

Kitosan Teradiasi Gamma 5 kGy Mempengaruhi Muatan Permukaan Nanopartikel MikroRNA

5 Gamma kGy Irradiated Chitosan Affects Surface Charge of mikroRNA Nanoparticle

Firasti A N Sumadi¹, DP Perkasa², Tirta Wardana³, Ronny Martien⁴ and Sofia Mubarika Harjana⁵

¹Program Studi Farmasi, Universitas Muhammadiyah Malang, Indonesia

²Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN, Indonesia

³Fakultas Kedokteran, Universitas Jendral Soedirman

⁴Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

⁵Departemen Histologi dan Biologi Sel, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada
korespondensi: firasti@umm.ac.id

Abstract Nanoparticles are non-viral vectors with biodegradability and controlled release abilities that are widely used in gene transfer. Nanoparticles are said to be able to effectively combine and concentrate DNA and RNA in products to be delivered to various cells. Based on changes in microRNA expression in cancer, delivery using microRNA nanoparticles from outside the body is expected to be one of the therapeutic solutions. Irradiated chitosan is assumed to undergo cutting off the main polysaccharide group to produce a smaller molecular weight compared to nonirradiated chitosan. The desired irradiation process to reduce chitosan particle size so that it has better absorption efficiency into the cell needs to be further evaluated including looking at its effect on the final potential zeta. Zeta potential is important to ensure that the nanoparticles are positive enough to be able to enter the negatively charged cell membrane. Chitosan used was irradiated at a dose of 5kGy mixed with 1: 1 nucleic acid ratio. The results of zeta potential measurements showed the highest zeta potential values of 15.27 mV and 13.63 mV obtained in the formula with chitosan-microRNA composition only. The measurement result of zeta potential of irradiated chitosan nanoparticles decreases the surface charge of the particles, this can reduce the potential of nanoparticles for the process of delivery into the cell.

Keyword : *Irradiated chitosan; nanoparticle; zeta potential*

I. PENDAHULUAN

Nanopartikel adalah vector non-viral dengan biodegradabilitas dan kemampuan pelepasan terkontrol yang banyak digunakan pada transfer gen. Nanopartikel dikatakan dapat mengkombinasikan dan mengkonsentrasikan DNA dan RNA secara efektif dalam produk untuk dihantarkan ke dalam berbagai macam sel. Karena ukurannya yang sangat kecil, nanopartikel berbasis polimer yang mengandung gen dapat mengatasi hambatan pada membrane sel dengan endositosis (Chen *et al.*, 2015). Model polianionik nanokompleks yang terbentuk dari polikation dan lawannya polianion telah menunjukkan potensi yang baik dalam aplikasinya sebagai agen biomedis dan nanobioteknologi (Deng *et al.*, 2014). Salah satu diantaranya yang digunakan sebagai bahan nanopartikel berbasis polikation-anion adalah kitosan.

Berdasarkan perubahan ekspresi mikroRNA pada kanker, sebuah pendekatan terapi dapat dilakukan untuk mengembalikan fungsinya dalam sel-sel tumor. Usaha yang dilakukan adalah dengan memungkinkan penghantaran menggunakan nanopartikel antagonis mikroRNA dan mimic mikroRNA eksogen. Antagonis mikroRNA (antimikroRNA) digunakan untuk menghambat mikroRNA endogen yang menunjukkan overekspresi pada kejadian kanker. Sedangkan mikroRNA tiruan digunakan untuk mengembalikan fungsi mikroRNA yang hilang karena ekspresinya yang rendah (Tyagi *et al.*, 2016).

