetyltrimethyl ammonium* (CTAB) namun ukuran yang dihasilkan ternyata sangat beragam. Selanjutnya di tahun 2015 beberapa peneliti diantaranya Cui *et al*, Guo *et al*, dan Arum *et al* juga mencoba memodifikasi Fe_3O_4 dengan surfaktan masing-masing berupa *perfluoro-polyether carboxylic acid*, SiO_2 -DMSA, dan kitosan-APTS, hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ukuran partikel yang dihasilkan beragam dan menyebabkan penurunan sifat magnetik material.

Penelitian Tran, *et al* (2015) juga telah dilakukan untuk mengidentifikasi pengaruh Bovine serum albumin (BSA) sebagai *surface modifier* Fe_3O_4 . Namun kekurangan dari penelitian ini adalah tidak adanya penjelasan terkait stabilitas dan kompatibilitas dari material tersebut dengan sistem in-vivo. Terkadang penggunaan HSA untuk sistem in-vivo jauh lebih baik dibandingkan dengan BSA karena sifatnya yang lebih biokompatibel. Selain itu menurut Wu, *et al* 2015 Penggunaan biomolekul sebagai *surface modifier* terkadang memberikan perubahan ukuran yang besar (yaitu mencapai >100 nm).

Xu, *et al* (2016) telah melakukan modifikasi Fe_3O_4 dengan kitosan dan *phytic acid*. Hasil penelitiannya tersebut menunjukkan ukuran partikel yang dihasilkan adalah 243 nm. Namun kekurangannya adalah sifat magnetiknya menurun yang dibuktikan dengan penurunan nilai saturasi magnetik serta adanya *phytic acid* menyebabkan sitotoksitasnya terhadap sel yang diuji meningkat.

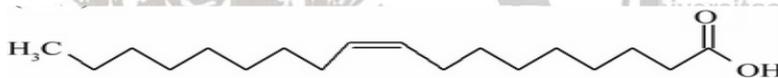
Sedangkan Shete, *et al* pada tahun 2015 mencoba untuk menggabungkan potensi asam oleat dan kitosan sebagai surface modifier pada Fe_3O_4 . Hasil penelitiannya tersebut menunjukkan bahwa material bersifat superparamagnetik dengan ukuran 16,5 nm serta tidak bersifat sitotoksik pada sel yang diuji (L929 cell line).

Dalam penelitian tersebut nanopartikel akan digunakan dalam aplikasi hyperthermia. Sehingga belum ada penjelasan terkait profil *drug loading* dan *drug release* apabila akan digunakan dalam aplikasi *drug delivery*. Mengingat kitosan memiliki stabilitas yang rendah dalam pH tumor yang asam, maka pada kajian selanjutnya diperlukan agen pengikat silang yang kompatibel untuk menjaga stabilitas kitosan sebagai agen *drug delivery*. Agen *crosslinker* juga dapat berperan dalam pengaturan pelepasan obat dalam aplikasi *drug delivery*. Lapisan non-magnetik yang terbentuk dipermukaan Fe_3O_4 menyebabkan saturasi magnetiknya relatif rendah yaitu $29,7 \text{ emu g}^{-1}$. Keberadaan layer non-magnetik terkadang menyebabkan berkurangnya susceptibilitas magnetik dari Fe_3O_4 . Oleh sebab itu diperlukan adanya kajian terkait komposisi yang tepat untuk menentukan ketebalan lapisan non-magnetik yang tetap mampu mempertahankan sifat magnetik Fe_3O_4 .

2.3 Asam Oleat

Asam oleat merupakan salah satu jenis surfaktan dan bersifat amphifilik yang bermakna bahwa dalam satu molekul asam oleat memiliki kepala bersifat hidrofilik dan ekor bersifat hidrofobik. Hal ini dikarenakan asam oleat memiliki rantai panjang hidrokarbon pada bagian ekor, sekaligus gugus asam karboksilat pada bagian kepala.

Struktur asam oleat disajikan pada Gambar 2.4. Asam oleat dapat digunakan sebagai pelapis (*coating*) pada permukaan nanopartikel. Mekanisme modifikasi permukaan dengan oleh asam oleat terjadi melalui koordinasi antara anion karboksilat dari asam oleat dengan permukaan nanopartikel (Shete, *et al.*, 2015 ; Pereira da Silva, *et al.*, 2016).



Gambar 2.4. Struktur asam oleat (Goli, *et al.*, 2012).

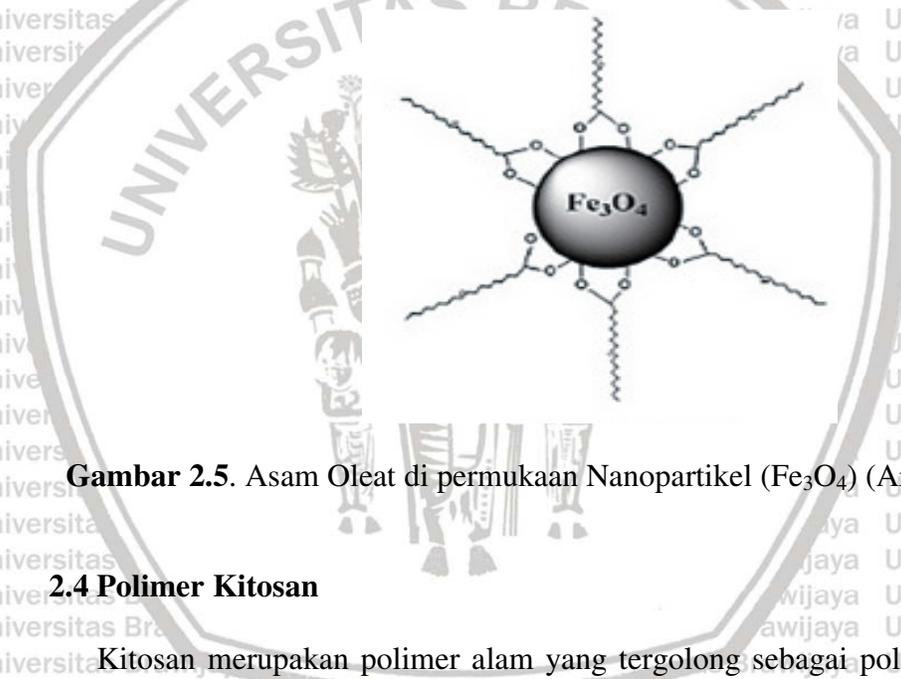
Dalam peranannya sebagai *surface modifier*, asam oleat bertindak sebagai *capping agent* atau *stabilizing agent* yang mampu mempertahankan stabilitas nanopartikel melalui pembentukan lapisan pelindung. Lapisan pelindung (*protective monolayer*) tersebut akan mencegah terjadinya aglomerasi pada nanopartikel.

Akibatnya, penambahan asam oleat dapat memfasilitasi pembentukan nanopartikel dengan ukuran yang lebih seragam dan monodispersitas yang tinggi (Tran, *et al.*, 2015; Bloemen, *et al.*, 2012).

Penggunaan asam oleat akan memberikan sifat hidrofobik dalam modifikasi permukaan nanopartikel oksida besi. Hal ini akan memberikan keuntungan tersendiri bagi aplikasi nanopartikel sebagai agen *drug delivery*. Obat-obat anti kanker yang

bersifat hidrofobik akan mudah terlemparkan pada nanopartikel yang dimodifikasi asam oleat. Selain itu asam oleat juga memiliki tingkat toksisitas yang rendah, bersifat biokompatibel, serta memiliki aktivitas anti bakteri. Oleh sebab itu asam oleat dapat memberikan kontribusi sebagai *surface modifier* pada material nanopartikel untuk aplikasi biomedis (Tran, *et al.*, 2015 ; Velusamy, *et al.*, 2016).

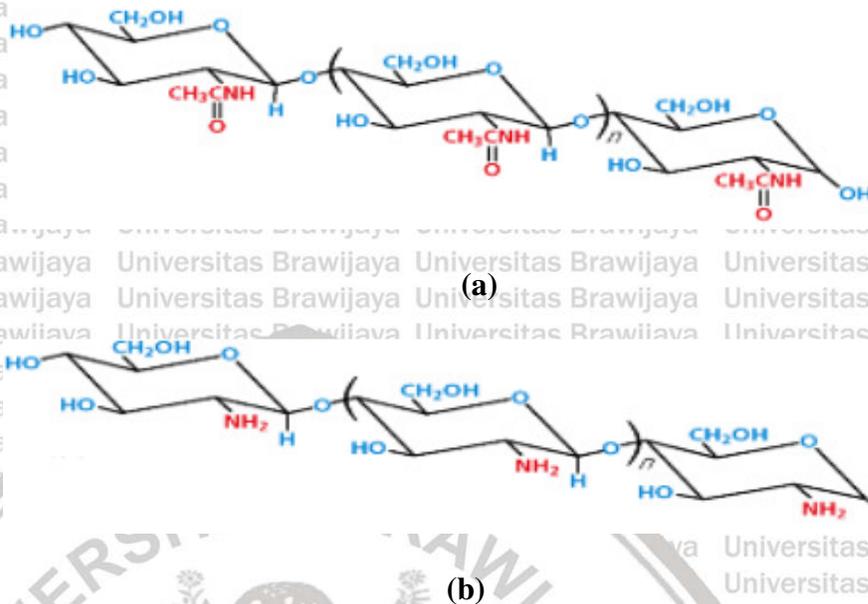
Modifikasi berbasis asam oleat pada permukaan nanopartikel Fe_3O_4 disajikan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Asam Oleat di permukaan Nanopartikel (Fe_3O_4) (Arum, *et al.*, 2015).

2.4 Polimer Kitosan

Kitosan merupakan polimer alam yang tergolong sebagai polisakarida sekaligus sebagai produk kitin yang terdeasetilasi. Gugus asetil pada atom C-2 dalam struktur kitin akan terlepas melalui proses hidrolisis dalam larutan alkali sehingga membentuk struktur kitosan (Bansal, *et al.*, 2011). Struktur kitin dan kitosan masing-masing disajikan pada Gambar 2.6a dan 2.6b.



Gambar 2.6. (a) Struktur Kitin dan (b) Struktur Kitosan (Kumar, *et al.*, 2014).

Kitosan dapat diperoleh secara alami dari cangkang hewan *crustacea* seperti udang, kepiting, dan kerang (Kumar, *et al.*, 2014 ; Bansal, *et al.*, 2011). Produksi kitosan dari cangkang hewan tersebut dapat dilakukan dengan mudah melalui tahapan deproteinasi, demineralisasi, *decolourisasi*, dan deasetilasi (Dutta, *et al.*, 2004). Pada umumnya kitosan memiliki derajat deasetilasi berkisar antara 66-95% dengan berat molekul antara 3800-20.000 Dalton (Bansal, *et al.*, 2011).

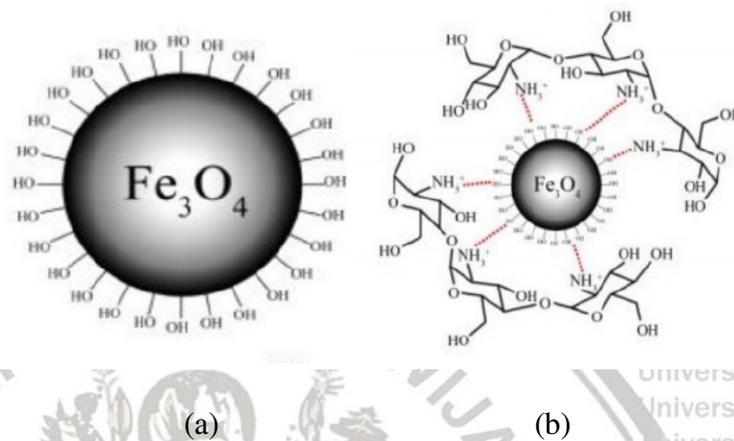
Ditinjau dari strukturnya, kitosan merupakan polimer kationik yang terdiri dari 2 sub unit, yaitu D-glukosamin dan N-asetil-D-glukosamin yang dihubungkan oleh ikatan (1-4) glikosidik. Kitosan memiliki tiga gugus fungsi reaktif yang meliputi gugus amina, gugus hidroksil primer, dan gugus hidroksil sekunder. Kitosan tidak larut dalam air. Namun dapat larut dalam kondisi asam. Pada kondisi pH yang rendah ($\text{pH} < 6,5$), gugus amina dari kitosan akan mengalami protonasi sehingga bermuatan

positif. Akibatnya kitosan akan mudah berinteraksi dengan molekul bermuatan negatif seperti fosfolipid, glukosaminoglikan, serta proteoglikan melalui interaksi elektrostatik. Sebaliknya, apabila pH meningkat maka kitosan akan mengalami deprotonasi sehingga menjadi tidak bermuatan dan kehilangan solubilitasnya (Raftery, *et al.*, 2013 ; Zargar, *et al.*, 2015).

Menurut Kumar, *et al.* (2014), sintesis nanopartikel kitosan dapat dilakukan melalui beberapa metode antara lain metode desolvasi, gelasi ionik, atau dengan penambahan agen pengikat silang (*cross-linker*). Selain itu nanopartikel kitosan juga dapat terbentuk akibat proses *self assembly* melalui penambahan senyawa hidrofobik. Menurut El Faray, *et al.*, (2012), penambahan senyawa hidrofobik seperti *fatty acid* dan asam karboksilat ke dalam larutan kitosan pada kondisi reaksi tertentu akan menyebabkan pembentukan nanopartikel kitosan. Penambahan senyawa hidrofobik tersebut ternyata juga memberikan akibat pada perubahan sifat kitosan. Kitosan yang pada awalnya bersifat hidrofilik dapat mengalami modifikasi menjadi bersifat amphifilik akibat penambahan senyawa hidrofobik tersebut (El Fray, *et al.*, 2012).

Kitosan memiliki manfaat yang sangat luas dan dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang. Hal ini dikarenakan kitosan memiliki beberapa sifat penting diantaranya yaitu hidrofilisitas, biokompatibilitas, biodegradabilitas, memiliki toksisitas yang rendah, memiliki aktivitas antimikroba, antitumor, dan antifungal (Huang, *et al.*, 2009 ; Honary, S., *et al.*, 2011 ; Bonferoni, *et al.*, 2014). Berdasarkan sifat tersebut, kitosan memiliki potensi yang sangat besar untuk dikembangkan dalam berbagai aplikasi biomedis. Beberapa aplikasi biomedis berbasis kitosan diantaranya adalah *wound healing*, *gene delivery*, rekayasa jaringan, serta *drug*

delivery (Huang, *et al.*, 2009). Kitosan dan Fe_3O_4 dapat digunakan bersama-sama sebagai kandidat agen *drug delivery*. Interaksi antara Fe_3O_4 dan kitosan diilustrasikan pada Gambar 2.7 (Unsoy, *et al.*, 2012).



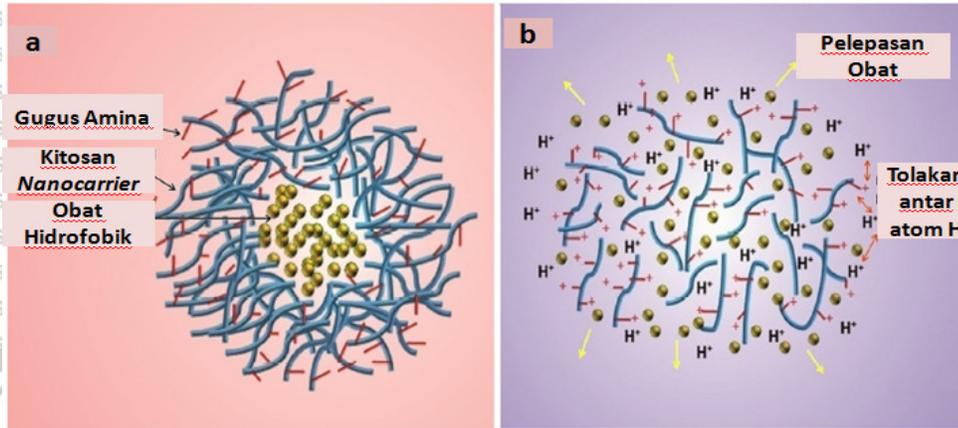
Gambar 2.7. (a) Struktur Fe_3O_4 , dan (b) Pelapisan permukaan Fe_3O_4 dengan kitosan (Unsoy, *et al.*, 2012).

Nanopartikel kitosan dapat digunakan sebagai *nanocarrier* (sistem pembawa) dalam aplikasi *drug delivery* karena memiliki sifat responsif terhadap perubahan pH.

Pada umumnya sel tumor memiliki kondisi lingkungan yang asam (pada kisaran pH 5-6,8). Pada kondisi lingkungan sel tumor tersebut, kitosan akan mengalami protonasi, sehingga bermuatan positif.

Keberadaan muatan-muatan positif pada struktur kitosan akan meningkatkan tolakan antara rantai polimer yang berbeda. Hal ini menyebabkan kitosan akan menjadi mudah larut (terdegradasi) sehingga pelepasan obat akan terjadi. Dalam perannya sebagai agen *drug delivery*, kitosan dapat digunakan untuk mengemban obat yang bersifat hidrofobik seperti paclitaxel dan doxorubicin. Kitosan sebagai agen *drug delivery* masing-masing pada kondisi lingkungan sel normal dan sel tumor

(kondisi asam) dapat diilustrasikan seperti pada Gambar 2.8 (Ghaz-Jahanian, *et al.*, 2015).



Gambar 2.8. Ilustrasi kitosan *nanocarrier* pada (a) sel normal dan (b) sel tumor.

2.5 Agen Pengikat Silang (*Crosslinker*)

Agen *crosslinker* merupakan agen pengikat silang yang menjadi penghubung antar rantai polimer polisakarida melalui suatu *inter chain linkage*. Berdasarkan interaksinya dengan polimer kitosan, *crosslinker* diklasifikasikan menjadi 2 jenis yaitu *crosslinker* fisik dan *crosslinker* kimia. *Crosslinker* fisik lebih banyak digunakan karena sifatnya yang dapat terdegradasi dalam jangka waktu penggunaan tertentu. Contoh *crosslinker* yang berinteraksi fisik (berikatan secara ionik) dengan kitosan adalah tripolyphosphate, asam sitrat, dan dekstran sulfat. Sedangkan *crosslinker* kimia memberikan stabilitas mekanik yang baik terhadap material kitosan *ter-crosslinking*. *Crosslinker* kimia berikatan secara kovalen dengan polimer kitosan.

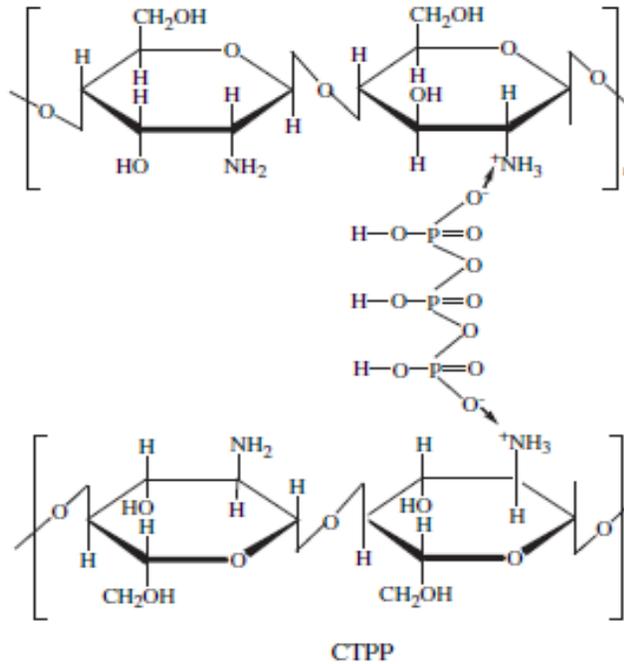
Contoh agen *crosslinker* kimia adalah glutaraldehid, vanilin, dan genipin (Shweta dan Sonia, 2013).

Crosslinker memberikan efek stabil terhadap struktur material kitosan dalam kondisi larutan asam maupun basa (Shweta dan Sonia, 2013). Selain itu agen *crosslinker* juga mereduksi ukuran partikel menjadi lebih kecil melalui reaksi inter dan intramolekular antara kitosan dengan *crosslinker* tersebut (Kumar, *et.al*, 2014).

Dalam pemanfaatan kitosan sebagai agen *drug delivery*, *crosslinker* juga berperan dalam mengontrol terjadinya pelepasan obat dari material (Deepa, *et.al*, 2012; Ibezim, *et.al*, 2011).

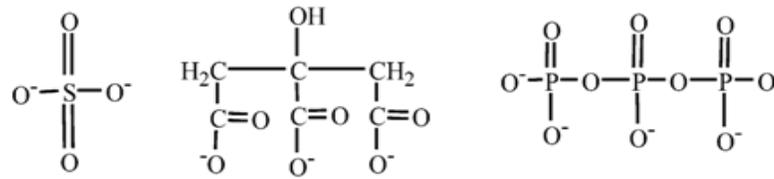
Crosslinker yang digunakan dalam struktur kitosan untuk keperluan biomedis tentunya harus bersifat biokompatibel dengan sistem *in vivo*. Glutaraldehid merupakan salah satu jenis agen *crosslinker* yang bersifat toksik dan iritan sehingga berbahaya untuk digunakan sebagai *crosslinker* kitosan untuk aplikasi *drug delivery* (Ibezim, *et.al*, 2011). *Crosslinker* seperti tripolyphosphate merupakan salah satu agen anionik *crosslinker* yang bersifat tidak beracun (non toksik) dan dapat meminimalisir efek samping berbahaya terhadap penggunaan *crosslinker* kimia. Tripolyphosphate berinteraksi secara elektrostatik dengan kitosan melalui gelasi ionik (Ibezim, *et.al*, 2011; Mi, *et.al*, 2003). Interaksi antara atom O yang bermuatan negatif pada TPP dengan atom N yang bermuatan positif pada kitosan ditunjukkan pada Gambar 2.9.

Mekanisme reaksi *crosslinking* dapat dipengaruhi oleh ukuran dan jenis *crosslinker*. Semakin kecil ukuran molekul *crosslinker* yang digunakan maka proses difusi *crosslinker* pada kitosan akan berlangsung lebih cepat sehingga dapat mempersingkat proses terjadinya pembentukan ikatan sialng (*crosslinking time*) (Shweta dan Sonia, 2013).



Gambar 2.9. Interaksi elektrostatis antara Kitosan dengan TPP (Wan Ngah dan Fatinathan, 2010).

Selain TPP terdapat beberapa jenis anionik *crosslinker* lain yang dapat digunakan sebagai *crosslinker* kitosan untuk aplikasi *drug delivery* diantaranya yaitu sulfat dan sitrat. Penggabungan antara dua agen *crosslinker* menunjukkan efek yang baik terhadap karakteristik material. Menurut penelitian yang dilaporkan oleh Shu dan Zhu pada tahun 2002 diketahui bahwa kombinasi antara *crosslinker* sulfat/TPP dan sitrat/TPP memberikan bentuk morfologi (*spherical*) yang lebih baik terhadap material. Ukuran *crosslinker* sulfat yang lebih kecil menyebabkan waktu *crosslinking* dapat berlangsung lebih cepat. Struktur anionik *crosslinker* ditunjukkan pada Gambar 2.10.



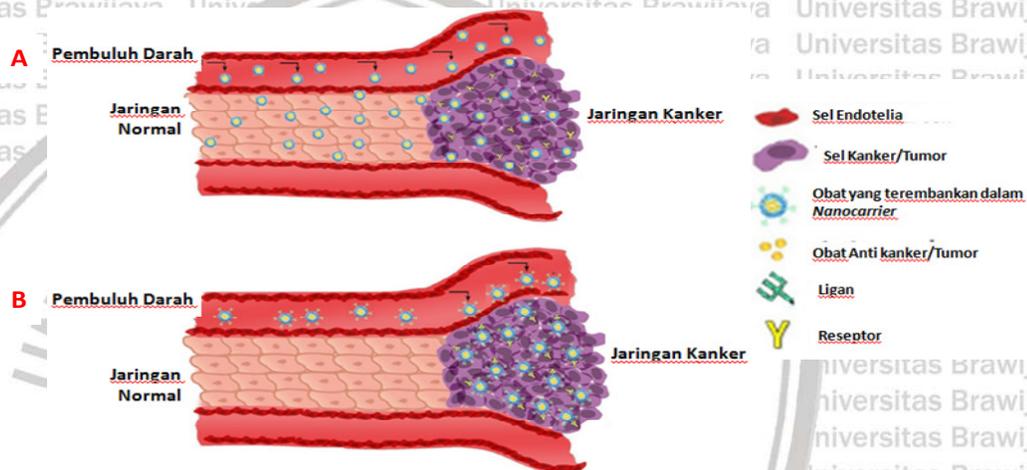
Gambar 2.10. Struktur *Crosslinker* Anionik : ion (a) sulfat, (b) sitrat, dan (c) TPP (Shu dan Zhu, 2002).

2.6 Agen *Drug Delivery*

Pemberian obat secara konvensional terhadap pasien penderita tumor maupun kanker memberikan sejumlah efek samping yang tidak diinginkan. Hal ini terjadi sebagai akibat dari distribusi obat yang tidak spesifik pada sel target. Sebagai contoh, pemberian obat doxorubicin dalam berbagai pengobatan tumor menyebabkan efek samping diantaranya kardi toksisitas, mukositis, dan alopecia (Jia, *et al.*, 2012). Dalam mengatasi berbagai permasalahan yang terjadi akibat distribusi obat yang tidak spesifik tersebut, maka dibuatlah suatu sistem penghantar obat yang dapat menghantarkan obat ke sel target yang spesifik dan meminimalisir efek samping dari pemberian dosis obat yang berlebih. Agen *drug delivery* tersebut harus memiliki karakteristik tertentu. Material berbasis nanopartikel biomaterial Fe₃O₄-AO-kitosan dapat digunakan sebagai kandidat agen *drug delivery* karena memenuhi karakter *drug delivery* salah satunya biokompatibel dengan tubuh.

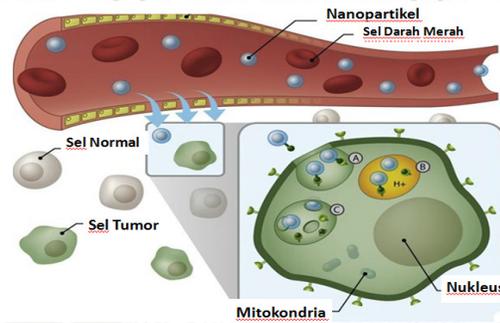
Dalam terapi tumor maupun kanker, agen *drug delivery* dibagi menjadi dua jenis yaitu *passive targeting drug delivery* dan *active targeting drug delivery* seperti ditunjukkan pada Gambar 2.11. Dalam penelitian ini material *drug delivery* berbasis Fe₃O₄-AO-kitosan termasuk sebagai *active targeting drug delivery*. Apabila pada

umumnya *active targeting* melibatkan adanya ligan yang memiliki afinitas spesifik terhadap reseptor ataupun molekul pada sel target, dalam hal ini peran ligan tersebut digantikan dengan medan magnet eksternal. Pengaruh medan magnet menyebabkan nanopartikel cenderung terarahkan pada sel target tertentu sesuai dengan arah medan magnet (Ghaz-Jahanian, et. al., 2015).



Gambar 2.11. (A) *Passive Targeting*, (B) *Active Targetting Drug Delivery System*.

Apabila material *drug delivery* telah sampai pada permukaan sel target, maka nanopartikel akan mengalami endositosis untuk masuk ke sel target dan membentuk endosom. Selanjutnya endosom mengalami asidifikasi (pengasaman), akibatnya akan terjadi proses *swelling*, dan pada akhirnya endosom akan pecah. Setelah itu nanopartikel beserta obat yang terkonjugasi pada nanopartikel dapat keluar. Ilustrasi penghantaran nanopartikel magnetik sebagai agen *drug delivery* melalui pembuluh darah secara *active targeting* disajikan pada Gambar 2.12 (Sun, et.al., 2008).



Gambar 2.12. Penghantaran Agen *Drug Delivery* Nanopartikel Magnetik secara *Active Targeting*.

Obat dalam sistem *drug delivery* dapat terikat secara kovalen ataupun terperangkap di dalam material pembawa (enkapsulasi). Oleh sebab itu kinetika pelepasan obat dalam tubuh juga dapat terjadi dengan berbagai mekanisme. Mekanisme pelepasan obat tersebut dapat terjadi diantaranya dengan proses difusi, disolusi, osmosis, erosi maupun degradasi (Siegel dan Rathbone, 2012).

2.7 Freeze Drying

Freeze drying atau liofilisasi merupakan suatu proses penghilangan air dari sampel yang dibekukan melalui sublimasi dan desorpsi di bawah kondisi vakum.

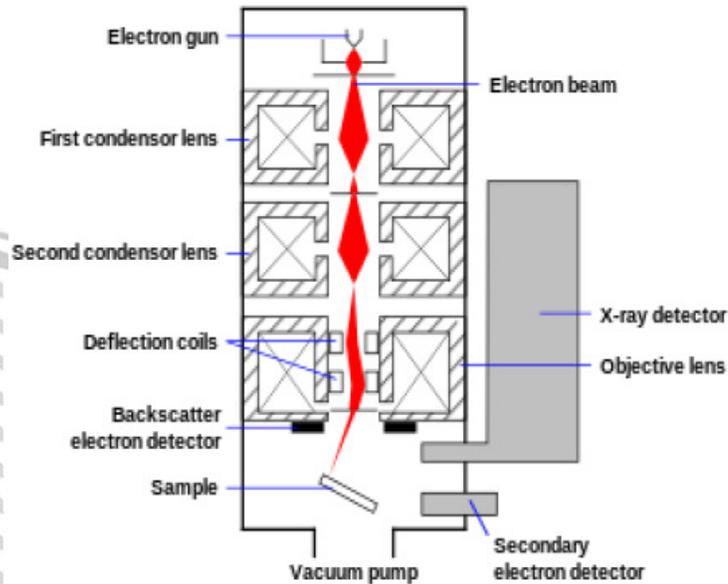
Proses ini banyak diterapkan dalam pengeringan produk-produk farmasi diantaranya vaksin, protein, peptide, nanopartikel, nanoemulsi, serta liposom. Prosedur *freeze drying* meliputi beberapa proses yaitu pembekuan (solidifikasi), pengeringan primer (sublimasi es), dan pengeringan sekunder (desorpsi air yang tidak membeku).

Pemanfaatan teknik pengeringan dengan *freeze drying* dalam penelitian ini dimaksudkan untuk menghindari pengkerutan (*shrinkage*) dari polimer kitosan pada

permukaan Fe_3O_4 sehingga dapat berkontribusi dalam pengembangan obat (Guibal, 2004).

2.8 Scanning Electron Microscope (SEM)

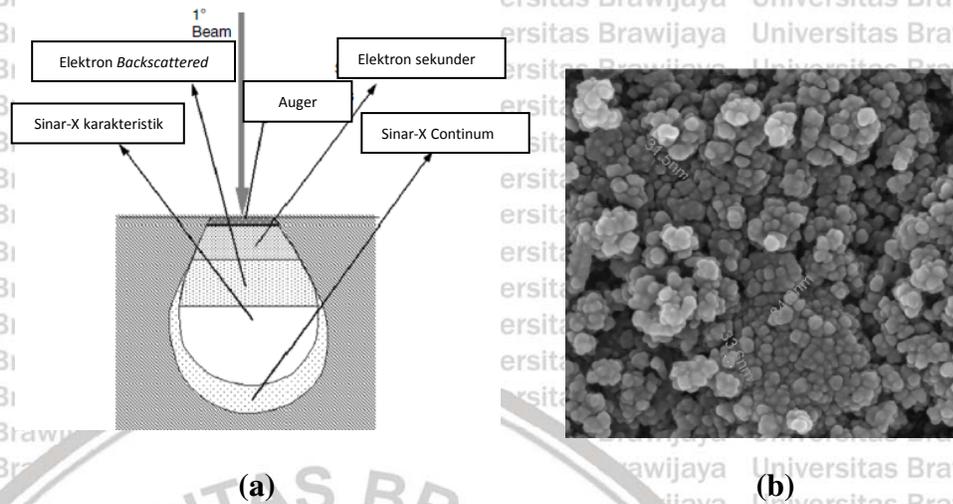
Teknik karakterisasi material dengan SEM merupakan teknik karakterisasi non-destruktif sampel. Karakterisasi dengan SEM akan memberikan informasi terkait morfologi mikrostruktur pada suatu material. Berbeda dengan mikroskop optik yang menggunakan cahaya sebagai sumber energi, pada SEM sumber cahaya tersebut digantikan oleh suatu berkas elektron berenergi tinggi. Hal ini dilatarbelakangi oleh penelitian sebelumnya pada tahun 1890. Dalam penelitian tersebut diketahui bahwa elektron dapat mengalami defleksi dengan adanya medan magnet. Prinsip inilah yang diterapkan pada SEM sebagai mikroskop elektron (Zhou, *et al.*, 2006; Bhardwaj dan Gupta, 2013). Komponen pada instrumen SEM ditunjukkan pada Gambar 2.13.



Gambar 2.13. Diagram Skematik SEM (Bhardwaj dan Gupta, 2013).

Perbedaan lainnya antara mikroskop elektron (SEM) dengan mikroskop optik adalah resolusi gambar yang dihasilkan dari mikroskop elektron akan lebih besar dibandingkan mikroskop optik. Hal ini terjadi karena panjang gelombang de Broglie yang dimiliki oleh elektron lebih pendek dibandingkan dengan gelombang optik. Akibatnya, energi yang dihasilkan dari elektron tersebut lebih besar untuk memberikan resolusi gambar yang lebih baik. Selain itu magnifikasi atau perbesaran gambar dengan SEM dapat mencapai 300.000 kali, sedangkan perbesaran dengan mikroskop optik hanya mencapai 100 kali. Hal ini terjadi karena mikroskop optik masih menggunakan lensa gelas untuk membelokkan cahaya. Sedangkan mikroskop elektron telah memanfaatkan lensa magnetik untuk memfokuskan energi dari elektron berenergi tinggi untuk diarahkan menuju sampel (Abdullah dan Khairurrijal, 2008 ; Joshi, *et al.*, 2008).

Pada SEM, berkas elektron berenergi tinggi yang ditembakkan pada permukaan nanopartikel akan berkontribusi memberikan gambaran permukaan material. Pembentukan gambar pada SEM terjadi akibat interaksi antara permukaan material dengan berkas elektron berenergi tinggi tersebut. Interaksi yang terjadi akan menghasilkan energi tertentu yang kemudian diubah menjadi beberapa bentuk sinyal yang berbeda. Sinyal tersebut terdiri dari elektron sekunder, elektron *backscattered*, dan sinar-X karakteristik. Masing-masing sinyal memiliki informasi tersendiri pada hasil analisis. Beberapa jenis sinyal yang dihasilkan ketika berkas electron menabrak sampel disajikan pada Gambar 2.14a.



Gambar 2.14. (a) Ilustrasi beberapa sinyal yang dihasilkan oleh interaksi *electron beam* dengan spesimen pada SEM (Zhou, *et al.*, 2006), (b) Gambar SEM Fe₃O₄-kitosan pada perbesaran 200.000 kali (Liu, *et al.*, 2011).

Emisi elektron sekunder akan memberikan informasi bentuk/morfologi dan topografi sampel, sedangkan emisi elektron *backscattered* berkontribusi dalam memberikan informasi topografi dan komposisi sampel. Sedangkan sinar-X karakteristik akan menghasilkan informasi terkait analisis elemental. Interaksi antara permukaan material dengan elektron berenergi tinggi terjadi secara elastik dan tidak elastik (*inelastic*). Emisi *backscattered* terbentuk akibat interaksi elastik tersebut, sedangkan emisi elektron sekunder sinar X karakteristik dihasilkan dari interaksi inelastik (Zhou, *et al.*, 2006 ; Bhardwaj dan Gupta, 2013). Dalam penelitian ini SEM dapat digunakan untuk mengetahui dan morfologi/bentuk partikel yang dihasilkan.

Contoh hasil karakterisasi dengan SEM disajikan seperti pada Gambar 2.14b.

