

**ENKAPSULASI FUKOSANTIN DARI *Cyclotella striata* DENGAN NANO
KITOSAN-PEKTIN MENGGUNAKAN METODE GELASI IONIK**

DISERTASI

Oleh

**RIDHO NAHROWI
NPM 2037061006**



**PROGRAM STUDI DOKTOR MIPA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

ENKAPSULASI FUKOSANTIN DARI *Cyclotella striata* DENGAN NANO KITOSAN–PEKTIN MENGGUNAKAN METODE GELASI IONIK

Oleh

RIDHO NAHROWI

Fukosantin merupakan senyawa karotenoid yang memiliki bioaktivitas sebagai agen antikanker, antiperadangan, antibakteri, dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis nano kitosan–pektin dan mengenkapsulasi fukosantin dengan nano kitosan–pektin menggunakan metode gelasi ionik. Kitosan yang digunakan dalam penelitian ini diekstraksi dari kulit udang. Kitosan hasil ekstraksi dikarakterisasi menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dan *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) serta dibandingkan dengan kitosan standar. Rendemen kitosan yang dihasilkan sebesar 16,24%. Nilai derajat deasetilasi kitosan dari kulit udang dan kitosan standar masing-masing memiliki nilai derajat deasetilasi sebesar 80,28 dan 79,96%. Berdasarkan analisis hasil DSC, kitosan hasil ekstraksi dari kulit udang kitosan dan kitosan standar masing-masing memiliki puncak eksoterm pada temperatur 307 dan 295°C. Selanjutnya dilakukan sintesis nano kitosan–pektin dengan perbandingan massa kitosan–pektin 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, dan 3:1. Hasil analisis *Particle Size Analyzer* (PSA) menunjukkan ukuran partikel nano kitosan–pektin terkecil diperoleh pada perbandingan massa kitosan–pektin 2:1, dengan distribusi ukuran partikel rata-rata sebesar 173 nm. Hasil analisis *Scanning Electron Microscope* (SEM) menunjukkan nano kitosan–pektin memiliki morfologi bulat dengan ukuran diameter 97–195 nm. Ikatan antara kitosan dengan pektin dapat diketahui dari hasil analisis FTIR dengan puncak serapan pada 1632 dan 1535 cm^{-1} yang mengidentifikasi vibrasi gugus karbonil pektin dan gugus amino kitosan. Selanjutnya, fukosantin diperoleh dari isolasi mikroalga *Cyclotella striata* dalam air laut kemudian diekstraksi menggunakan etanol dan selanjutnya dimurnikan dengan menggunakan *Medium-Pressure Liquid Chromatography* (MPLC). Berdasarkan hasil kromatogram MPLC, senyawa fukosantin tersebut berada pada fraksi 8 dan 9 yang dibuktikan dengan hasil analisis spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 448 nm. Enkapsulasi fukosantin dilakukan

dengan cara menambahkan larutan nano kitosan–pektin secara *dropwise* ke dalam larutan fukosantin. Nilai efisiensi enkapsulasi fukosantin adalah sebesar 75,19%. Enkapsulasi fukosantin dalam nano kitosan–pektin meningkatkan waktu paruh oksidasi 133 jam lebih lama dibandingkan dengan fukosantin yang tidak dienkapsulasi.

Kata kunci: enkapsulasi, fukosantin, gelasi ionik, kitosan, pektin.

ABSTRACT

ENCAPSULATION OF FUCOXANTHIN FROM *Cyclotella striata* BY NANO CHITOSAN–PECTIN USING IONIC GELATION METHOD

By

RIDHO NAHROWI

Fucoxanthin is a carotenoid compound with bioactivity as an anticancer, anti-inflammatory, antibacterial, and antioxidant agent. This research aims to synthesize nano chitosan–pectin and encapsulate the fucoxanthin with nano chitosan–pectin using the ionic gelation method. The chitosan used in this research was extracted from shrimp shells. The extracted chitosan was characterized using Fourier Transform Infrared (FTIR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) and compared with standard chitosan. The yield of chitosan produced was 16.24%. The deacetylation degree of chitosan from shrimp shells and standard chitosan was 80.28% and 79.96%, respectively. Based on the DSC analysis results, chitosan extracted from chitosan shrimp shells and standard chitosan have exothermic peaks at a temperature of 307 and 295°C, respectively. Next, nano chitosan–pectin synthesis was carried out with chitosan–pectin mass ratios of 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, and 3:1. The results of the Particle Size Analyzer (PSA) analysis showed that the smallest chitosan–pectin nanoparticle size was obtained at a chitosan–pectin mass ratio of 2:1, with an average particle size distribution of 173 nm. The results of Scanning Electron Microscope (SEM) analysis show that nano chitosan–pectin has sphere morphology with a diameter of 97–195 nm. The interaction between chitosan and pectin was known from the results of FTIR analysis with absorption peaks at 1632 and 1535 cm⁻¹, which identify the vibration of the carbonyl group of pectin and the amino group of chitosan. Next, fucoxanthin was obtained from the isolation of the microalgae *Cyclotella striata* in seawater, then extracted using ethanol, and then purified using Medium-Pressure Liquid Chromatography (MPLC). Based on the resulting MPLC chromatogram, the fucoxanthin compound is found in fractions 8 and 9, as proven by the results of UV-Vis spectrophotometer analysis at a maximum wavelength of 448 nm. The encapsulated fucoxanthin is carried out by adding the

nano chitosan–pectin solution dropwise to the fucoxanthin solution. The efficiency of fucoxanthin encapsulation in nano chitosan–pectin was 75.19%. Encapsulation of fucoxanthin in nano chitosan–pectin increased the oxidation half-time by 133 hours longer than the unencapsulated fucoxanthin.