Kitosan tersedia secara komersial pada beberapa tipe dan memiliki berat molekul yang bervariasi antara 10.000 hingga 1.000.000. Fungsi umum kitosan adalah sebagai agen coating, disintegan,

agen pembentuk film, mucoadhesive, pengikat tablet, agen peningkat viskositas. Kitosan telah diproses menjadi beberapa bentuk sediaan termasuk gel, film, beads, microspheres, tablets, dan pelapis untuk liposom (Rowe, 2009). Kitosan iradiasi diasumsikan mengalami pemotongan gugus utama polisakarida sehingga menghasilkan berat molekul yang lebih kecil dibandingkan dengan kitosan noniradiasi. Proses iradiasi yang diinginkan untuk mengecilkan ukuran partikel kitosan sehingga memiliki efisiensi penyerapan ke dalam sel lebih baik perlu dievaluasi lebih lanjut termasuk melihat pengaruhnya pada zeta potensial akhir. Zeta potensial penting untuk memastikan nanopartikel cukup positif untuk dapat memasuki membran sel yang bermuatan negatif.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kitosan

Kitosan memiliki rantai dasar bermuatan positif yang dapat membentuk kompleks nano dengan asam nukleat dalam hal ini termasuk mikroRNA yang bermuatan negatif. Kitosan dapat meningkatkan kemampuan masuk ke dalam sel dengan berikatan pada membran sel yang bermuatan negatif serta melindungi mikroRNA dari nuklease. Kitosan juga dipilih karena manfaatnya yang lain seperti toksisitas rendah, imunogenisitas rendah, dan juga biodegradabilitas dan biokompatibilitas yang baik (Chen, 2015).

2.2 Nanopartikel Kitosan-Asam Nukleat

Diantara metode paling dasar pembuatan nanopartikel kitosan dengan asam nukleat adalah dengan memanfaatkan interaksi elektrostatik dengan mencampur kitosan yang bermuatan positif dengan asam nukleat yang bermuatan negatif. Metode kedua adalah dengan gelasi ionik. Metode ini melibatkan penggunaan polianion sebagai pengikat silang (*cross linker*) dan yang biasanya digunakan adalah tripoliphosphate (TPP). (Raftery *et al.*, 2013).

Asam nukleat yang bermuatan negatif karena mengandung gugus pospat secara otomatis akan berikatan dengan polimer bermuatan positif seperti kitosan yang mengandung gugus nitrogen. Nanopartikel ini selanjutnya akan masuk ke dalam sel melalui proses endositosis setelah sebelumnya kompleks yang bermuatan positif berikatan dengan

membran sel yang bermuatan negatif. Vesikel ini kemudian masuk dalam sitoplasma dan dapat melepaskan asam nukleat yang dibawa karena degradasi oleh enzim di dalam sel (Martien, 2009).

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi efisiensi transfeksi dari nanopartikel kitosan dengan asam nukleat yakni berat molekul, derajat deasetilasi, rasio n/p, konsentrasi asam nukleat, dosis asam nukleat, pH dari media transfeksi, konten serum, stabilitas kompleks asam nukleat dan kitosan, toksisitas vector kitosan, modifikasi kitosan untuk mempermudah transfeksi, dan tipe sel yang ditransfeksi. Berat molekul kitosan yang lebih kecil akan menghasilkan kompleksasi kitosan-asam nukleat yang lebih kecil, namun kitosan dengan berat molekul yang lebih besar dapat mengikat plasmid lebih efisien. Sementara itu derajat deasetilasi menunjukkan presentase muatan positif grup asetil pada rantai kitosan sehingga sangat menentukan muatan dari polimer. Keseluruhan muatan dari kompleks kitosan-asam nukleat dapat dihitung dari rasio n/p (nitrogen/phosphate) yang mempengaruhi kemampuan kitosan untuk sepenuhnya menangkap asam nukleat dan berikatan pada ukuran nanopartikel yang terbentuk (Raftery *et al.*, 2013).

Faktor iradiasi gamma () yang digunakan dalam penelitian ini juga termasuk metode untuk proses sterilisasi produk farmasetik. Bagaimanapun iradiasi akan mempengaruhi performa dari sistem penghantaran obat sehingga diperlukan karakterisasi untuk menentukan sifatnya (Desai dan Park, 2006).