2.9 Fourier Transform Infra-Red (FTIR)

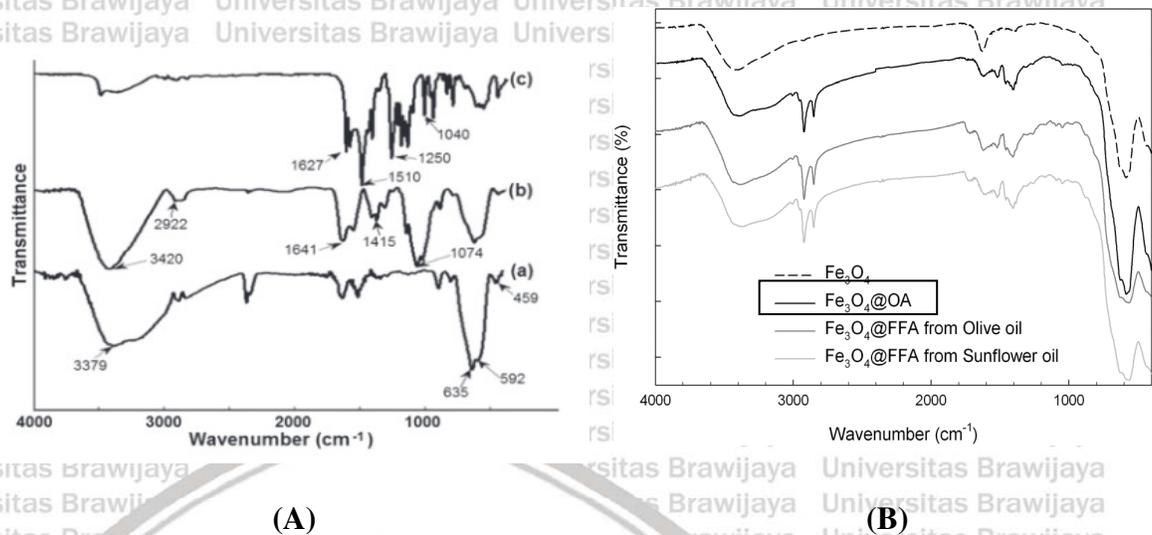
Analisis dengan FTIR dapat dilakukan dengan dua cara yaitu kualitatif dan kuantitatif. Dalam analisis kualitatif kombinasi antara vibrasi atau rotasi dari berbagai gugus fungsi dan interaksi konsekutif dari gugus fungsi tersebut dengan atom atau molekul menghasilkan kompleks spektrum FTIR yang khas pada masing-masing senyawa. Karakterisasi dengan FTIR tersebut umumnya digunakan dalam elusidasi struktur maupun identifikasi senyawa. Penggunaan FTIR dalam elusidasi struktur didasarkan pada karakteristik serapan radiasi IR yang spesifik untuk beberapa gugus fungsi tertentu. Penggunaan spektrum FTIR juga dapat membantu mengidentifikasi senyawa hasil sintesis melalui pencocokan spektra FTIR dari suatu senyawa yang diuji tersebut dengan spektra standarnya. Berbeda dengan analisis kualitatif, FTIR dalam analisis kuantitatif dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi masing-masing komponen dalam campuran yang homogen dengan persamaan hukum *Lambert-Beer-Bouguer*. Dimana dalam persamaan tersebut menjelaskan bahwa intensitas pita serapan secara proporsional linear dengan konsentrasi komponen (Dutta, 2017).

Pada prinsipnya, spektrum FTIR terbentuk sebagai konsekuensi dari penyerapan radiasi elektromagnetik pada frekuensi tertentu yang sesuai dengan energi vibrasi molekul sampel. Terdapat beberapa bentuk energi yang dimiliki oleh suatu molekul diantaranya yaitu energi elektronik, energi vibrational, energi rotational, dan energi translational. Energi translational berkaitan dengan pergantian molekul dalam suatu ruang (*space*) sebagai fungsi dari pergerakan termal suatu materi. Energi rotasional menyebabkan molekul mengalami pergerakan berupa rotasi sebagai konsekuensi

penyerapan energi elektromagnetik pada daerah gelombang mikro. Energi vibrational menunjuk pada penyerapan energi oleh molekul sebagai komponen atom yang bervibrasi dan menjadi pusat ikatan kimia. Vibrasi molekul tersebut karakteristik untuk suatu gugus fungsi dengan panjang ikatan dan sudut ikat tertentu (Dutta, 2017).

Aplikasi FTIR sangat beragam untuk berbagai bidang diantaranya analisis nanomaterial, analisis makanan seperti zat aditif, analisis lingkungan seperti air, partikel atmosfer, dan gas, *forensic sciences*, analisis semikonduktor, analisis *pharmaceutical*, dan lain sebagainya. Dalam penelitian ini, FTIR akan digunakan untuk analisis nanomaterial. Dalam hal ini, FTIR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dalam material nanopartikel. Analisis ini berguna untuk identifikasi nanopartikel yang dimodifikasi permukaannya dengan tujuan meningkatkan afinitas, reaktivitas, dan kompatibilitasnya untuk aplikasi kedepan. Analisis nanomaterial dengan FTIR memberikan informasi gugus fungsi yang terdapat dalam material dan menentukan strategi atau metode modifikasi permukaan yang tepat pada nanomaterial (Dutta, 2017). Dalam penelitian ini analisis nanopartikel Fe_3O_4 dapat dilakukan dengan mengamati puncak-puncak serapan yang khas untuk magnetit (Fe_3O_4).

Gambar 2.15A menunjukkan contoh spectra FTIR pada sampel Fe_3O_4 yang dimodifikasi permukaannya dengan kitosan dan diembankan molekul curcumin. Pada daerah antara $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ diketahui bahwa terdapat gugus O-H untuk Fe_3O_4 . Adanya gugus O-H disebabkan karena adanya gugus OH yang terikat pada permukaan Fe_3O_4 . Serapan vibrasi O-H dapat dilihat pada bilangan gelombang di daerah $\sim 3329\text{ cm}^{-1}$. Adanya vibrasi bending O-H juga muncul pada daerah $\sim 1625\text{ cm}^{-1}$.



Gambar 2.15. (A) Spektra FTIR pada sampel (a) Fe_3O_4 tanpa lapisan kitosan, (b) Fe_3O_4 -kitosan, (c) Curcumin@ Fe_3O_4 -kitosan (Pham, *et al.*, 2017), (B) Spektra FTIR Fe_3O_4 dengan modifikasi Asam Oleat (AO) dalam penelitian Zhang, *et al.* (2006).

Keberadaan gugus Fe-O muncul pada serapan antara $800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. Menurut Pham, *et al.*, 2017, vibrasi stretching Fe-O pada bilangan gelombang $\sim 592\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi Fe-O pada sisi tetrahedral struktur *inverse spinel*. Sedangkan serapan pada bilangan gelombang $\sim 459\text{ cm}^{-1}$ diidentifikasi sebagai serapan Fe-O pada sisi tetrahedral dan oktahedral. Keberadaan molekul kitosan sebagai *surface modifier* dapat diidentifikasi pada panjang gelombang 2992 cm^{-1} yang sesuai untuk vibrasi stretching C-H dari kitosan dan 1641 cm^{-1} sebagai vibrasi N-H dari kitosan (Dutta, 2017; Pham., *et al.*, 2017).

Sedangkan, Gambar 2.15B menunjukkan contoh spectra FTIR pada sampel Fe_3O_4 yang dimodifikasi permukaannya dengan beberapa jenis *surface modifier*, salah satu diantaranya adalah dengan penambahan asam oleat (AO). Seperti pada Gambar 2.15A, serapan pada daerah antara $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan serapan gugus O-H

untuk Fe_3O_4 . Adanya vibrasi bending O-H juga muncul pada daerah $\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$, sedangkan serapan dari asam oleat ditunjukkan dengan serapan C=O simetris dan asimetris pada daerah bilangan gelombang $\sim 1400\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$.

2.10 Difraksi Sinar-X

Teknik karakterisasi material dengan difraksi sinar-X (XRD) juga merupakan teknik karakterisasi non-destruktif sampel. Karakterisasi dengan XRD akan memberikan informasi terkait struktur kristal dari suatu material. Berdasarkan jenis sampelnya, XRD dibagi menjadi dua tipe yaitu X-ray kristalografi (difraksi kristal tunggal) dan x-ray powder (serbuk). X-ray kristalografi digunakan apabila sampel materialnya merupakan suatu Kristal tunggal, sedangkan X-ray powder digunakan pada sampel serbuk yang bukan merupakan sebuah kristal tunggal. Informasi yang diperoleh dari X-ray kristalografi diantaranya meliputi jarak antar kisi, panjang ikatan, dan sudut ikatan. Sedangkan X-ray powder memberikan informasi yang lebih penting seperti ukuran Kristal (McMahon, 2007).

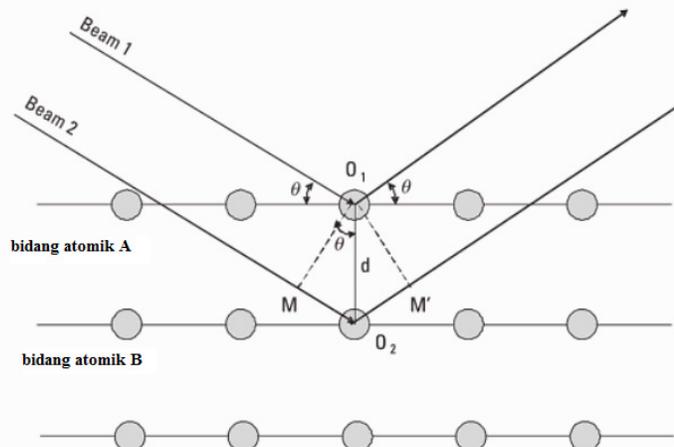
Sinar X pada dasarnya merupakan radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang yang cenderung pendek ($10^{-5}\text{-}10 \text{ nm}$) namun memiliki energi yang tinggi ($10^3\text{-}10^6 \text{ eV}$). Sinar X dihasilkan akibat adanya interaksi antara elektron berkecepatan tinggi dengan elektron pada kulit atom. Sinar-X ini dapat digunakan dalam menentukan susunan atom dalam kristal. Apabila seberkas sinar-X diberikan pada sampel kristal, maka bidang kristal akan membiaskan sinar-X yang memiliki panjang gelombang yang bernilai sama dengan jarak antar atom dalam struktur kristal. Sinar-X akan ditangkap oleh detektor kemudian diinterpretasikan sebagai suatu

difrakrogram. Suatu kristal yang terdiri dari susunan atom-atom akan menghasilkan gelombang sekunder akibat tumbukan antara sinar-X dengan elektron sampel.

Gelombang ini dapat mengalami interferensi konstruktif (saling menguatkan) maupun destruktif (saling meniadakan) yang ditentukan dengan hukum Braag melalui persamaan 2.1. (Khoiroh, 2013; Bhardwaj dan Gupta, 2013).

$$2 d \sin \theta = n\lambda \quad (2.1)$$

Dimana d merupakan jarak kisi, θ adalah sudut Bragg, n adalah orde difraksi yang nilainya bilangan bulat (1,2,3..), serta λ adalah panjang gelombang sinar X.



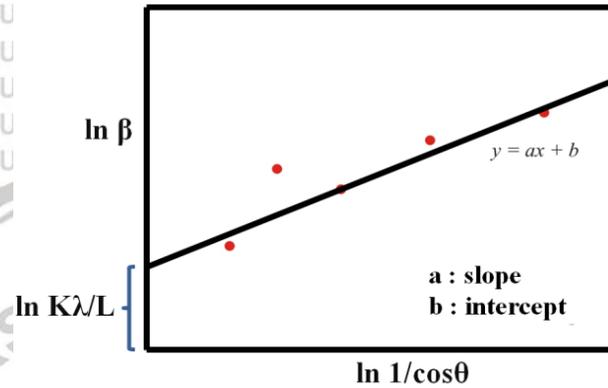
Gambar 2.16. Difraksi Sinar-X pada Bidang Kristal (Mc Mahon, 2007).

Hasil karakterisasi dengan XRD berupa difraktogram dapat digunakan dalam penentuan ukuran kristal menggunakan persamaan *Debye Scherrer* termodifikasi.

Persamaan yang dimodifikasi ini dibuat oleh Monshi, *et al.*, pada tahun 2012 untuk meminimalisir sumber error. Persamaan *Debye Scherrer* termodifikasi disajikan pada persamaan 2.2 dan diplotkan pada Gambar 2.17.

$$\ln \beta = \ln \frac{K \cdot \lambda}{L \cdot \cos \theta} = \ln \frac{K \cdot \lambda}{L} + \ln \frac{1}{\cos \theta} \quad (2.2)$$

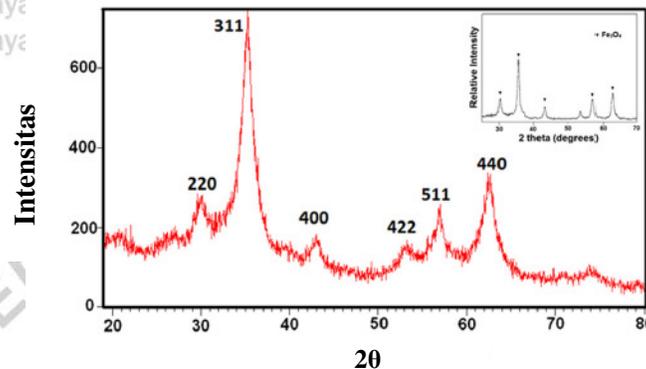
Dimana, β adalah nilai *full width at half maximum* (FWHM), K adalah konstanta bentuk (yang biasanya bernilai 0,89-0,9), λ adalah panjang gelombang sinar-X yang digunakan, L adalah ukuran kristalit, dan θ adalah sudut Bragg.



Gambar 2.17. Plot Persamaan *Debye Scherrer* Termodifikasi (Monshi, *et al.*, 2012).

Analisa lebih lanjut dari data XRD untuk analisa kuantitatif dapat dilakukan dengan menggunakan *software* yang berbasis pada analisis Rietveld. *Software* yang umum digunakan dalam analisa kuantitatif dari data XRD diantaranya adalah Rietica, Fullprof, dan MAUD. Prinsipnya data difraktogram dari sampel serta database difraktogram untuk komponen yang akan diukur persentase komposisinya diinputkan pada *software*. Selanjutnya dilakukan perhitungan secara kuantitatif sehingga diperoleh persentase komponen dalam masing-masing sampel tersebut. MAUD merupakan program *open source* untuk pencocokan pola difraksi (*profile fitting*) yang mudah digunakan dan tidak membutuhkan waktu yang lama untuk analisis fasa secara kuantitatif (Lutterotti, 2009). Dalam penelitian ini karakterisasi berbasis XRD dimaksudkan untuk melakukan konfirmasi apakah Fe_3O_4 yang terbentuk memiliki karakter difraktogram yang sesuai dengan standar (dengan melihat puncak difraksi yang sesuai dengan puncak difraksi (hkl) dari standar. Selain itu data difraktogram

dapat diolah lebih lanjut untuk menentukan ukuran Kristalit nanopartikel, distribusi ukuran Kristalit, serta melakukan kalkulasi terhadap persentase besi oksida dalam sampel. Gambar 2.18 menunjukkan contoh difraktogram Fe_3O_4 nanopartikel hasil sintesis dengan Fe_3O_4 standar (inset) (Azizian, *et al.*, 2016).

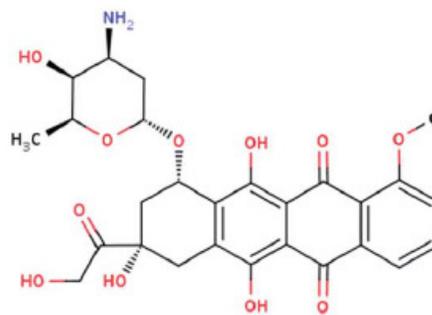


Gambar 2.18. Difraktogram XRD Fe_3O_4 (Azizian, *et al.*, 2016).

2.11 Doxorubicin

Doxorubicin menurut *food and drug administration* (FDA) merupakan salah satu obat yang berpotensi untuk digunakan dalam kemoterapi. Obat ini termasuk dalam kelas anthracycline, yang terdiri atas aglyconic dan gula. Aglycone terdiri dari cincin tetrasiklin dengan kuinin-hidrokuinon yang berdekatan serta substituent metoksi dan kelompok karbonil. Sedangkan komponen gula melekat pada salah satu cincin dengan ikatan glikosidik. Struktur molekul doxorubicin disajikan pada Gambar 2.19 (Tacar, *et al.*, 2013 dan Shan, *et al.*, 2014). Dalam sistem metabolisme, doxorubicin memiliki waktu paruh dalam penyerapannya oleh sel selama 3-5 menit. Doxorubicin akan berikatan dengan protein plasma dan memasuki sel melalui proses difusi pasif. Obat ini pada umumnya akan terakumulasi pada konsentrasi intraseluler. Doxorubicin di dalam kompartmen inti lima puluh kali lebih banyak dibandingkan sitoplasma.

Jumlah doxorubicin dalam inti sel bisa mencapai 340 μM . Hal ini merepresentasikan bahwa satu molekul doxorubicin dapat mengalami interkalasi pada setiap lima pasangan basa dari DNA. Selain itu sisa doxorubicin (dengan jumlah 2% dari total obat intraseluler) akan didistribusikan ke organel lainnya dalam sistem intraseluler (Tacar, *et al.*, 2013).



Gambar 2.19. Struktur doxorubicin (Shan, *et al.*, 2014).

Doxorubicin tidak memiliki selektivitas pada sel tertentu. Akibatnya, penggunaan obat ini tidak hanya mempengaruhi sel kanker tetapi juga sel normal. Apabila hal ini terjadi, dikhawatirkan pasien akan mengalami penurunan sistem kekebalan tubuh dan sangat rentan terinfeksi mikroba. Selain itu obat-obat yang termasuk kelas anthracycline dapat menyebabkan berbagai efek toksik pada sistem *in vivo*.

Doxorubicin sebagai salah satu jenis anthracycline yang dapat menyebabkan terjadinya kardiotoxikitas (kerusakan hati). Efek samping seperti mual dan muntah, masalah gastrointestinal, masalah saraf, serta kebotakan juga dapat dialami oleh pasien yang mengonsumsi obat ini. Oleh sebab itu perlu adanya suatu material pengantar yang dapat digunakan untuk menghantarkan obat-obat anti-kanker seperti doxorubicin menuju ke sel target yang spesifik. Selain itu, adanya sistem *drug*

delivery diharapkan mampu mengurangi dampak negatif yang ditimbulkan dari penggunaan obat tersebut (Tacar, *et al.*, 2013).

Dalam penelitian ini Doxorubicin akan diembankan dalam suatu material *drug delivery* berupa Fe₃O₄-AO-kitosan. Proses penghantaran obat menuju ke sel target yang spesifik diharapkan mampu mengurangi efek samping yang dapat ditimbulkan dengan penggunaan obat tersebut. Menurut Shan, *et.al* (2014), doxorubicin dapat diembankan dalam suatu material *drug delivery* yang terdiri dari polimer micelle amphifilik. Simulasi molecular dinamik telah dilakukan untuk mengetahui interaksi antara doxorubicin dengan kitosan oligosakarida-asam hidrofobik.

Dari hasil simulasi tersebut diketahui bahwa interaksi antara doxorubicin dengan rantai asam lemak tunggal-kitosan oligosakarida terjadi melalui interaksi hidrofobik. Energi total rata-rata dalam proses simulasi molecular tersebut cukup tinggi. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh doxorubicin yang terjepit (berada diantara) ujung gugus hidrofobik dan hidrofilik dari asam lemak-kitosan oligosakarida dan berinteraksi dengan kedua ujung gugus tersebut. Namun interaksi antara obat dengan dengan gugus hidrofobik lebih mendominasi (Shan, *et al.*, 2014). Model obat doxorubicin juga banyak digunakan dalam beberapa uji *in vitro* untuk melihat profil *drug release* dari suatu material *drug delivery*. Hal ini dikarenakan doxorubicin memiliki emisi dan fluoresense yang spesifik pada panjang gelombang 480 nm. Hal ini penting untuk membantu memonitor pelepasan obat (Bar, *et al.*, 2012).

BAB III**KONSEP PENELITIAN****3.1 Kerangka Konsep Penelitian**

Penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan metode sintesis nanopartikel Fe_3O_4 dan menghasilkan sebuah produk nanopartikel berbasis Fe_3O_4 melalui modifikasi permukaan dengan asam oleat dan kitosan sebagai kandidat agen penghantar obat (*drug delivery*). Nanopartikel Fe_3O_4 memiliki tendensi (kecenderungan) untuk mengalami aglomerasi dikarenakan daya tarik magnetik dan gaya Van der Waals yang kuat antar partikelnya. Oleh sebab itu diperlukan adanya modifikasi permukaan untuk meminimalisir terjadinya hal tersebut.

Surfaktan dipilih sebagai salah satu material modifikasi yang dilampirkan pada permukaan Fe_3O_4 dan berkontribusi dalam mereduksi terjadinya aglomerasi. Surfaktan dapat menghasilkan tolakan elektrostatis atau halangan sterik antar partikel magnetik. Surfaktan asam oleat memiliki rantai karbom hidrokarbon yang panjang dengan gugus polar dibagian kepala yang sangat mudah berikatan dengan permukaan nanopartikel Fe_3O_4 . Sedangkan rantai panjang hidrofobik pada bagian ekor akan bertindak sebagai penolak (*repellent*) yang mencegah partikel magnet untuk berada dalam jarak yang berdekatan (Wu, *et al.*, 2015).

Dalam penelitian ini akan dilakukan pengembangan metode sintesis melalui 2 metode untuk menghasilkan nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan yaitu metode kopresipitasi *ex-situ* dan metode kopresipitasi *in-situ*. Hal ini dilakukan untuk mengetahui bagaimanakah pengaruh metode tersebut dalam mengurangi terjadinya aglomerasi serta pengaruhnya terhadap sifat dan karakteristik material yang

dihasilkan. Metode pertama (metode *ex-situ*) dilakukan dengan mencampurkan garam $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ke dalam 50 mL akuades. Selanjutnya ditambahkan *amoniak water* ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) hingga $\text{pH} > 8$ untuk memfasilitasi terbentuknya Fe_3O_4 . Pembentukan nanopartikel Fe_3O_4 ditandai dengan munculnya endapan berwarna hitam. Kemudian dilakukan modifikasi dengan penambahan asam oleat dan diikuti dengan penambahan larutan kitosan serta agen *crosslinker* berupa TPP dan sulfat. Produk akhir nanopartikel yang dihasilkan adalah Fe_3O_4 -AO-kitosan. Dalam metode ini diperkirakan proses nukleasi kristal Fe_3O_4 diikuti oleh proses pertumbuhan kristal. Setelah itu dilakukan proses pelapisan pada permukaan Fe_3O_4 .

Sedangkan dalam metode kedua (metode *in-situ*), pembuatan nanopartikel Fe_3O_4 melalui pencampuran garam $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ke dalam 50 mL akuades. Selanjutnya ditambahkan asam oleat ke dalam larutan Fe tersebut sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Pembentukan Fe_3O_4 terjadi dalam suasana alkali dengan penambahan larutan *ammonia* ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ke dalam larutan garam Fe dan asam oleat. Prosedur selanjutnya adalah penambahan larutan kitosan serta agen *crosslinker*. Sehingga produk akhir yang terbentuk adalah nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan. Dalam metode kedua ini diperkirakan proses nukleasi kristal Fe_3O_4 lebih dominan dibandingkan proses pertumbuhannya. Hal ini diakibatkan karena agen pelapis dipermukaan sudah ditambahkan diawal reaksi. Namun dikhawatirkan yang terlapisi oleh asam oleat tidak hanya Fe_3O_4 namun fasa besi oksida lainnya. Sehingga diperlukan karakterisasi material untuk memastikan fasa yang terbentuk adalah Fe_3O_4 . Selain itu penentuan persentase komposisi fasa besi oksida pada sampel juga menjadi perlu dilakukan. Masing-masing produk nanopartikel tersebut akan

dikeringkan dengan metode *freeze drying* dan dikarakterisasi dengan SEM, FTIR, XRD, dan VSM untuk mengetahui pengaruh kedua metode terhadap reduksi aglomerasi partikel, ukuran partikel, morfologi, dan karakter magnetik, serta karakter *drug delivery* nanopartikel yang dihasilkan.

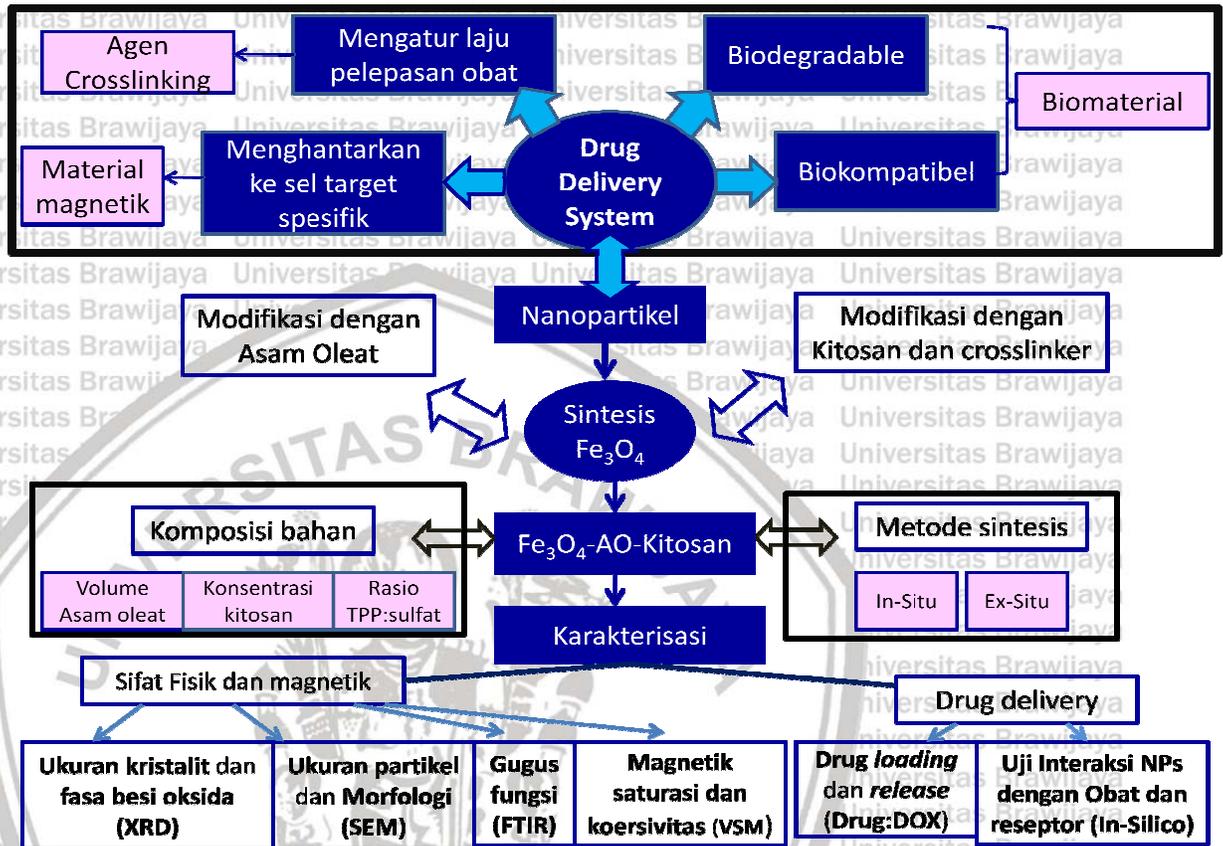
Karakteristik produk nanopartikel juga dipengaruhi oleh komposisi bahan, diantaranya konsentrasi kitosan, volume asam oleat, serta agen *crosslinker*. Pengaruh tersebut dapat ditinjau dari perbedaan sifat fisik, karakter magnetik, laju pelepasan obat (*drug release*) dari nanopartikel. Dalam penelitian ini, asam oleat yang ditambahkan sebagai modifikasi permukaan Fe_3O_4 bervariasi yaitu, 0,5; 1; dan 1,5 mL. Tujuan dari variasi ini adalah untuk mengetahui komposisi asam oleat yang optimum dipermukaan Fe_3O_4 dalam mencegah aglomerasi untuk menghasilkan nanopartikel dengan ukuran yang lebih kecil dan dapat mempertahankan sifat superparamagnetik. Semakin banyak asam oleat diperkirakan akan mampu menjaga stabilitas nanopartikel dan mencegah proses oksidasi nanopartikel.

Larutan kitosan juga dibuat dalam dua variasi konsentrasi meliputi, 0,5% dan 1%. Tujuan dari variasi ini adalah untuk mengetahui komposisi kitosan yang optimum dipermukaan Fe_3O_4 dalam mencegah aglomerasi dan mempertahankan ukuran yang lebih kecil. Namun konsentrasi kitosan yang lebih tinggi dikhawatirkan akan membentuk lapisan yang lebih tebal dipermukaan Fe_3O_4 dan menyebabkan ukuran partikel lebih besar. Selain itu agen pengikat silang TPP dan sulfat juga dibedakan dengan variasi komposisi TPP:sulfat yaitu, 2,5:7,5% ; 5:7,5%; dan 7,5:7,5%. Semakin banyak TPP diperkirakan dapat berkontribusi terhadap pembentuk material dengan bentuk *spherical* yang lebih baik. Hal ini dikarenakan TPP dapat

berinteraksi secara inter- dan intra- molekular dengan kitosan untuk membentuk morfologi yang *spherical* (Shu dan Zhu, 2002). Pengujian karakteristik *drug delivery* yang meliputi pengembangan dan pelepasan obat dari nanopartikel juga dilakukan pada beberapa sampel nanopartikel. Selanjutnya material nanopartikel hasil sintesis dikeringkan dan dikarakterisasi dengan SEM, FTIR, XRD, dan VSM untuk mengetahui sifat fisik dan karakter magnetik nanopartikel.

Ukuran kristalit nanopartikel dalam setiap sampel dengan variasi metode sintesis, volume asam oleat, konsentrasi kitosan, dan rasio konsentrasi agen *crosslinker* diketahui berdasarkan data karakterisasi XRD. Dari hasil karakterisasi XRD akan diperoleh suatu difraktogram yang digunakan dalam penentuan ukuran kristalit Fe_3O_4 melalui persamaan *Debye Scherrer* termodifikasi. Selain itu data XRD tersebut juga dapat digunakan dalam penentuan persentase Fe_3O_4 dalam sampel dengan *software* MAUD yang berbasis metode Rietveld. Karakterisasi dengan SEM memberikan informasi bentuk/morfologi dan ukuran partikel. Karakterisasi dengan FTIR dimaksudkan untuk mengetahui keberadaan gugus fungsi penyusun material. Karakterisasi dengan VSM juga dilakukan untuk mengetahui karakter magnetik pada material nanopartikel. Keberhasilan sintesis dan modifikasi permukaan nanopartikel Fe_3O_4 sebagai kandidat agen *drug delivery* diuji berdasarkan efisiensi *loading* obat serta laju pelepasan obat oleh nanopartikel juga diuji dalam penelitian ini. Interaksi antara nanopartikel dengan obat dan reseptor dipermukaan sel ditinjau secara *in-silico* dengan *molecular docking*.

3.2. Skema Konsep Penelitian



3.3. Hipotesis Penelitian

1. Nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan yang dihasilkan dengan metode in-situ akan memiliki bentuk yang lebih *spherical* dibandingkan nanopartikel yang dihasilkan dengan metode ex-situ.
2. Apabila semakin banyak asam oleat, maka ukuran kristalit akan semakin kecil, karakter magnetik akan lebih tinggi, serta efisiensi *drug loading* yang semakin besar.
3. Apabila semakin banyak kitosan, maka ukuran partikel dan ukuran kristalit akan semakin besar.

4. Apabila semakin besar rasio konsentrasi TPP dan sulfat, maka dapat menyebabkan ukuran partikel menjadi lebih kecil dengan bentuk *spherical* yang lebih baik.

5. Pelepasan obat yang lebih cepat terjadi pada pH yang lebih asam dibandingkan pH netral.



BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung mulai tahun 2016 dan berakhir tahun 2018. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Lingkungan dan Laboratorium Fisika Universitas Brawijaya. Karakterisasi SEM, FTIR, VSM, dan XRD dilakukan di Laboratorium Material dan Teknologi, Gifu University, Jepang.

4.2. Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi dua bagian. Kelompok pertama yaitu bahan-bahan yang digunakan dalam preparasi material nanopartikel Fe_3O_4 -AO-Kitosan yang meliputi kitosan berat molekul rendah (*low molecular weight chitosan*, drajat deasetilasi 75-85%), sodium tripolyphosphate ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, 85% (w/w)), besi (II) klorida tetrahidrat besi ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 98% (w/w)), besi (III) klorida heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99% (w/w)), yang dibeli dari Sigma Aldrich. Selain itu dalam penelitian ini juga digunakan larutan amoniak (NH_3 , 25% (v/v)), asam oleat (AO, 99% (v/v)), etanol (EtOH, 96% (v/v)), sodium sulfat (Na_2SO_4 , 99% (w/w)), asam asetat glacial (CH_3COOH , 100% (v/v)), dan akuades (teknis) yang dibeli dari Merck. Semua bahan memiliki *grade* pro analis (p.a) kecuali disebutkan lain.

Sedangkan, kelompok kedua yaitu bahan-bahan yang digunakan dalam pengujian obat yang diembankan pada material Fe_3O_4 -AO-Kitosan yang diantaranya

meliputi model obat Kemodoxin Doxorubicin HCl (DOX, 2 mg/mL) dan Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, pH 7.4) dibeli dari Sigma Aldrich dan natrium bikarbonat.

4.2.2 Alat Penelitian

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca Ohaus Adventurer, *magnetic stirer*, *motor rotary*, *syringe*, pompa *syringe*, pH meter merk Laquatwin, *dialysis tubing cellulose membrane*, *freeze dryer*, *Scanning Electron Microscope* (SEM SU3500, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo), *X-Ray Diffraction* (XRD Ultima IV, Type II diffractometer, Rigaku Americas Corporation), *Fourrier Transform Infra-Red* (FTIR Perkin-Elmer spectrum 400, USA), *Vibrating Sample Magnetometry* (VSM, C7-10A, TOEI Industry, Co. Ltd, Tokyo, Japan), dan peralatan gelas.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan pada penelitian ini yaitu:

Tahap 1 :

1. Pembuatan nanopartikel Fe_3O_4 .
2. Proses modifikasi permukaan Fe_3O_4 dengan penambahan surfaktan berupa asam oleat (AO) dan polimer kitosan.
3. Penambahan agen pengikat silang (*crosslinker*) yaitu tripolyphosphate dan sulfat.
4. Penentuan pengaruh metode sintesis terhadap sifat fisik, karakter magnetik, dan karakter *drug delivery* nanopartikel.

5. Penentuan pengaruh konsentrasi kitosan terhadap sifat fisik, karakter magnetik, dan karakter *drug delivery* nanopartikel.
6. Penentuan pengaruh rasio konsentrasi TPP:Sulfat sebagai *crosslinker* terhadap sifat fisik, karakter magnetik, dan karakter *drug delivery* nanopartikel.
7. Pengeringan sampel nanopartikel dengan *freeze dryer*.

Tahap 2 :

1. Karakterisasi nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan instrumen SEM, FTIR, XRD, dan VSM.
2. Pengujian efisiensi *loading* obat pada material nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan.

Tahap 3 :

1. Pengujian kecepatan pelepasan obat (*drug release*) secara *in vitro*.
2. Pengujian interaksi nanopartikel dengan obat dan reseptor sel secara *in-silico*.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Pembuatan Nanopartikel Fe₃O₄

Prosedur kerja pembuatan nanopartikel Fe₃O₄ dalam penelitian ini mengacu pada prosedur kerja Unsoy, *et.al* (2012) dengan beberapa modifikasi. Nanopartikel Fe₃O₄ disiapkan dengan mencampurkan garam FeCl₂.4H₂O dan FeCl₃.6H₂O dengan rasio mol 1:2 ke dalam 50 mL akuades. Selanjutnya ditambahkan larutan *ammonia* (NH₃.H₂O) 3 M melalui pompa *syringe* dengan kecepatan 20 mL/jam sambil diaduk

dengan *magnetic stirrer*. Selanjutnya akan terbentuk endapan berwarna hitam.

Endapan hitam kemudian dicuci dengan akuades hingga $\text{pH} \pm 7$. Sebelum dikarakterisasi material tersebut dikeringkan terlebih dahulu dengan *freeze dryer*.

Karakterisasi dilakukan dengan SEM, FTIR, dan XRD.

4.4.2 Modifikasi Permukaan Nanopartikel Fe_3O_4 dengan Surfaktan Asam Oleat dan Polimer Kitosan

Dalam penelitian ini pengaruh metode sintesis terhadap sifat fisik, karakter magnetik, serta karakter *drug delivery* nanopartikel akan diuji menggunakan 2 metode berbeda yaitu metode kopresipitasi ex-situ dan in-situ. Dalam metode ex-situ, sintesis Fe_3O_4 dilakukan terlebih dahulu dan kemudian dilanjutkan dengan modifikasi permukaan melalui penambahan asam oleat, kitosan serta agen *crosslinker*. Sedangkan dalam metode in-situ, penambahan asam oleat dilakukan sebelum Fe_3O_4 terbentuk. Kemudian dilakukan prosedur lebih lanjut dengan penambahan kitosan dan agen *crosslinker*.