Keyword: chitosan, encapsulation, fucoxanthin, ionic gelation, pectin

**ENKAPSULASI FUKOSANTIN DARI *Cyclotella striata* DENGAN NANO
KITOSAN–PEKTIN MENGGUNAKAN METODE GELASI IONIK**

Oleh

RIDHO NAHROWI

Disertasi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
DOKTOR MIPA**

Pada

**Program Pascasarjana
Doktor MIPA**



**PROGRAM STUDI DOKTOR MIPA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

Judul Disertasi

**ENKAPSULASI FUKOSANTIN DARI
Cyclotella striata DENGAN NANO
KITOSAN-PEKTIN MENGGUNAKAN
METODE GELASI IONIK**

Nama Mahasiswa

Ridho Nahrowi

Nomor Pokok Mahasiswa

2037061006

Jurusan

: Doktor MIPA

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Prof. John Hendri, Ph.D.

NIP. 19581021198703001

Promotor

Prof. Andi Setiawan, Ph.D.

NIP. 19581021198703001

Ko-Promotor

Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna J., M.Si.

NIP. 197707132009122002

Ko-Promotor

2. Ketua Program Studi Doktor MIPA

Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc.

NIP. 196103111988031001

PENGESAHAN PENGUJI

**ENKAPSULASI FUKOSANTIN DARI *Cyclotella striata* DENGAN NANO
KITOSAN-PEKTIN MENGGUNAKAN METODE GELASI IONIK**

DISERTASI

OLEH

Ridho Nahrowi
NPM. 2037061006

Tim Penguji

Ketua : Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.
NIP.196403261989021001

Sekretaris : Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

Anggota : Dr. G. Nugoho Susanto, M.Sc.
NIP. 19610311 1988031001

: Prof. John Hendri, Ph.D.
NIP. 19581021198703001

: Prof. Andi Setiawan, Ph.D.
NIP. 195809221988111001

: Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna J., M.Si.
NIP. 197707132009122002

: Prof. Kamisan D. Pandiangan, M.Si.
NIP. 197212051997032001

: Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, M.T.
NIP. 197407052000031001

: Prof. Dr. Sal Prima Yudha, M.Si.
NIP. 197406012000031001

Telah dipertahankan di depan tim penguji pada sidang terbuka
dan dinyatakan telah memenuhi syarat pada tanggal **29 Juli 2024**

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam

Direktur Program Pascasarjana

Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.
NIP. 196403261989021001

PERNYATAAN ORISINILITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya di dalam disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan 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 pustaka.

Bandar Lampung, 29 Juli 2024



RIDHO NAHROWI
NPM. 2037061006

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Margamulya pada tanggal 8 Mei 1993, sebagai anak pertama dari tiga bersaudara, dari Bapak Supingi dan Ibu Mujiah. Penulis mulai menempuh pendidikan di TK PGRI 5 Sribasuki, lulus pada tahun 1999 dan melanjutkan pendidikan di SD Negeri 1 Margamulya dan lulus pada tahun 2005. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan di SMP Negeri 2 Batanghari dan selesai pada tahun 2008. Pada tahun yang sama, penulis melanjutkan pendidikan di SMA Negeri 1 Batanghari dan lulus pada tahun 2011. Pendidikan penulis dilanjutkan di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung dan lulus pada tahun 2015. Setelah itu penulis melanjutkan pendidikan di Program Pascasarjana Magister Kimia Universitas Lampung dan lulus tahun 2017. Pada tahun 2020, penulis melanjutkan pendidikan di Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung.

MOTO DAN PERSEMBAHAN

***“Innallâha lâ yughayyiru mâ biqaumin hattâ
yughayyirû mâ bi'anfusihim”***

Sesungguhnya Allah tidak mengubah keadaan suatu kaum hingga mereka mengubah apa yang ada pada diri mereka. (QS. 13: 11)

“Lâ yukallifullâhu nafsan illâ wus'ahâ”

Allah tidak membebani seseorang, kecuali menurut kesanggupannya. (QS. 2: 286)

Atas Rahmat Allah SWT. Ku persembahkan karya sederhana ini kepada

- ♥ *Orang tuaku tercinta Bapak Supingi dan Ibu Mujiah yang selalu mengalunkan do'a dalam setiap langkahku. Terima kasih atas segala bimbingan, nasihat, wejangan, kasih sayang, daya dan upaya yang tiada hentinya. Mohon doa restunya agar setiap langkahku selalu dalam keberkahan Allah SWT.*
- ♥ *To My Beloved “Garwo Ginasih Muyassaroh, S.Pd.” terima kasih atas perhatian, dukungan, motivasi, semangat, dan curahan kasih sayang yang begitu tulus untukku. Semoga Allah SWT selalu menjaga keluarga kita dalam kebaikan hingga ke surga.*
- ♥ *Anakku tercinta Muhaimin Asy'ari yang telah memberikan kebahagiaan dan keceriaan dalam setiap momenku, semoga ananda selalu dalam keberkahan dan sukses dunia akhirat.*

- ♥ *Adikku tersayang Bipda Farhanul Majid dan Nila Rahmasari, semoga kalian berdua selalu menjadi anak yang berbakti untuk orangtua, agama, bangsa, dan negara, serta sukses dunia akhirat.*
- ♥ *Bapak Sugiran (alm) dan Ibu Marsiyati, terima kasih atas do'a, dukungan, dan motivasinya.*
- ♥ *Promotor I Bapak Prof. John Hendri, Ph.D., Ko-Promotor I Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D., Ko-Promotor II Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si., dan semua Civitas Akademika Program Studi Doktor MIPA yang telah membimbing dan mendidik penulis selama menempuh pendidikan di kampus.*
- ♥ *Bapak Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T., selaku pembimbing S1 dan S2, terima kasih atas dukungan dan motivasi kepada penulis untuk terus belajar dan menimba ilmu.*
- ♥ *Keluarga Tim Penelitian Prof. John Hendri, Ph.D., Ibu Dr. Si. Widyastuti, M.Si. Bapak Dr. Si. Syaiful Bahri, M.Si. Bapak Dr. Si. (C) Wawan Abdullah Setiawan, M.Si. Dr. Si. (C) Fendi Setiawan, M.Si. dan Nafila Khansa Salsabila, M.Si. yang telah memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis.*

SANWACANA

Alhamdulillah, tsummal hamdulillah, tsummal hamdulillahi rabbil alamin, segala puji hanya bagi Allah, *Rabb* semesta alam yang telah memberikan nikmat-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul “Enkapsulasi Fukosantin dari *Cyclotella striata* dengan Nano Kitosan–Pektin Menggunakan Metode Gelasi Ionik” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor Sains (Dr.Si) pada Prodi Doktor MIPA Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Bacaan *Allahumma sholli wasallim wabarik ‘alaihi* semoga tetap terlimpahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang memberikan syafa’atnya kepada seluruh umatnya di dunia dan di akhirat, Aamiin.