III. METODE PENELITIAN

Penelitian yang akan dilakukan berupa penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group* menggunakan nanopartikel kitosan-mikroRNA sebagai objek penelitian.

3.1 Bahan

Kitosan berat molekul medium (Sigma) dari Dr. rer. nat Ronny Martien, M.Si dan juga digunakan juga kitosan yang diradiasi dengan dosis 5kGy yakni kitosan untuk keperluan medis (PT Biotech Surindo) yang didapatkan dari BATAN.

3.2 Pembuatan Nanopartikel dan Pengukuran Zeta Potensial

Nanopartikel dibuat dengan mencampurkan sebanyak 1:1 perbandingan larutan asam nukleat dengan larutan kitosan 0,05% kemudian campuran kemudian divorteks. Campuran ini akan otomatis membentuk nanokompleks karena interaksi muatan positif RNA (dari fosfat) dan juga chitosan yang bermuatan positif (Martien, 2009). MikroRNA yang digunakan dalam formulasi terdiri dari 2 macam yakni mikroRNA (1) dan mikroRNA (2). Zeta potensial dari permukaan kompleks yang terbentuk diukur menggunakan alat yang sama yaitu Horiba Sz-100

menurunkan muatan permukaan partikel dikarenakan mungkin terjadi pemutusan gugus amino selama proses radiasi.

Muatan permukaan nanopartikel adalah faktor yang krusial dalam menentukan efisiensi transfeksi nanopartikel (Gan *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2016; Kaban *et al.*, 2016). Selain karena menentukan proses interaksi dengan membran sel yang bermuatan negatif dan menginisiasi endositosis, proses pelepasan partikel dari endolisosom juga dipengaruhi oleh muatan permukaan nanopartikel. Interaksi nanopartikel dan lisozim juga dipengaruhi oleh muatan permukaan (Gan *et al.*, 2015).

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sistem pembawa obat yang baik dikarakterisasi dengan : 1) obat dilepaskan pada situs yang tepat dengan dosis yang tepat, dan pada waktu yang dibutuhkan, 2) biokompatibel dan biodegradable, dan 3) obat tertransformasi menjadi nontoksik dan polimer yang membawa dapat dieleminasi tanpa menimbulkan kerusakan dari tubuh. Sistem nanopartikel dipilih karena dapat diadministrasikan secara intravena karena diameter dari kapiler pembuluh darah yang paling kecil diperkirakan adalah 4 μm (Sailaja *et al.*, 2010; Wilczewska *et al.*, 2012).

V. PENUTUP

Proses iradiasi gamma dengan dosis 5 kGy dapat menurunkan zeta potensial dari nanopartikel kitosan dengan mikroRNA yang terbentuk. Hal ini perlu didukung lebih lanjut dengan penelitian selanjutnya untuk mengetahui apakah penurunan zeta potensial juga menurunkan efisiensi penghantaran nanopartikel pada sel.

Tabel 4.1. Hasil Zeta Potensial dari Nanopartikel MikroRNA

Formula	Zeta Potensial (mV)
Kitosan – mikroRNA (1)	15.27
Kitosan teriradiasi – mikroRNA (1)	1.33
Kitosan - mikroRNA (2)	13.63
Kitosan iradiasi – mikroRNA (2)	2.67

Hasil pengukuran zeta potensial menunjukkan nilai zeta potensial paling tinggi yakni 15,27 mV dan 13,63 mV didapatkan pada formula dengan komposisi kitosan-mikroRNA saja (tabel 1). Hasil kitosan iradiasi ternyata