4.4.2.1 Metode In-situ

Nanopartikel Fe_3O_4 disiapkan dengan mencampurkan garam $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan rasio mol 1:2 ke dalam 50 mL akuades. Selanjutnya dilakukan penambahan larutan *ammonia* ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 3 M ke dalam larutan yang berisi garam besi sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Penambahan larutan *ammonia* bertujuan untuk memfasilitasi terbentuknya nanopartikel Fe_3O_4 . Larutan asam oleat sebanyak (0,1 dan 1 mL) kemudian ditambahkan ke dalam larutan garam Fe ketika *ammonia* yang ditambahkan mencapai 5,5 mL ($\text{pH} \pm 9,2$). Kemudian dilanjutkan kembali

dengan penambahan *ammonia water* hingga pH 10. Selanjutnya akan terbentuk endapan berwarna hitam. Larutan kitosan dibuat dengan melarutkan 0,03 gram kitosan ke dalam 3 mL asam asetat 1% v/v untuk mendapatkan larutan kisan 1% w/v. Larutan kitosan sebanyak 3 mL kemudian ditambahkan ke dalam larutan Fe_3O_4 -asam oleat melalui pompa *syringe* dengan kecepatan 10 mL/jam sambil diaduk dengan *magnetic stirer*. Setelah itu dilakukan penambahan agen *crosslinker* TPP/sulfat (rasio konsentrasi 7,5% : 7,5%) sebanyak 3 mL melalui pompa *syringe* sambil tetap diaduk dengan *magnetic stirer* selama 2 jam. Koloid Fe_3O_4 -AO-kitosan yang terbentuk kemudian dicuci dengan akuades hingga pH ± 7 , disuspensikan dalam 50 mL akuades, dan disimpan pada temperatur 4 °C sebelum dikeringkan. Pengeringan sampel nanopartikel dilakukan melalui metode *freeze drying*. Sampel yang telah kering kemudian dikarakterisasi dengan SEM, FTIR, dan XRD.

4.4.2.2 Metode Ex-situ

Nanopartikel Fe_3O_4 disiapkan dengan mencampurkan garam $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan rasio mol 1:2 ke dalam 50 mL akuades. Selanjutnya ditambahkan larutan *ammonia water* ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 3 M melalui pompa *syringe* dengan kecepatan 10 mL/jam sambil diaduk dengan *magnetic stirer* hingga pH 10. Selanjutnya akan terbentuk endapan berwarna hitam yang mengindikasikan terbentuknya nanopartikel Fe_3O_4 . Selanjutnya nanopartikel Fe_3O_4 dicuci dengan akuades hingga pH netral. Kemudian asam oleat sebanyak 1 mL ditambahkan ke dalam nanopartikel Fe_3O_4 . Asam oleat tersebut dilarutkan terlebih dahulu dalam etanol dengan rasio volume AO:etanol 1:4, ke dalam larutan yang berisi Fe_3O_4 sambil tetap diaduk dengan

magnetic stirrer selama 30 menit dan dikondisikan pada temperatur 80 °C. Larutan kitosan 1% w/v sebanyak 10 mL ditambahkan ke dalam larutan yang berisi Fe₃O₄ dan asam oleat. Kemudian dilanjutkan dengan penambahan *crosslinker* berupa TPP/sulfat (rasio konsentrasi 7,5% : 7,5%) sebanyak 3 mL melalui pompa *syringe* dengan kecepatan 10 mL/jam sambil diaduk dengan *magnetic stirer* selama 2 jam. Koloid Fe₃O₄-AO-kitosan yang terbentuk kemudian dicuci dengan akuades hingga pH ±7, disuspensikan dalam 50 mL akuades, dan disimpan pada temperatur 4 °C sebelum dikeringkan. Pengeringan sampel nanopartikel dilakukan melalui metode *freeze drying*. Sampel yang telah kering kemudian dikarakterisasi dengan SEM, FTIR, dan XRD.

4.4.3 Pembuatan Nanopartikel Fe₃O₄-AO-Kitosan dengan Variasi Volume Asam Oleat.

Pembuatan Nanopartikel Fe₃O₄-AO-Kitosan dengan variasi komposisi asam oleat. Pembuatan Fe₃O₄ dilakukan sesuai prosedur 4.4.1. Kemudian ditambahkan asam oleat ke dalam nanopartikel Fe₃O₄ yang telah dicuci hingga pH netral dengan volume asam oleat yang bervariasi yaitu 0,5; 1; dan 1,5 mL dalam etanol (rasio volume asam oleat : etanol 1:4). Larutan kitosan dibuat dengan melarutkan 0,1 gram kitosan ke dalam 10 mL asam asetat 1 % v/v untuk mendapatkan larutan kitosan 1 % w/v. Larutan kitosan sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan ke dalam larutan Fe₃O₄-AO melalui pompa *syringe* sambil diaduk dengan *magnetic stirer*. Selanjutnya diikuti dengan penambahan larutan *crosslinker* TPP/sulfat (rasio konsentrasi 7,5% : 7,5%) melalui pompa *syringe* dengan kecepatan 10 mL/jam sambil diaduk dengan

magnetic stirrer selama 2 jam. Koloid Fe₃O₄-AO-kitosan yang terbentuk kemudian dicuci dengan akuades hingga pH ±7, disuspensikan dalam 50 mL akuades, dan disimpan pada temperatur 4 °C sebelum dikeringkan. Pengeringan sampel nanopartikel dilakukan melalui metode *freeze drying*. Sampel yang telah kering kemudian dikarakterisasi dengan SEM, FTIR, XRD, dan VSM.

4.4.4 Pembuatan Nanopartikel Fe₃O₄-AO-Kitosan dengan Variasi Konsentrasi Kitosan

Pembuatan Fe₃O₄ dilakukan sesuai prosedur 4.4.1. Kemudian ditambahkan asam oleat sebanyak 1 mL (asam oleat dilarutkan dalam 4 mL etanol) ke dalam larutan Fe₃O₄ melalui pompa *syringe* dengan kecepatan 10 mL/jam. Larutan kitosan dibuat dengan variasi kitosan (0,05 dan 0,1 g) ke dalam 10 mL asam asetat 1 % v/v untuk mendapatkan larutan kitosan 0,5 ; dan 1 % w/v). Larutan kitosan yang telah dibuat kemudian ditambahkan ke dalam larutan yang berisi Fe₃O₄ dan asam oleat melalui pompa *syringe* dengan kecepatan 10 mL/jam sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setelah itu dilanjutkan dengan penambahan 3 mL larutan *crosslinker* TPP/sulfat (rasio konsentrasi 7,5%:7,5%) ke dalam larutan Fe₃O₄-AO-kitosan melalui pompa *syringe* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 2 jam. Koloid Fe₃O₄-AO-kitosan yang terbentuk kemudian dicuci dengan akuades hingga pH ±7, disuspensikan dalam 50 mL akuades, dan disimpan pada temperatur 4 °C sebelum dikeringkan. Pengeringan sampel nanopartikel dilakukan melalui metode *freeze drying*. Sampel yang telah kering kemudian dikarakterisasi dengan SEM, FTIR, dan XRD.

4.4.5 Pembuatan Nanopartikel Fe_3O_4 -AO-Kitosan dengan Variasi Rasio Konsentrasi Tripolyphosphate dan Sulfat

Pembuatan Nanopartikel Fe_3O_4 -AO-Kitosan akan dibuat dengan berbagai variasi rasio komposisi agen pengikat silang (*crosslinker*). Pembuatan Fe_3O_4 dilakukan sesuai prosedur 4.4.1. Asam oleat dalam etanol (rasio volume asam oleat : etanol 1:4) sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan ke dalam larutan Fe_3O_4 . Setelah itu dilanjutkan penambahan larutan kitosan dengan konsentrasi 1% sebanyak 3 mL melalui pompa *syringe* dengan kecepatan 10 mL/jam sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Larutan *crosslinker* berupa kombinasi TPP dan sulfat sebanyak 3 mL ditambahkan ke dalam larutan Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan berbagai variasi rasio konsentrasi yaitu 2,5:7,5%; 5:7,5%; dan 7,5:7,5% sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 2 jam. Koloid Fe_3O_4 -AO-kitosan yang terbentuk kemudian dicuci dengan akuades hingga pH ± 7 , disuspensikan dalam 50 mL akuades, dan disimpan pada temperatur 4 °C sebelum dikeringkan. Pengeringan sampel nanopartikel dilakukan melalui metode *freeze drying*. Sampel yang telah kering kemudian dikarakterisasi dengan SEM, FTIR, dan XRD.

4.4.6 Pengeringan Sampel Nanopartikel dengan *Freeze Dryer*.

Preparasi sampel dilakukan dengan menempatkan sampel Fe_3O_4 dan Fe_3O_4 -AO-kitosan dalam botol yang ditutup dengan plastik *wrap*, kemudian bagian tengah plastik diberi lubang, selanjutnya sampel dibekukan pada temperature -70 °C selama 30 menit. Sampel yang telah beku dimasukkan dalam alat *freeze dryer* dan dibekukan

selama 5 menit untuk menyesuaikan temperatur. Tahapan selanjutnya yaitu tekanan dalam sistem diturunkan hingga kondisi vakum selama 10 menit. Kemudian dilakukan pengeringan selama 30 jam dimana air mengalami sublimasi dari fasa es menjadi fasa gas. Gas tersebut akan masuk ke dalam *ice condenser* dan mengalami pembekuan kembali menjadi es dan dibuang melalui *drain*.

4.4.7 Karakterisasi Nanopartikel Fe₃O₄-AO-Kitosan

4.4.7.1 Scanning Elctron Microscope (SEM)

Penentuan morfologi dan ukuran partikel Fe₃O₄-AO-kitosan dilakukan dengan menggunakan instrumen SEM. Kitosan-Fe₃O₄ nanopartikel yang akan dikarakterisasi direkatkan pada suatu silinder logam dengan menggunakan perekat ganda. Sampel difoto dengan perbesaran tertentu sehingga akan diperoleh data karakterisasi yang menunjukkan morfologi permukaan material dan dari gambar yang dihasilkan maka dilakukan penentuan ukuran partikel.

4.4.7.2 Fourier Transform Infrared (FTIR)

Karakterisasi dengan FTIR dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya interaksi antara Fe₃O₄, asam oleat, kitosan, serta agen *crosslinker*. Karakterisasi dengan FTIR dilakukan dengan mengembankan sampel nanopartikel bare Fe₃O₄ dan Fe₃O₄-AO-kitosan pada plat KBR, kemudian diukur dengan alat FTIR pada bilangan gelombang 4000-400 cm⁻¹. Sampel nanopartikel sebanyak 2.10⁻³ g digerus bersama dengan 0,075 g KBr hingga homogen, selanjutnya dibuat dalam bentuk pellet. Pellet tersebut kemudian dimasukkan ke dalam instrument FTIR dan dilakukan proses analisa sehingga akan diperoleh spectra untuk masing-masing sampel yang dianalisis.

4.4.7.3 X-Ray Diffraction (XRD)

Karakterisasi pada material nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dilakukan dengan menggunakan difraktometer sinar-X untuk mengetahui pengaruh perbedaan metode serta rasio komposisi kitosan dan asam oleat pada varian sampel. Pola XRD sampel diperoleh berdasarkan pengukuran dengan *X-ray diffraction* (XRD) Merk Philips tipe **Xpert MPD**, menggunakan radiasi **Cu $K\alpha$ (30 mA, 40 KV)**. Pola difraktogram sinar-X Fe_3O_4 hasil karakterisasi kemudian dibandingkan dengan data *Inorganic Crystal Structure Database (ICSD)* untuk mengetahui eksistensi Fe_3O_4 dari sampel nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan berbagai variasi kondisi. Data XRD juga digunakan dalam penentuan ukuran kristal serta penentuan persentase Fe_3O_4 dalam varian sampel nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan.

4.4.7.4 Vibrating Sample Magnetometer (VSM)

Penentuan karakteristik magnetik pada material nanopartikel dilakukan dengan karakterisasi VSM. Sampel disiapkan di dalam kertas saring yang dipotong kecil-kecil dan ditimbang dengan berat 0,05 gram. Sampel diletakkan diantara 2 kumparan Helmholtz yang tersusun secara paralel. Pada kumparan tersebut diberikan arus serta gelombang elektromagnetik sehingga akan terjadi interaksi antara elektron sampel dengan gelombang tersebut.

4.4.8 Pengujian Efisiensi *Loading* Obat pada Sampel Nanopartikel

Pengujian efisiensi loading obat dilakukan dengan mendispersikan 5 mg nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan yang telah dikeringkan dengan *freeze dryer* dan 10 mg model obat (doxorubicin) ke dalam 30 mL buffer fosfat (PBS) pada pH 7,4.

phosphate buffer saline (PBS) merupakan larutan penyangga yang mampu meniru konsentrasi ion, osmolaritas, dan pH cairan tubuh manusia. Dengan kata lain, PBS meniru kondisi cairan ekstraseluler (*extracellular fluid*) pada kondisi *in vivo*. Larutan PBS cenderung tidak menyebabkan kerusakan sel, tidak beracun, dan tidak menyebabkan terbentuknya interferen presipitan pada penelitian biologi, medis, atau biokimia. Oleh sebab itu dalam penelitian ini larutan PBS digunakan sebagai media dalam proses pengembanan maupun pelepasan obat. Selanjutnya dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* terhadap larutan selama 1 jam. Nanopartikel kemudian dipisahkan dari larutan dengan bantuan medan magnet eksternal. Larutan kemudian dianalisa dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 480 nm. Dari pengukuran tersebut akan diperoleh nilai absorbansi yang akan dikonversi menjadi konsentrasi. Data konsentrasi doxorubicin sisa yang dibandingkan dengan konsentrasi awal doxorubicin akan digunakan untuk menghitung efisiensi pengembanan obat pada nanopartikel.

4.4.9 Pengujian Pelepasan Obat (*Drug Release*)

Pengujian kecepatan pelepasan obat dilakukan dengan mendispersikan 5 mg nanopartikel (yang telah mengandung doxorubicin) ke dalam tabung dialysis dan diletakkan dalam wadah yang berisi 30 mL larutan PBS. Pengujian dilakukan pada pH 4,0 dan pH 7,4, pada suhu 37°C. Kemudian doxorubicin yang terlepas ke dalam buffer diamati pada interval waktu 1, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, dan 84 jam. Pada setiap interval waktu, sebanyak 5 mL larutan buffer diambil dan kemudian dianalisis

dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 480 nm untuk mengetahui jumlah doxorubicin yang berhasil dilepaskan dari nanopartikel.

4.4.10 Pengujian Interaksi antara Nanopartikel dengan Reseptor Sel secara *In-Silico*

Pengujian interaksi antara nanopartikel dengan obat dilakukan secara *in-silico*. Langkah awal yang perlu dilakukan adalah mengunduh struktur molekul penyusun nanopartikel dari Protein Data Bank (PDB). Penentuan interaksi yang terjadi antara kitosan (Pubchem ID 71853), Asam oleat (Pubchem ID 445639), Fe₃O₄ (Pubchem ID 16211978), dan doxorubicin (Pubchem ID 31703) dilakukan analisis *molecular docking* menggunakan tools Hex 8.0. Proses *docking* dilakukan dengan metode *blind docking* Parameter yang diamati adalah kestabilan antara ligan dan reseptor yang ditunjukkan dengan nilai *binding energy*. Selain menganalisis stabilitas nanopartikel, docking juga digunakan untuk melihat interaksi antara polimer kitosan dan reseptor tranferin menggunakan software Autodock Vina yang terintegrasi program PyRx. Keberhasilan interaksi antara ligan dan reseptor ditunjukkan dengan nilai *binding affinity* yang semakin negatif yang merepresentasikan interaksinya semakin stabil dan memicu terjadinya *biological activity*.

4.4.11 Pengujian Interaksi antara Nanopartikel dengan dan tanpa Obat dalam Menginduksi Terjadinya Apoptosis.

Langkah awal yang dilakukan adalah mengunduh struktur caspase-8 (PDB ID: 3KJQ) dan Topoisomerase II (PDB ID: 3QX3) dari PDB. Selanjutnya dilakukan preparasi terhadap struktur tersebut. Setelah itu untuk mengetahui pengaruh

nanopartikel dengan maupun tanpa diembankan obat terhadap proses apoptosis, maka dilakukan simulasi *molecular docking* antara nanopartikel dengan caspase-8 dan Topoisomerase II dilakukan secara online menggunakan *software Patchdock*. Hasil *molecular docking* divisualisasikan dengan *software Discovery Studio Visualizer*.

4.5 Analisa Data

Ukuran kristal Fe₃O₄-AO-kitosan pada masing-masing varian sampel diperoleh dari pengolahan data karakterisasi XRD dan dihitung melalui persamaan *Debye Scherrer* termodifikasi sebagaimana ditunjukkan pada persamaan 4.1 (Monshi, *et.al.*, 2012).

$$\ln \beta = \ln \frac{K\lambda}{L \cdot \cos \theta} = \ln \frac{K\lambda}{L} + \ln \frac{1}{\cos \theta} \quad (4.1)$$

Keterangan :

L = Ukuran kristal

K = Konstanta bentuk kristal

λ = Panjang gelombang sinar X (nm)

β = FWHM (rad)

θ = Sudut *Bragg*

Dari persamaan tersebut dibuat grafik hubungan $\ln 1/\cos \theta$ terhadap $\ln \beta$ seperti ditunjukkan pada Bab 2 Gambar 2.16. Intersep kurva menunjukkan ukuran kristal. Penentuan persentase Fe₃O₄ dalam sampel dilakukan dengan pengolahan data XRD dengan *software* MAUD berbasis metode Rietveld. Bentuk/morfologi dan persen komposisi nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan diketahui melalui analisis dengan SEM, sedangkan penentuan karakter magnetik pada material nanopartikel Fe₃O₄-AO-

kitosan ditunjukkan dengan nilai saturasi magnetik dan koersivitas yang diperoleh dengan analisis dengan VSM.

Efisiensi pengembanan obat doxorubicin pada material nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan ditentukan melalui persamaan 4.2 berikut ini :

$$\text{Eff. Loading Obat (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi Awal Obat} - \text{Konsentrasi Akhir Obat}}{\text{Konsentrasi Awal Obat}} \times 100\% \quad (4.2)$$

Pelepasan obat dari nanopartikel ditentukan menggunakan pengukuran jumlah doxorubicin dalam interval waktu tertentu menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 480 nm.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

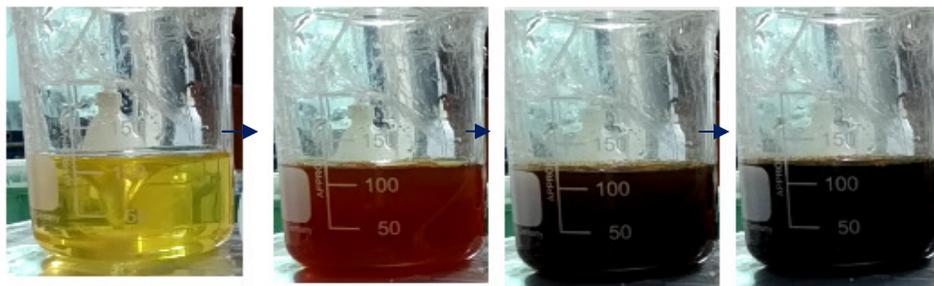
5.1 Sintesis Nanopartikel Fe₃O₄

Sintesis nanopartikel Fe₃O₄ secara kopresipitasi dilakukan dengan mencampurkan garam FeCl₃.6H₂O yang berupa padatan berwarna kuning dan FeCl₂.4H₂O yang berupa padatan berwarna hijau (rasio mol 1:2) ke dalam 50 mL akuades yang kemudian menghasilkan larutan berwarna kuning. Tahapan pembentukan magnetit (Fe₃O₄) dapat terjadi melalui reaksi berikut (Petcharoenand Sirivat 2012):



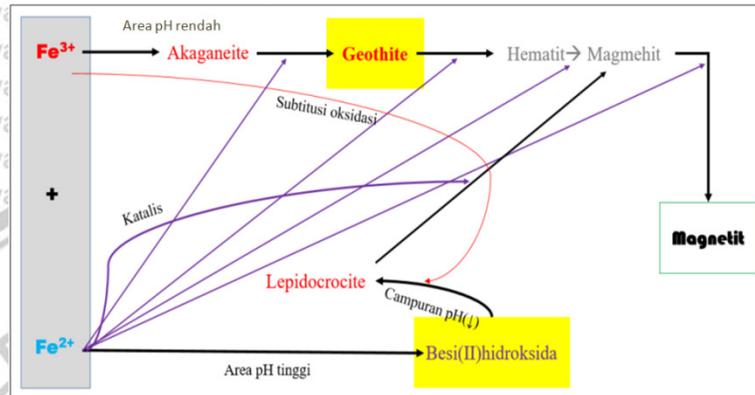
Nanopartikel Fe₃O₄ terbentuk dengan penambahan pereaksi berupa larutan alkali.

Selama penambahan larutan alkali tersebut terjadi perubahan warna larutan besi yaitu dari kuning → merah bata → kecoklatan → hitam. Perubahan larutan menjadi hitam menunjukkan bahwa Fe₃O₄ telah terbentuk. Tahap perubahan warna yang terjadi dalam pembentukan nanopartikel Fe₃O₄ dapat dilihat pada Gambar 5.1



Gambar 5.1. Tahapan perubahan warna larutan selama proses sintesis Fe₃O₄ secara kopresipitasi.

Adanya perubahan warna yang terjadi selama pembentukan Fe_3O_4 menunjukkan perubahan fasa besi oksida di dalam larutan. Skema jalur pembentukan nanopartikel magnetit dengan metode kopresipitasi dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2. Skema jalur pembentukan nanopartikel magnetit dengan metode kopresipitasi (Ahn, *et al.*, 2012).

Dari skema 5.2, dapat dijelaskan bahwa penambahan larutan basa pada pH yang rendah menyebabkan basa bereaksi dengan ion Fe^{3+} membentuk fasa akageneite. Sementara itu, pada pH yang lebih tinggi (penambahan larutan basa secara kontinu) menyebabkan ion Fe^{2+} juga dapat membentuk ferro hidroksida. Akibatnya dalam pembentukan Fe_3O_4 akan terjadi dua proses nukleasi dalam rute (tahap) yang berbeda yaitu (1) rute pembentukan akageneit \rightarrow geothit \rightarrow hematit dan maghemit \rightarrow magnetit, dan (2) rute pembentukan ferro hidroksida \rightarrow lepidocrocit \rightarrow maghemit \rightarrow magnetit (Ahn, *et al.*, 2012).

5.1.1 Sintesis Nanopartikel Fe_3O_4 secara Kopresipitasi

Penelitian ini diawali dengan sintesis nanopartikel Fe_3O_4 dengan metode kopresipitasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ukuran kristalit *bare* Fe_3O_4 yang

dihasilkan adalah sekitar 8 nm dengan waktu kopresipitasi selama 1 jam. Dalam metode kopresipitasi, ukuran nanopartikel yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh jenis larutan basa yang digunakan. Menurut Yuanbi, *et al* (2008), proses nukleasi dan pertumbuhan nanopartikel salah satunya dipengaruhi oleh jenis larutan basa. Dalam penelitiannya tersebut, Yuanbi, *et al.* (2008) menggunakan dua jenis larutan basa, yaitu *ammonia* dan NaOH untuk mendapatkan nanopartikel Fe_3O_4 . Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan *ammonia* dalam sintesis nanopartikel Fe_3O_4 menyebabkan peningkatan pH larutan terjadi secara bertahap. Hal ini akan mempermudah proses pengaturan pH akhir larutan untuk menghasilkan nanopartikel dengan ukuran yang lebih kecil dan komposisi Fe_3O_4 yang murni. Sementara itu, penggunaan NaOH diketahui dapat menyebabkan peningkatan pH yang tidak terkendali jika dilakukan di atas pH 8. Akibatnya sulit untuk melakukan kontrol pH akhir larutan dalam menghasilkan nanopartikel Fe_3O_4 dengan ukuran dan kemurnian yang diinginkan.

Selain jenis larutan basa, kecepatan pengadukan juga merupakan faktor yang perlu diperhatikan dalam pembuatan nanopartikel Fe_3O_4 secara kopresipitasi. Dalam penelitian sebelumnya, telah dilakukan investigasi terkait pengaruh variasi kecepatan pengadukan terhadap ukuran kristalit dan kemurnian fasa besi oksida dari nanopartikel. Dalam penelitian tersebut kecepatan pengadukan divariasi menjadi 3 yaitu 180, 250 dan 320 rpm dengan waktu reaksi selama 1 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin cepat pengadukan ukuran kristalitnya akan semakin besar. Hal ini terjadi karena kecepatan pengadukan menyebabkan difusi ion besi dalam pembentukan kristal menjadi lebih cepat sehingga ukuran kristalnya menjadi

lebih besar. Perubahan kecepatan pengadukan dari 180 rpm menjadi 250 rpm dapat meningkatkan persentase Fe_3O_4 pada sampel. Secara visual nanopartikel yang dihasilkan berwarna hitam dan memiliki respon aktif terhadap medan magnet eksternal. Sementara itu pada kecepatan 320 rpm, persentase Fe_3O_4 yang dihasilkan menjadi berkurang. Hal ini dikarenakan adanya pengadukan dengan kecepatan yang tinggi mampu mendeformasi kristal yang telah terbentuk menjadi struktur kristal yang lain. Akibatnya dihasilkan struktur kristal besi yang tidak diinginkan yakni berupa hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Selain itu nanopartikel yang dihasilkan dengan kecepatan 320 rpm tidak memiliki kemampuan untuk dipengaruhi dengan medan magnet eksternal. Perbedaan secara visual yang bisa diamati dan sangat jelas terlihat adalah nanopartikel yang dihasilkan dengan kecepatan pengadukan 320 rpm ini berwarna merah bata. Oleh sebab itu kecepatan pengadukan juga menentukan karakteristik fisik nanopartikel.

5.1.2 Sintesis Nanopartikel Fe_3O_4 secara Kopresipitasi dengan Ultrasonikasi (*Coprecipitation assisted Ultrasonication*)

Penelitian selanjutnya terkait pembuatan nanopartikel Fe_3O_4 juga telah dilakukan dengan menggabungkan metode kopresipitasi dengan ultrasonikasi. Penggabungan metode kopresipitasi dengan ultrasonikasi tersebut diharapkan mampu mempercepat waktu reaksi pembentukan Fe_3O_4 , mengurangi kontaminasi senyawa lain, serta memperkecil ukuran dengan mencegah proses aglomerasi. Proses pembentukan nanopartikel dengan metode kopresipitasi-ultrasonikasi dikondisikan sama dengan pembentukan nanopartikel secara kopresipitasi tanpa ultrasonikasi.

Namun, hasil penelitian menunjukkan bahwa ukuran kristalit nanopartikel *bare* Fe₃O₄ yang dihasilkan masih di atas 10 nm apabila durasi ultrasonikasi dilakukan selama 30 menit. Apabila waktu ultrasonikasi diperpanjang menjadi 1 jam atau lebih, ukuran kristalit menjadi lebih kecil yaitu sekitar 7 nm. Dalam metode sintesis ini diketahui bahwa ukuran nanopartikel *bare* Fe₃O₄ dipengaruhi oleh durasi waktu ultrasonikasi.

Semakin lama waktu ultrasonikasi, maka ukuran kristalit nanopartikel yang dihasilkan akan semakin kecil.

Merujuk pada hasil penelitian dengan metode kopresipitasi tanpa ultrasonikasi (pada sub bab 5.1.1), metode kopresipitasi-ultrasonikasi ini menghasilkan nanopartikel dengan ukuran yang tidak jauh berbeda dalam waktu reaksi yang sama.

Selain itu limitasi dari penggunaan ultrasonikasi untuk skala besar adalah membutuhkan energi yang lebih tinggi. Proses ultrasonikasi dengan frekuensi yang tinggi juga dikhawatirkan dapat memicu terbentuknya radikal bebas akibat proses kavitasi dari gelembung air pada media ultrasonikasi.

Berdasarkan penjelasan pada sub 5.1.1 dan 5.1.2, dapat disimpulkan bahwa kopresipitasi tanpa ultrasonikasi lebih efektif dalam proses sintesis nanopartikel Fe₃O₄. Selain itu dalam upaya menghasilkan nanopartikel dengan ukuran dan sifat magnetik yang sesuai untuk agen *drug delivery*, maka dalam penelitian ini larutan basa yang digunakan dalam metode kopresipitasi berupa *larutan ammonia* (NH₃.H₂O) dengan kecepatan pengadukan 250 rpm. Selama proses pembuatan nanopartikel Fe₃O₄, larutan garam besi perlu dikondisikan hingga pH ± 10, untuk mendapatkan partikel Fe₃O₄ yang lebih murni. Hal ini dikarenakan tahapan pembentukan Fe₃O₄ diawali dengan presipitasi ion Fe³⁺ pada kisaran pH 3-4,

selanjutnya diikuti dengan presipitasi ion Fe^{2+} pada pH yang lebih tinggi yaitu pada pH 8-9. Kopersipitasi kedua ion tersebut menghasilkan Fe_3O_4 dimulai pada pH 8,5 dan kopersipitasi sempurna kedua ion terjadi pada $\text{pH} > 9,2$ (Liang, *et.al*, 2011).

Nanopartikel yang dihasilkan dari metode kopresipitasi ini kemudian dicuci dengan akuades hingga pH netral dan dikeringkan dengan *freeze dryer* sebelum akhirnya dikarakterisasi. Hasil karakterisasi dengan XRD menunjukkan bahwa kristalit nanopartikel Fe_3O_4 yang dihasilkan dalam penelitian ini berukuran 8,64 nm.

5.2 Modifikasi Permukaan Nanopartikel Fe_3O_4 dengan Polimer dan Asam Oleat.

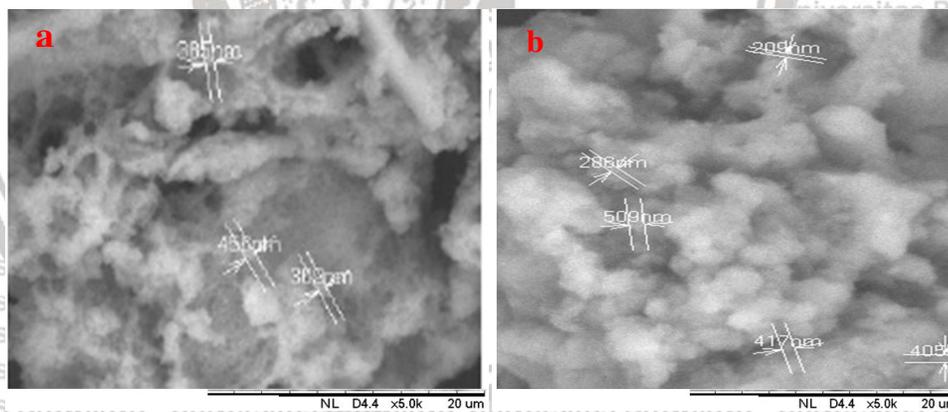
Pemanfaatan nanopartikel sebagai agen *drug delivery* perlu memperhatikan beberapa faktor, salah satunya material yang digunakan dalam memodifikasi permukaannya. Modifikasi permukaan dimaksudkan untuk menghasilkan nanopartikel yang lebih stabil dan tidak mudah teroksidasi. Modifikasi pada permukaan nanopartikel dapat dilakukan dengan berbasis bahan organik seperti polimer dan surfaktan. Polimer yang digunakan dapat berupa polimer alam seperti kitosan maupun polimer sintesis berupa polivinil alcohol (PVA). Selain polimer, surfaktan berupa asam oleat juga dapat berperan sebagai *surface modifier* pada Fe_3O_4 .

Oleh sebab itu penelitian dilanjutkan dengan modifikasi pada permukaan nanopartikel Fe_3O_4 menggunakan polimer dan surfaktan asam oleat.

5.2.1 Modifikasi Permukaan Fe_3O_4 dengan Polimer.

Nanopartikel Fe_3O_4 yang telah disintesis melalui metode kopresipitasi selanjutnya dimodifikasi bagian permukaannya dengan menggunakan *surface modifier* berupa polimer alam yaitu kitosan. Penambahan *surface modifier* dapat

dilakukan dengan dua cara yaitu (1) dilakukan selama proses pembentukan nanopartikel Fe_3O_4 , (2) dilakukan setelah nanopartikel Fe_3O_4 terbentuk sampai dihasilkan Fe_3O_4 -kitosan. Selanjutnya nanopartikel Fe_3O_4 yang dimodifikasi tersebut dikarakterisasi dengan SEM untuk melihat morfologi permukaannya. Hasil karakterisasi dengan SEM disajikan pada Gambar 5.3, dan dapat dilakukan analisis bahwa penambahan *surface modifier* dengan cara yang pertama menghasilkan nanopartikel Fe_3O_4 -kitosan dengan bentuk permukaan yang lebih halus dan bentuk *spherical* yang tidak sempurna. Dalam proses sintesis Fe_3O_4 -kitosan dengan cara yang pertama, lapisan kitosan terikat silang dengan agen *crosslinking* berupa tripolyphosphate dan sitrat. Kitosan sebagai agen pelapis (*coating*) terlihat membentuk bagian yang menyerupai pori di permukaan nanopartikel Fe_3O_4 .

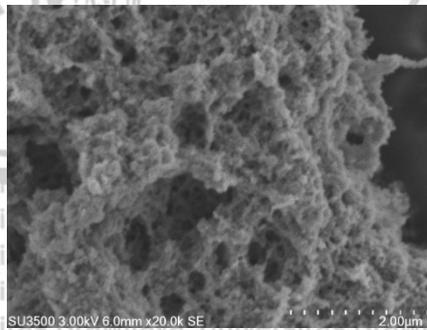


Gambar 5.3. SEM nanopartikel Fe_3O_4 -kitosan dengan penambahan *surface modifier* (a) selama proses pembentuka Fe_3O_4 , (b) setelah Fe_3O_4 terbentuk sampai dihasilkan Fe_3O_4 -kitosan.

Sementara itu, penambahan *surface modifier* dengan metode kedua melibatkan proses penambahan kitosan yang dilakukan setelah Fe_3O_4 terbentuk. Hasil karakterisasi dengan SEM memperlihatkan morfologi permukaan nanopartikel yang

dihasilkan didominasi bentuk partikel *spherical*. Pembentukan nanopartikel Fe_3O_4 -kitosan dengan metode kedua ini dilakukan dengan penambahan agen *crosslinking* berupa Tripolyphosphate dan sulfat. Namun hasil karakterisasi SEM menunjukkan ukuran partikel yang dihasilkan dengan metode kedua ini lebih besar dibandingkan metode yang pertama. Oleh sebab itu penelitian selanjutnya dilakukan dengan mencoba menggunakan polimer sintetis dan agen *crosslinking* yang berbeda.

Penelitian selanjutnya yang dilakukan adalah modifikasi Fe_3O_4 menggunakan jenis *surface modifier* berbasis polimer sintetis yaitu polivinyl alkohol (PVA) dengan agen *crosslinking* berupa glutaraldehid (GA). Seperti halnya modifikasi Fe_3O_4 dengan kitosan yang dilakukan dengan dua cara, maka penelitian dengan PVA juga dilakukan dengan dua cara yaitu (1) *surface modifier* berupa PVA dan GA ditambahkan pada saat pembentukan Fe_3O_4 sampai akhirnya terbentuk Fe_3O_4 -PVA, dan (2) PVA dan GA ditambahkan setelah Fe_3O_4 terbentuk. Nanopartikel juga dikarakterisasi dengan SEM untuk melihat morfologi permukaannya dan disajikan pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4. SEM nanopartikel Fe_3O_4 -PVA dengan penambahan *surface modifier* setelah Fe_3O_4 terbentuk sampai dihasilkan Fe_3O_4 -PVA (cara kedua).

Pada penelitian dengan menggunakan *surface modifier* berupa PVA dengan cara yang pertama, yaitu penambahan *surface modifier* selama pembentukan Fe_3O_4 ,

maka produk nanopartikel yang dihasilkan menyerupai bongkahan dan nanopartikel justru kehilangan sifat magnetiknya. Sehingga tidak dikarakterisasi dengan SEM.