Teriring do’a yang tulus, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Lampung Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M. yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh pendidikan pada Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si. selaku Direktur Pascasarjana Universitas Lampung.
3. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. yang telah menyiapkan fasilitas untuk kelancaran pendidikan dan penelitian penulis.
4. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D. selaku promotor dan pembimbing akademik penulis yang telah membimbing, mendidik, dan mengarahkan penulis dengan kesabaran dan kasih sayang yang tulus sehingga disertasi ini dapat terselesaikan. Semoga barokah Allah selalu menyertai Beliau.

5. Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D. selaku Ko-Promotor I penulis yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan sehingga disertasi ini dapat terselesaikan. Semoga Allah membalasnya dengan kebaikan.
6. Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si. selaku Ko-Promotor II penulis yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan sehingga disertasi ini dapat terselesaikan.
7. Ibu Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan, M.Si. selaku Penguji 1 yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan nasihat kepada penulis sehingga disertasi ini dapat terselesaikan dengan baik.
8. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Penguji 2 yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan nasihat kepada penulis sehingga disertasi ini dapat terselesaikan dengan baik.
9. Bapak Prof. Dr. Sal Prima Yudha, M.Si. selaku Penguji Eksternal yang telah memberikan masukan dan saran sehingga disertasi ini menjadi lebih baik.
10. Bapak Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc. selaku Ketua Program Studi Doktor MIPA atas saran, masukan, dan bantuannya.
11. Ibu Dr. Khoirin Nisa, M.Si. selaku Sekretaris Program Studi Doktor MIPA atas saran, masukan, dan bantuannya.
12. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset dan Teknologi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Republik Indonesia yang telah memberikan pendanaan Penelitian Disertasi Doktor dengan nomor kontrak 114/E5/PG.02.00.PT/2022 tanggal 10 Mei 2022.
13. Bapak Dr. Si. Subian Saidi, M.Si., Ibu Dr. Si. Dian Kurniasari, M.Sc., Bapak Dr. Si. Aristoteles, M.Si., Bapak Dr. Si. Syaiful Bahri, M.Si., Ibu Tika Widayanti, M.Si., Bapak Arif Surtono, M.Si., Bapak Rico Andrian, M.Kom., Bapak Nurjoko, M.T.I., dan Ibu Reni Permata Sari, M.Si. yang telah memberikan dukungan dan semangat kepada penulis.
14. Bapak Dr. Ir. Paul Benyamin Timotiwu, M.S. selaku Kepala UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) tahun 2016–2023 dan Bapak Prof. Dr. La Zakaria, M.Sc. selaku Kepala UPT LTSIT tahun 2023 yang telah menyediakan fasilitas *Scanning Electron Microscope* (SEM).

15. Ibu Dr. Si. Widyastuti, M.Si., Bapak Purna Firdaus, M.Si., Kurniawan Shidiq Sutikno, M.Si., Annisa Mufida, M.T., Romando Lumbanraja, S.P., Ibu Farlina, S.P., Rosyidatul Lutfiah, M.Si., Nafila Khansa Salsabila, M.Si., dan seluruh staf UPT LTSIT yang telah membantu penulis selama penelitian.
16. Ibu Wiji Rahayu dan PT Diethelm Keller Siber Hegner (DKSH) Indonesia yang telah menyediakan fasilitas *Particle Size Analyzer* (PSA).
17. Siti Aisah, M.Si. yang telah memberikan dukungan penelitian tentang nano kitosan dari fungi.
18. Seluruh civitas akademika Universitas Lampung yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan bantuannya, semoga Allah membalas seluruh amal baik kita semua.

Akhir kata, penulis memohon maaf kepada semua pihak apabila disertasi ini masih terdapat kesalahan dan kekeliruan, semoga tesis ini dapat berguna dan bermanfaat dalam rangka pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi untuk masa depan, Aamiin.

Bandar Lampung, 29 Juli 2024

Penulis

Ridho Nahrowi

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR GAMBAR.....	iii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
DAFTAR PUBLIKASI	vi
DAFTAR SEMINAR	vii
 BAB I. PENDAHULUAN	 1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian	4
1.3. Manfaat Penelitian	5
1.4. Kebaharuan Penelitian	5
 BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	 6
2.1. Kitosan	6
2.1.1. Sumber-Sumber Kitosan	6
2.1.2. Sifat-Sifat Kitosan.....	8
2.1.3. Proses Ekstraksi Kitosan	9
2.1.4. Aplikasi Kitosan dalam Bidang Pengobatan	12
2.2. Pektin	12
2.2.1. Sifat-Sifat Pektin	13
2.2.2. Aplikasi Pektin dalam Bidang Farmasi	13
2.3. Metode Gelasi Ionik.....	14
2.4. Interaksi Kimia Kitosan dengan Pektin	16
2.5. Mikroalga <i>Cyclotella striata</i>	17
2.6. Fukosantin	18
2.6.1. Isolasi Fukosantin	18
2.6.2. Sifat Bioaktivitas Fukosantin.....	19
2.7. Enkapsulasi Fukosantin dalam Nano Kitosan-pektin	20
2.8. Karakterisasi.....	22
2.8.1. <i>Fourier Transform Infrared</i>	23
2.8.2. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>	25
2.8.3. <i>Particle Size Analyzer</i>	26
2.8.4. <i>Scanning Electron Microscope</i>	28
2.8.5. <i>Transmission Electron Microscope</i>	29
2.8.6. <i>Medium-Pressure Liquid Chromatography</i>	30