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Chen, Xiao, Shen Gu, Bi-Feng Chen, Wei-Liang Shen, Zi Yin, Guo-Wei Xu, Jia-Jie Hu, et al. "Nanoparticle Delivery of Stable MiR-199a-5p Agomir Improves the Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells via the HIF1 α Pathway." *Biomaterials* 53 (June 2015): 239–50. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.071>.
- [2]. Deng, Xiongwei, Minjun Cao, Jiakun Zhang, Kelei Hu, Zhaoxia Yin, Zhixiang Zhou, Xiangqian Xiao, et al. "Hyaluronic Acid-Chitosan Nanoparticles for Co-Delivery of MiR-34a and Doxorubicin in Therapy against Triple Negative Breast Cancer." *Biomaterials* 35, no. 14 (May 2014): 4333–44. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.006>.
- [3]. Tyagi, Nikhil, Sumit Arora, Sachin K. Deshmukh, Seema Singh, Saravanakumar Marimuthu, and Ajay P. Singh. "Exploiting Nanotechnology for the Development of MikroRNA-Based Cancer Therapeutics." *Journal of Biomedical Nanotechnology* 12, no. 1 (January 1, 2016): 28–42. <https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2172>.
- [4]. Desai, Kashappa Goud, and Hyun Jin Park. "Study of Gamma-Irradiation Effects on Chitosan Microparticles." *Drug Delivery* 13, no. 1 (January 2006): 39–50. <https://doi.org/10.1080/10717540500309123>.
- [5]. Rowe, Raymond C., Paul J. Sheskey, Walter G. Cook, Marian E. Fenton, and American Pharmacists Association, eds. *Handbook of Pharmaceutical Excipients: Edited by Raymond C. Rowe, BPharm, PhD, DSC, FRPharmS, FRSC, CPhys, MInstP, Chief Scientist, Paul J. Sheskey, BSc, RPh, Principal Research Scientist, the Dow Chemical Company, Midland, MI, USA, Walter G. Cook, BSc, PhD, Research Fellow, Materials Science Group of Pharmaceutical R&D, Pfizer, Sandwich, Kent, UK, Marian E. Fenton, BSc, MSc, Development Editor, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London, UK*. Seventh edition. London: APhA/Pharmaceutical Press, 2012.
- [6]. Raftery, Rosanne, Fergal O'Brien, and Sally-Ann Cryan. "Chitosan for Gene Delivery and Orthopedic Tissue Engineering Applications." *Molecules* 18, no. 5 (May 15, 2013): 5611–47. <https://doi.org/10.3390/molecules18055611>.
- [7]. Martien R., "Oral Delivery of Nucleic Acid" *Oral Delivery of Macromolecular Drugs* (2009) https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0200-9_12
- [8]. Sailaja, A Khrisna, P Amareshwar, and P Charkravarty. "Chitosan Nanoparticles as a Drug Delivery System." *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 1, no. 3 (2010): 474–84.
- [9]. Wilczewska, A. Z., K Niemirowics, K H Markiewicz, and Halina Car. "Nanoparticle as Drug Delivery Systems." *Pharmacological Reports*, no. 64 (2012): 1020–37.
- [10]. Gan, Quan, Tao Wang, Colette Cochrane, and Paul McCarron. "Modulation of Surface Charge, Particle Size and Morphological Properties of Chitosan-TPP Nanoparticles Intended for Gene Delivery." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 44, no. 2–3 (August 2005): 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.06.001>.
- [11]. Wu, Guangsheng, Chao Feng, Guangyan Hui, Zhongshan Wang, Jun Tan, Lankun Luo, Peng Xue, Qintao Wang, and Xiguang Chen. "Improving the Osteogenesis of Rat Mesenchymal Stem Cells by Chitosan-Based-MikroRNA Nanoparticles." *Carbohydrate Polymers* 138 (March 2016): 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.044>.
- [12]. Kaban, Kubra, Emine Salva, and Julide Akbuga. "In Vitro Dose Studies on Chitosan Nanoplexes for MikroRNA Delivery in Breast Cancer Cells." *Nucleic Acid Therapeutics* 27, no. 1 (February 2017): 45–55. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0633>.