Sementara itu hasil karakterisasi dengan SEM untuk nanopartikel disintesis dengan cara kedua (*surface modifier* ditambahkan setelah Fe_3O_4 terbentuk) menunjukkan bahwa morfologi nanopartikel memiliki permukaan yang berpori. Morfologi nanopartikel pada prinsipnya dapat dipengaruhi oleh jenis dan komposisi dari material yang melapisi permukaannya. Jenis dan komposisi material yang tepat dapat menghasilkan nanopartikel dengan bentuk, ukuran, dan sifat magnetik tertentu yang dapat dipertimbangkan untuk digunakan dalam aplikasi *drug delivery*. Selain itu metode penambahan *surface modifier* juga mempengaruhi struktur morfologi nanopartikel.

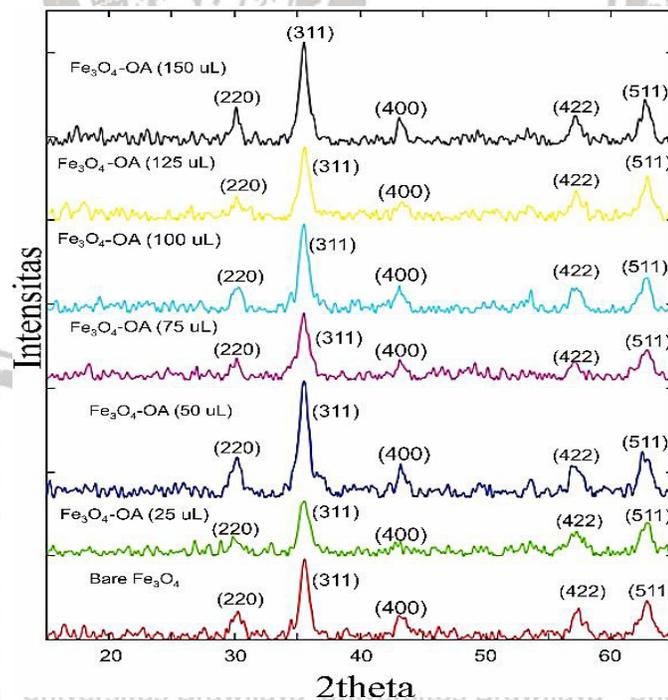
Berdasarkan data hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa pembuatan nanopartikel dengan polimer alam memiliki tingkat keberhasilan yang lebih baik untuk menghasilkan nanopartikel Fe_3O_4 -polimer dengan kedua cara penambahan *surface modifier* (baik saat proses pembentukan Fe_3O_4 , maupun penambahan *surface modifier* setelah Fe_3O_4 terbentuk).

5.2.2 Modifikasi Permukaan Fe_3O_4 dengan Asam Oleat

Pada sub 5.2.1, telah disebutkan bahwa polimer alam maupun sintesis dapat digunakan sebagai *surface modifier*. Berdasarkan strukturnya, kitosan dan PVA tergolong sebagai polimer yang bersifat hidrofilik. Namun selain polimer, beberapa literatur menyebutkan bahwa surfaktan juga dapat berperan sebagai *surface modifier*.

Surfaktan dalam strukturnya memiliki kepala yang bersifat hidrofilik namun bagian ekor yang bersifat hidrofobik. Obat-obatan dalam terapi kanker umumnya bersifat

hidrofobik, maka permukaan Fe_3O_4 juga dapat dimodifikasi dengan tambahan surfactant yang bersifat hidrofobik untuk mengembangkan obat kanker. Hal ini dapat meminimalisir penggunaan reagen organik yang bersifat toksik serta meningkatkan kompatibilitas dari agen *drug delivery*. Salah satu surfaktan yang bersifat biokompatibel dan non-toxic adalah asam oleat (AO). Penelitian lanjutan terkait modifikasi permukaan nanopartikel Fe_3O_4 dilakukan dengan menggunakan asam oleat sebagai *surface modifier*. Asam oleat dibuat dalam beberapa komposisi, yaitu 25-150 μL dengan interval konsentrasi 25 μL . Nanopartikel Fe_3O_4 -AO yang dihasilkan kemudian dikarakterisasi dengan XRD dan data hasil karakterisasi tersebut digunakan dalam penentuan ukuran kristalit. Difraktogram XRD disajikan pada Gambar 5.5



Gambar 5.5 Difraktogram XRD pada sampel Fe_3O_4 -Asam Oleat dengan variasi asam oleat 25-150 μL .

Hasil penelitian menunjukkan bahwa komposisi optimum asam oleat yang digunakan adalah 100 μL . Pada komposisi optimum, nanopartikel $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-AO}$ yang dihasilkan memiliki ukuran kristalit terkecil (yaitu 6,25 nm) dengan persentase Fe_3O_4 tertinggi yaitu 96,3%. Namun nanopartikel $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-AO}$ yang dihasilkan memiliki solubilitas yang rendah di dalam air. Apabila akan digunakan dalam aplikasi *drug delivery*, sebaiknya nanopartikel $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-AO}$ ini perlu dimodifikasi lebih lanjut.

Penelitian selanjutnya didesain untuk menghasilkan nanopartikel Fe_3O_4 secara kopresipitasi dan dimodifikasi permukaannya dengan menggunakan kombinasi dua jenis *surface modifier*, yaitu kitosan dan asam oleat. Selain itu kitosan juga dimodifikasi dengan penambahan *crosslinker* berupa campuran TPP dan sulfat. Tujuan penggunaan kombinasi *surface modifier* tersebut adalah untuk mempertahankan stabilitas Fe_3O_4 sehingga tidak mudah mengalami aglomerasi, mencegah oksidasi Fe_3O_4 , serta dalam aplikasinya sebagai *drug delivery*, nanopartikel dapat digunakan untuk mengembangkan obat-obat yang bersifat hidrofobik. Penggunaan kombinasi *crosslinker* TPP dan sulfat dimaksudkan untuk menghasilkan nanopartikel yang *spherical* serta mempertahankan stabilitas kitosan dalam suasana asam.

5.3 Pengaruh Metode Kopresipitasi Ex-situ dan In-situ terhadap Nanopartikel $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Asam Oleat-Kitosan}$.

Pada sub bab 5.2 telah disebutkan bahwa tahapan penambahan *surface modifier* berpengaruh terhadap sifat fisik nanopartikel. Oleh sebab itu salah satu tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh penambahan *surface modifier* pada permukaan nanopartikel Fe_3O_4 . Dalam penelitian ini, metode sintesis

nanopartikel dikembangkan menjadi 2 tipe yaitu kopresipitasi in-situ dan ex-situ.

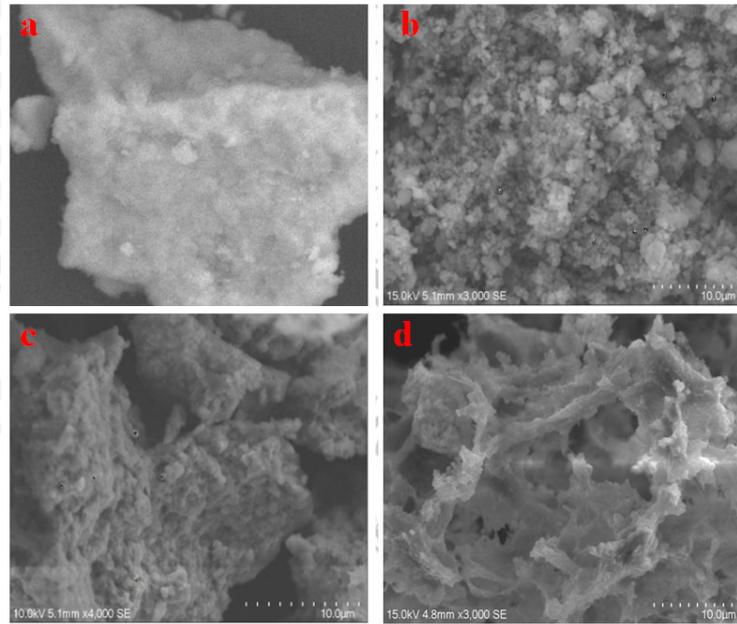
Metode in-situ dapat dikategorikan sebagai *one-pot reaction* dimana *surface modifier* ditambahkan selama proses pembentukan Fe_3O_4 . Sementara itu, metode kopresipitasi ex-situ merepresentasikan proses sintesis dengan *post modification* dimana *surface modifier* ditambahkan bertahap setelah nanopartikel Fe_3O_4 terbentuk.

Proses pembuatan nanopartikel diawali dengan sintesis Fe_3O_4 secara kopresipitasi, lalu kemudian dilanjutkan dengan proses modifikasi permukaannya dengan penambahan asam oleat dan kitosan serta *crosslinker*. Masing-masing sampel nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan hasil sintesis secara kopresipitasi ex-situ maupun in-situ tersebut selanjutnya dikeringkan dengan *freeze dryer* dan dikarakterisasi dengan SEM, XRD, dan FTIR.

Pada metode ex-situ nanopartikel diprediksi akan membentuk suatu struktur *core-shell* yang terdiri dari Fe_3O_4 dibagian *core*, dengan asam oleat dan kitosan yang terikat silang TPP dan sulfat pada bagian *shell*. Sedangkan, pada metode In-situ, nanopartikel Fe_3O_4 yang terlapis permukaannya dengan asam oleat berada tersebar dipermukaan kitosan yang terikat silang TPP dan sulfat.

Hasil karakterisasi dengan SEM pada nanopartikel *bare* Fe_3O_4 (Fe_3O_4 tanpa *coating* AO dan kitosan) dan Fe_3O_4 -AO-Kitosan yang disintesis dengan metode ex-situ dan in-situ disajikan pada Gambar 5.6. Hasil SEM menunjukkan bahwa morfologi/bentuk nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan yang dihasilkan dengan metode ex-situ (Gambar 5.6b) adalah *spherical*. Berbeda dengan metode Ex-situ, nanopartikel yang dihasilkan dengan metode in-situ (pada Gambar 5.6c) dengan penambahan asam oleat 1 mL) menunjukkan bentuk *spherical* namun tidak sebaik pada metode Ex-situ.

Bentuk nanopartikel ini menyerupai lembaran namun didominasi oleh bentuk *spherical* dipermukaannya.



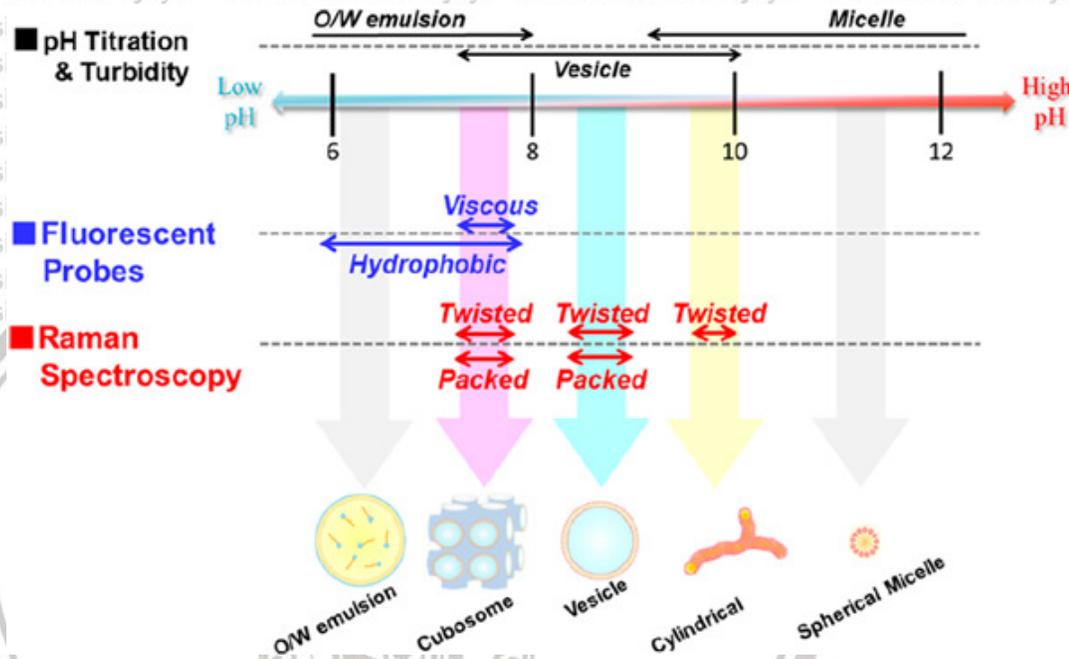
Gambar 5.6. Hasil SEM Morfologi permukaan pada sampel nanopartikel (a) *bare* Fe_3O_4 , dan Fe_3O_4 -AO kitosan yang disintesis secara (b) kopresipitasi *ex-situ* (komposisi AO 1 mL), dan kopresipitasi *in-situ* dengan komposisi AO (c) 1 mL, (d) 0,1 mL perbesaran 3000x.

Pada komposisi asam oleat yang lebih rendah (100 μl), bentuk nanopartikel sangat berbeda dibandingkan dengan bentuk nanopartikel lainnya yaitu menyerupai lembaran berpori dengan permukaan yang lebih halus. Hal ini menunjukkan bahwa nanopartikel (Fe_3O_4 -AO-kitosan) yang dihasilkan dengan metode *ex-situ* memiliki bentuk *spherical* yang lebih baik dibandingkan dengan nanopartikel yang diperoleh pada metode *In-situ*. Hasil penelitian menunjukkan fenomena yang sama dengan prediksi awal dimana pada metode *ex-situ* nanopartikel membentuk suatu struktur

core-shell yang terdiri dari Fe_3O_4 dibagian *core*, dengan *surface modifier* pada bagian *shell* sehingga morfologi permukaannya menunjukkan bentuk *spherical*. Sedangkan, pada metode *in-situ*, nanopartikel Fe_3O_4 akan berada tersebar dipermukaan *surface modifier*.

Berdasarkan hasil SEM, nanopartikel yang dihasilkan di dalam penelitian ini (baik dengan metode kopresipitasi *ex-situ* maupun *in-situ*) keduanya terlihat membentuk *cluster*. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Janke, *et al.* (2014), menunjukkan bahwa asam oleat memiliki kecenderungan membentuk kumpulan partikel-partikel yang bergantung pada kondisi pH serta keadaan protonasi dari molekul asam oleat tersebut. Pada metode *ex-situ*, asam oleat dilarutkan dengan etanol dan ditambahkan pada Fe_3O_4 yang telah dicuci hingga pH netral. Pada kondisi tersebut, asam oleat akan berada pada fasa minyak dan cenderung membentuk *cubosome type vesicle*. Sedangkan, pada metode *in-situ*, penambahan asam oleat dilakukan ketika proses pembentukan inti (nukleasi) Fe_3O_4 . Kondisi larutan pada saat itu didominasi oleh basa karena penambahan larutan *ammonia* dan ditunjukkan dengan pH larutan >9.2 . Pada kondisi tersebut, asam oleat cenderung membentuk vesikel. Secara teoritis, pembentukan vesikel tersebut diharapkan mampu menghasilkan nanopartikel dengan bentuk *spherical* yang lebih baik. Namun vesikel yang dihasilkan cenderung berbentuk tubular/silinder. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Suga, *et al.* (2016) yang melaporkan bahwa *spherical* vesikel dari asam oleat berada pada pH 8,5. Apabila pH larutan tersebut ditingkatkan maka asam oleat cenderung membentuk vesikula yang berbentuk silinder (*silindrical type vesicle*). Akibatnya berdasarkan hasil SEM terlihat bahwa

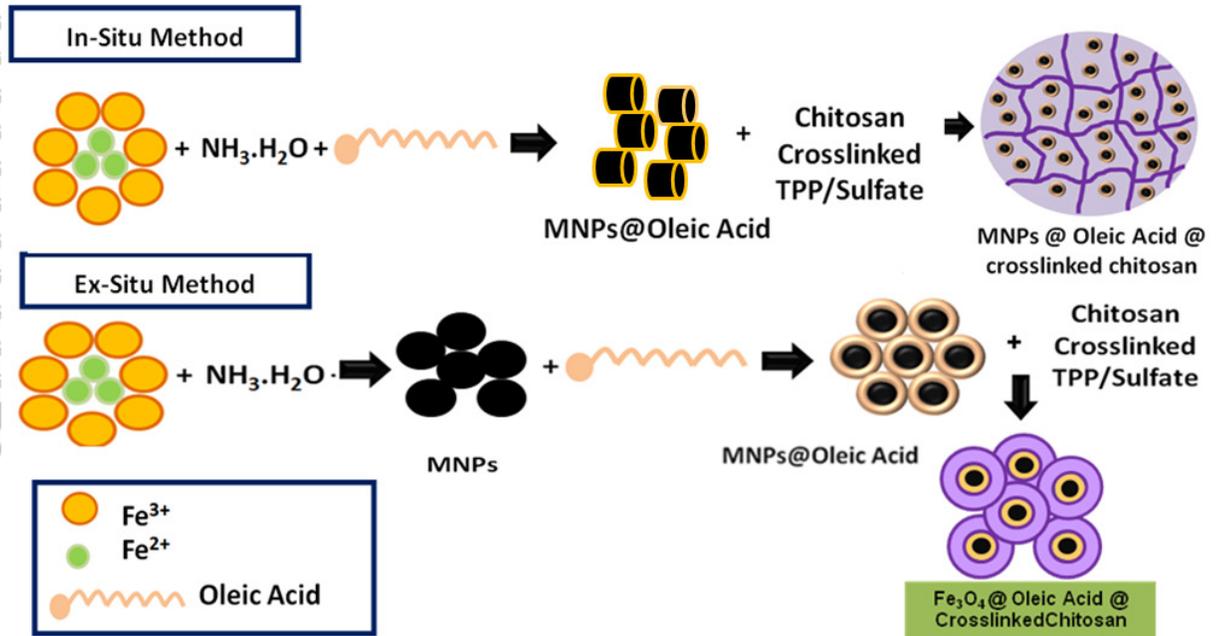
bentuk *spherical* yang lebih baik cenderung diperoleh dengan metode sintesis kopresipitasi *ex-situ* dibandingkan *in-situ*. Perubahan fasa dari asam oleat pada kondisi pH asam maupun basa disajikan pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7. Perubahan fasa asam oleat pada kondisi pH rendah hingga pH tinggi. Vesikel terbentuk pada *range* pH 7,5 sampai 9,6 dengan beberapa perbedaan konformasi dari tipe *cubosome* hingga menjadi *cylindrical* (Suga, *et al.* 2016).

Struktur morfologi nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan (komposisi asam oleat 100 μl) yang dihasilkan secara sintesis *in-situ* memiliki kemiripan dengan hasil SEM dalam penelitian sebelumnya dengan modifikasi Fe_3O_4 menggunakan polimer kitosan saja (pada Gambar 5.3A). Namun struktur morfologinya menjadi berbeda apabila komposisi asam oleat ditingkatkan menjadi 1 mL. Mekanisme reaksi yang mungkin

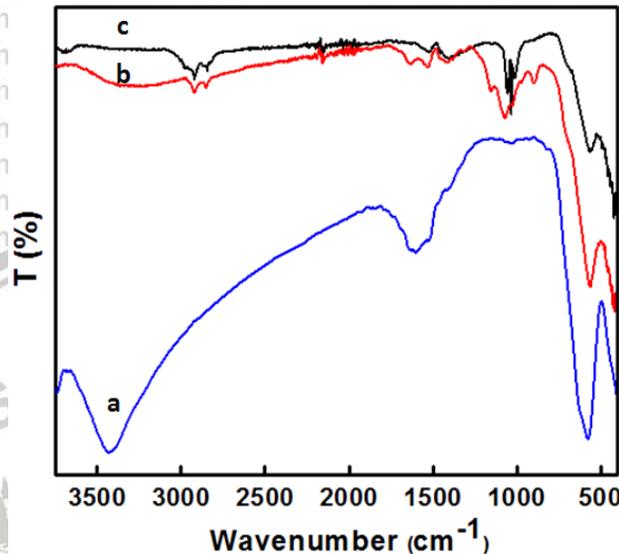
terjadi dengan metode kopresipitasi ex-situ dan in-situ dalam pembentukan nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan ditunjukkan pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8. Mekanisme reaksi yang mungkin terjadi dengan proses kopresipitasi in-situ dan ex-situ.

Karakterisasi sampel nanopartikel juga dilakukan dengan FTIR untuk memastikan keberadaan gugus fungsi dari molekul-molekul penyusun nanopartikel. Profil spektra FTIR yang diperoleh untuk sampel *bare* Fe₃O₄ dan Fe₃O₄-AO-kitosan yang dihasilkan dengan metode kopresipitasi ex-situ dan in-situ disajikan pada Gambar 5.9. Terdapat perbedaan serapan FTIR yang signifikan khususnya pada daerah bilangan gelombang kisaran ~3300-3500 cm⁻¹. Puncak serapan OH dipermukaan Fe₃O₄ ditunjukkan pada daerah 3300-3400. Puncak tersebut mengalami penurunan intensitas pada sampel nanopartikel yang dimodifikasi permukaannya. Hal ini

mengindikasikan bahwa permukaan nanopartikel telah berinteraksi dengan *surface modifier*.



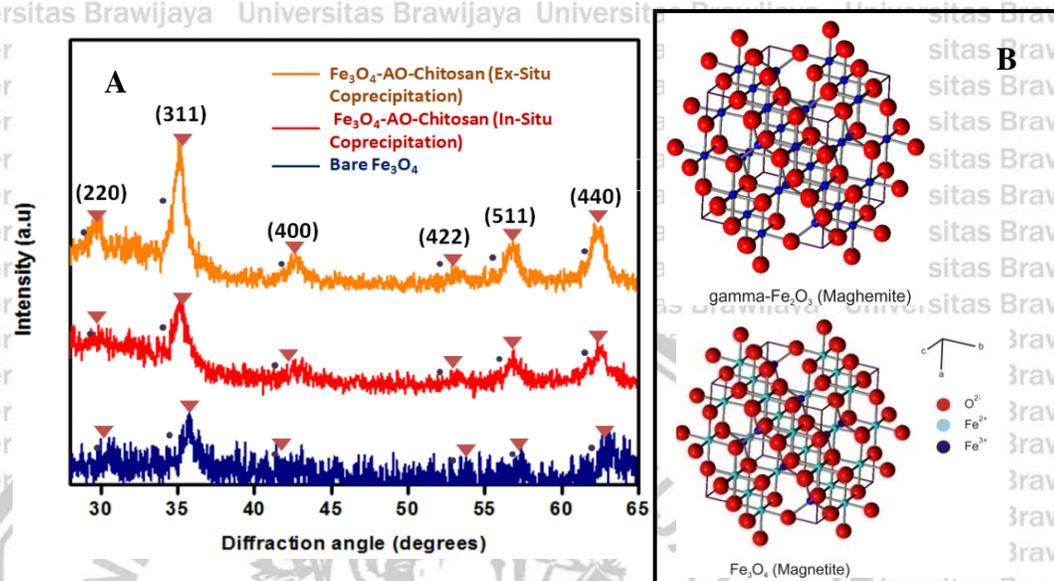
Gambar 5.9. Spektra FTIR pada sampel nanopartikel (a) *bare* Fe₃O₄, dan Fe₃O₄-AO-kitosan yang disintesis secara (b) kopresipitasi *ex-situ*, (c) kopresipitasi *in-situ*.

Puncak serapan pada kisaran bilangan gelombang 1100-1300 muncul pada nanopartikel yang disintesis secara *ex-situ* dan *in-situ*, namun tidak terlihat untuk sampel *bare* Fe₃O₄. Puncak tersebut diprediksi puncak serapan dari material *surface modifier* di permukaan Fe₃O₄. Selain itu terdapat dua puncak serapan pada rentang panjang gelombang 1420-1610 untuk sampel yang dihasilkan secara kopresipitasi *ex-situ* dan *in-situ*. Kedua puncak tersebut diidentifikasi sebagai serapan simetris (COO⁻) dan asimetris (COO) dari asam oleat. Puncak C-H simetris dan asimetris dari asam oleat juga muncul pada bilangan gelombang 2950 dan 2880 cm⁻¹. Puncak ini tidak dimiliki oleh sampel tanpa *coating* (*bare* Fe₃O₄). Puncak serapan pada daerah bilangan gelombang 568 cm⁻¹ merupakan vibrasi Fe-O dari Fe₃O₄. Puncak serapan ini

muncul pada ketiga spektra FTIR baik untuk *bare* Fe₃O₄ maupun Fe₃O₄-AO-kitosan yang disintesis secara kopresipitasi *ex-situ* dan *in-situ*. Selain itu ditemukan keberadaan *shoulder peak* disekitar daerah bilangan gelombang ~600 cm⁻¹ yang diperkirakan merupakan puncak serapan untuk maghemite (γ -Fe₂O₃). Oleh sebab itu penentuan persentase kelimpahan Fe₃O₄ untuk seluruh sampel nanopartikel perlu dilakukan.

Karakterisasi selanjutnya dilakukan dengan XRD untuk menentukan pola difraksi sinar-X dari sampel, serta menghitung kelimpahan fasa besi oksida pada masing-masing sampel, dan menentukan ukuran kristalit nanopartikel. Pola difraksi nanopartikel *bare* Fe₃O₄ dan Fe₃O₄ dengan pelapisan kitosan-asam oleat yang dihasilkan melalui metode kopresipitasi *in-situ* dan *ex-situ* disajikan pada Gambar 5.10A. Puncak difraksi pada sampel *bare* Fe₃O₄ dan Fe₃O₄-AO-kitosan yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan data standar ICSD #26410 untuk menentukan keberadaan senyawa Fe₃O₄ dalam sampel. Pola difraksi yang diperoleh dari sampel ini memiliki kesesuaian dengan pola kristal Fe₃O₄. Data XRD menunjukkan puncak-puncak difraksi yang sesuai untuk Fe₃O₄ pada bidang hkl masing-masing (220), (311), (400), (422), (511) dan (440) yang mengindikasikan bahwa Fe₃O₄ telah diperoleh. Berdasarkan hasil identifikasi diketahui bahwa dalam penelitian ini Fe₃O₄ berhasil diperoleh baik melalui metode sintesis kopresipitasi *in-situ* maupun *ex-situ*. Berdasarkan hasil karakterisasi XRD juga dapat dilihat bahwa pola difraksi sinar-X pada sampel *bare* Fe₃O₄ memiliki kemiripan dengan pola difraksi Fe₃O₄ yang dilapisi permukaannya dengan asam oleat dan kitosan. Hal ini

menunjukkan adanya *surface modifier* tidak berpengaruh terhadap perubahan struktur kristal Fe_3O_4 .



Gambar 5.10. (A) Pola difraksi sinar-X pada sampel Fe_3O_4 tanpa dan dengan *coating* asam oleat-kitosan yang disintesis secara kopesipitasi in-situ dan ex-situ dan (B) Struktur *ball stick* dari Fe_3O_4 dan $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Namun belakangan diketahui bahwa pola difraksi dan posisi puncak difraksi untuk Fe_3O_4 memiliki kesamaan dengan $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (berdasarkan ICSD #172905 untuk $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Struktur Fe_3O_4 dan $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dapat dilihat pada Gambar 5.10B. Oleh sebab itu diperlukan adanya perhitungan persentase kelimpahan fasa besi oksida pada masing-masing sampel. Penentuan kelimpahan fasa besi oksida diperoleh dengan mengolah data hasil karakterisasi XRD menggunakan *software* MAUD. Hasil pengolahan data dengan *software* MAUD untuk penentuan persentase besi oksida pada masing-masing sampel disajikan pada Tabel 1. Data hasil perhitungan dengan

software tersebut menunjukkan bahwa komponen utama besi oksida yang terdapat dalam sampel nanopartikel adalah Fe_3O_4 . Data ini juga diperkuat dengan tampilan visual dari nanopartikel yaitu berwarna hitam serta memiliki respon aktif terhadap medan magnet eksternal.

Tabel 1. Ukuran dan persentase besi oksida pada nanopartikel dengan metode berbeda.

Parameter	Ukuran kristalit ^a (nm)	Ukuran Partikel ^b (nm)	Fe_3O_4 ^a (%)	$\gamma-Fe_2O_3$ ^a (%)
Bare Fe_3O_4	8,64	73-162	87,98	12,02
Pengaruh Metode				
Ex-situ	4,73	94-149	97,90	2,10
In-situ	14,64	200-461	75,75	24,25

^aPerolehan data berdasarkan pengolahan data hasil karakterisasi XRD

^b Perolehan data berdasarkan hasil karakterisasi SEM

Berdasarkan Tabel 1, terlihat bahwa persentase Fe_3O_4 tersebut meningkat setelah dilakukan pelapisan dengan asam oleat dan kitosan yang disintesis melalui metode kopresipitasi ex-situ. Namun, cenderung menurun pada nanopartikel yang disintesis dengan metode in-situ. Hal ini bisa disebabkan karena penambahan *surface modifier* selama proses pembentukan Fe_3O_4 menyebabkan *surface modifier* tersebut telah melapisi fasa maghemite terlebih dahulu sebelum magnetit terbentuk (seperti digambarkan dalam tahapan pembentukan Fe_3O_4 , skema 5.2). Fasa besi oksida maghemite ini memiliki stabilitas yang jauh lebih tinggi dibandingkan magnetite. Maghemite ini juga dapat menjadi produk oksidasi dari magnetit.

Selain penentuan persentase besi oksida pada sampel, difraktogram XRD juga digunakan dalam penentuan ukuran kristalit dengan perhitungan menggunakan

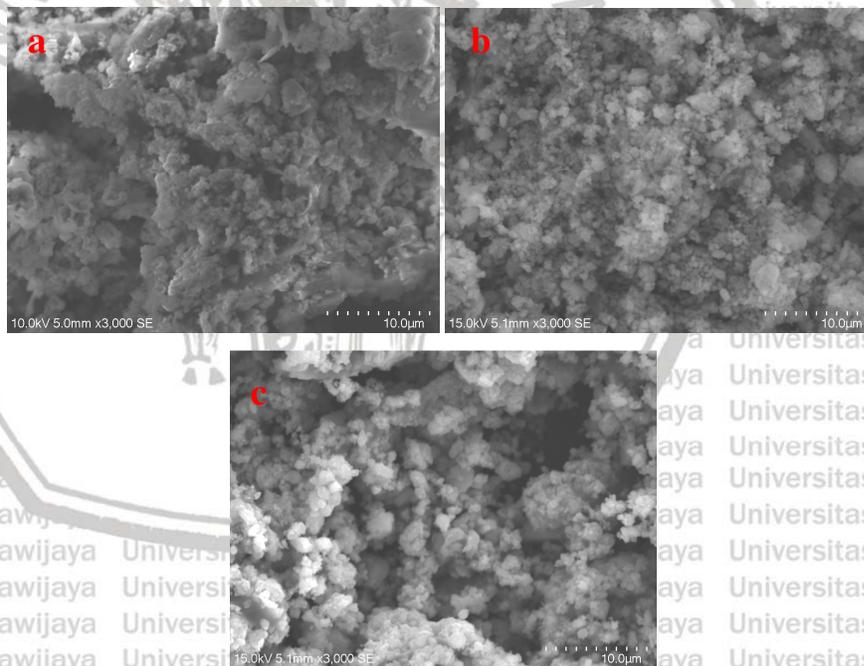
persamaan *Debye Scherrer* termodifikasi. Hasil perhitungan kristalinit disajikan pada tabel 1. Ukuran kristalinit terkecil diperoleh dengan metode sintesis secara kopresipitasi ex-situ. Dapat dilihat bahwa terdapat korelasi antara ukuran kristalinit dengan persentase Fe_3O_4 dimana Persentase Fe_3O_4 meningkat dengan semakin kecilnya ukuran kristalinit.

Berdasarkan hasil karakteristik fisik nanopartikel yang meliputi bentuk, ukuran, dan persentase kelimpahan Fe_3O_4 , diketahui bahwa nanopartikel yang diperoleh dengan metode kopresipitasi ex-situ morfologi *spherical* dengan ukuran yang lebih kecil dan persentase Fe_3O_4 yang lebih tinggi. Oleh sebab itu nanopartikel yang dihasilkan dengan metode ex-situ lebih cocok digunakan sebagai kandidat agen *drug delivery* dibandingkan nanopartikel yang dihasilkan dari metode kopresipitasi in-situ. Oleh sebab itu kajian lebih lanjut terkait pengaruh variasi komposisi material dalam metode sintesis kopresipitasi ex-situ dilakukan untuk mengetahui komposisi optimum dalam menghasilkan nanopartikel yang sesuai sebagai kandidat agen *drug delivery*.

5.4 Pengaruh Komposisi Asam Oleat terhadap Nanopartikel Fe_3O_4 -Asam Oleat-Kitosan.

Pembuatan nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan yang terikat silang TPP dan sulfat dilakukan dengan metode kopresipitasi ex-situ, namun dengan menggunakan komposisi asam oleat yang bervariasi. Dalam penelitian ini, asam oleat dibuat dalam tiga variasi komposisi yaitu 0,5; 1, dan 1,5 mL. Masing-masing nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan hasil sintesis kemudian dikarakterisasi dengan SEM, FTIR, dan XRD. Karakterisasi dengan SEM memberikan informasi morfologi permukaan dan ukuran

Nanopartikel. Bentuk/morfologi permukaan nanopartikel yang dihasilkan dengan variasi komposisi asam oleat berdasarkan hasil karakterisasi dengan SEM disajikan pada Gambar 5.11. Hasil tersebut menunjukkan bahwa asam oleat dengan komposisi yang lebih kecil menyebabkan partikel-partikel membentuk *cluster* dengan ukuran yang lebih besar dan bentuk morfologi permukaan yang tidak seragam. Hal ini dimungkinkan karena rendahnya komposisi asam oleat yang berinteraksi dengan Fe_3O_4 memberikan peluang untuk kitosan juga dapat berinteraksi dengan permukaan Fe_3O_4 . Dalam penelitian ini keduanya berperan sebagai *surface modifier*. Akibatnya terjadi kompetisi antara asam oleat dan kitosan untuk berinteraksi dengan Fe_3O_4 .



Gambar 5.11. Morfologi permukaan nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan penambahan asam oleat (a) 0.5 mL, (b) 1 mL, dan (c) 1.5 mL masing-masing dengan perbesaran 3000x.

Tabel 2. Ukuran Partikel Fe₃O₄-AO-Kitosan dengan variasi komposisi asam oleat.

Parameter	Ukuran Partikel (nm)
Komposisi Asam Oleat (mL)	
0,5	199-386
1	94-149
1,5	197-294

Ukuran molekul polimer kitosan dan asam oleat yang berbeda menyebabkan pembentukan *cluster* dengan ukuran yang tidak seragam. Ukuran partikel pada

sampel nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan variasi asam oleat dapat dilihat pada

Tabel 2. Berdasarkan data pada Tabel 2 dan morfologi permukaan pada Gambar 5.11,

diketahui bahwa *cluster* nanopartikel mulai berkurang dengan penambahan asam

oleat yang lebih yang lebih besar. Berkurangnya pembentukan *cluster* akan

menghasilkan partikel dengan ukuran dan bentuk yang lebih seragam. Hal ini

kemungkinan disebabkan sebagian besar permukaan Fe₃O₄ cenderung berinteraksi

dengan asam oleat dan membentuk *protective monolayer* diseluruh permukaannya.

Pada komposisi yang tepat, molekul asam oleat yang terdiri dari rantai

hidrokarbon panjang dan bersifat hidrofobik mampu menurunkan gaya tarik antar

partikel untuk membentuk *cluster*. Selain itu keberadaan asam oleat juga mampu

mencegah terjadinya oksidasi Fe₃O₄ dengan membentuk *protective monolayer* di

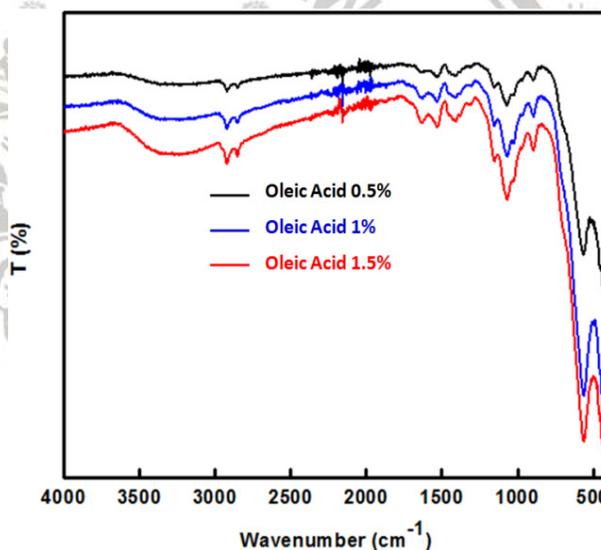
permukaan Fe₃O₄. Namun pada komposisi yang lebih tinggi, asam oleat cenderung

membentuk *bilayer* dan berinteraksi dengan kitosan membentuk partikel yang

berukuran lebih besar (Baharuddin, *et al.*, (2018)). Secara keseluruhan, hasil SEM

menunjukkan bahwa bentuk nanopartikel yang dihasilkan adalah *spherical*.