2.8.7.	Spektrofotometer UV-Vis	31
2.8.8.	Efisiensi Enkapsulasi.....	32
2.8.9.	Stabilitas Fukosantin	34
BAB III.	METODOLOGI PENELITIAN	36
3.1.	Waktu dan Tempat.....	36
3.2.	Alat dan Bahan	36
3.3.	Pengambilan Sampel Kulit Udang	37
3.4.	Preparasi Sampel Kulit Udang	37
3.5.	Ekstraksi Kitosan dari Kulit Udang.....	37
3.6.	Sintesis Nano Kitosan-pektin	38
3.7.	Isolasi Fukosantin dari Mikroalga <i>Cyclotella striata</i>	39
3.8.	Enkapsulasi Fukosantin dalam Nano Kitosan-pektin	40
3.8.1.	Analisis Efisiensi Enkapsulasi Fukosantin	40
3.8.2.	Analisis Stabilitas Fukosantin.....	42
3.9.	Karakterisasi.....	42
3.9.1.	<i>Fourier Transform Infrared</i>	43
3.9.2.	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>	44
3.9.3.	<i>Particle Size Analyzer</i>	44
3.9.4.	<i>Scanning Electron Microscope</i>	44
3.9.5.	<i>Transmission Electron Microscope</i>	45
BAB IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	46
4.1.	Preparasi Sampel	46
4.2.	Ekstraksi Kitosan dari Kulit Udang.....	47
4.3.	Sintesis Nano Kitosan-Pektin	54
4.4.	Isolasi Fukosantin dari Mikroalga <i>Cyclotella striata</i>	59
4.5.	Enkapsulasi Fukosantin dalam Nano Kitosan-pektin	66
BAB V.	KESIMPULAN.....	71
5.1.	Simpulan	71
5.2.	Saran	71
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Struktur Kitosan.....	6
2.2. Skema Ekstraksi kitosan dari Kulit Udang	10
2.3. Reaksi Deasetilasi Kitin	11
2.4. Struktur Pektin.....	13
2.5. Interaksi Kitosan dengan Tripolifosfat	15
2.6. Interaksi Kitosan dengan Pektin	16
2.7. Struktur Fukosantin	18
2.8. Skema Enkapsulasi Fukosantin dalam Kitosan–Pektin	21
4.1. (a) Kulit Udang Bersih, (b) Kulit Udang Kering, dan (c) Serbuk Kulit Udang	46
4.2. (a) Kitin dan (b) Kitosan	48
4.3. Spektrum FTIR (a) Kitin, (b) Kitosan Kulit Udang, dan (c) Kitosan Standar	50
4.4. Kurva DSC (a) Kitosan Kulit Udang dan (b) kitosan standar	52
4.5. Gambar SEM (a) Kitosan Kulit Udang dan (b) Kitosan Standar	53
4.6. Distribusi ukuran partikel (a) Kitosan, (b) Pektin, (c) Nano Kitosan–Pektin 1:1, (d) Nano Kitosan–Pektin 1:2, (e) Nano Kitosan–Pektin 2:1, (f) Nano Kitosan–Pektin 1:3 dan (g) Nano Kitosan–Pektin 3:1	55
4.7. Spektrum FTIR (a) Kitosan, (b) Pektin, dan (c) Nano Kitosan–Pektin	57
4.8. (a) SEM Nano Kitosan–pektin dan (b) TEM Nano Kitosan–Pektin	58
4.9. Kultur mikroalga <i>Cyclotella striata</i> pada (a) Hari Pertama dan (b) Hari Keempat Belas	60
4.10. Skema Isolasi Fukosantin dari Mikroalga <i>Cyclotella striata</i>	61
4.11. Kromatogram MPLC ekstrak fukosantin	62
4.12. Spektra UV-Vis Senyawa Karotenoid Hasil MPLC pada (a) Fraksi 8, (b) Fraksi 9, (c) Fraksi 10 dan (d) Fraksi 11	64
4.13. Spektrum FTIR (a) Fukosantin Standar dan (b) Fukosantin Hasil Isolasi	65
4.14. (a) Stabilitas Fukosantin dalam Etanol dan (b) Stabilitas Nano Kitosan–Pektin–Fukosantin pada Temperatur Ruang dalam Kondisi Gelap	67
4.15. Spektrum FTIR Nano Kitosan–Pektin–Fukosantin	69
4.16. SEM Nano-Kitosan–Pektin–Fukosantin dan (b) TEM Nano-Kitosan–Pektin–Fukosantin	70

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1. Serapan FTIR Kitin, Kitosan, Pektin, dan Fukosantin	24

DAFTAR LAMPIRAN

1. Diagram Alir Penelitian
2. Tabulasi Penelitian
3. Sertifikat Seminar Internasional
4. Jurnal Publikasi

DAFTAR PUBLIKASI

1. Nahrowi, R., Solehati, S, Widyastuti, W, Juliasih, N. L. G. R., Pandiangan, K. D., Setiawan, A., and Hendri, J. 2024. New Encapsulation of Fucoxanthin Isolated from *Cyclotella striata* by Nano Chitosan–Pectin using Ionic Gelation Method. *Science and Technology Indonesia*, **9**(3), 517–528. – Q3 Scopus.
2. Aisah, S., Nahrowi, R., Setiawan, W. A., Setiawan, F., Mulyono, M., Juliasih, N. L. G. R., Hendri, J. Yuwono, S. D., and Setiawan, A. 2024. Antibacterial Activity of Nano Chitosan Derived from Mangrove Fungus Endophyte, *Fusarium sp.* 20CB07. *AACL Bioflux*, **17**(1), 449–463. – Q3 Scopus.