Keberadaan asam oleat sebagai *surface modifier* pada Fe_3O_4 diidentifikasi berdasarkan keberadaan gugus fungsinya dengan menggunakan instrumen FTIR. Hasil identifikasi gugus fungsi dari sampel nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan FTIR disajikan pada Gambar 5.12. Berdasarkan hasil karakterisasi dengan FTIR, puncak serapan yang menunjukkan adanya asam oleat pada permukaan Fe_3O_4 yaitu puncak C=O asimetris dan simetris yang berada pada posisi bilangan gelombang 1424 dan 1533 cm^{-1} . monodentat bersifat lebih fleksibel dibandingkan *bridging* dan *chelating*.



Gambar 5.12. Spektra FTIR pada sampel nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan penambahan volume asam oleat yang berbeda.

Secara teoritis, asam oleat dipermukaan Fe_3O_4 dapat membentuk struktur monodentat, *bridging*, maupun *chelating*. Berdasarkan hasil penelitian Jadhav, *et al.* (2013) dan Okassa, *et al.* (2007), diketahui bahwa apabila selisih serapan simetris dan asimetris lebih dari 100 cm^{-1} maka intekasi monodentat lebih dominan terjadi dipermukaan Fe_3O_4 . Dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa asam oleat

membentuk struktur monodentat dipermukaan Fe_3O_4 (karena selisih serapan asimetris dan simetris lebih dari 100 cm^{-1}). Struktur monodentat bersifat lebih fleksibel dibandingkan *bridging* dan *chelating*.

Spektra FTIR yang diperoleh pada sampel nanopartikel dengan variasi komposisi asam oleat dalam penelitian ini sangat mirip dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Zhang, *et al.* (2006) dengan spektra FTIR yang telah ditunjukkan pada Gambar 2.15B. Perbedaan yang tampak dari spektra FTIR dalam penelitian ini dengan penelitian Zhang (Gambar 2.15B) adalah, dalam penelitian ini terdapat puncak-puncak serapan tambahan pada daerah bilangan gelombang $< 1500\text{ cm}^{-1}$ yang diprediksi sebagai puncak serapan yang menunjukkan adanya kitosan serta agen *crosslinking*. Puncak pada daerah bilangan gelombang 1100 cm^{-1} menunjukkan interaksi antara Fe-O-C yang menjadi indikator interaksi Fe_3O_4 dengan polimer maupun asam oleat. Peningkatan intensitas puncak pada daerah ini diikuti dengan melemahnya puncak OH didaerah bilangan gelombang 3500 cm^{-1} .

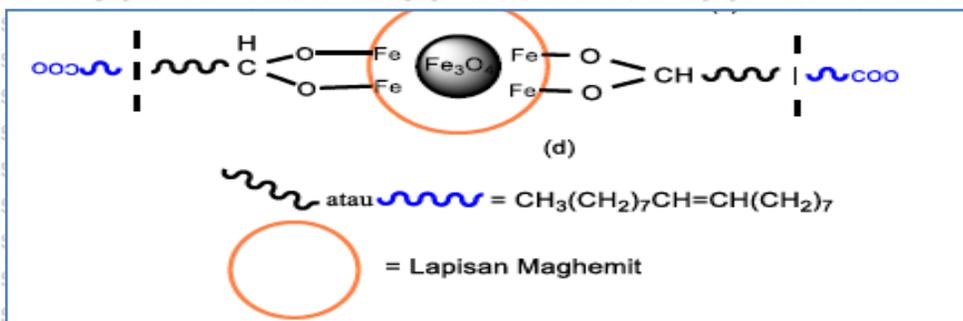
Pada komposisi yang lebih besar asam oleat dapat membentuk *bilayer* dipermukaan Fe_3O_4 . Hal ini telah dibuktikan pada penelitian sebelumnya yang telah dijelaskan dalam sub bab 5.2.2. Persamaan penelitian seperti yang telah dijelaskan pada sub bab 5.2.2 dengan penelitian ini adalah keduanya sama-sama menggunakan asam oleat sebagai *surface modifier*. Namun, perbedaan mendasar penelitian pendahuluan dengan penelitian ini adalah dalam penelitian ini *surface modifier* yang digunakan tidak hanya berupa asam oleat. Selain itu komposisi asam oleat yang digunakan dalam penelitian sebelumnya jauh lebih rendah ($25\text{-}150\text{ }\mu\text{L}$) dibandingkan komposisi asam oleat yang digunakan dalam penelitian ini. Oleh karena itu prosedur

sintesis yang dilakukan juga sedikit berbeda dengan penelitian ini. Adanya dua jenis *surface modifier* yang berbeda sifat hidrofilisitas tersebut menyebabkan pada penelitian ini komposisi asam oleat yang digunakan lebih banyak dari sebelumnya.

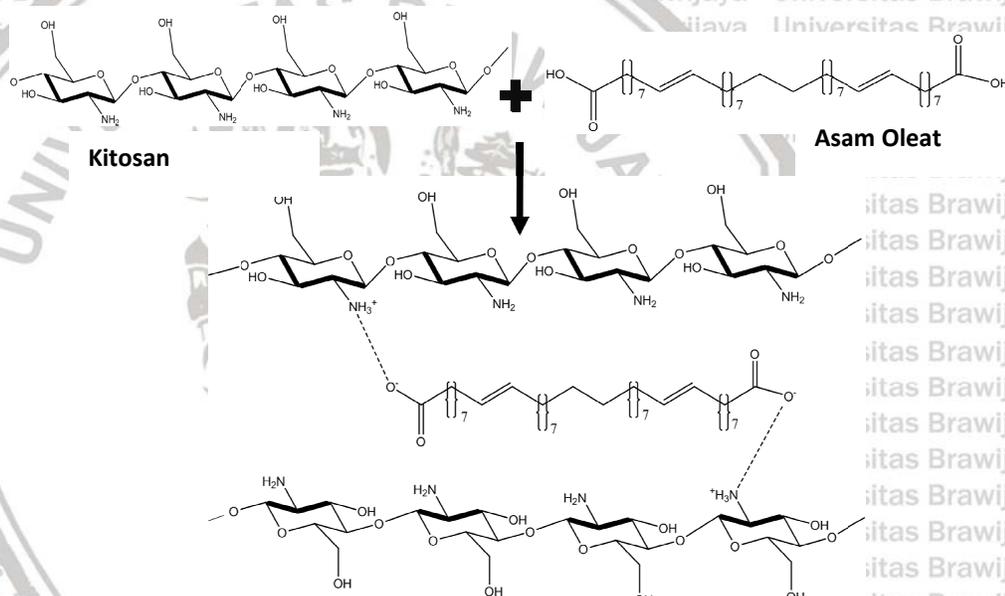
Apabila asam oleat yang digunakan lebih rendah komposisinya dapat menyebabkan *clustering* dan bentuk partikel menjadi tidak seragam. Namun komposisi yang berlebih juga dapat berpengaruh terhadap peningkatan ukuran partikel serta mempengaruhi kelarutannya dalam air.

Dalam pembentukan struktur *bilayer*, lapisan asam oleat pertama akan berada di permukaan Fe_3O_4 , sedangkan lapisan asam oleat kedua berinteraksi secara hidrofobik (dibatasi oleh garis putus-putus) dengan asam oleat pertama seperti disajikan pada Gambar 5.13. Apabila kondisi ini terjadi, maka dimungkinkan adanya peran asam oleat sebagai *crosslinker*. Asam oleat diprediksi dapat berinteraksi dengan kitosan melalui pertukaran proton (dari gugus karboksil ($-\text{COOH}$) pada asam oleat dengan gugus amina ($-\text{NH}_2$) bebas dari kitosan. Hal ini sesuai dengan penelitian Sailakshmi, *et al.* (2013), yang memungkinkan adanya interaksi antara gugus amina dan gugus karboksil secara elektrostatis.

Mekanisme reaksi yang mungkin terjadi antara asam oleat sebagai *crosslinker* pada kitosan ditunjukkan pada Gambar 5.14. Peran *crosslinker* dari asam oleat tersebut juga dapat mempengaruhi ukuran nanopartikel. Hal ini menyebabkan nanopartikel yang dihasilkan dengan penambahan asam oleat 1.5 mL lebih kecil dibandingkan penambahan asam oleat 0.5 mL.

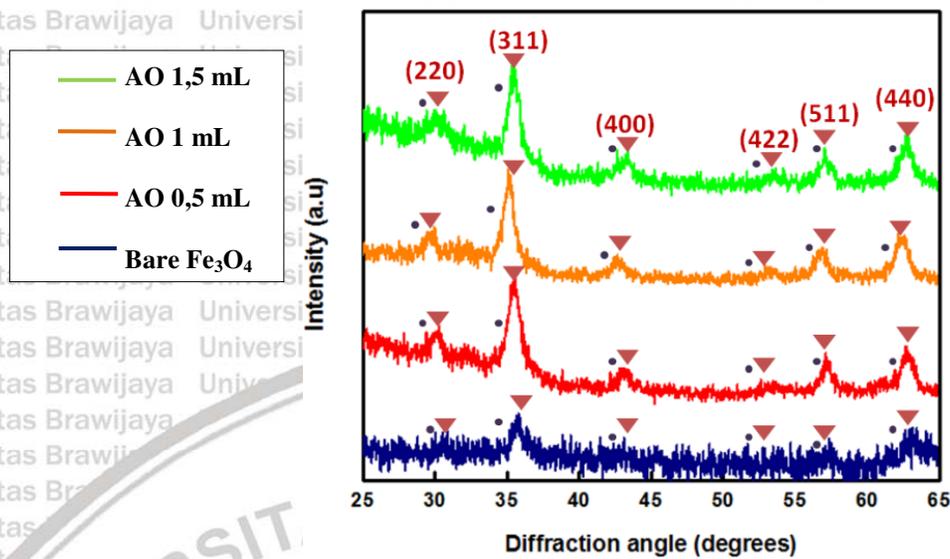


Gambar 5.13. Asam oleat dipermukaan Fe_3O_4 dapat membentuk struktur *bilayer*.



Gambar 5.14. Interaksi elektrostatis antara asam oleat dengan kitosan.

Karakterisasi selanjutnya dilakukan dengan XRD pada sampel nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan komposisi asam oleat berbeda dan pola difraksinya disajikan pada Gambar 5.15.



Gambar 5.15. Pola difraksi sinar-X pada nanopartikel dengan variasi komposisi asam oleat.

Data karakterisasi dengan XRD ini kemudian digunakan untuk menentukan ukuran kristalit nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan. Perhitungan dilakukan dengan persamaan *Debye-scherrer* termodifikasi dan disajikan pada Tabel 3. Berdasarkan hasil perhitungan, ukuran nanopartikel terkecil diperoleh dengan komposisi asam oleat sebanyak 1 mL. Berdasarkan data yang disajikan pada Tabel 3, diketahui bahwa penambahan asam oleat lebih dari 1 mL menyebabkan ukuran kristalit nanopartikel mengalami peningkatan. Oleh sebab itu, komposisi optimum asam oleat yang ditambahkan sebagai *surface modifier* dalam penelitian ini adalah 1 mL. Selain perhitungan ukuran kristalit, persentase Fe₃O₄ juga dapat ditentukan dengan mengolah data karakterisasi XRD.

Tabel 3. Ukuran dan komposisi besi oksida pada nanopartikel dengan variasi asam oleat.

Parameter	Ukuran kristalit (nm)	Fe ₃ O ₄ (%)	γ-Fe ₂ O ₃ (%)
Komposisi Asam			
Oleat (mL)			
0,5	9,82	85,98	14,05
1	4,73	97,90	2,10
1,5	5,69	98,73	1,27

Pengolahan data dilakukan dengan *software* MAUD dan disajikan pada Tabel 3.

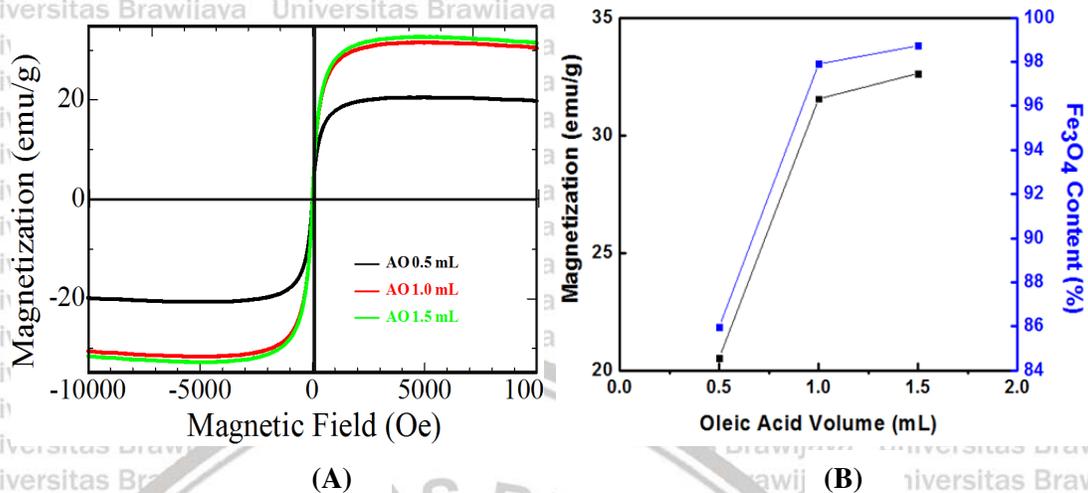
Berdasarkan perhitungan persentase Fe₃O₄ dengan *software* tersebut, diketahui bahwa Fe₃O₄ meningkat dengan semakin banyaknya asam oleat. Hal ini membuktikan bahwa asam oleat dapat berperan sebagai *surface modifier* untuk mencegah oksidasi dari Fe₃O₄ dalam membentuk γ-Fe₂O₃.

Sifat magnetik dari nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan variasi komposisi asam oleat ditentukan dari hasil karakterisasi dengan *vibrating sample magnetometry* (VSM). Dalam penelitian sebelumnya, penentuan sifat magnetik dilakukan dengan instrumentasi *electron spin resonance* (ESR). Pada prinsipnya ESR merupakan salah satu jenis spektroskopi untuk menunjukkan interaksi dari spin elektron bebas dengan medan magnet luar. Dalam pengamatan kemagnetan menggunakan ESR data yang dapat diperoleh berupa nilai faktor *g-lande* serta grafik absorpsi medan magnet oleh bahan. Faktor *g-lande* ini akan memberikan informasi tentang reaksi spin yang terjadi pada material. Perhitungan nilai faktor *g-lande* dapat diperoleh dengan memasukan hasil pengukuran nilai frekuensi dan arus dari sampel. Energi resonansi dari

nanopartikel Fe_3O_4 dapat diketahui dari kurva resonansi yang bisa menunjukkan karakteristik magnetik dari sampel. Apabila kemagnetan yang dimiliki oleh suatu sampel tinggi, energi yang dibutuhkan sampel untuk beresonansi dengan alat ESR kecil. Hal ini ditunjukkan dengan kurva resonansi pada osiloskop serta nilai faktor *g-lande* yang rendah. Sedangkan, apabila kemagnetan yang dimiliki sampel rendah atau sama sekali tidak ada, dibutuhkan energi yang lebih tinggi untuk membuat sampel dapat beresonansi dengan alat ESR, yang berarti nilai faktor *g-lande* juga akan tinggi.

Hasil perhitungan nilai faktor *g-lande* pada sampel nanopartikel Fe_3O_4 yang dilapisi PVA dan kitosan (pada sub bab 5.2.1) masing-masing 1,9 dan 1,7. Hal ini menunjukkan bahwa jenis *surface modifier* mempengaruhi besarnya nilai faktor *g-lande*. Menurut Aji (2014) diketahui bahwa nilai faktor *g-lande* ini juga berkorelasi dengan ukuran partikel. Semakin kecil ukuran partikel dapat menyebabkan semakin kecilnya nilai *g-lande*. Namun penentuan nilai faktor *g-lande* tersebut belum mampu menunjukkan sifat superparamagnetik dari material untuk dapat digunakan dalam aplikasi *drug delivery*. Oleh sebab itu dalam penelitian ini digunakan *vibrating sample magnetometry* (VSM) untuk menentukan nilai magnetik saturasi sekaligus koersivitas dari nanopartikel.

Hasil karakterisasi dengan VSM pada sampel nanopartikel dalam penelitian ini menghasilkan data berupa nilai saturasi magnetik (*magnetization*) dan nilai koersivitas yang dapat dilihat dari *loop hysteresis*. Hasil karakterisasi dengan VSM pada sampel nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan variasi komposisi asam oleat disajikan pada Gambar 5.16A.



Gambar 5.16. (A) Loop hysteresis pada sampel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan penambahan AO yang bervariasi. (B) Grafik hubungan antara nilai saturasi magnetik dan persen Fe₃O₄ pada sampel nanopartikel dengan komposisi AO yang berbeda.

Nilai magnetik saturasi yang diperoleh pada masing-masing sampel yaitu 20,53, 31,55, dan 32,63 emu/g untuk sampel dengan komposisi asam oleat sebanyak 0,5, 1, dan 1,5 mL. Hasil karakterisasi dengan VSM menunjukkan bahwa semakin tinggi komposisi asam oleat, nilai magnetik saturasinya akan semakin meningkat. Terdapat perbedaan yang signifikan dari nilai magnetik saturasi sampel nanopartikel dengan *bulk* Fe₃O₄. Aliakbari, *et al.* (2015) melaporkan bahwa *bulk* Fe₃O₄ memiliki nilai magnetik saturasi sebesar 62 emu/g. Perbedaan nilai magnetik saturasi tersebut dimungkinkan terjadi karena perubahan struktur dari *bulk* material menjadi nanopartikel. Selain itu terdapatnya *layer* non-magnetik dipermukaan Fe₃O₄ juga menjadi faktor yang sangat berpengaruh terhadap penurunan nilai magnetik saturasi nanopartikel dibandingkan *bulk* Fe₃O₄.

Terdapat korelasi yang linear antara nilai magnetik saturasi dengan persentase Fe_3O_4 pada sampel nanopartikel yang dihitung dengan MAUD *software* berbasis *Rietveld Refinement* dan disajikan pada Gambar 5.16B. Peningkatan magnetik saturasi terjadi seiring dengan meningkatnya persentase Fe_3O_4 pada sampel. Masing-masing sampel menunjukkan koersivitas yang rendah yaitu 6 Oe. Akibatnya nanopartikel (Fe_3O_4 -AO-kitosan) dapat diklasifikasikan memiliki sifat superparamagnetik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Jadhav, *et al.* (2013) yang menyebutkan bahwa superparamagnetik diindikasikan dengan nilai koersivitas yang rendah (<10 Oe). Nilai koersivitas yang rendah sangat diperlukan dalam penggunaan bahan magnetik sebagai agen *drug delivery*. Secara singkat dapat disimpulkan bahwa karakteristik nanopartikel Fe_3O_4 -asam oleat-kitosan dengan variasi asam oleat berbeda yang paling memenuhi karakter agen *drug delivery* diperoleh dengan penambahan asam oleat optimum 1 mL, hal ini dikarenakan bentuknya yang *spherical* dengan ukuran yang lebih kecil, dan sifatnya magnetik yang tergolong sebagai superparamagnetik.

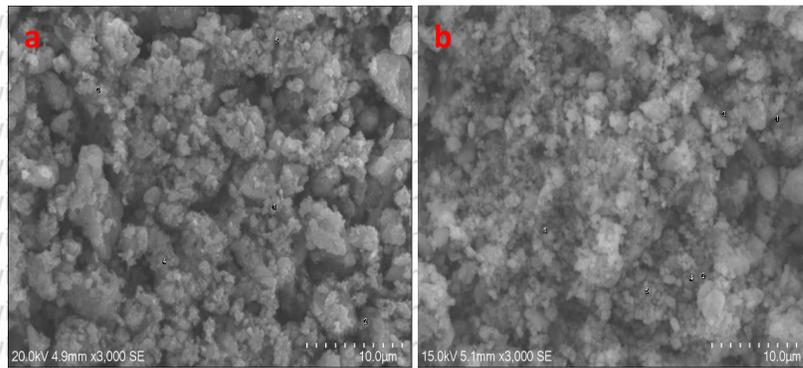
5.5 Pengaruh Konsentrasi Kitosan terhadap Nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan

Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan adalah investigasi terkait pembuatan nanopartikel Fe_3O_4 dengan modifikasi permukaan menggunakan satu jenis *surface modifier* yakni berupa kitosan (pada sub bab 5.2.1). Dalam penelitian tersebut diketahui bahwa adanya kitosan dapat menghambat pertumbuhan kristal Fe_3O_4 serta diprediksi mampu memecah cluster Fe_3O_4 yang terbentuk. Bagian kecil kristal Fe_3O_4

ini kemudian berinteraksi dengan molekul kitosan secara elektrostatis untuk membentuk kristal kitosan- Fe_3O_4 .

Nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan yang terikat silang TPP dan sulfat juga telah disintesis di dalam penelitian ini secara kopresipitasi *ex-situ* dengan menggunakan komposisi AO optimum (1 mL), TPP:sulfat 7,5%:7,5%, namun dengan variasi konsentrasi kitosan. Penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh konsentrasi kitosan terhadap nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan membandingkan dua konsentrasi (kitosan) yaitu 0,5% dan 1%. Seperti halnya penentuan pengaruh variasi metode sintesis dan komposisi asam oleat, nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan yang dihasilkan dengan variasi konsentrasi kitosan juga dikarakterisasi dengan SEM, XRD, dan FTIR.

Dalam interaksinya dengan Fe_3O_4 , kitosan akan lebih mudah memecah *cluster* Fe_3O_4 untuk membentuk kitosan- Fe_3O_4 sehingga ukurannya menjadi lebih kecil, namun hal ini tidak terjadi untuk Fe_3O_4 -asam oleat dalam membentuk Fe_3O_4 -asam oleat-kitosan. Hal ini kemungkinan dikarenakan muatan negatif dipermukaan Fe_3O_4 sebelum terlapisi asam oleat lebih banyak dibandingkan muatan negatif pada Fe_3O_4 -asam oleat untuk berinteraksi secara elektrostatis dengan kitosan yang bermuatan positif. Hasil karakterisasi dengan SEM memberikan informasi morfologi permukaan serta ukuran partikel. Hasil SEM morfologi permukaan nanopartikel Fe_3O_4 -OA-kitosan dengan konsentrasi kitosan berbeda disajikan pada Gambar 5.17, dan data ukuran partikelnya dapat dilihat pada Tabel 4.



Gambar 5.17. Hasil SEM Morfologi permukaan Nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan konsentrasi komposisi OA 1 mL, rasio TPP:Sulfat 7,5%:7,5% dan konsentrasi kitosan berbeda (a) 1%, (b) 0.5% masing-masing dengan perbesaran 3000x.

Tabel 4. Ukuran partikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan.

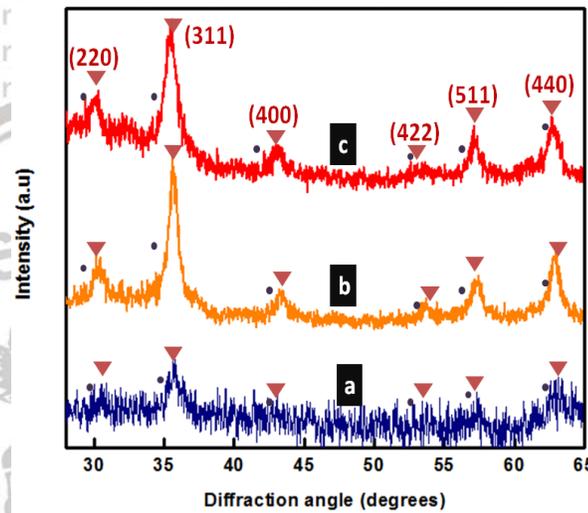
Parameter	Ukuran Partikel (nm)
Konsentrasi Kitosan (%)	
0,5	200-333
1,0	199-386

Morfologi permukaan nanopartikel yang diperoleh menunjukkan *spherical shape* dari nanopartikel. Namun ukuran partikel sampel pada konsentrasi kitosan 1% terlihat lebih besar dibandingkan ukuran partikel sampel dengan konsentrasi kitosan 0,5%.

Hal ini kemungkinan dapat disebabkan pada komposisi *crosslinker* yang sama namun dengan konsentrasi kitosan berbeda dapat menyebabkan adanya molekul kitosan yang tidak terikat silang TPP dan sulfat sehingga ukurannya menjadi lebih besar.

Selain karakterisasi dengan SEM, nanopartikel dengan variasi kitosan juga dikarakterisasi dengan XRD untuk menentukan struktur kristal, ukuran kristalit, dan kelimpahan fasa besi oksida pada masing-masing sampel. Pola difraksi sinar-X yang

dihasilkan dari karakterisasi XRD menunjukkan bahwa puncak difraktogram berada pada posisi 2θ yang sesuai untuk Fe_3O_4 dengan struktur kubus inverse spinel. Pola difraksi sinar-X pada nanopartikel dengan variasi konsentrasi kitosan disajikan pada Gambar 5.18.



Gambar 5.18. Pola difraksi sinar-X pada nanopartikel (a) *bare* Fe_3O_4 , dan nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan (b) 0,5% dan (c) 1%.

Pola difraksi sinar-X pada nanopartikel *bare* Fe_3O_4 dan Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan menunjukkan pola yang mirip, dimana puncak-puncak difraksi muncul pada posisi 2θ yang hampir sama untuk setiap sampel. Hal ini mengindikasikan bahwa *coating* kitosan tidak menyebabkan terjadinya perubahan struktur kristal. Sementara itu lebar dan intensitas puncak difraksi terlihat berbeda untuk masing-masing sampel. Selanjutnya data karakterisasi XRD ini digunakan untuk menentukan ukuran kristalit.

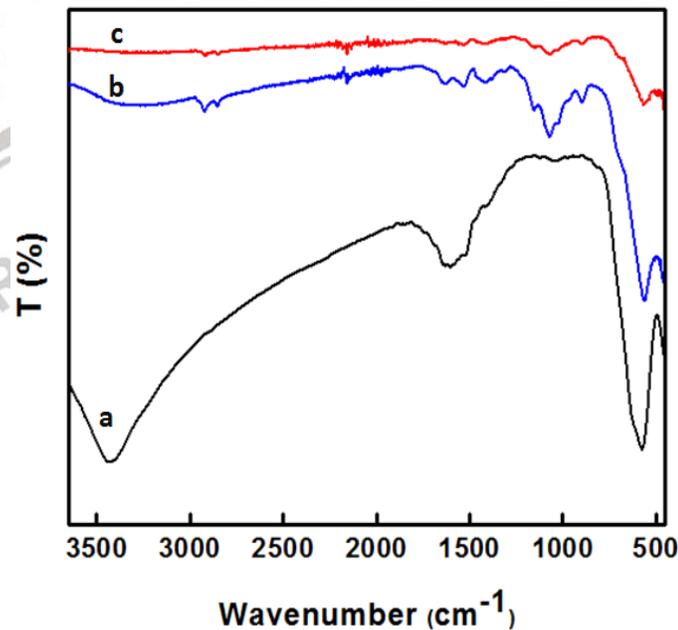
Perhitungan ukuran kristal dilakukan dengan mengolah data karakterisasi XRD menggunakan persamaan *Debye Scherrer* termodifikasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi kitosan tidak berpengaruh signifikan terhadap perubahan ukuran kristalit. Peningkatan konsentrasi kitosan dari 0,5% menjadi 1% mengakibatkan terjadinya penurunan ukuran kristalit nanopartikel dari 9,93 nm menjadi 9,82 nm. Ukuran nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Ukuran dan Komposisi Besi Oksida Nanopartikel dengan Variasi Kitosan.

Parameter	Ukuran kristalit (nm)	Fe ₃ O ₄ (%)	γ-Fe ₂ O ₃ (%)
Konsentrasi Kitosan (%)			
0,5	9,93	94,58	5,42
1	9,82	85,98	14,02

Penurunan ukuran kristalit yang tidak signifikan tersebut kemungkinan disebabkan oleh adanya mekanisme interaksi yang berbeda. Dimana dalam penelitian sebelumnya Fe₃O₄ langsung berinteraksi dengan kitosan sebagai *surface modifier*, sedangkan dalam penelitian ini Fe₃O₄ yang terlapis oleh asam oleat yang kemudian akan berinteraksi dengan kitosan. Penelitian Vargas, *et al.* (2008) terkait pembuatan komposit dengan komposisi yang terdiri asam oleat dan kitosan menunjukkan ukuran partikel yang dihasilkan dipengaruhi oleh komposisi asam oleat.

Penentuan keberadaan gugus fungsi dari molekul kitosan sebagai *surface modifier* pada Fe_3O_4 dilakukan dengan karakterisasi menggunakan FTIR. Spektra FTIR yang diperoleh untuk sampel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan disajikan pada Gambar 5.19.



Gambar 5.19. Spektra FTIR nanopartikel (a) *bare* Fe_3O_4 , dan nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan (b) 0,5%, (c) 1%.

Keberadaan serapan pada daerah bilangan gelombang 1317 cm^{-1} merupakan puncak serapan yang berkorespondensi terhadap vibrasi C-N dari kitosan. Serapan tersebut hanya terdapat pada sampel Fe_3O_4 yang dimodifikasi permukaannya, namun tidak terlihat pada *bare* Fe_3O_4 . Serapan puncak karakteristik untuk vibrasi C-N mengalami penurunan intensitas pada nanopartikel dengan konsentrasi kitosa 0,5%. Selain itu keberadaan kitosan juga diperkuat dengan munculnya puncak serapan di daerah 1422 cm^{-1} yang diprediksi merupakan puncak dari gugus CH_2 kitosan dalam CH_2OH

group. Data FTIR ini telah menunjukkan bahwa kitosan terdapat pada sampel nanopartikel dan berperan sebagai *surface modifier* pada Fe₃O₄.

Efek fungsional permukaan dari nanopartikel menjadi suatu hal yang menarik untuk dipelajari dikarenakan karakter permukaan nanopartikel akan berpengaruh terhadap interaksinya dengan beberapa protein dan sel dalam sistem *in-vivo*.

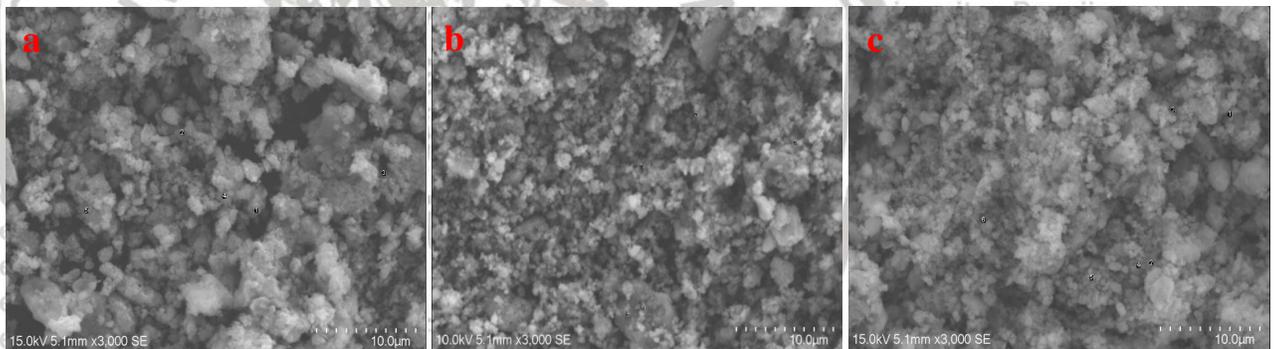
Umumnya partikel dianggap sebagai benda asing dan dapat mengalami proses opsonisasi oleh makrofag dalam tubuh. Faktor permukaan ini perlu diperhatikan untuk mempertahankan stabilitas nanopartikel selama proses distribusinya menuju ke sel target agar tidak mengalami pembuangan oleh sistem retikulum endotelial.

Karakteristik permukaan seperti sifat hidrofobisitas, muatan, dan gugus fungsi berperan dalam mempertahankan stabilitas nanopartikel. Permukaan nanopartikel yang bersifat hidrofilik dapat melindungi nanopartikel dari proses opsonisasi sekaligus mampu mempertahankan stabilitasnya di dalam sirkulasi darah sehingga tidak dikenali oleh sistem imun tubuh. Oleh sebab itu adanya kitosan hydrophilic sebagai *surface modifier* di bagian permukaan nanopartikel dapat meningkatkan biokompatibilitas dari agen *drug delivery*.

Secara singkat berdasarkan hasil karakterisasi dengan SEM, XRD, dan FTIR, dapat disimpulkan bahwa variasi konsentrasi kitosan tidak berpengaruh signifikan terhadap perubahan ukuran kristalit, ukuran partikel, serta adanya kitosan ditunjukkan dengan serapan di daerah 1317 dan 1422 cm⁻¹ masing-masing untuk gugus C-N dan CH₂ dari kitosan.

5.6 Pengaruh Rasio Konsentrasi TPP:sulfat terhadap Nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan

Preparasi Fe₃O₄-AO-kitosan dengan variasi rasio konsentrasi TPP :sulfat namun dengan komposisi AO dan kitosan yang konstan (masing-masing AO 1 mL, konsentrasi kitosan 1%) telah diinvestigasi. Karakteristik fisik nanopartikel yang meliputi morfologi, ukuran, persentase Fe₃O₄, serta keberadaan gugus fungsi *crosslinker* ditentukan dengan karakterisasi menggunakan SEM, XRD, dan FTIR. Morfologi permukaan pada nanopartikel diamati dengan SEM dan disajikan pada Gambar 5.20.



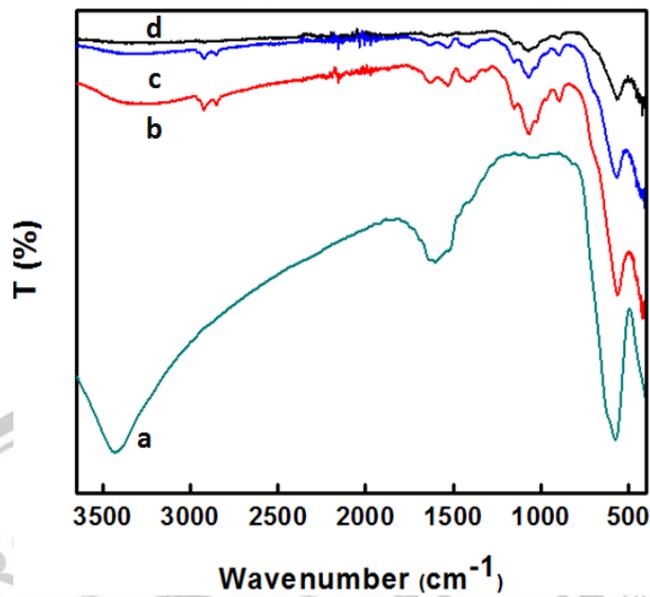
Gambar 5.20. Morfologi permukaan Nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan konsentrasi kitosan 1% dan komposisi OA 1 mL, namun rasio TPP:Sulfat berbeda (a) 2,5%:7,5%, (b) 5%:7,5%, dan (c) 7,5%:7,5% masing-masing dengan perbesaran 3000x.

Dari hasil karakterisasi SEM terlihat nanopartikel berbentuk *spheric*. Pembentukan *spherical shape* tersebut dipengaruhi oleh adanya *crosslinker* TPP dan sulfat. Seluruh sampel nanopartikel dalam penelitian ini hampir seluruhnya berbentuk *spheric* karena adanya kontribusi dari agen *crosslinker*. Dalam bentuk *aqueous*, struktur kitosan dapat mengalami pelebaran konformasi dan menjadi lebih fleksibel

(Lee, *et al.* (2013) dan Obaidat, *et al.* (2010)). Hal ini terjadi karena adanya tolakan dari muatan elektrostatik yang dihasilkan oleh polimer kitosan tersebut. Struktur yang fleksibel dari kitosan sangat mendukung pembentukan *spherical shape* dari nanopartikel ketika kitosan berinteraksi intramolekular dengan crosslinker TPP dan sulfat. Hasil ini sesuai dengan penelitian Shu and Zhu (2002) yang menyebutkan bahwa kombinasi antara TPP dan sulfat berperan dalam pembentukan *spherical morphology* dari nanopartikel.

Untuk memastikan keberadaan *crosslinker* TPP dan sulfat yang berkontribusi terhadap *spherical shape* pada masing-masing sampel nanopartikel, maka identifikasi gugus fungsi telah dilakukan dengan instrument FTIR. Spektra FTIR pada sampel nanopartikel dengan variasi rasio konsentrasi TPP:sulfat disajikan pada Gambar 5.21. Pada spektra FTIR tersebut keberadaan gugus fungsi TPP ditunjukkan oleh serapan P-O-P stretching yang muncul pada daerah *fingerpint* yaitu pada daerah bilangan gelombang 892 cm^{-1} (Mwangi, *et al.* (2016)).

Dalam sub-bab sebelumnya telah disebutkan bahwa keberadaan kitosan salah satunya ditunjukkan dengan puncak serapan pada bilangan gelombang 1317 cm^{-1} yang berkorespondensi terhadap vibrasi C-N. Intensitas dari serapan yang menunjukkan adanya kitosan ini semakin menurun dengan meningkatnya rasio konsentrasi TPP:sulfat untuk membentuk nanopartikel. Hal tersebut mengindikasikan bahwa interaksi yang terjadi antara TPP dan sulfat dengan kitosan terjadi secara ionic (Mwangi, *et al.* (2016)).



Gambar 5.21. (a) Spektra FTIR nanopartikel *bare* Fe₃O₄ serta Spektra FTIR nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dengan komposisi AO 1 mL, kitosan 1%, dan rasio konsentrasi TPP:Sulfat (b)7,5:7,5% (c) 5:7,5%, dan (d) 2,5:7,5%.

Menurut Fernandes, *et al.* (2005), interaksi antara kitosan dan sulfat ditunjukkan dengan serapan FTIR didaerah bilangan gelombang 1.113 cm⁻¹ (S-O *stretching*) dan 618 cm⁻¹ (S-O *bending*). Puncak FTIR didaerah bilangan gelombang tersebut tidak terlalu tajam kemungkinan dikarenakan konsentrasi sulfat yang kecil dan interaksinya dengan kitosan yang terjadi secara ionik. Secara umum, gugus *tripolyphosphoric* dari TPP dan gugus sulfat dari natrium sulfat akan berinteraksi dengan gugus amina dari kitosan. Interaksi tersebut memicu proses *gelasi ionic* yang menyebabkan terjadinya konversi kitosan polimer dalam membentuk nanopartikel yang *spherical*.

Penentuan ukuran kristalit dan persentase Fe₃O₄ pada nanopartikel dengan rasio TPP:sulfat yang bervariasi dilakukan dengan pengolahan data karkterisasi XRD. Hasil pengolahan data tersebut disajikan pada Tabel 6. Berdasarkan data pada Tabel

6, Semakin tinggnyai rasio TPP:sulfat menyebabkan ukuran partikel dan ukuran kristalit yang dihasilkan menjadi semakin kecil. Selain itu terjadi peningkatan fasa magnetite (Fe_3O_4) dengan semakin kecilnya ukuran nanopartikel Adanya interaksi kitosan dengan TPP dan sulfat berpengaruh terhadap ukuran nanopartikel.

Tabel 6. Ukuran dan persentase besi oksida dengan rasio TPP:sulfat bervariasi.

Parameter	Ukuran kristalit ^a (nm)	Ukuran Partikel ^b (nm)	Fe_3O_4 (%)	$\gamma-Fe_2O_3$ (%)
Rasio konsentrasi				
TPP:Sulfat (w/v %)				
2,5 : 7,5	11,21	209-331	88,41	11,59
5 : 7,5	7,40	171-237	93,46	6,54
7,5 : 7,5	4,73	94-149	97,90	2,10

^a Perolehan data berdasarkan pengolahan data hasil karakterisasi XRD

^b Perolehan data berdasarkan hasil karakterisasi SEM

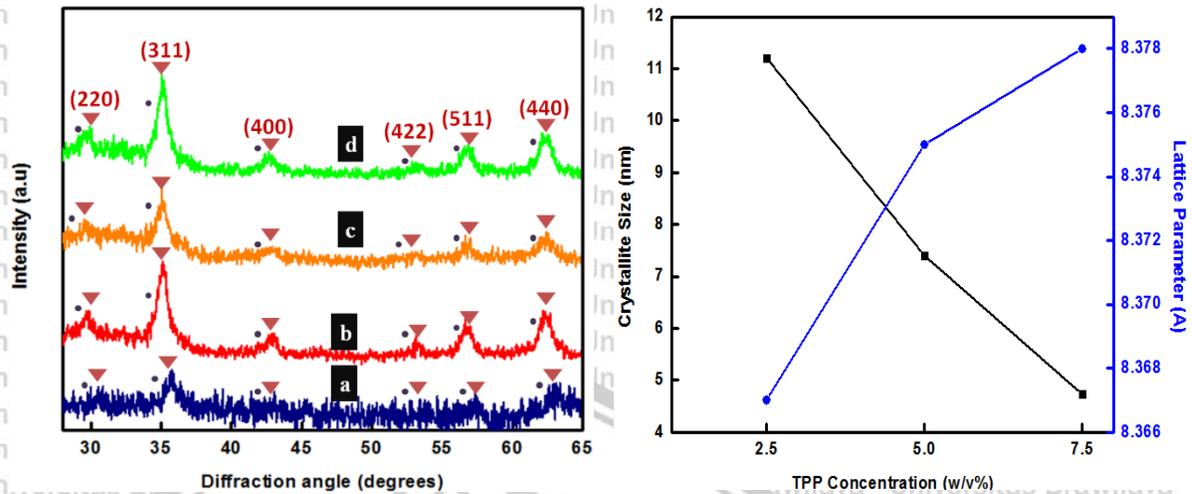
Hasil penelitian Jonassen, *et al.* (2012) juga mendukung data hasil penelitian ini.

Tingginya rasio konsentrasi TPP terhadap kitosan dapat memperkecil kemungkinan terjadinya pembentukan partikel dengan ukuran lebih besar apabila proses *gelasi ionic* terjadi dalam waktu yang singkat tidak lebih dari 24 jam. Berbeda dengan pengaruh konsentrasi kitosan pada sub bab 5.4, perubahan rasio konsentrasi agen *crosslinking* TPP dan sulfat menunjukkan adanya penurunan ukuran nanopartikel. Peningkatan konsentrasi TPP dari 2,5% menjadi 7,5% memberikan pengaruh terhadap penurunan ukuran kristalit dan partikel. Ukuran terkecil diperoleh dengan konsentrasi TPP 7,5%. Hal ini menunjukkan bahwa rasio konsentrasi TPP:sulfat yang

optimum untuk menghasilkan ukuran terkecil dan kemurnian Fe_3O_4 tertinggi adalah 7,5%:7,5%.

Pola difraksi sinar-X pada nanopartikel Fe_3O_4 dan Fe_3O_4 -AO-kitosan dengan rasio konsentrasi *crosslinker* yang berbeda disajikan pada Gambar 5.22A. Analisis terhadap pola difraksi tersebut menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan struktur kristal dari Fe_3O_4 dengan adanya agen *crosslinker*. Namun terjadi perubahan ukuran kristalit dan parameter kisi. Terdapat korelasi antara konsentrasi TPP dengan perubahan parameter kisi. Semakin tinggi konsentrasi TPP menyebabkan ukuran kristalit menurun. Akibatnya nilai parameter kisi mengalami peningkatan. Parameter kisi mencerminkan jarak ikatan antara atom Fe dan O dalam struktur magnetik nanopartikel. Semakin tingginya konsentrasi TPP berpengaruh pada semakin kecilnya ukuran kristalit dan semakin besarnya jarak antara atom Fe dan O dalam struktur nanopartikel, Korelasi tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.22B.

Berdasarkan JCPDS File19-629 untuk Fe_3O_4 dan JCPDS File 39-1346 untuk $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, parameter kisi (*lattice parameter*) Fe_3O_4 dan $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ masing-masing adalah 8.396Å dan 8.346Å. Hasil XRD menunjukkan sampel nanopartikel yang dihasilkan dalam penelitian ini memiliki nilai parameter kisi yang berada diantara nilai parameter kisi untuk Fe_3O_4 dan $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Hal tersebut menegaskan bahwa sampel mengandung dua komponen besi oksida tersebut. (Cornell and Schwertmann, (2006)).



Gambar 5.22. (A) Pola difraksi nanopartikel (a) bare Fe_3O_4 , dan nanopartikel Fe_3O_4 -AO-Kitosan dengan rasio konsentrasi TPP:Sulfat (b) 7,5:7,5% (c) 5:7,5%, dan (d) 2,5:7,5%. (B) Grafik korelasi antara konsentrasi TPP dengan ukuran kristalit dan parameter kisi.

Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh penelitian sebelumnya namun dengan menggunakan satu jenis *surface modifier* yaitu PVA. Hasil penelitian menunjukkan nilai parameter kisi yang juga berkorelasi dengan ukuran kristalit meskipun dalam penelitian tersebut digunakan agen *crosslinking* yang berbeda. Agen *crosslinking* yang digunakan sebelumnya adalah glutaraldehid. Pengaruh glutaraldehid sebagai agen pengikat silang pada PVA hampir sama dengan TPP pada kitosan. Namun dalam penelitian ini glutaraldehid tidak digunakan sebagai agen *crosslinking* karena beberapa referensi melaporkan bahwa penggunaan glutaraldehid untuk sistem *in-vivo* terkadang dapat menyebabkan iritasi. Oleh sebab itu penggunaan glutaraldehid yang tidak kompatibel sebaiknya diminimalisir khususnya dalam pembuatan nanopartikel sebagai kandidat agen *drug delivery*.

Secara singkat berdasarkan hasil karakterisasi dengan SEM, XRD, dan FTIR, dapat disimpulkan bahwa variasi konsentrasi *crosslinker* berpengaruh terhadap ukuran kristalit, ukuran partikel, dan persentase besi oksida, serta menunjukkan penurunan intensitas puncak serapan C-N di daerah 1317 cm^{-1} yang menandakan bahwa semakin tingginya kelimpahan *crosslinker* untuk berinteraksi dengan kitosan secara ionik. Ukuran yang lebih kecil diperoleh dengan penambahan agen *crosslinking* dengan rasio komposisi yang lebih tinggi.

5.7 Analisis Karakteristik *Drug Delivery* Nanopartikel Fe_3O_4 -AO-Kitosan

Nanopartikel yang telah dimodifikasi permukaannya dengan asam oleat dan kitosan kemudian diuji efisiensi *drug loading* dan profil *drug release* dengan model obat doxorubicin (DOX). *Drug loading* dapat diartikan sebagai kemampuan nanopartikel dalam proses pengembanan obat. Proses *drug loading* diterapkan untuk sampel dengan variasi komposisi asam oleat (0,5; 1; dan 1,5 mL) serta pada sampel dengan konsentrasi kitosan 0,5% dan 1%. Tujuannya adalah untuk mengetahui sampel mana yang memiliki efisiensi pengembanan tertinggi. Efisiensi yang lebih tinggi juga dapat digunakan untuk memprediksi interaksi antara obat dengan komponen dari nanopartikel. Sementara itu, profil *drug release* dapat diartikan sebagai kemampuan nanopartikel dalam pelepasan obat. Dalam proses *drug release* digunakan larutan media berupa PBS yang dikondisikan pada kondisi pH asam dan pH netral dan suhu 37°C . Hal ini dimaksudkan untuk merepresentasikan kondisi sel kanker dan kondisi fisiologis. Penentuan konsentrasi obat yang terembankan maupun yang

dilepaskan dari nanopartikel dilakukan dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer *visible* pada panjang gelombang maksimum dari DOX.

5.7.1 *Drug Loading* pada Nanopartikel Fe₃O₄-AO-Kitosan

Dalam proses *drug loading*, obat doxorubicin dilarutkan ke dalam larutan buffer fosfat (PBS) pH 7,4 (konsentrasi DOX yang disiapkan untuk *drug loading* adalah 25 mg/L). Selanjutnya sebanyak 10 mg nanopartikel ditambahkan ke dalam larutan obat doxorubicin dan diaduk selama 1 jam. Pada menit awal, dapat diamati bahwa nanopartikel mengambang diatas larutan meskipun telah dihomogenkan melalui pengadukan dengan *magnetic stirrer*. Namun, setelah beberapa menit terlihat bahwa nanopartikel akan mulai mengendap ke bagian dasar larutan. Hal ini menunjukkan bahwa nanopartikel mengalami *swealling* dan memiliki massa lebih berat sehingga bergerak turun ke dasar larutan. Penentuan efisiensi *drug loading* dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan doxorubicin sebelum dan sesudah ditambahkan nanopartikel pada panjang gelombang 480 nm.

Dalam penelitian ini tidak dilakukan uji efisiensi *drug loading* pada nanopartikel *bare* Fe₃O₄. Hal ini dikarenakan *bare* Fe₃O₄ memiliki stabilitas yang lebih rendah dibandingkan Fe₃O₄ yang dimodifikasi permukaannya. Selanjutnya sampel kitosan dengan konsentrasi yang berbeda selanjutnya akan digunakan dalam pengujian *drug loading* untuk melihat pengaruh konsentrasi kitosan terhadap efisiensi pengembanan obat.

Efisiensi pengembanan DOX disajikan pada Tabel 7. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nanopartikel dengan komposisi kitosan yang lebih rendah menghasilkan efisiensi *drug loading* yang lebih tinggi.

Tabel 7. Efisiensi *drug loading* (doxorubicin) pada sampel nanopartikel.

Konsentrasi Kitosan (w/v %)	Komposisi Asam Oleat (mL)	<i>Drug Loading Efficiency</i> (%)
0,5	1	45,45
1	1	34,10
1	1	32,65
1	1,5	34,78

Hal ini membuktikan bahwa DOX tidak berinteraksi dengan kitosan. Xu, *et al* (2013) melaporkan bahwa pada dasarnya DOX cenderung berinteraksi secara ionik dengan gugus asam karboksilat (dari asam oleat). Interaksi ionik tersebut dapat terjadi karena pada kondisi pH netral, asam karboksilat mengalami deprotonasi membentuk ion karboksilat yang bermuatan negatif. Sementara itu, Doxorubicin mengalami protonasi membentuk ion ammonium yang bermuatan positif. Namun terkadang dalam suatu struktur yang lebih kompleks, pengembanan obat tidak hanya dipengaruhi oleh interaksi ionik saja. Adanya efek hidrofobisitas dalam interaksi yang lemah juga dapat berkontribusi dalam pengembanan obat. Dalam penelitian ini efisiensi *drug loading* DOX pada Fe₃O₄-AO-kitosan tertinggi adalah 45,45%.

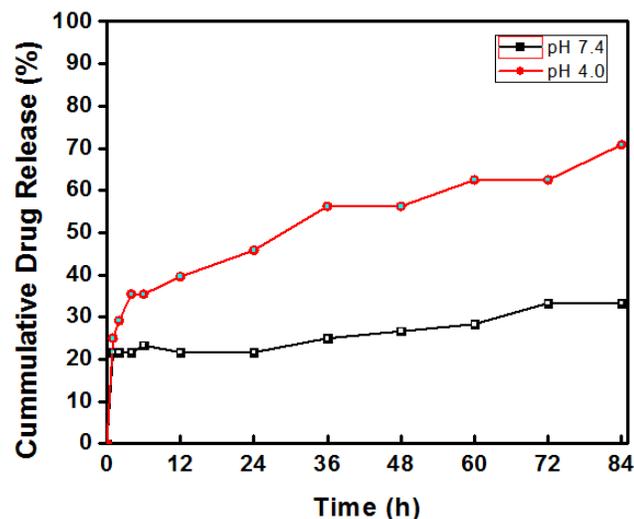
5.7.2 *Drug Release* Nanopartikel Fe₃O₄-AO-Kitosan

Pelepasan obat DOX dari nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan dilakukan dalam medium larutan PBS dengan pH yang berbeda. Sebanyak 5 mg nanopartikel-DOX

yang telah dikeringkan dengan *freeze dryer* dimasukkan ke dalam tabung dialysis yang berisi 5-10 mL larutan PBS. Dalam hal ini tabung dialysis berperan sebagai membrane semi-permeable dan larutan PBS berfungsi sebagai larutan donor.

Selanjutnya tabung dialysis yang berisi nanopartikel dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi 80-100 mL larutan PBS. Larutan PBS dalam gelas kimia berfungsi sebagai larutan *receiver*. Secara teoritis obat akan keluar dari nanopartikel dan melewati tabung dialysis menuju ke larutan *receiver*. Selanjutnya absorbansi larutan *receiver* diamati dari menit ke 0 hingga 84 jam dengan interval waktu tertentu untuk menentukan persentase obat yang keluar dari nanopartikel dan melewati membran.

Profil *drug release* dari nanopartikel disajikan pada Gambar 5.23.



Gambar 5.23. Profil pelepasan doxorubicin (DOX) dari nanopartikel Fe₃O₄-AO-chitosan.

Berdasarkan hasil pengukuran dengan spektrofotometer *visible* pada panjang gelombang maksimum DOX (480 nm), diketahui bahwa pelepasan obat sangat dipengaruhi oleh pH medium. Persentase *drug release* meningkat pada kondisi pH

yang lebih rendah. Hal ini dimungkinkan terjadi akibat struktur kitosan dalam nanopartikel tidak stabil dalam kondisi asam ($pK_a = 6,5-6,8$) (Patil *et al.*, 2016).

Selain itu, gugus asam karboksilat dari asam oleat ($pK_a = 4,8$) (Janke *et al.*, 2014) juga akan mengalami protonasi pada kondisi pH yang lebih rendah.

Lemahnya interaksi antara DOX dan gugus asam karboksilat dari asam oleat mengakibatkan lepasnya DOX dari nanopartikel. Hal ini juga mendukung fakta bahwa pengembangan DOX terjadi akibat kombinasi dari interaksi ionic dan efek hidrofobik. Dalam kondisi pH asam (pH 4,0) yang merepresentasikan kondisi sel kanker, persentase kumulatif pelepasan DOX mencapai 70,83% dalam waktu 84 jam. Sementara itu, pada kondisi pH fisiologis (pH 7,4), persentase kumulatif pelepasan DOX hanya 33,33%. Hal ini mengindikasikan bahwa nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan memiliki sifat sensitif terhadap pH dan mampu memberikan respon pelepasan obat yang lebih maksimal dalam kondisi sel kanker dibandingkan pada kondisi fisiologis sel normal.

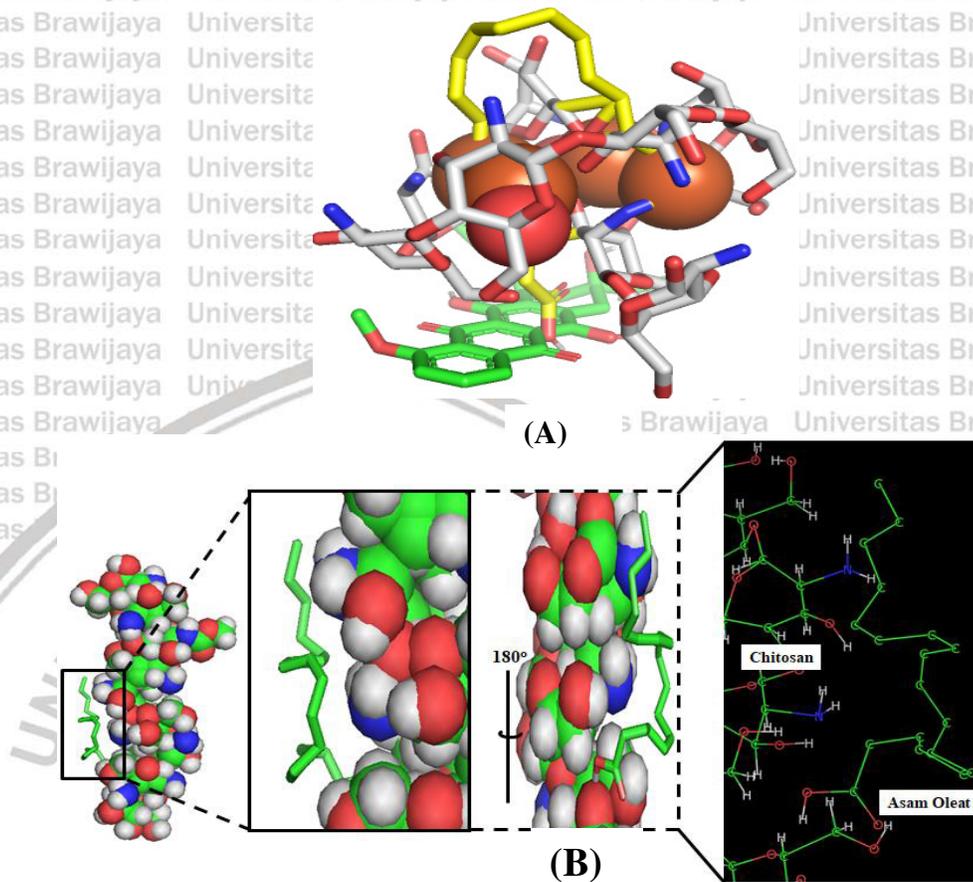
5.8 Analisis Interaksi antara Nanopartikel dengan Obat Doxorubicin secara *In-Silico*

Analisis stabilitas nanopartikel dikaji melalui komputasi secara *in-silico* dengan sistem *molecular docking* menggunakan program Hex 8.0. Interaksi yang terjadi pada nanopartikel dengan komposisi Fe_3O_4 -AO-Kitosan menghasilkan nilai *binding energy* sebesar -127,15 J/mol. Namun, terjadi perubahan nilai *binding energy* menjadi -265,16 J/mol setelah nanopartikel diembankan molekul obat yang berupa

Doxorubicin. Nilai *binding energy* nanopartikel yang semakin negatif menunjukkan semakin kuat ikatan yang terjadi dalam strukturnya.

Interaksi yang terjadi pada nanopartikel yang telah terikat dengan Doxorubicin disajikan pada Gambar 5.24A. Berdasarkan gambar tersebut dapat dilihat bahwa DOX cenderung terikat pada molekul asam oleat, sedangkan Fe_3O_4 di bagian *core/inti* dari keseluruhan struktur nanopartikel dengan asam oleat-kitosan di bagian *shell*. Interaksi antara asam oleat dan kitosan dipermukaan Fe_3O_4 belum terlihat cukup jelas. Namun dalam komposisi asam oleat yang lebih rendah dimungkinkan terjadinya kompetisi antara asam oleat dengan kitosan untuk berikatan dengan Fe_3O_4 .

Hal ini dimungkinkan karena kitosan memiliki gugus amina ($-\text{NH}_2$) yang dapat berinteraksi secara elektrostatik dengan permukaan Fe_3O_4 yang terdiri dari gugus (OH^-). Namun dalam komposisi asam oleat yang lebih tinggi maka Asam oleat akan cenderung berikatan dengan Fe_3O_4 sedangkan kitosan cenderung berinteraksi dengan asam oleat dipermukaan nanopartikel $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-AO}$ seperti ditunjukkan pada Gambar 5.24B. Kitosan dapat berperan sebagai *shell* dibagian permukaan nanopartikel. Interaksi yang terjadi pada kitosan dan asam oleat dapat berupa interaksi elektrostatik antara gugus amina ($-\text{NH}_2$) kitosan dengan gugus karboksil ($-\text{COOH}$) dari asam oleat. Hasil *molecular docking* ini mendukung data hasil penelitian yang sebelumnya telah diperoleh dari karakterisasi dengan SEM, FTIR, dan XRD.



Gambar 5.24. (A) Prediksi interaksi nanopartikel dengan DOX, (B) Prediksi interaksi kitosan dan asam oleat sebagai *surface modifier* pada struktur nanopartikel.

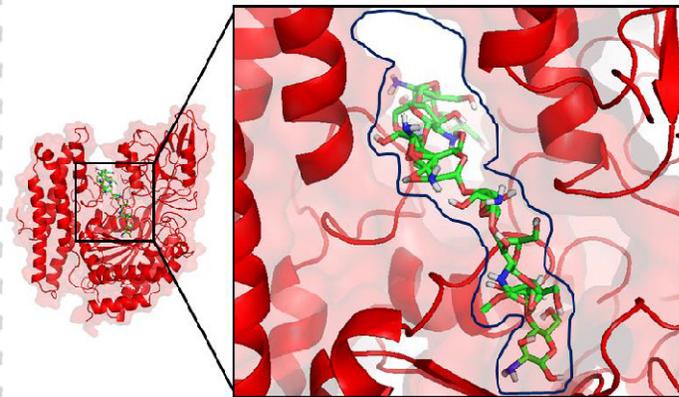
5.9 Analisis Interaksi antara Nanopartikel dengan Reseptor Sel secara *In-Silico*

Nanopartikel diinjeksikan ke tubuh dan didistribusikan menuju ke sel target melalui aliran darah. Pada dasarnya nanopartikel sebagai agen *drug delivery* diharapkan hanya mempengaruhi sel kanker namun tidak merusak sel normal. Cara membedakan sel kanker dari sel normal adalah bahwa sel kanker memiliki kondisi ekstraselular yang lebih asam dibandingkan sel normal, selain itu sel kanker juga terdapat memiliki reseptor ligan yang mengalami *overexpression* di permukaannya.

Dalam penelitian ini digunakan metode *in-silico* untuk memprediksi interaksi yang terjadi antara nanopartikel dengan salah satu reseptor di membran sel. Reseptor transferin merupakan salah satu jenis protein yang dapat berikatan dengan iron.

Reseptor transferin diregulasi dan mengalami *overexpression* pada kebanyakan permukaan sel kanker dengan berbagai tipe. Oleh sebab itu reseptor transferin dapat membantu mengarahkan nanopartikel untuk menuju ke sel kanker namun tidak mempengaruhi sel normal. Selain itu nanopartikel dapat berinteraksi dengan reseptor ligan karena dalam kondisi sel kanker pembuluh darah bersifat *leak* (*leaky barrier* sehingga mudah ditembus oleh nanopartikel), dibandingkan dengan kondisi sel normal pembuluh darah akan terikat kuat dengan sel.

Dalam penelitian ini, kami juga mencoba melakukan *molecular docking* antara reseptor transferin dengan salah satu komponen nanopartikel yaitu kitosan seperti disajikan pada Gambar 5.25. Kitosan dipilih karena lapisan kitosan sendiri berada bagian luar nanopartikel/permukaan nanopartikel. Oleh karena itu kitosan diperkirakan memiliki posibilitas terbesar untuk berinteraksi dengan reseptor transferin di membrane sel kanker.



Gambar 5.25. Interaksi antara kitosan dengan transferin reseptor di permukaan sel.

Tabel 8. *Binding affinity* dalam interaksi antara reseptor transferin dan kitosan.

Reseptor Sel	Ligan	Mode	<i>Binding Affinity</i> Ligan (Kcal/mol)
Transferin Receptor (TFRC)	Kitosan	1	-9,0
		2	-8,9
		3	-8,8
		4	-8,7
		5	-8,7
		6	-8,6
		7	-8,5
		8	-8,3

Hasil *molecular docking* dengan Autodock Vina yang terintegrasi PyRx menunjukkan bahwa interaksi antara reseptor transferin dengan kitosan menghasilkan 9 nilai *binding affinity* pada 9 posisi ikatanyang berbeda seperti disajikan pada Tabel 8. Nilai *binding affinity* terendah yaitu -9,0 Kcal/mol yang mengindikasikan bahwa posisi ini merupakan posisi yang paling stabil untuk terjadinya interaksi antara reseptor transferin dengan kitosan. Nilai *binding affinity* yang kecil mengindikasikan adanya *biological activity* yang terjadi antara keduanya.

Adanya nanopartikel akan menyebabkan terjadinya peningkatan terhadap permeabilitas membran sel. Selanjutnya berdasarkan nilai *binding affinity* yang diperoleh, dapat diketahui bahwa transferin reseptor dapat memediasi terjadinya *biological activity* salah satunya dalam bentuk proses endositosis. Akibatnya akan terjadi proses internalisasi nanopartikel. Ketika mengalami endositosis maka, *clathryn protein* akan membentuk cage disekitar vesikel endositosis yang akan melepaskan nanopartikel dari membrane sel menuju ke dalam sel. Di dalam kondisi sel kanker terjadi perubahan kondisi keasaman dibandingkan dibagian luar sel,

kondisi intraselular sel kanker lebih asam dibandingkan ekstraselular. Oleh sebab itu material *surface modifier* yang berupa kitosan dan asam oleat akan mengalami degradasi dan menyebabkan obat kanker yang diembankan berupa DOX akan mengalami pelepasan di dalam sel kanker dan memicu kematian sel. Sementara itu nanopartikel diprediksi akan terbuang karena sifatnya yang biodegradable.

5.10. Peran Nanopartikel dan Doxorubicin sebagai Agen *Drug Delivery* dalam Menginduksi terjadi Proses Apoptosis

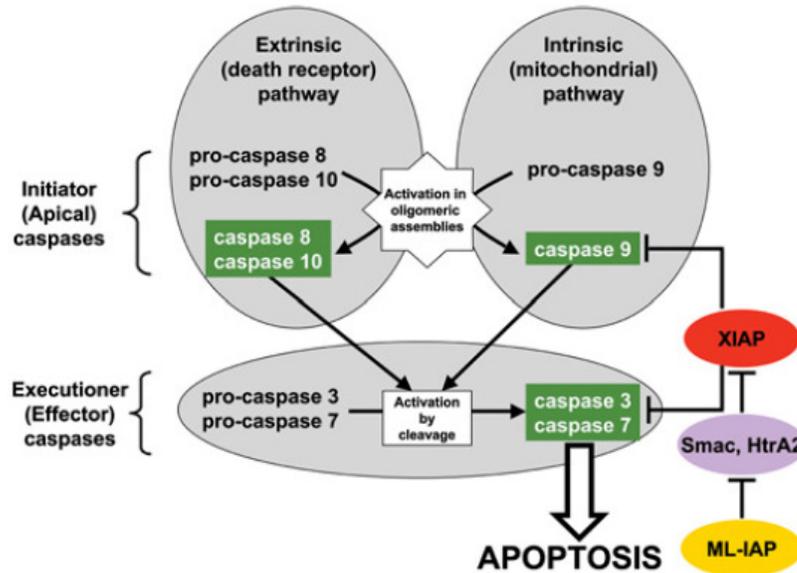
Agen *drug delivery* pada prinsipnya berperan dalam proses penghantaran obat menuju ke sel target yang spesifik serta meningkatkan efisiensi dan efektivitas pemberian obat pada pasien. Dalam penelitian ini, agen *drug delivery* juga diharapkan mampu menginduksi/memicu terjadinya proses apoptosis selama pemberian terapi untuk penderita kanker. Pada hakikatnya apoptosis dapat diartikan sebagai suatu fenomena kematian sel yang terprogram. Apoptosis dapat terjadi secara normal selama perkembangan dan penuaan, sebagai mekanisme homeostatik untuk mempertahankan populasi sel dalam jaringan. Namun dalam kondisi kanker, terdapat gangguan pada pembentukan sinyal apoptosis, akibatnya terjadilah perkembangan sel yang tidak terkendali dan menjadi ciri khas dari sel kanker. Oleh sebab itu, salah satu hal yang mendasari pemberian terapi pada penderita kanker baik dengan radiasi maupun penggunaan obat-obat kemoretopi adalah untuk memicu terjadinya proses apoptosis (Blanchard, *et al.* 1999; Elmore, 2007; dan Hassan, *et al.* 2014).

Secara umum mekanisme apoptosis terdiri dari 4 tahapan yaitu: (1) induksi, (2) integrasi, (3) eksekusi/pelaksana, dan (4) fagositosis. Signal penginduksi apoptosis

dapat berupa sinyal ekstraseluler maupun intraseluler. Sebagai contoh dari signal ekstraseluler adalah hormone dan interaksi ligan-reseptor sel, sedangkan signal intraseluler diantaranya dapat berasal dari radiasi ionisasi, kerusakan karena oksidasi radikal bebas, dan gangguan pada siklus sel. Kedua jalur penginduksi tersebut bertemu di dalam sel dan berubah menjadi famili protein pengeksekusi utama yang dikenal sebagai caspase. Caspase sendiri merupakan family aspartat spesifik dari sistein protease yang berperan dalam memediasi terjadinya apoptosis. Secara umum, famili caspase yang berperan dalam proses apoptosis dapat diklasifikasikan menjadi dua tipe yaitu caspase inisiator dan caspase efektor. Caspase inisiator berperan dalam menginisiasi apoptosis karena memiliki prosegment yang lebih panjang dalam menunjang proses autokatalitik dan aktivasi. Sedangkan caspase efektor berperan dalam mengeksekusi terjadinya apoptosis dengan prosegment yang lebih pendek dan bekerja untuk menghancurkan protein selular dalam proses kematian sel terprogram. Caspase yang tergolong sebagai inisiator terdiri dari beberapa jenis diantaranya yaitu caspase 8, 9, dan 10. Sedangkan caspase yang tergolong sebagai efektor adalah caspase 3, 6, dan 7 (Prior dan Salvesen, 2004; Debatin, 2004; dan Elmore, 2007).

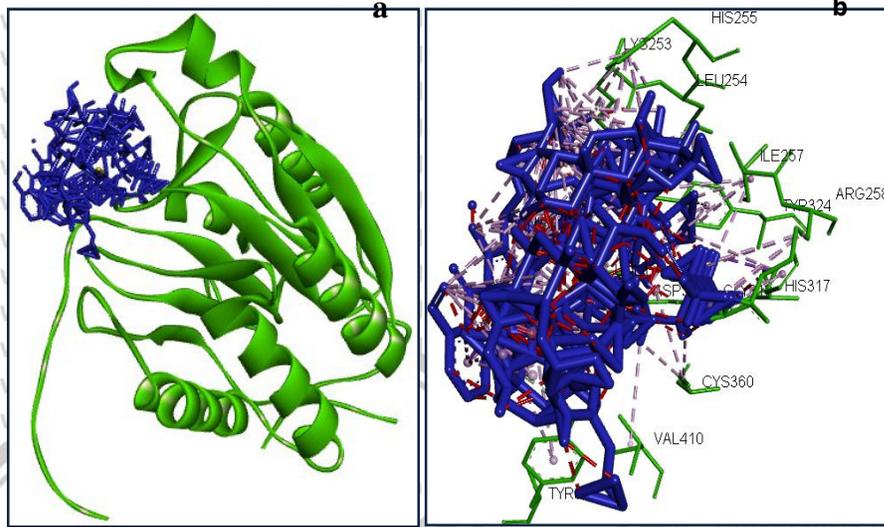
Jalur apoptosis yang terjadi dengan melibatkan peran caspase disajikan pada Gambar 5.26. Pada penelitian ini telah dilakukan proses *molecular docking* untuk mengetahui interaksi yang terjadi antara nanopartikel dengan salah satu caspase inisiator dalam memicu terjadinya apoptosis melalui jalur caspase-8. Pemilihan caspase-8 dikarenakan caspase ini merupakan salah satu caspase inisiator yang dapat aktif melalui interaksi antara ligan dan reseptor kematian sel. Pada penelitian ini nanopartikel akan berperan sebagai ligan untuk mengaktivasi caspase-8. Tujuan dari

perlakuan *docking* pada caspase-8 disini adalah untuk mengetahui apakah nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan yang telah diimbangkan dengan obat DOX (NPsDOX) dapat berinteraksi dengan caspase-8 dan mengaktifasi/menginduksi proses apoptosis.

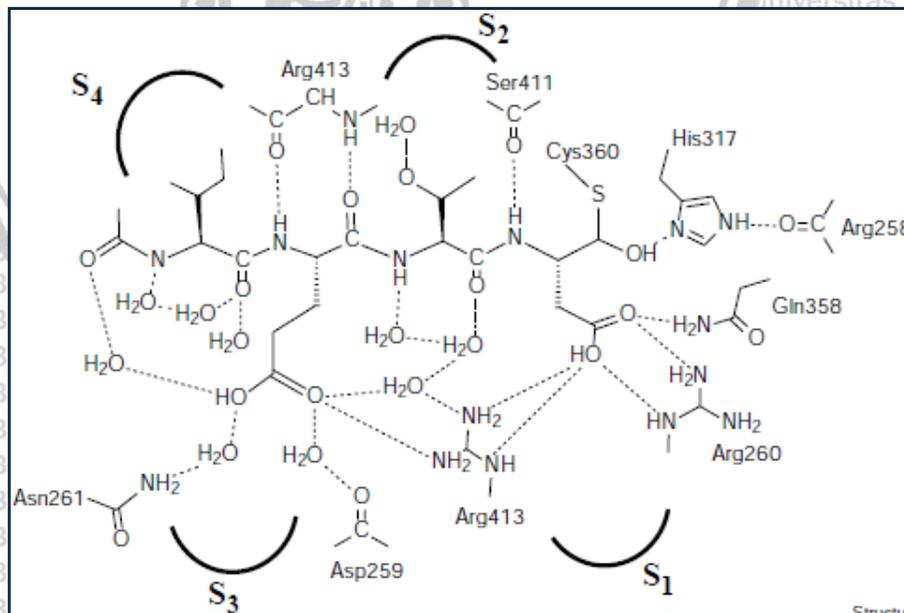


Gambar 5.26. Jalur apoptosis yang terjadi melalui sinyal penginduksi caspase (Prior dan Salvesen, 2004).

Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa nanopartikel dapat berinteraksi dengan caspase-8 pada sisi katalitik triad. Hal tersebut ditunjukkan melalui interaksi NPsDOX dengan beberapa residu asam amino yang terdiri dari Cys360, His317, dan Arg258. Pada sisi S2 pocket NPsDOX juga mengalami interaksi secara hidrofobik dengan residu asam amino berupa Val410. Selain itu terdapat interaksi yang terjadi antara ligan NPsDOX dengan caspase-8 melalui ikatan hydrogen yaitu pada Tyr365 dimana ligan berfungsi sebagai donor-H dan Tyr sebagai akseptor. Interaksi yang terjadi antara ligan dengan residu asam amino dari caspase-8 disajikan pada Gambar 5.27.



Gambar 5.27. (a) Representasi 3D pada interaksi antara caspase-8 (berwarna hijau) dengan NPDOX (berwarna biru), (b) Posisi interaksi antara NPDOX dengan caspase-8 pada residu asam amino tertentu.



Gambar 5.28. Interaksi antara inhibitor dengan caspase-8 dalam menghambat aktivitas caspase-8 pada sisi triad katalitik dan sisi antara S4 dan S2 (Watt, *et al*, 1999).

Menurut Watt, *et al.*, (1999), caspase-8 dapat mengalami inhibisi untuk menjalankan proses apoptosis apabila terdapat rantai utama inhibitor (*mainchain inhibitor*) dalam struktur caspase8-ligan. *Mainchain inhibitor* tersebut ditandai dengan adanya residu asam amino Arg413 dan Ser411. Residu Arg413 adalah residu krusial yang membentuk interaksi ikatan hidrogen antara rantai utama dan rantai inhibitor peptida. Dalam kondisi adanya inhibitor, gugus N-asetil dari residu 413 dan 411 akan berinteraksi dengan inhibitor dalam posisi trans dengan sisi katalitik triad dari caspase-8 seperti terlihat pada Gambar 5.28.

Tidak adanya residu asam amino 413 dan 411, serta tidak terbentuknya ikatan hidrogen (yang ditandai dengan garis putus-putus) pada residu asam amino tersebut, mampu menunjukkan bahwa NPsDOX tidak berperan sebagai inhibitor. Selain itu tidak adanya interaksi dengan residu asam amino pada *S4 pocket* yaitu Tyr412 dan Trp420 juga menunjukkan tidak adanya interaksi antara inhibitor dengan caspase-8 (Watt, *et al.* 1999). Oleh sebab itu nanopartikel diprediksi berperan sebagai *inducer* untuk memicu terjadinya apoptosis. Apabila caspase-8 aktif, maka secara otomatis akan mengaktifkan *downstream* caspase-3. Menurut Wu, *et al.* (2016), proses apoptosis yang melewati proses caspase-8 dapat terjadi melalui dua cara yaitu:

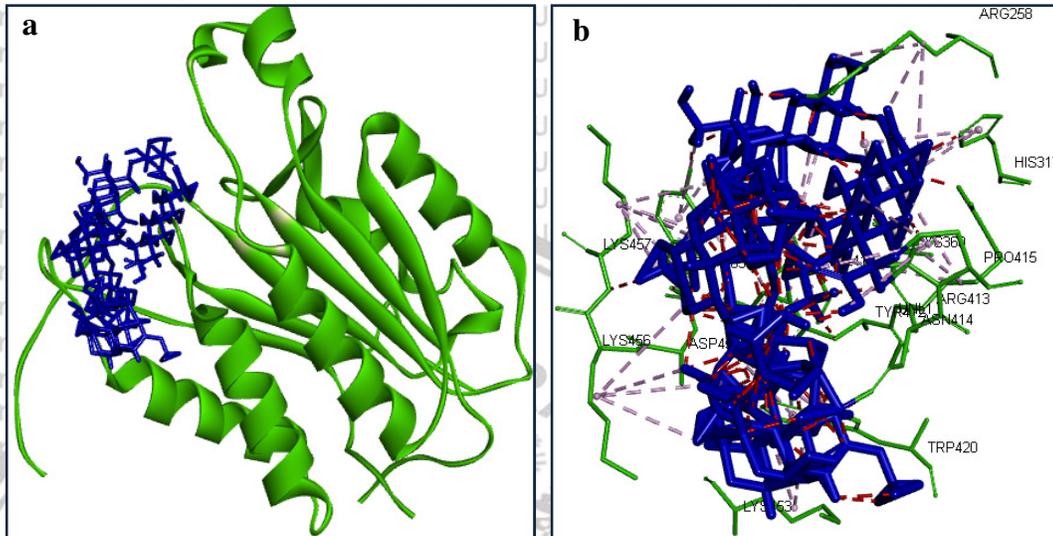
1. Caspase-8 secara langsung mengubah procaspase-3 menjadi caspase-3. Caspase-3 merupakan caspase efektor yang akan mengeksekusi terjadinya apoptosis.
2. Caspase-8 meningkatkan permeabilitas mitokondria dan menyebabkan pelepasan sitokrom c ke sitosol. Sitokrom c bersama Apaf-1 mengaktifkan

caspase-9, dimana caspase-9 kemudian mengaktifkan caspase-3 dan memicu terjadinya apoptosis.

Pada prinsipnya caspase-3 tidak dapat aktif dengan sendirinya karena memiliki prosegmen yang lebih pendek dibandingkan caspase-8, serta konsentrasi intraselular dari caspase-3 yang tidak memadai untuk mendukung proses autokatalitik dan aktivasi. Dalam hal ini caspase-3 merupakan caspase eksekutor dari proses apoptosis yang melewati jalur caspase-8. Berdasarkan hasil *molecular docking* antara NPsDOX dan caspase-8 menunjukkan bahwa agen *drug delivery* berperan dalam meningkatkan efektivitas proses apoptosis secara enzimatik melalui aktivasi caspase-8.

Selain melakukan simulasi *molecular docking* antara caspase-8 dengan nanopartikel yang telah diembankan obat Doxorubicin, dalam penelitian ini juga telah dilakukan simulasi antara caspase-8 dengan nanopartikel tanpa obat. Hasil simulasi menunjukkan bahwa nanopartikel tanpa obat tidak berperan dalam proses aktivasi apoptosis. Hal tersebut ditunjukkan dengan munculnya residu asam amino Arg413 yang merupakan salah satu *main chain* inhibitor sehingga tidak menimbulkan sinyal untuk menginduksi terjadinya apoptosis. Residu asam amino ini akan berinteraksi dengan sisi triad katalitik dari caspase 8 pada posisi trans. Selain residu asam amino 413, pada hasil *molecular docking* antara nanopartikel tanpa obat dengan caspase-8 diketahui bahwa pada S4 *pocket* terdapat residu asam amino Trp412 dan Tyr420. Hal ini semakin memperjelas bahwa tanpa adanya obat nanopartikel akan berperan sebagai inhibitor. Hasil *molecular docking* ini juga dapat menjadi indikator awal yang menunjukkan bahwa nanopartikel tanpa obat tidak memunculkan sifat sitotoksik apabila akan diujikan secara in-vitro. Hasil *molecular docking* antara caspase-8

dengan nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan tanpa diimbangkan dengan obat doxorubicin disajikan pada Gambar 5.29.

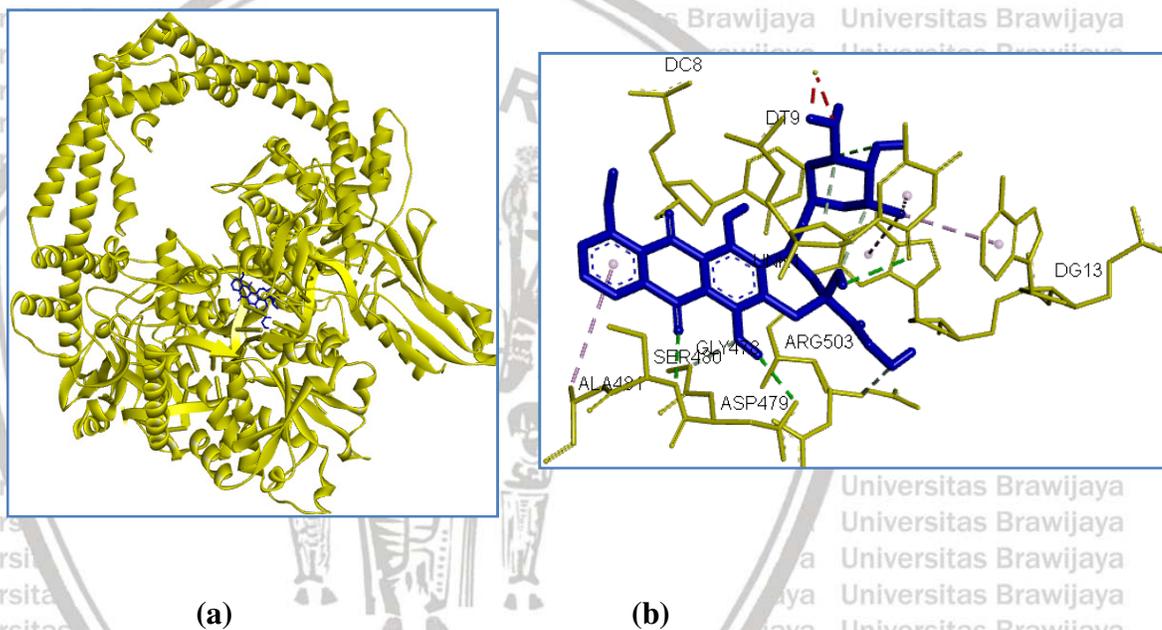


Gambar 5.29. (a) Representasi 3D pada interaksi antara caspase-8 (berwarna hijau) dengan Nanopartikel Fe₃O₄-AO-kitosan (berwarna biru), (b) Posisi interaksi antara Nanopartikel dengan caspase-8 pada residu asam amino tertentu.

Adanya obat antikanker berupa doxorubicin yang merupakan senyawa antrasiklin juga dapat memicu terjadinya apoptosis melalui jalur yang berbeda. Di dalam penelitian ini juga telah dilakukan simulasi *molecular docking* antara doxorubicin dengan DNA Topoisomerase II. Menurut Farsani, *et al.* (2016), peran doxorubicin sebagai obat kanker adalah untuk menghambat peran Topoisomerase II.

DNA Topoisomerase II merupakan enzim yang mengatur topologi DNA dan sangat penting untuk integritas materi genetik selama proses transkripsi, replikasi, dan rekombinasi. Dalam pemberian terapi kanker, obat kanker bekerja dengan menghambat enzim tersebut sehingga dapat menginduksi terjadinya apoptosis. Menurut Eissa, *et al.*, (2018), daerah binding site utama DNA Topoisomerase II

terdiri dari residu asam amino Asp479 Arg503, Gln778, Leu502, Met782 Cyt8, T9, Cyt11, Gua13, Ade12. Hasil *molecular docking* yang disajikan pada Gambar 5.30. menunjukkan bahwa doxorubicin dapat berperan sebagai inhibitor Topoisomerase II melalui interaksi dengan beberapa nukleotida dan residu asam amino yang terdapat pada sisi aktif Topoisomerase II seperti Asp479 Arg503, Gln778, Ser480, Ala481 dan DT9.



Gambar 5.30. (a) Representasi 3D pada interaksi antara Topoisomerase II (berwarna kuning) dengan doxorubicin (berwarna biru), (b) Posisi interaksi antara Topoisomerase II dengan doxorubicin pada residu asam amino tertentu.

Interaksi yang terjadi pada residu asam amino Arg503, Gly478, dan Ser480 adalah interaksi dengan melibatkan ikatan hidrogen. Sedangkan interaksi dengan residu asam amino berupa Gln778 terjadi dengan melibatkan interaksi sterik. Interaksi dengan DT9 dan Ala481 terjadi melalui interaksi hidrofobik. Topoisomerase

II merupakan salah satu target penting dari terapi dengan menggunakan obat kanker.

Obat anti kanker akan berinterferensi dengan *cell cycle* sehingga mengarah pada kematian sel.

Selain melakukan simulasi *molecular docking* dengan doxorubicin, di dalam penelitian ini juga dilakukan *molecular docking* antara NPsDOX dengan

Topoisomerase II dan hasilnya disajikan pada Gambar 5.31. Namun berdasarkan hasil *docking* tersebut dapat dilihat bahwa ligan NPsDOX tidak berinteraksi dengan sisi aktif dari Topoisomerase II (yang ditunjukkan melalui interaksi melalui beberapa residu asam amino yang tidak berada disisi aktif Topoisomerase II). Oleh sebab itu berdasarkan hasil *molecular docking* tersebut dapat diketahui bahwa agen *drug delivery* berupa nanopartikel tidak berperan untuk meningkatkan kematian sel melalui jalur ini. Namun lepasnya obat doxorubicin di dalam sel kanker yang menjadi hal penting dalam memicu kematian sel melalui jalur Topoisomerase II.



Gambar 5.31. Interaksi antara NPsDOX dengan DNA Topoisomerase II.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Metode kopresipitasi *ex-situ* dan *in-situ* mempengaruhi ukuran dan morfologi nanopartikel. Metode kopresipitasi *ex-situ* lebih efektif digunakan dalam sintesis nanopartikel Fe_3O_4 -AO-kitosan sebagai kandidat agen *drug delivery* karena menghasilkan ukuran kristalit yang lebih kecil yaitu 4,73 nm dan ukuran partikel yang lebih kecil yaitu 94-149 nm serta morfologi yang *spherical* untuk material sebagai agen *drug delivery*.
2. Variasi komposisi asam oleat mempengaruhi ukuran kristalit dan partikel Fe_3O_4 -AO-kitosan. Komposisi optimum asam oleat untuk menghasilkan ukuran terkecil dan persentase Fe_3O_4 tertinggi adalah 1 mL. Nilai saturasi magnetik meningkat seiring dengan semakin tingginya komposisi asam oleat dan nanopartikel dapat diklasifikasikan memiliki sifat superparamagnetik dengan nilai koersivitas 6 Oe.
3. Variasi konsentrasi kitosan tidak berpengaruh signifikan terhadap perubahan ukuran kristalit nanopartikel karena penambahan kitosan tidak mampu memecah *cluster* Fe_3O_4 -AO yang telah terbentuk lebih dahulu sebelum penambahan kitosan. Semakin tinggi konsentrasi kitosan mengakibatkan ukuran partikel hanya meningkat dari kisaran 200-333 nm pada konsentrasi 0,5% menjadi 199-386 nm pada konsentrasi 1%, dan terjadi penurunan persentase Fe_3O_4 sebanyak 8,6%.
4. Variasi rasio konsentrasi TPP dan sulfat sebagai *crosslinker* berpengaruh terhadap morfologi *spherical* material Fe_3O_4 -AO-kitosan. Semakin tinggi

rasio konsentrasi TPP:sulfat mampu menurunkan ukuran partikel dan ukuran kristalit serta meningkatkan persentase Fe_3O_4 .

5. Efisiensi *drug loading* maksimum diperoleh dengan komposisi asam oleat yang lebih tinggi dan konsentrasi kitosan 0,5% yaitu sebesar 45,45%. Profil *drug release* menunjukkan pada 12 jam pertama, persentase *drug release* pada pH asam dua kali lebih besar dibandingkan pada pH netral. Pada pH asam persentase kumulatif *drug release* yaitu 70,83% sedangkan pada pH netral adalah 33,33%.

6. Interaksi yang terjadi antara nanopartikel dengan obat yang dikaji secara *in-silico* menunjukkan bahwa obat terikat pada asam oleat. Selain itu terjadi interaksi antara kitosan reseptor di permukaan sel yaitu reseptor transferin dengan menghasilkan *binding affinity* -9 Kcal/mol yang diprediksi mampu memicu terjadinya *biological activity*. Hasil simulasi *molecular docking* antara nanopartikel-DOX dengan caspase-8 menunjukkan bahwa nanopartikel ini bersifat sebagai *inducer* untuk mengaktivasi proses apoptosis, sedangkan tanpa adanya obat nanopartikel bersifat sebagai inhibitor.

6.2 Saran

1. Penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan dengan mengembangkan modifikasi permukaan berbasis ligan yang aktif terhadap sel target tertentu.
2. Perlu dilakukan simulasi *molecular dynamic* untuk memastikan interaksi yang terjadi antara nanopartikel dengan sel secara virtual.
3. Perlu dilakukan uji *in-vitro* menggunakan sel kanker untuk memastikan kondisi yang sebenarnya apabila nanopartikel dan obat diinteraksikan dengan sel tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M., dan Khairurrijal, 2009. Review: Karakterisasi Nanomaterial, *Jurnal Nanosains & Nanoteknologi*, 2(1), pp. 1-9.
- Ahn, T., Kim, J.H., Yang, H.M., Lee, J.W., Kim, J.D., 2012. Formation Pathways of Magnetite Nanoparticles by Coprecipitation Methode, *The Journal of Physical Chemistry C*, 116, pp. 6069-6076.
- Aji, W., Kajian Sifat Kemagnetan Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) Fe₃O₄ menggunakan *Electron Spin Resonance (ESR)*, *Skripsi*, Program Studi Fisika, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Arum, Y., Ok-Oh, Y., Kang, H. W., Hwan- Ahn, S., Oh, J., 2015. Chitosan-Coated Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles as Carrier of Cisplatin for Drug Delivery, *The Korean Society of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1), pp. 89-98.
- Azizian, R., Doroodchi, E. dan Moghtaderi, B., 2016. Influence of Controlled Aggregation on Thermal Conductivity of Nanofluids, *Journal of Heat Transfer*, 138, pp.1-6.
- Baharuddin, A.A., Ang, B.C., Hussein, N.A.A., Andriyana, A., Wong, Y.H., 2018. Mechanisms of Highly Stabilized Ex-Situ Oleic Acid-Modified Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with 4-Pentynoic Acid, *Materials Chemistry and Physics*, 203, pp. 212-222.
- Bansal, V., Sharma, P. K., Sharma, N., Pal, O. P., Malviya, R., 2011. Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery, *Advances in Biological Research*, 5(1), pp.28-37.
- Bar, H., Yacoby, I., Benhar, I., 2012. Targeted Drug-carrying Phage Nanomedicines, In: *Current Research in Pharmaceutical Technology*, Globig, S., Hunter, W., ed, New York: Apple Academic Press.
- Bhusnan, B., 2004. Introduction to Nanotechnology, In: *Springer Handbook of Nanotechnology*, Bhusnan, B., ed, New York:Springer
- Bhardwaj, R., Gupta, V., 2013. Characterization Techniques for Nano-Materials in Nanoelectronics: A Review, *2nd International Conference on Role of Technology in Nation Building (ICRTNB-2013)*, ISBN: 97881925922-1-3.

Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P.R., Marco, S.D., Krebs, J.F., Wu, J.C.,

Tomaselli, K.J., dan Grütter, M.G., 1999. The Three-Dimensional Structure of Caspase-8: An Initiator Enzyme In Apoptosis. *Structure*, 7(9), pp. 1125-1133.

Blanco, E., Shen, H., dan Ferrari, M., 2015. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery, *Nature of Biotechnology*, 33(9), pp. 941-951.

Bloemen, M., Brullot, W., Luong, T. T., Geukens, N., Gils, A., dan Verbiest, T., 2012. Improved Functionalization of Oleic Acid-coated Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 14, pp.1-10.

Bonferoni, M.C., Sandri, G., Delleria, E., Rossi, S., Ferrari, F., Mori, M., dan Caramella, C., 2014. Ionic Polymeric Micelles Based on Chitosan and Fatty Acids and Intended for Wound Healing. Comparison of Linoleic and Oleic Acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87, pp.101-106.

Cai, Y., Cheng, Y., Hong, X., Liu, Z., Yuan, W., 2013. Porous microsphere and its applications. *International Journal of Nanomedicine*, 8, pp.1111-1120.

Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., dan Shin, D. M., 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14, pp.1310-1316.

Christian, P., Kammer, F. V. D., Baalousha, M., dan Hofmann, T., 2008. Nanoparticles: Structure, Properties, Preparation and Behaviour in Environmental Media. *Ecotoxicology*, 17, pp.326-343.

Cornell, R.M, dan Schwertmann, U., 2003, The Iron Oxide: Structure, Properties, Reaction, Occurrences and Uses, 2nd.Ed., Wiley-VCH: Weinheim

Cui, H., Li, D., Zhang, Z., 2015. Preparation and Characterization of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Modified by Perfluoropolyether Carboxylic Acid Surfactan, *Materials Letters*, 143, pp. 38-40

De Jong, W.H., dan Borm, P.J., 2008. Drug Delivery and Nanoparticles: Hazards and Application, *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), pp.133-149.

Debatin, K.M., 2004, Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy, *Cancer Immunol Immunother*, 53(3), pp.153-9.

- Deepa, G., Kumar, A., Thulasidasan, T., Anto, R.J., Pillai, J., Kumar, G.S.V., 2012. Cross-Linked Acrylic Hydrogel for The Controlled Delivery of Hydrophobic Drugs in Cancer Therapy, *International Journal of Nanomedicine*, 7, pp. 4077–4088.
- Dorniani, D., Hussein, M. Z., Kura, A. U., Fakurazi, S., Shaari, A. H., Ahmad, Z. 2012. Preparation of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Coated with Gallic Acid for Drug Delivery, *International Journal of Nanomedicine*, 7, pp. 5745–5756.
- Dumitriu, S. dan Dumitriu, M., 1996. Hydrogels as Support for Drug Delivery Systems. In S. Dumitriu, ed. *Polyaccharides in Medicinal Application*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Dutta, P.K., Dutta, J., dan Tripathi, C.S., 2004. Chitin and Chitosan: Chemistry, Properties, and Application, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63, pp.20-31.
- Dutta, A., 2017. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, In: *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, Thomas S., Thomas, R., Zachariah, A. K., Mishra, R. K., ed, Netherlands: Elsevier Inc.
- El Fray, M., Niemczyk, A., dan Pabin-Szafko, B., 2012. Chemical Modification of Chitosan with Fatty Acids. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 17, pp.29–36.
- Eissa, I.H., El-Naggar, A.M., Nour E.A., El-Sattar, A., dan Youssef, A.S.A., 2018, Design and Discovery of Novel Quinoxaline Derivatives as Dual DNA Intercalators and Topoisomerase II Inhibitors, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 18, pp.195-209.
- Elmore, S., 2007, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicologic Pathology*, 5(4), pp.495-516
- Farsani, F.M., Ganjalikhany, M.R., Dehbashi, M., Naeini, M.M., dan Vallian, S., 2016. Structural basis of DNA topoisomerase II-a (Top2-a) inhibition: a computational analysis of interactions between Top2-a and its inhibitors. *Mec Chem Res*, 25(6), pp.1250-1259
- Fernandez-Pacheco, A., 2011. Studies of Nanoconstrictions, Nanowires and Fe₃O₄ Thin Films: Electrical Conduction and Magnetic Properties, Fabrication by

Focused Electron/Ion Beam. *Dissertation*, Cavendish Laboratory, University of Cambridge.

Fernandes, A. L. P., Morais, W. A., Santos, A. I. B., de Araujo, A. M. L., dos

Santos, D. E. S., Pavinatto, F. J., Oliveira Jr., O. N., Dantas, T. N. C., Pereira, M. R., Fonseca, J. L. C., 2005. The Influence of Oxidative Degradation on

The Preparation of Chitosan Nanoparticles, *Colloid Polym Sci*, 284, pp.1–9.

Ghaz-Jahanian, M.A., Abbaspour-Aghdam, F., Anarjan, N., Berenjian, A., dan Jafarizadeh-Malmiri, H., 2014. Application of Chitosan Based Nanocarrier in

Tumor Targeted Drug Delivery, *Mol Biotechnol*, 57, pp. 201-218.

Goli, M.B., Pande, M. dan Bellaloui, N., 2012. Effects of Chelating Agents on Protein, Oil, Fatty acids, and Minerals in Soybean Seed, *Agricultural Sciences*, 3(4), pp. 517–523.

Guibal, E., 2004. Interaction of Metal Ions with Chitosan-based Sorbents: A Review, *Separation and Purification Technology*, 38(1), pp.43-74.

Guo, X. Y., Mao, F., Wang, W., Yang, Y., Bai, Z., 2015, Sulfhydryl Modified Fe₃O₄@SiO₂ Core/Shell Nanocomposite: Synthesis and Toxicity Assessment in Vitro, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, Just Accepted Manuscript , pp. 1-27.

Hassan, M., Watari, H., Almaaty A.A., Ohba, Y., dan Sakuragi, N., 2014. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer, *Biomed Res Int*. 2014, pp.1-23

Hasan, S., 2015. A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences*, 4, pp.1–3.

Honary, S., Ghajar, K., Khazaeli, P., dan Shalchian, P., 2011. Preparation, Characterization and Antibacterial Properties of Silver-Chitosan Nanocomposites using Different Molecular Weight Grades of Chitosan. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1), pp.69–74.

Huang, L., Cheng, X., Liu, C., Xing, K., Zhang, J., Sun, G., Li, X., dan Chen, X 2009. Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity of Oleic Acid-Grafted Chitosan Oligosaccharide Nanoparticles. *Frontiers of Biology in China*, 4(3), pp. 321–327.

Ibezim, E.C., Andrade, C.T., Marcia, C., Baretto, B., Odimegwu, D.C., De Lima,

F.F., 2011. Ionically Cross-linked Chitosan/Tripolyphosphate Microparticles for the Controlled Delivery of Pyrimethamine, *Ibnosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences*, 3 (3), 77-88

Indira, T., dan Lakshmi, P., 2010. Magnetic Nanoparticles: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 3(3), pp. 1035–1042.

Iqbal P., Preece J. A. dan Mendes P. M., 2012. Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. In *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, (ed) J. W. Steed and P. A. Gale, Germany : John Wiley & Sons Ltd.

Issa, B., Obaidat, I. M., Albiss, B. A., dan Haik, Y., 2013. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, pp. 2126–21305.

Jadhav, N.V., Prasad, A.I., Kumar, A., Mishra, R., Dhara, S., Babu, K.R., Prajapat, C.L., Misra, N.L., Ningthoujamb, R.S., Pandey, B.N., Vatsa, R.K., 2013. Synthesis of Oleic Acid Functionalized Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles and Studying Their Interaction with Tumor Cells for Potential Hyperthermia Applications, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 108, pp.158– 168.

Jain, K.K., 2008. *Drug delivery systems - an overview.*, in: K.K. Jain (Ed.), *Drug Delivery Systems*, Humana Press.

Janke, J.J, Bennett, W.F.D, Tieleman, D.P., 2014. Oleic Acid Phase Behavior from Molecular Dynamics Simulations, *Langmuir*, 30, pp. 10661–10667.

Jia, Y., 2012. Co-encapsulation of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery, pp.1697–1708.

Jonassen, H., Kjoniksen, A.L., Hiorth, M., 2012. Effects of Ionic Strength on the Size and Compactness of Chitosan Nanoparticles, *Colloid Polym Sci*, 290, pp. 919–929.

Joshi, M., Bhattacharyya, A., dan Ali, S.W., 2008. Characterization Techniques for Nanotechnology Applications in Textiles, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 33, pp. 304-317.

Khoiroh, L.M., 2013. Pengaruh pH dan Suhu Kalsinasi terhadap Sintesis Pigmen Hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) dengan Metode Termal Transformasi FeOOH, *Tesis*, Program Pascasarjana Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

Kolhatkar, A. G., Jamison, A. C., Litnov, D., Wilson, R. C., dan Lee, T. R., 2013. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, pp.15977–16009.

Kreuter, J., 2007. Nanoparticles - A historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331, pp. 1–10.

Krukemeyer, M.G., Krenn, V., Jakobs, M., dan Wagner, W., 2012. Mitoxantrone-iron oxide biodistribution in blood, tumor, spleen, and liver-magnetic nanoparticles in cancer treatment, *Journal of Surgical Research*, 175, pp. 35-43.

Krukemeyer, M.G., Krenn, V., Huebner, F., Wagner, W. and Resch, R., 2015. History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6(6), pp. 336.

Kumar, N, Patel, A.K., Kumari, N., dan Kumar, A., 2014. A Review on Chitosan Nanoparticles for Cancer Treatment, *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4(4), pp. 63-65.

Lee, D.W., Lim, C., Israelachvili, J. N., Hwang, D. S., 2013. Strong Adhesion and Cohesion of Chitosan in Aqueous Solutions, *Langmuir*, 29, pp. 14222–14229.

Li, B., dan Zhong, W.H., 2012. Nanoscience and Nanomaterials: Synthesis, Manufacturing and Industry Impacts, Pennsylvania: DEStech publications, Inc.

Liang, X., Shi, H., Jia, X., Yang, Y., dan Liu, X., 2011. Dispersibility, Shape and Magnetic Properties of Nano- Fe_3O_4 Particles. *Materials Sciences and Applications*, 2, pp. 1644–1653.

Liopo, A., Conjussteau, A., Tsyboulski, D., Ermolinsky, B., Kazansky, A Oraevsky, A., 2012. Biocompatible Gold Nanorod Conjugates for Preclinical Biomedical Research, *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 3(2), pp.

I-24.

Liu, Y., Jia, S., Wu, Q., Ran, J., Zhang, W., Wu., S., 2011. Studies of Fe₃O₄-Chitosan Nanoparticles Prepared by Co-Precipitation under The Magnetic Field for Lipase Immobilization, *Catalysis Communications*, 12, pp. 717-720

Liu, H., Ji, S., Zheng, Y., Li, M., Yang, H., 2013. Modified Solvothermal Synthesis of Magnetic Microspheres with Multifunctional Surfactant Cetyltrimethyl Ammonium Bromide And Directly Coated Mesoporous Shell, *Powder Technology*, 246, pp. 520-529.

Lutterotti, L., 2009. MAUD Second Video Lesson part 1-5, <https://www.youtube.com/user/MaudRietveldProgram>.

Mahdavi, M., Ahmad, M., Haron, M.J., Namvar, F., Nadi, B., AbRahman, M.Z., Amin, J.,

2013. Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications, *Molecules*, 18, pp. 7533-7548

Mane, S., 2016. Effect of Porogens (Type and Amount) on Polymer Porosity : A Review. *Canadian Chemical Transaction*, 4(2), pp. 210-225.

Mansouri, M., Nazarpak, M. H., Solouk, A., Akbari, S., dan Hasani-Sadrabadi, M. M., 2017. Magnetic Responsive of Paclitaxel Delivery System Based on SPION and Palmitoyl Chitosan. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 421, pp. 316-325.

McMahon, G., 2007. *Analytical Instrumentation: A Guide to Laboratory, Portable, and Miniaturized Instruments*, West Sussex : Wiley.

Mi, F.W., Sung, H.W., Shyu, S.S., Su, C.C., Peng, C.K., 2003. Synthesis and Characterization of Biodegradable TPP/GenipinCocrosslinked Chitosan Gel Beads, *Polymer*, 44, pp. 6521-6530

Mody, V.V., Cox, A., Shah, S., Singh, A., Bevins, W., dan Parihar, H., 2014. Magnetic Nanoparticle Drug Delivery Systems for Targeting Tumor, *Appl Nanosci*, 4, pp. 385-392.

Monshi, A., Foroughi, M. R., dan Monshi, M. R., 2012. Modified Scherrer Equation to Estimate More Accurately Nano-Crystallite Size Using XRD, *World Journal of Nano Science and Engineering*, 2, pp. 154-160.

Mwangi, W.W., Ho, K.W., Ooi, C.W., Tey, B.T., Chan, E.S., 2016. Facile Method For Forming Ionically Cross-Linked Chitosan Microcapsules From Pickering Emulsion Templates, *Food Hydrocolloids*, 55, pp. 26-33.

Obaidat, R., Al-Jbour, N., Al-Sou'd, K., Sweidan, K., Al-Remawi, M., Badwan, A., 2010. Some Physico-Chemical Properties of Low Molecular Weight Chitosans and their Relationship to Conformation in Aqueous Solution, *J Solution Chem*, 39, pp. 575–588.

Okassa, L.N., Marchais, H., Douziech-Eyrolles, L., Herve, K., Cohen-Jonathan, S., Munnier, E., Souce, M., Linassier, C., Dubois, P., Chourpa, I., 2007. Optimization of Iron Oxide Nanoparticles Encapsulation within Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Sub-Micron Particles, *Eur J Pharm Biopharm*, 67, pp. 31-38.

Panta, P.C., dan Bergmann, C.P., 2015. Obtention by Coprecipitation and Magnetic Characterization of Fe₃O₄ Nanoparticles Coated with Surfactants Abstract Synthesis and Characterization. *Nano Research & Applications*, 1, pp. 1–4.

Patil, S., Bhatt, P., Lalani, R., Amrutiya, J., Vhora, I., Kolte, A., Misra, A., 2016. Low Molecular Weight Chitosan–Protamine Conjugate For Sirna Delivery With Enhanced Stability And Transfection Efficiency, *RSC Adv*, 6, pp. 110951–110963.

Pereira da Silva, S., Costa de Moraes, D. and Samios, D., 2016. Iron Oxide Nanoparticles Coated with Polymer Derived from Epoxidized Oleic Acid and Cis-1, 2-Cyclohexanedicarboxylic Anhydride: Synthesis and Characterization. *Journal of Material Science & Engineering*, 5(3), pp. 1–7.

Petcharoen, K., dan Sirivat, A., 2012. Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles via the Chemical Co-Precipitation Method, *Materials Science & Engineering B*, 177(5), pp. 421–27.

Pham, X. N., Nguyen, T. P., Pham, T. N., Tran, T. T. N., Tran, T. V. T., 2017. Synthesis and Characterization of Chitosan coated Magnetite Nanoparticles and Their Application In Curcumin Drug Delivery, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7, pp. 1-10.

Prior, P.F., dan Salvesen, G.S., 2004. The Protein Structures That Shape Caspase Activity, Specificity, Activation And Inhibition. *Biochem. J.* 384, pp. 201–232.

Qu, J., Liu, G., Wang, Y., dan Hong, R., 2010. Preparation of Fe₃O₄ -Chitosan Nanoparticles used for Hyperthermia. *Advanced Powder Technology*, 21, pp.461–467.

Raftery, R., O'Brien, F. J., dan Cryan, S. A., 2013. Chitosan for Gene Delivery and Orthopedic Tissue Engineering Applications. *Molecules*, 18, pp. 5611–5647.

Romberg, B., Hennink, W. E., dan Storm, G., 2008. Sheddable Coatings for Long-Circulating Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 25(1), pp. 55–71.

Sailakshmi, G., Mitra, T., Gnanamani, A., 2013. Engineering of Chitosan and Collagen Macromolecules using Sebacic Acid for Clinical Applications, *Prog Biomater*, 2, pp. 1-11.

Salavati-Niasari, M., Mahmoudi, T., Amiri, O., 2012. Easy Synthesis of Magnetite Nanocrystals via Coprecipitation Method, *Journal of Cluster Science*, 23, pp. 597–602.

Scialabba, C., Licciardi, M., Mauro, N., Rocco, F., Ceruti, M., dan Giammona, G., 2014. Inulin-Based Polymer Coated Spions as Potential Drug Delivery Systems for Targeted Cancer Therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88, pp. 695–705.

Shan, P., Shen, J. W., Xu, D. H., Shi, L. Y., Gao, J., Lan, Y. W., Wang, Q., Wei, S. H., 2014. Molecular Dynamic Study on The Interaction between doxorubicin and hydrophobically modified chitosan oligosaccharides, *Royal Society of Chemistry*, 4, pp. 23730–23739.

Shete, P. B. Patil, R. M., Tiwale, B. M., Pawar, S. H., et al., 2015. Water dispersible oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles for biomedical applications *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 377, pp. 406–410.

Sheng-nan, S., Chao, W., dan Zan-zan, Z., 2014. Magnetic iron oxide nanoparticles : Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chin. Phys. B*, 23(3), pp.1–19.

Shu, X.Z., dan Zhu, K.J., 2002. Controlled Drug Release Properties of Ionically Cross-Linked Chitosan Beads: The Influence of Anion Structure, *International Journal of Pharmaceutics*, 233, 217–225

Shweta, A., Sonia, P., 2013. Pharmaceutical Relevance of Crosslinked Chitosan in Microparticulate Drug Delivery, *International Research Journal of Pharmacy*, 4 (2), pp. 45-51

Silva, V. A. J., Andrade, P. L., Silva, M. P. C., Bustamante D, A., Valladares, L.

D. L. S., dan Aguiar, J. A., 2013. Synthesis and Characterization of Fe₃O₄ Nanoparticles Coated with Fucan Polysaccharides. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 343, pp.138–143.