DAFTAR SEMINAR

1. The 2nd International Conference on Chemistry, Pharmacy and Medical Sciences (ICCPM), 2021
2. The 4th International Conference on Applied Sciences, Mathematics, And Informatics (ICASMI), 2022

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Fukosantin merupakan senyawa karotenoid yang memiliki keunikan struktur kimia sehingga memiliki banyak aktivitas biologis yang sangat bermanfaat bagi kesehatan manusia (Din *et al.*, 2022). Beberapa sifat biologis fukosantin antara lain antidiabetes, antiinflamasi, antimalaria, dan antioksidan (Khaw *et al.*, 2022). Terlepas dari sifat-sifat biologis tersebut, fukosantin merupakan senyawa yang tidak stabil apabila disimpan dalam jangka waktu yang lama. Ikatan allen, ikatan rangkap terkonjugasi, dan 5,6-mono-epoksida dalam struktur fukosantin menyebabkan senyawa ini sangat mudah teroksidasi dan terdegradasi (Zhang *et al.*, 2015). Beberapa peneliti sebelumnya telah menyampaikan perlunya untuk mengenkapsulasi fukosantin dalam matriks konjugasi untuk mengatasi masalah ketidakstabilannya.

Pada saat ini, kajian pengembangan fukosantin difokuskan pada mikroalga sebagai sumber produksi fukosantin. Keunggulan mikroalga sebagai sumber produksi fukosantin diantaranya proses kultivasinya sangat mudah, pertumbuhannya sangat cepat, dan kandungan fukosantinnya sangat tinggi (Khaw *et al.*, 2022; Pajot *et al.*, 2022). Salah satu spesies mikroalga dari genus *Cyclotella* telah teridentifikasi sebagai sumber potensial fukosantin. Mengacu pada hasil *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS), kandungan fukosantin dalam *Cyclotella cryptica* sebesar 0,86 mg/g berat kering (Merz *et al.*, 2023). Spesies lain dari *Cyclotella*, yaitu *Cyclotella meneghiniana* juga diketahui sebagai sumber fukosantin (Gundermann *et al.*, 2019). Namun, kajian dari spesies *Cyclotella* yang lain sebagai sumber fukosantin hingga saat ini masih sangat terbatas. Dalam penelitian ini, digunakan *Cyclotella striata* sebagai

sumber fukosantin untuk kajian enkapsulasi fukosantin dalam nano kitosan-pektin.

Beberapa matriks konjugasi telah berhasil diaplikasikan untuk enkapsulasi fukosantin menggunakan metode gelasi ionik. Enkapsulasi fukosantin dalam kitosan dan kasein dapat meningkatkan bioavailabilitas fukosantin dengan cara meningkatkan stabilitas penyimpanannya selama empat minggu penyimpanan (Koo *et al.*, 2016). Nano kitosan-glikolipid yang digunakan untuk mengenkapsulasi fukosantin meningkatkan stabilitas fukosantin yang diindikasikan oleh peningkatan waktu paruhnya (Ravi and Baskaran, 2015). Enkapsulasi fukosantin pada nanopartikel kitosan alginat juga meningkatkan stabilitas fukosantin dalam lingkungan yang terkontrol, sehingga meningkatkan aktivitas biologis antiinflamasi dan antioksidan (Sorasitthiyanukarn *et al.*, 2024). Disisi lain, penggunaan alginat sebagai matriks enkapsulasi memiliki beberapa kekurangan, diantaranya hidrogel alginat terlalu rapuh untuk memberikan perlindungan dalam jangka panjang pada bahan terenkapsulasi. Disamping itu, kekuatan mekanik alginat tidak dapat memberikan kekuatan perlindungan yang cukup untuk bahan terenkapsulasi (Enck *et al.*, 2021).

Salah satu metode yang digunakan untuk enkapsulasi fukosantin adalah metode gelasi ionik. Metode ini didasarkan pada ikatan silang kitosan dengan ion tripolifosfat (Abdelgawad and Hudson, 2019). Struktur jaringan matriks konjugasi yang terbentuk melalui metode gelasi ionik menyediakan stabilitas material terenkapsulasi, sehingga mencegahnya terdegradasi karena pH, temperatur, dan tekanan mekanik (Chun *et al.*, 2014). Saat ini, metode gelasi ionik telah diaplikasikan di berbagai bidang, termasuk pada bidang farmasi, material baru, dan pertanian. Keunggulan metode ini adalah kemampuannya menghasilkan ukuran partikel yang berbeda-beda sehingga dapat disesuaikan dengan tujuan aplikasinya (Hoang *et al.*, 2022). Namun penambahan tripolifosfat pada metode gelasi ionik sangat beresiko bagi kesehatan manusia. Hal ini terkait dengan peningkatan risiko penyakit arteri koroner pada manusia (Sriamornsak and Dass, 2022).

Dalam penelitian ini, sintesis nano kitosan dilakukan dengan cara menambahkan polianion pektin sebagai pengganti tripolifosfat ke dalam larutan kitosan. Nano kitosan–pektin yang didapatkan selanjutnya digunakan untuk mengenkapsulasi fukosantin. Matriks konjugasi nano kitosan–pektin dapat meningkatkan stabilitas fukosantin. Beberapa senyawa yang tidak stabil telah berhasil ditingkatkan kestabilannya melalui enkapsulasi dalam kitosan–pektin, antara lain asasantin (Liu *et al.*, 2019), neohesperidin (Karim *et al.*, 2020), dan pelargonidin (Karim *et al.*, 2022). Namun, kajian tentang enkapsulasi fukosantin dalam nano kitosan–pektin sampai saat ini belum pernah dilakukan.

Kitosan merupakan polisakarida semi-kristalin linier yang memiliki unit pengulangan 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranosida dan 2-asetamido-2-deoksi-D-glukopiranosida yang terikat oleh β (1→4) (Boudouaia *et al.*, 2019). Produk kitosan dan turunannya sering diaplikasikan dalam sistem penghantaran obat sehingga dapat meningkatkan efisiensi sediaan farmasi. Kitosan dan turunannya telah berhasil digunakan untuk pengaturan atau perlindungan gen antioksidan (Chun and Chandrasekaran, 2019) dan modul transportasi sediaan farmasi ke dalam jaringan mukosa (Leichner *et al.*, 2019). Disamping itu, kitosan juga bermanfaat sebagai antijamur dan antibiofilm (Torres-Rêgo *et al.*, 2019).

Ekstraksi kitosan dilakukan menggunakan biomaterial kulit udang mengacu pada metode yang telah dilaporkan oleh Said Al Hoqani dengan modifikasi (Said Al Hoqani *et al.*, 2020). Untuk verifikasi polimer kitosan, maka dilakukan karakterisasi yang meliputi karakteristik gugus fungsi dan pengukuran derajat deasetilasi menggunakan FTIR, karakteristik termal menggunakan DSC, dan morfologi permukaan menggunakan SEM yang dibandingkan dengan kitosan standar.

Untuk sintesis nano kitosan, digunakan pektin yang merupakan polianion alami dengan unit pengulangan asam D-galakturonat dengan ikatan α (1–4) (Zhao *et al.*, 2020). Interaksi elektrostatik antara kitosan dan pektin membentuk kompleks polielektrolit sehingga dapat digunakan sebagai penghantar obat (Paşcalău *et al.*, 2020), misalnya penghantar obat antidiabetes dan obat antikanker (Salama *et al.*,

2020). Polimerisasi pektin dengan polimer bermuatan positif telah digunakan secara luas untuk enkapsulasi sediaan farmasi, karena stabil terhadap hidrasi (Tian *et al.*, 2020) dan memiliki kapasitas menghimpun air yang tinggi (Bombaldi de Souza *et al.*, 2019).

Kitosan hasil ekstraksi selanjutnya digunakan untuk sintesis nano kitosan–pektin menggunakan metode gelasi ionik yang merupakan modifikasi metode yang telah dilaporkan oleh (Abdel-Hafez *et al.*, 2018). Perbandingan massa kitosan–pektin yang digunakan adalah 1:1; 1:2; 2:1; 1:3; dan 3:1. Kemudian dilakukan karakterisasi nano kitosan–pektin yang meliputi karakteristik ukuran partikel menggunakan PSA, morfologi permukaan menggunakan SEM dan TEM, serta karakteristik gugus fungsi menggunakan FTIR.

Untuk mendapatkan senyawa fukosantin, digunakan mikroalga *Cyclotella striata* yang dikultivasi dalam media air laut. Biomassa hasil kultivasi diekstraksi dalam etanol dan dimurnikan menggunakan MPLC. Karakterisasi validasi senyawa fukosantin dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui panjang gelombang maksimum sebagai karakteristik serapan spesifik dari fukosantin.

Enkapsulasi fukosantin dilakukan dengan cara menambahkan larutan nano kitosan–pektin ke dalam larutan fukosantin secara *dropwise*. Nano kitosan–pektin–fukosantin dikarakterisasi yang meliputi *Efficiency Encapsulation*, stabilitas fukosantin, karakteristik gugus fungsi menggunakan FTIR, serta morfologi permukaan menggunakan SEM dan TEM.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah mengenkapsulasi fukosantin dalam nano kitosan–pektin untuk meningkatkan stabilitas fukosantin dengan cara:

1. Mengekstraksi kitosan dari kulit udang.
2. Mensintesis nano kitosan–pektin dengan menggunakan metode gelasi ionik.
3. Mengisolasi fukosantin dari mikroalga *Cyclotella striata*.

4. Mengenkapsulasi fukosantin dalam nano kitosan–pektin.
5. Menguji efisiensi enkapsulasi dan stabilitas fukosantin dalam nano kitosan–pektin.

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah meningkatkan stabilitas senyawa-senyawa antioksidan yang dienkapsulasi dalam nano kitosan–pektin dan meningkatkan nilai tambah limbah kulit udang dalam upaya mengurangi dampak pencemaran lingkungan.

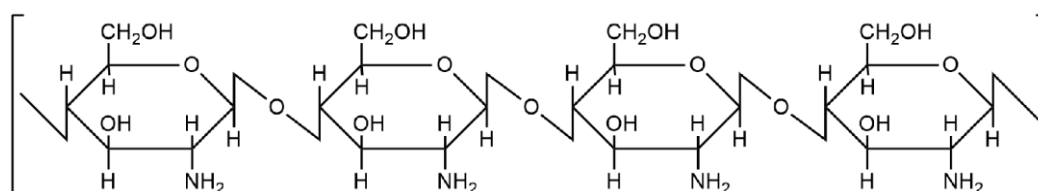
1.4. Kebaruan Penelitian

Kebaruan dari penelitian ini adalah matriks konjugasi nano kitosan–pektin yang digunakan untuk enkapsulasi fukosantin dalam upaya meningkatkan kestabilan fukosantin. Matriks konjugat nano kitosan–pektin telah berhasil digunakan untuk mengenkapsulasi asasantin, neohesperidin, dan pelargonidin. Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas biologis hampir sama dengan fukosantin. Informasi enkapsulasi fukosantin melalui nano kitosan–pektin belum pernah dilakukan oleh beberapa peneliti.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kitosan

Kitosan merupakan polimer alam kationik yang diperoleh dari deasetilasi kitin. Polimer ini tersusun atas monomer 2-amino-2-deoksi-D-glukosa dengan ikatan β -(1 $\rightarrow$ 4) telah banyak digunakan di berbagai bidang, misalnya pertanian, tekstil, makanan, kosmetik, dan farmasi (Pan *et al.*, 2019). Polimer ini secara ilmiah sangat aman dengan biokompatibilitas tinggi untuk digunakan dalam bidang farmakologi, kesehatan, dan medis. Kitosan juga memiliki sifat penyerap kelembaban yang tinggi sehingga nyaman untuk digunakan sebagai bahan pakaian dalam dan kaus kaki (Eivazzadeh-Keihan *et al.*, 2022). Struktur kitosan disajikan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Struktur Kitosan (Said Al Hoqani *et al.*, 2020).