Siegel, R.A., dan Rathbone, M.J., 2012. Overview of Controlled Release Mechanism, In: Siepmann, J., Siegel, R.A., dan Rathbone, M.J., eds, *Fundamental and Application of Controlled Release Drug Delivery*, USA: Springer.

Singh, R., dan Lillard, J.W., 2009. Nanoparticle-based Targeted Drug Delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3), pp. 215–223.

Snipstad, S., Westorm, S., Morch, Y., Afadzi, M., Aslund, A. K. O., dan Davies, C. L., 2014. Contact-Mediated Intracellular Delivery of Hydrophobic Drugs from Polymeric Nanoparticles. *Cancer nanotechnology*, 5(8), pp. 1–18.

Sun, C., Lee, J.S., dan Zhang, M., 2008. Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and Drug Delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp. 1252-1265.

Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C. R., 2013. Doxorubicin: An Update on Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery Systems. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), pp. 157-170

Tran, T. T. D., Vo, T., V., dan Tran, P. H. L., 2015. Design of Iron Oxide Nanoparticles Decorated Oleic Acid and Bovine Serum Albumin for Drug Delivery. *Chemical Engineering Research and Design*, 94, pp. 112–118.

Ulbrich, W., dan Lamprecht, A., 2010. Targeted Drug-Delivery Approaches by Nanoparticulate Carriers in The Therapy of Inflammatory Diseases, *Journal of The Royal Society Interface*, 7, pp. S55-S66.

Unsoy, G., Yalcin, S., Khodadust, R., Gunduz, F., dan Gunduz, U., 2012. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide

- nanoparticles produced for biomedical applications, *J Nanopart Res*, 14, pp.964-977.
- Vanneman, M., dan Dranoff, G., 2012. Combining Immunotherapy and Targeted Therapies in Cancer Treatment. *Nature Review Cancer*, 12, pp. 237–251.
- Vargas, M., Albers, A., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C., 2009. Characterization Of Chitosan–Oleic Acid Composite Films, *Food Hydrocolloids*, 23, pp. 536–547.
- Velusamy, P., Hung, S. C., Shritama, A., Kumar, G. V., Jeyanthi, V., dan Pandian, K., 2016. Synthesis of Oleic Acid Coated Iron Oxide Nanoparticles and Its Role in Anti-Biofilm Activity against Clinical Isolates of Bacterial Pathogens. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 59, pp. 450–456.
- Vicky, V., Mody, Cox, A., Shah, S., Singh, A., Bevins, W., dan Parihar, H., 2014. Magnetic Nanoparticle Drug Delivery Systems for Targeting Tumor, *Applied Nanoscience*, 4, pp. 385–392.
- Voicu, G., Geanaliu-Nicolae, R. E., Pirvan, A. A., Andronescu, E., dan Iordache, F., 2016. Synthesis, Characterization and Bioevaluation of Drug-Collagen Hybrid Materials for Biomedical Applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 510, pp. 474–484.
- Wahajuddin, dan Arora, S., 2012. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Magnetic Nanoplatfroms as Drug Carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 7, pp. 3445–3471.
- Wan Ngah, W.S., Fatinathan, S., 2010. Adsorption Characterization of Pb(II) And Cu(II) Ions onto Chitosan-Tripolyphosphate Beads: Kinetic, Equilibrium and Thermodynamic Studies, *Journal of Environmental Management*, 91, pp. 958–969
- Watt, W., Koeplinger, K.A., Mildner, A.M., Heinrikson, R.L., Tomasselli, A.G., dan Watenpugh, K.D., 1999. The Atomic-Resolution Structure of Human Caspase-8, A Key Activator of Apoptosis. *Structure*, 7(9), pp. 1135–1143.
- Wei, Y., Han, B., Hu, X., Lin, Y., Wang, X., Deng, X., 2011. Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles and Their Magnetic Properties, *Procedia Engineering*, 27, pp. 632-637.

Wu, W., He, Q., dan Jiang, C., 2008. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3, pp. 397–415.

Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., Kim, W. K., 2015. Recent Progress On Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Surface Functional Strategies and Biomedical Applications, *Science and Technology of Advanced Materials*, 16, pp. 1-43.

Wu, Y., Zhao, D., Zhuang, J., Zhang, F., dan Xu, C., 2016. Caspase-8 and Caspase-9 Functioned Differently at Different Stages of the Cyclic Stretch-Induced Apoptosis in Human Periodontal Ligament Cells. *Plos One*, e0168268.

Wulandari, I. O., 2015. Pembuatan Dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan-Fe₃O₄ Secara Kopresipitasi Ex-Situ Menggunakan Tripolyphosphate/Sulfat Sebagai Crosslinker, *Tesis*, Program Pascasarjana Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

Xu, J. K., Zhang, F. F., Sun, J. J., Sheng, J., Wang, F., Sun, M., 2014. Bio and nanomaterials based on Fe₃O₄. *Molecules*, 19, pp. 21506–21528.

Xu, Z., Guo, M., Yan, H., Liu, K., 2013. Enhanced Loading of Doxorubicin into Polymeric Micelles by a Combination of Ionic Bonding and Hydrophobic Effect, and The pH-Sensitive and Ligand-Mediated Delivery of Loaded Drug, *Reactive & Functional Polymers*, 73, pp. 564–572.

Xu, D., Xie, R., Xu, T., Guo, X., Liu, Q., Liu, J., Lv, W., Jing, X., Zhang, H., Wang, J., 2016. Combination Therapeutics of Doxorubicin with Fe₃O₄@Chitosan@Phytic Acid Nanoparticles for Multi-responsive Drug Delivery, *Royal Society of Chemistry*, 6, pp. 88248-88254.

Yuanbi, Z., Zumin, Q., Jiaying, H., 2008. Preparation and Analysis of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Used as Targeted-drug Carriers, *Journal of Chemical Engineering*, 16 (3), pp. 451-455.

Zaki A.J., M., Patil, S. K., Baviskar, D. T., dan Jain, D. K., 2012. Implantable Drug Delivery System: A review. *International Journal of PharmTech Research*, 4(1), pp. 280–292.

Zargar, V., Asghari, M., dan Dashti, A., 2015. A Review on Chitin and Chitosan

Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications.

ChemBioEng Reviews, 2, pp. 1–24.

Zhang, L., He, R., dan Gu, H.C., 2006. Oleic Acid coating on the Monodisperse

Magnetite Nanoparticles, *Applied Surface Science*, 253, pp. 2611-2617

Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z.L., dan Joy, D., 2006. Fundamental of Scanning

Electron Microscopy (SEM), In: Zhou, W., dan Wang, Z.L., eds, Scanning

Microscopy for Nanotechnology Techniques and Application, New York:

Springer.



LAMPIRAN

Lampiran A Beberapa penelitian terkait modifikasi permukaan Fe₃O₄ sejak Tahun 2011-2016

No.	AUTHOR (TAHUN)	MATERIAL	METODE SINTESIS	KELEBIHAN	KEKURANGAN
1.	Liu, <i>et al</i> (2011)	Fe ₃ O ₄ -kitosan terikat silang glutaraldehid.	Kopresipitasi	-	- Bentuk material beragam -penggunaan agen pengikat silang glutaraldehid dihindari dalam pembuatan material untuk aplikasi <i>drug delivery</i> karena sifatnya yang <i>irritant</i> .
2.	Wei, <i>et al</i> (2011)	Fe ₃ O ₄ yang dimodifikasi asam sitrat dan asam oleat.	Kopresipitasi	-Kapabilitas dispersi yang tinggi dalam air dan asam oleat. -Adanya sodium sitrat dan asam oleat mampu mencegah terjadinya aglomerasi antar partikel. -Nanopartikel yang dihasilkan memiliki ukuran rata-rata 12-15 nm.	
3.	Dorniani, <i>et al</i> (2012)	Fe ₃ O ₄ yang dimodifikasi kitosan dan asam galat		-ukuran partikel berkisar antara 11-14 nm.	- Fe ₃ O ₄ yang dilapisi kitosan dan asam galat memiliki bentuk partikel yang tak tentu karena aglomerasi. -material <i>carrier</i> bersifat sitotoksik pada sel yang diuji yaitu HT29 dan MCF7. -Pelepasan obat diawal pengujian (pada menit ke 150) sudah mencapai 70%
4.	Salavati-Niasari, <i>et al.</i> , (2012)	Fe ₃ O ₄ -asam oktanoat.	Kopresipitasi	ukuran partikel yang dihasilkan berkisar 25 nm.	Partikel berbentuk batang (<i>rod</i>) Dalam aplikasinya sebagai <i>drug delivery</i> , bentuk <i>spherical</i> lebih disukai dibandingkan bentuk <i>rod</i> untuk mempermudah proses penghantaran obat di

					dalam sistem in vivo.
5.	Mahdavi, <i>et al</i> (2013)	Fe ₃ O ₄ -asam oleat	Kopresipitasi	Ukuran partikel yang dihasilkan <100 nm.	Memiliki keterbatasan untuk terdispersi pada pelarut polar.
6.	Liu, <i>et al</i> (2013)	Fe ₃ O ₄ - cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)	Solvothermal		Hasil karakterisasi TEM menunjukkan distribusi ukuran yang beragam. Namun pada konsentrasi CTAB yang tinggi distribusi ukuran menjadi lebih sempit yang berkisar 230-250 nm. Semakin lama waktu reaksi (solvothermal) distribusi ukuran semakin sempit (semakin seragam), namun bentuk partikel menjadi tidak seragam. Menurut Liopo, <i>et al</i> (2012), penggunaan CTAB pada permukaan AuNanorod menyebabkan efek toksik.
7.	Bonferoni, <i>et al.</i> , (2014)	Kitosan termodifikasi asam oleat dan asam linoleat.		kitosan memiliki biokompatibilitas. Selain itu asam oleat dan linoleat juga diketahui dapat mempercepat mekanisme perbaikan jaringan. Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa material ini bersifat sangat biokompatibel dengan fibroblast dermal manusia.	Penelitian belum diterapkan untuk <i>drug delivery</i> pada jenis sel lainnya.
8.	Cui, <i>et al</i> (2015)	Fe ₃ O ₄ -perfluoro-polyether-carboxylic acid (PCAS)	Kopresipitasi	Ukuran partikel antara 8-14 nm. Penambahan surfaktan menyebabkan penurunan nilai saturasi magnetik dari 74,68 menjadi 55,392 emu g ⁻¹ .	Tidak ada penjelasan terkait toksisitasnya.
9.	Guo, <i>et al</i>	Fe ₃ O ₄	Solvothermal	Agregasi partikel dapat	-Ukuran partikel Fe ₃ O ₄ sebelum

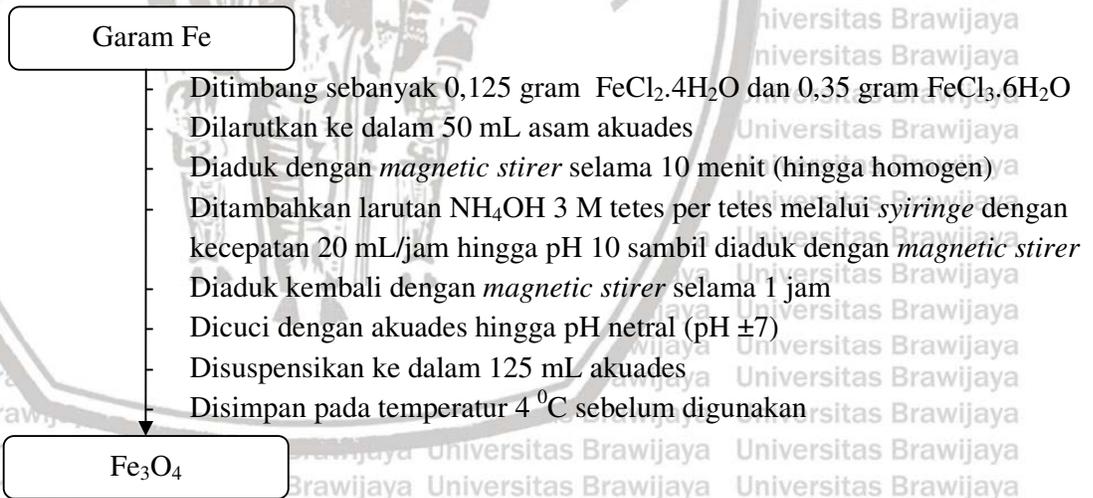
	(2015)	@SiO ₂ @DMSA		direduksi dengan adanya gugus hidrofilik dari DMSA	dan setelah dimodifikasi DMSA adalah 783 nm dan 420 nm. Sedangkan ukuran partikel Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ sebelum dan sesudah ditambah dengan DMSA adalah 613 nm dan 450 nm. Penambahan DMSA menyebabkan reduksi ukuran partikel. -Distribusi ukuran beragam. -Tidak ada penjelasan terkait sitotoksitasnya.
10.	Tran, <i>et al</i> (2015)	Fe ₃ O ₄ -bovine serum albumin (BSA)	Ultrasonikasi	-Ukuran diameter rata-rata partikel yang dihasilkan adalah 28,33 nm. -Profil <i>drug release</i> yang terkontrol. -Pada kondisi pH 7,4 (pH fisiologis) pelepasan obat paclitaxel dari <i>carrier</i> berlangsung selama 30 hari.	-Tidak ada penjelasan profil pelepasan obat pada pH tumor/kanker. -Tidak ada penjelasan uji in vitro maupun in vivo sitotoksik pada sel atau hewan uji. Terkadang penggunaan BSA untuk uji in vitro menunjukkan sitotoksitas yang rendah, namun belum tentu untuk sistem in vivo. Terkadang penggunaan HSA jauh lebih kompatibel dengan sistem in vivo dibandingkan BSA -Menurut Wu, <i>et al.</i> , (2015) Penggunaan biomolekul sebagai <i>surface modifier</i> terkadang memberikan perubahan ukuran yang besar (mencapai >100 nm)
11.	Arum, <i>et al</i> (2015)	Fe ₃ O ₄ -3-Aminopropyl-trimethoxysilane (APTS)	Silanasi dan mikroemulsi	Fe ₃ O ₄ -APTS-Cisplatin maupun Fe ₃ O ₄ -Cs-Cisplatin berbentuk <i>spherical</i> . Fe ₃ O ₄ -APTS-Cisplatin menunjukkan sifat sitotoksik pada sel HeLa. Namun material <i>carrier</i>	Penggunaan glutaraldehid sebagai agen <i>crosslinker</i> sebaiknya dihindari karena bersifat <i>irritant</i> .

				Fe ₃ O ₄ -APTS dan kitosan cenderung tidak sitotoksik pada sel HeLa.	
12.	Xu, <i>et al</i> (2016)	Fe ₃ O ₄ @kitosan@ <i>phytic acid</i> (FCP).	Solvothermal	-	Ukuran nanopartikel FCP yang dihasilkan adalah 243 nm. Namun magnetik saturasi dari Fe ₃ O ₄ menurun dengan adanya modifikasi dengan kitosan dan <i>phytic acid</i> yaitu dari 53,30 menjadi 24,83 emu g ⁻¹ . Selain itu <i>phytic acid</i> bersifat toksik terhadap MG63 <i>cell line</i> . Sedangkan carrier yang hanya tersusun oleh Fe ₃ O ₄ @kitosan tidak memberikan efek toksik.
13.	Shete, <i>et al</i> (2015)	Fe ₃ O ₄ dimodifikasi permukaannya berbasis kitosan dan asam oleat.	Kopresipitasi	Partikel yang dihasilkan memiliki sifat superparamagnetik. Berdasarkan hasil karakterisasi TEM, nanopartikel bare Fe ₃ O ₄ adalah 22,8 nm sedangkan Fe ₃ O ₄ -AO-Kitosan berukuran diameter 16,5 nm. Nanopartikel <i>carrier</i> bersifat tidak beracun pada L929 <i>cell line</i> .	Dalam penelitian tersebut nanopartikel akan digunakan dalam aplikasi hyperthermia. Sehingga belum ada penjelasan terkait profil <i>drug loading</i> dan <i>drug release</i> apabila akan digunakan dalam aplikasi <i>drug delivery</i> . Mengingat kitosan memiliki stabilitas yang rendah dalam pH tumor yang asam, maka pada kajian selanjutnya diperlukan agen pengikat silang yang kompatibel untuk menjaga stabilitas kitosan sebagai agen drug delivery. Agen <i>crosslinker</i> juga dapat berperan dalam pengaturan pelepasan obat dalam aplikasi <i>drug delivery</i> . Lapisan non-magnetik yang terbentuk dipermukaan Fe ₃ O ₄ menyebabkan saturasi

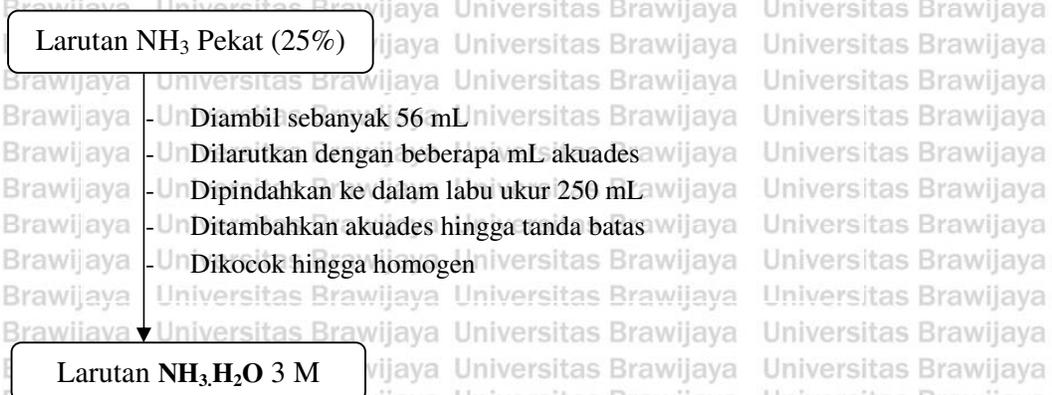
				<p>magnetiknya relatif rendah yaitu 29,7 emu g⁻¹. Keberadaan layer non-magnetik terkadang menyebabkan berkurangnya susceptibilitas magnetik dari Fe₃O₄. Oleh sebab itu diperlukan adanya kajian terkait komposisi yang tepat untuk menentukan ketebalan lapisan non-magnetik yang tetap mampu mempertahankan sifat magnetik Fe₃O₄.</p>
--	--	--	--	--

Lampiran B. Diagram Kerja

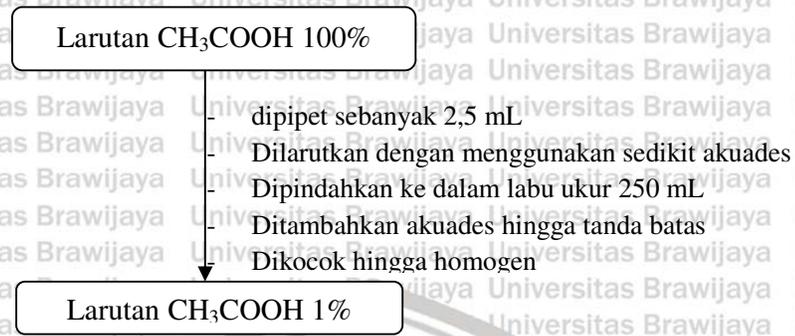
B.1 Pembuatan Larutan Fe₃O₄



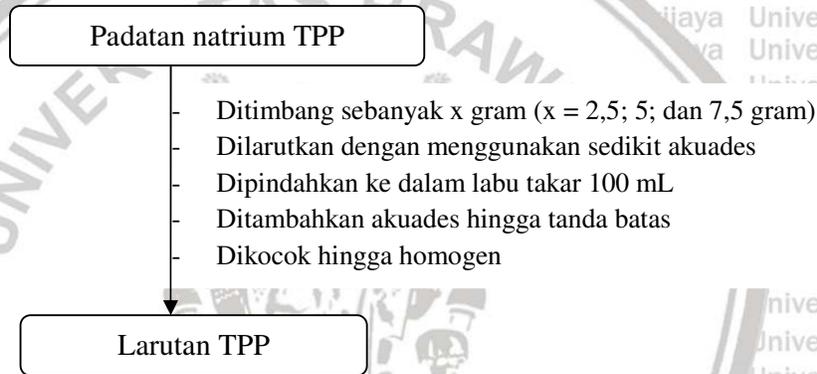
B.2 Pembuatan Larutan NH₃.H₂O 3 M



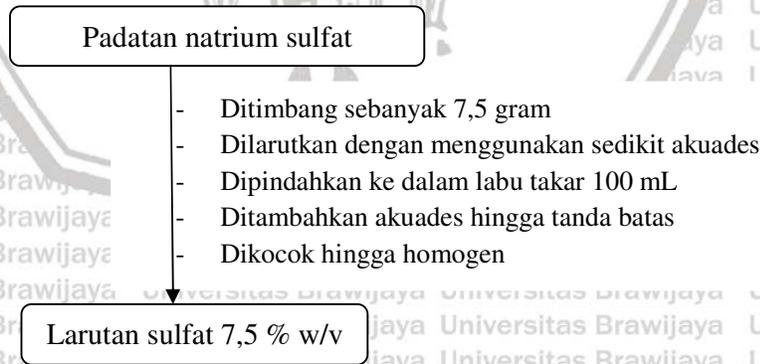
B.3 Pembuatan Larutan Asam 1% v/v sebanyak 250 mL



B.4 Pembuatan Larutan TPP sebanyak 100 mL



B.4 Pembuatan Larutan Natrium Sulfat sebanyak 100 mL



Lampiran C. Perhitungan

C.1 Pembuatan Larutan NH₃.H₂O 3 M Sebanyak 250 mL

$$\text{Berat terkandung} = \frac{25}{100} \times 910 = 227,5$$

$$[NH_4OH] = \frac{\text{Berat terkandung}}{Mr} = \frac{227,5}{17} = 13,38 M$$

$$V_{NH_3} = \frac{3 M \times 250 mL}{13,38 M} = 56,05 mL$$

C.2 Pembuatan Larutan Fe₃O₄ dengan rasio mol Fe²⁺ dan Fe³⁺ (1:2)

$$\text{Mol Fe}^{2+} = 6 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa FeCl}_2 \cdot 4H_2O \text{ yang dibutuhkan} &= \text{mol Fe}^{2+} \times \text{Mr FeCl}_2 \cdot 4H_2O \\ &= 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \times 198,81 \text{ gram/mol} \\ &= 0,125 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\text{Mol Fe}^{3+} = 12 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa FeCl}_3 \cdot 6H_2O \text{ yang dibutuhkan} &= \text{mol Fe}^{3+} \times \text{Mr FeCl}_3 \cdot 6H_2O \\ &= 12 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \times 270,1 \text{ gram/mol} \\ &= 0,350 \text{ gram} \end{aligned}$$

C.3 Pembuatan Larutan Asam Asetat 1 % v/v Sebanyak 250 mL

$$1 \%v/v = \frac{\text{Volume asam asetat } 100\%}{100 \text{ mL}}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume asam asetat } 100\% &= 1 \%v/v \times 250 \text{ mL} \\ &= 2,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

C.4 Pembuatan Larutan TPP 7,5 % w/v Sebanyak 100 mL

$$7,5 \%w/v = \frac{\text{Massa TPP}}{100 \text{ mL}}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa TPP} &= 7,5 \%w/v \times 100 \text{ mL} \\ &= 7,5 \text{ gram} \end{aligned}$$

C.5 Pembuatan Larutan TPP 5 % w/v Sebanyak 100 mL

$$5,0 \%w/v = \frac{\text{Massa TPP}}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Massa TPP} = 5,0 \%w/v \times 100 \text{ mL}$$

$$= 5 \text{ gram}$$

C.6 Pembuatan Larutan TPP 2,5 % w/v Sebanyak 100 mL

$$2,5 \%w/v = \frac{\text{Massa TPP}}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Massa TPP} = 2,5 \%w/v \times 100 \text{ mL}$$

$$= 2,5 \text{ gram}$$

C.7 Pembuatan Larutan sulfat 7,5 % w/v Sebanyak 100 mL

$$7,5 \%w/v = \frac{\text{Massa Sodium Sulfat}}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Massa natrium sulfat} = 7,5 \%w/v \times 100 \text{ mL}$$

$$= 7,5 \text{ gram}$$

Lampiran D. Kumpulan Data

D.1 DATA XRD

Sampel 1

FWHM (drajat)	FWHM (rad)	ln FWHM	2θ	θ	cos θ	1/cos θ	ln 1/cosθ
1.108	0.019346032	-3.94527	30.2	15.1	0.965473	1.035762	0.035138
0.9411	0.016431905	-4.10853	35.46	17.73	0.952502	1.049866	0.048663
0.76	0.013269841	-4.32226	43.1	21.55	0.930097	1.075156	0.072466

K.lamda	exp intercep	L
0.144816	0.014742807	9.822851

Sampel 2

FWHM (drajat)	FWHM (rad)	ln FWHM	2θ	θ	cos θ	1/cos θ	ln 1/cosθ
1.108	0.019346032	-3.94527	30.2	15.1	0.965473	1.035762	0.035138

0.9411	0.016431905	-4.10853	35.46	17.73	0.952502	1.049866	0.048663
0.76	0.013269841	-4.32226	43.1	21.55	0.930097	1.075156	0.072466

K.lamda	exp intercep	L
0.144816	0.030593	4.73372

Sampel 3

FWHM (drajat)	FWHM (rad)	ln FWHM	2θ	θ	cos θ	1/cos θ	ln 1/cosθ
1.7256	0.03013	-3.50225	30.33	17.665	0.952847	1.049486	0.048301
2.1085	0.036815	-3.30185	35.64	26.82	0.892428	1.120538	0.113809
2.3518	0.041063	-3.19264	43.04	28.52	0.87865	1.138109	0.129368

K.lamda	exp intercep	L
0.144816	0.025451	5.690007

Sampel 4

FWHM (drajat)	FWHM (rad)	ln FWHM	2θ	θ	cos θ	1/cos θ	ln 1/cosθ
0.7183	0.012542	-4.37869	35.15	17.575	0.953323	1.048963	0.047802
1.3156	0.022971	-3.77353	53.37	26.685	0.893489	1.119208	0.112621
0.8454	0.014761	-4.21577	62.21	31.105	0.856222	1.167921	0.155226

K.lamda	exp intercep	L
0.144816	0.01292	11.20894

Sampel 5

FWHM (drajat)	FWHM (rad)	ln FWHM	2θ	θ	cos θ	1/cos θ	ln 1/cosθ
1.72	0.030032	-3.5055	29.6	14.8	0.966823	1.034315	0.033739
1.72	0.030032	-3.5055	35.02	17.51	0.953664	1.048587	0.047443
1.8756	0.032749	-3.4189	42.64	28.02	0.882784	1.13278	0.124675

K.lamda	exp intercep	L
0.144816	0.019546	7.409118

Sampel 6

FWHM (drajat)	FWHM (rad)	ln FWHM	2θ	θ	cos θ	1/cos θ	ln 1/cosθ
1.1267	0.019673	-3.92853	30.3	21.65	0.929455	1.075899	0.073157
1.683	0.029386	-3.52725	35.32	28.66	0.877481	1.139626	0.1307
1.724	0.030102	-3.50318	42.86	31.43	0.853278	1.171951	0.15867

K.lamda	exp intercep	L
0.144816	0.009326	15.52903

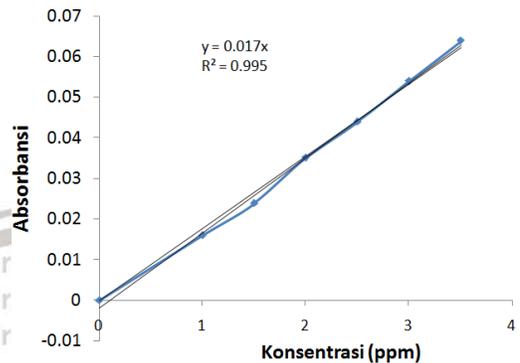
Sampel In-situ

FWHM (drajat)	FWHM (rad)	ln FWHM	2θ	θ	cos θ	1/cos θ	ln 1/cosθ
1.1954	0.020872	-3.86934	35.08	17.54	0.953507	1.04876	0.047609
0.72	0.012571	-4.37633	53.56	26.78	0.892743	1.120143	0.113456
0.64	0.011175	-4.49411	56.8	28.4	0.879649	1.136818	0.128233

K.lamda	exp intercep	L
0.144816	0.009892	14.63933

D.3 KURVA BAKU

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0
1	0.016
1.5	0.024
2	0.035
2.5	0.044
3	0.054
3.5	0.064



D.4 DATA DRUG LOADING

Sampel kitosan 2%

Menit Ke-	Absorbansi	[ppm]	Loading Efficiency (%)
0	0.044	25.88235294	0
60	0.035	20.58823529	20.45454545

Sampel kitosan 1%

Menit Ke-	Absorbansi	[ppm]	Loading Efficiency (%)
0	0.044	25.88235294	0

60 0.029 17.05882353 34.09090909

Sampel kitosan 0,5%

Menit Ke-	Absorbansi	[ppm]	Loading Efficiency (%)
0	0.044	25.88235294	0
60	0.024	14.11764706	45.45454545

Sampel AO 1 mL

Menit Ke-	Absorbansi	[ppm]	Loading Efficiency (%)
0	0.044	25.88235294	0
60	0.028	16.47058824	36.36363636

Sampel AO 0,5 mL

Menit Ke-	Absorbansi	[ppm]	Loading Efficiency (%)
0	0.046	27.05882353	0
60	0.03	17.64705882	34.7826087

D.5 DATA DRUG RELEASE

pH 7,4	Rata-rata		mg	mg/g	%release	Dose (mg)
Waktu (jam)	Absorbansi	[ppm]				
0	0	0	0	0	0	30
1	0.013	0.764705882	0.065	6.5	21.66666667	30
2	0.013	0.764705882	0.065	6.5	21.66666667	30
4	0.013	0.764705882	0.065	6.5	21.66666667	30
6	0.014	0.823529412	0.07	7	23.33333333	30
12	0.013	0.764705882	0.065	6.5	21.66666667	30
24	0.013	0.764705882	0.065	6.5	21.66666667	30
36	0.015	0.882352941	0.075	7.5	25	30
48	0.016	0.941176471	0.08	8	26.66666667	30
60	0.017	1	0.085	8.5	28.33333333	30
72	0.02	1.176470588	0.1	10	33.33333333	30
84	0.02	1.176470588	0.1	10	33.33333333	30

pH 4	Rata-Rata		mg	mg/g	%release	Dose (mg)
Waktu (jam)	Absorbansi	[ppm]				
0	0	0	0	0	0	28.23529412
1	0.012	0.705882353	0.070588235	7.058823529	25	28.23529412
2	0.014	0.823529412	0.082352941	8.235294118	29.1666667	28.23529412
4	0.017	1	0.1	10	35.4166667	28.23529412
6	0.017	1	0.1	10	35.4166667	28.23529412
12	0.019	1.117647059	0.111764706	11.17647059	39.5833333	28.23529412
24	0.022	1.294117647	0.129411765	12.94117647	45.8333333	28.23529412
36	0.027	1.588235294	0.158823529	15.88235294	56.25	28.23529412
48	0.027	1.588235294	0.158823529	15.88235294	56.25	28.23529412
60	0.03	1.764705882	0.176470588	17.64705882	62.5	28.23529412

D.6 Data Simulasi Molecular Docking antara NPsDOX dengan Caspase-8.

Name	Distance	Category	Types	From Chemistry	To Chemistry
:UNL1:H - A:HIS317	3.8314	Hydrophobic	Pi-Sigma	C-H	Pi-Orbitals
A:ARG258 - :UNL1	4.80974	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
A:ARG258 - :UNL1	5.12762	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
A:ARG258 - :UNL1	5.17274	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
A:ARG258 - :UNL1	5.34752	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
A:CYS360 - :UNL1	4.44738	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
A:CYS360 - :UNL1	3.36693	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1:O - A:LYS253	4.26579	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1:O - A:LEU254	5.15898	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1 - A:LEU254	4.77927	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1 - A:ILE257	4.64585	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1 - A:LEU254	3.67993	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1 - A:ILE257	3.30972	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1:H - A:LEU254	4.99101	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1:H - A:ILE257	4.59842	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1:H - A:ILE257	4.67404	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1:H - A:LYS253	4.58658	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1:H - A:LEU254	5.16533	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1:H - A:CYS360	3.52192	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1:H - B:VAL410	4.53054	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
:UNL1:H - A:ILE257	3.94897	Hydrophobic	Alkyl	Alkyl	Alkyl
A:HIS255 - :UNL1	4.66003	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:HIS255 - :UNL1	5.31701	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:HIS255 - :UNL1:H	4.02935	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:HIS255 - :UNL1:H	4.53994	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:HIS255 - :UNL1:H	4.04889	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:HIS255 - :UNL1:H	4.38874	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:HIS317 - :UNL1	5.40158	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:HIS317 - :UNL1	4.65656	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:HIS317 - :UNL1	5.49923	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:TYR324 - :UNL1:O	5.16406	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:TYR324 - :UNL1	4.00514	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:TYR324 - :UNL1	5.31562	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:TYR324 - :UNL1:H	5.29265	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
A:ARG258:CZ - :UNL1:H	2.25058	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
A:ARG258:NE - :UNL1:H	2.15852	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
A:ASP319:CG - :UNL1:H	2.26346	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
A:ASP319:OD1 - :UNL1:H	2.1525	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric

A:ASP319:OD2 - :UNL1:O	1.9178	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
A:GLY318:O - :UNL1:H	1.89956	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
A:LYS253:O - :UNL1:H	2.20555	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric

D.7 Data Simulasi Molecular Docking antara Doxorubicin dengan Top II.

Name	Distance	Category	Types	From Chemistry	To Chemistry
B:SER480:N - N:UNK1:O	3.19011	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
E:DC8:O3' - N:UNK1:O	2.2344	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
E:DC8:N4 - N:UNK1:O	3.28889	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
N:UNK1:H - F:DT9:O2	2.84563	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
N:UNK1:H - B:ASP479:OD1	2.64007	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
B:GLY478:CA - N:UNK1:O	2.44403	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
B:ARG503:CD - N:UNK1:O	2.96938	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
N:UNK1:C - N:UNK1:O	3.46537	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
N:UNK1:C - F:DT9:O4'	3.60678	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
D:DA12 - N:UNK1:C	4.2721	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
D:DG13 - N:UNK1:C	4.99095	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
F:DT9 - N:UNK1:C	4.65155	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
N:UNK1 - B:ALA481	5.04288	Hydrophobic	Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl

D.8 Data Simulasi Molecular Docking antara NPsDOX dengan Top II.

Name	Distance	Category	Types	From Chemistry	To Chemistry
			Unfavorable Bump;Unfavorable Positive;Unfavorable Metal-Donor	Steric; Positive;H-Donor	Steric; Positive;Metal
B:LYS879:NZ - :UNL1:H	2.25697	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:GLN954:CD - N:UNK1:C	2.3992	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:CA - :UNL1:H	2.32624	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:C - :UNL1:H	2.34713	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:CB - :UNL1:C	2.32358	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:CB - :UNL1:H	1.42124	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:CB - :UNL1:H	2.28246	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:CG - :UNL1:H	1.44416	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:CG - :UNL1:H	2.31331	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:CD - :UNL1:H	2.08587	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:CD - :UNL1:H	1.52877	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:CE - :UNL1:H	2.1581	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:CE - :UNL1:H	1.57707	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:LYS1006:NZ - :UNL1:H	2.17862	Unfavorable	Unfavorable Bump;Unfavorable Positive-Positive	Steric;Positive	Steric;Positive
B:THR1009:CG2 - :UNL1:O	1.35256	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
B:THR1009:CG2 - :UNL1:H	2.19665	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric

D:DG18:N2 - :UNL1:H	2.15811	Unfavorable	Unfavorable Bump;Metal-Donor	Steric;H-Donor	Steric;Metal
D:DT20:C5' - :UNL1:C	2.19266	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
D:DT20:C5' - :UNL1:H	1.15686	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
D:DT20:C4' - :UNL1:H	1.71446	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
D:DT20:C4' - :UNL1:H	2.22898	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
D:DT20:C1' - :UNL1:H	2.19621	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
D:DT20:C1' - :UNL1:H	2.33679	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
E:DA1:C2 - N:UNK1:O	1.82931	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
E:DC3:C4' - N:UNK1:O	1.41868	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
E:DC4:C4' - :UNL1:O	2.28951	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
E:DC4:C1' - :UNL1:H	1.83343	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric
E:DC4:C2 - :UNL1:H	2.38103	Unfavorable	Unfavorable Bump	Steric	Steric

Lampiran E. Respon nanopartikel terhadap magnet eksternal.