2.1.1. Sumber-Sumber Kitosan

Kitosan tersusun atas atom karbon, hidrogen, dan nitrogen masing-masing sebesar 44,11%, 6,84%, dan 7,97% (Garg *et al.*, 2019). Sumber utama kitosan berasal dari lingkungan perairan laut. Kitosan banyak ditemukan pada cangkang krustasea (udang dan kepiting) serta dinding sel fungi atau jamur (Vasylchenko and Abramova, 2015).

2.1.1.1. Kulit Udang

Biomaterial utama yang umum digunakan untuk produksi kitosan adalah kulit udang. Kandungan utama kulit udang antara lain kitin (18,1%), CaCO_3 (33,3%), dan protein (38,6%). Kitin yang diekstraksi dari kulit udang dapat di deasetilasi menggunakan basa kuat untuk menghasilkan kitosan (Hu *et al.*, 2020). Prosedur ekstraksi dan bahan baku yang digunakan sangat mempengaruhi kualitas kitosan yang dihasilkan. Dalam satu dekade terakhir, para peneliti mengembangkan metode ekstraksi kitosan yang dititikberatkan pada proses deasetilasinya. Hasil dari pengembangan proses deasetilasinya adalah terbukanya struktur kristal kitin yang dapat meningkatkan aksesibilitas unit asetil ke dalam larutan alkali. Produksi kitosan dari kulit udang memiliki nilai manfaat yang sangat tinggi karena dapat mengurangi limbah yang dapat mencemari lingkungan dan meningkatkan nilai tambah limbah tersebut (Antonino *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil studi literatur, penelitian tentang ekstraksi kitosan dan turunannya dari kulit udang menghasilkan nilai rendemen sekitar 23–25%. Nilai tersebut sangat layak untuk diproduksi dalam skala industri apabila ditinjau dari aspek ekonomi. Kajian tersebut memberikan rekomendasi untuk memanfaatkan limbah kulit udang sebagai sumber produksi kitosan, karena sekitar 40–50% berat kulit udang akan menjadi sampah dan berpotensi menjadi polutan di wilayah pesisir secara signifikan (Kou *et al.*, 2021).

2.1.1.2. Fungi

Selain kulit udang, biomaterial yang dapat digunakan sebagai bahan baku kitosan adalah fungi. Secara anatomi, dinding sel fungi mengandung komponen utama kitin yang dapat di deasetilasi menjadi kitosan. Beberapa golongan fungi yang mengandung kitin pada dinding selnya antara lain *Basidiomycetes*, *Ascomycetes*, *Zygomycetes*, dan *Deuteromycetes* (Abo Elsoud and El Kady, 2019; Ghormade *et al.*, 2017). Kitosan yang diproduksi dari fungi memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan kitosan dari kulit udang. Kelebihan-kelebihan tersebut diantaranya derajat deasetilasi yang lebih tinggi, kelarutan dalam asam yang lebih tinggi, dan distribusi molekul yang lebih luas. Kitosan fungi juga tidak

mengandung protein allergen, contohnya tropomiosin yang terdapat pada kitosan kulit udang. Produksi kitosan dari fungi juga menghasilkan produk samping asam sitrat yang berguna untuk diaplikasikan pada bidang lainnya (Crognale *et al.*, 2022).

Kitosan dalam dinding sel fungi terdapat dalam dua bentuk, yaitu terikat secara kovalen dengan β -glukan dan sebagai aminoglikosida bebas. β -glukan dan kitin pada mulanya terakumulasi secara terpisah dalam dinding sel fungi dan setelah itu keduanya membentuk ikatan antar polimer. Pembentukan kompleks tersebut menyebabkan ikatan silang yang kaku pada dinding sel fungi dan ini menyebabkan permasalahan dalam ekstraksi kitosan fungi. Untuk memecahkan kompleks ikatan silang antara kitin dan glukan, maka diperlukan alkali kuat sehingga diperoleh kitosan dengan kuantitas dan kualitas yang tinggi. Setelah proses fermentasi, ekstraksi kitosan dari fungi dilakukan melalui dua tahap yakni perlakuan asam dan basa dari dinding sel jamur. Perlakuan basa bertujuan untuk menghilangkan protein yang ada pada dinding sel jamur. Selanjutnya perlakuan asam bertujuan untuk menghilangkan fosfat atau bahan yang tidak larut dalam dinding sel jamur. Dinding sel jamur tersebut dinaikkan pH nya menjadi 9–10 untuk mengendapkan kitosan (Huq *et al.*, 2022).

2.1.2. Sifat-Sifat Kitosan

Kitosan merupakan polimer yang mudah terdegradasi, tidak bersifat racun, berfungsi sebagai perekat, dan menimbulkan respon biologis di dalam tubuh manusia. Polimer ini dapat berada di dalam air dibawah kondisi asam setelah protonasi amino untuk memberikan densitas muatan positif yang tinggi (Abdelgawad and Hudson, 2019).

Kitosan dapat berikatan dengan kation seperti Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} dan lain-lain. Berdasarkan sifat ini kitosan dapat diaplikasikan dalam bidang pengemasan makanan dan pengobatan. Ikatan kitosan dengan nanomaterial logam digunakan sebagai bahan kemasan makanan dan senyawa antimikroba yang berkepanjangan. Kelarutan kitosan dalam air tergantung pada pH larutan sehingga berpengaruh

terhadap sifat biologis dalam tubuh. Kerapatan muatan kitosan tergantung pada derajat protonasi gugus amino yang ditentukan oleh derajat asetilasi, pH, dan kekuatan ionik. Ikatan glikosidik di ekuatorial dalam struktur kitosan menyebabkan rotasi terbatas rantai polimer sehingga menghasilkan viskositas intrinsik yang tinggi. Ikatan glikosidik ini juga rentan terdegradasi terhadap asam, basa, radikal bebas, dan enzim hidrolase (Priyadarshi and Rhim, 2020).

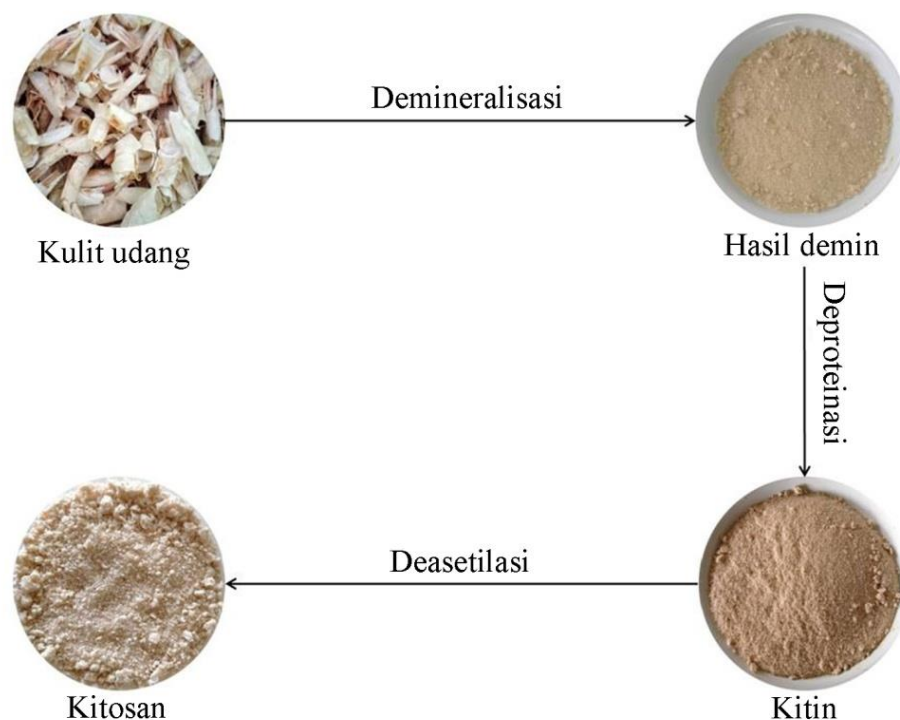
2.1.3. Proses Ekstraksi kitosan

Ekstraksi kitosan dari kulit udang dapat dilakukan dengan beberapa teknik, antara lain ekstraksi secara kimia, hidrolisis enzimatis, dan teknik mikrobiologi (Santos *et al.*, 2020). Dalam penelitian ini ekstraksi kitosan dilakukan menggunakan teknik ekstraksi secara kimia. Ekstraksi kitosan diawali dengan ekstraksi kitin dari kulit udang melalui proses demineralisasi dan deproteinasi. Konversi kitin menjadi kitosan dilakukan melalui proses deasetilasi. Demineralisasi kulit udang dilakukan menggunakan larutan asam klorida pada suhu tertentu, sedangkan proses deproteinasi dan deasetilasi dilakukan dengan menggunakan larutan natrium hidroksida pada suhu tertentu. Kondisi optimum isolasi kitin yaitu menggunakan larutan HCl 3% pada temperatur 25°C dan waktu pengadukan satu jam serta larutan NaOH 50% pada temperatur 110°C dan waktu pengadukan 3 jam. Konsentrasi optimum deasetilasi kitin yaitu sebesar 50% (Said Al Hoqani *et al.*, 2020).

Secara kimia proses ekstraksi kitosan dari kulit udang dijelaskan sebagai berikut. Pada tahap demineralisasi, mineral yang terdapat pada kulit udang dipisahkan menggunakan larutan asam klorida (HCl). Mineral utama yang terdapat pada kulit udang adalah kalsium fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), kalsium karbonat (CaCO_3), dan magnesium karbonat (MgCO_3). Pelarutan mineral dalam larutan asam disebabkan karena pertukaran ion antara mineral dengan larutan asam klorida. Setelah proses pencucian, diperoleh residu dan filtrat. Pembuktian keberhasilan proses demineralisasi dilakukan uji ammonium oksalat terhadap filtrat. Reaksi ion oksalat dengan kalsium membentuk endapan putih.

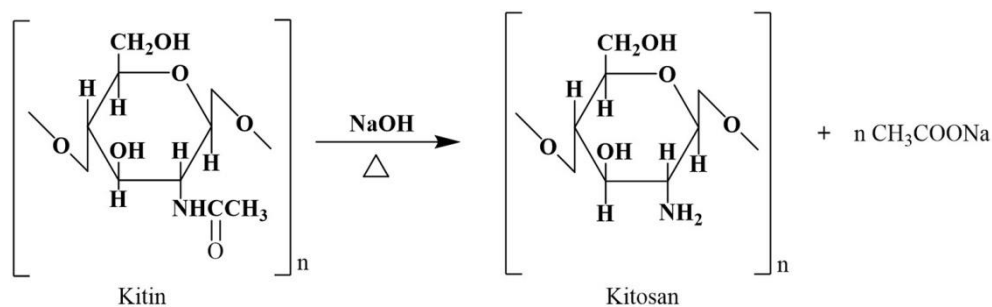
Dalam tahap deproteinasi, protein yang terdapat pada sampel dihilangkan dengan menggunakan larutan natrium hidroksida (NaOH). Ekstraksi protein dengan larutan natrium hidroksida membentuk natrium proteinat. Ion Na^+ mengendapkan protein dengan cara mengikat ion negatif pada ujung rantai protein. Pengujian keberhasilan deproteinasi dilakukan menggunakan larutan CuSO_4 . Reaksi protein dengan CuSO_4 membentuk senyawa kompleks berwarna ungu (Hendri dan Laila, 2013).

Monomer kitin memiliki gugus N-asetil yang terikat pada C-2-D-glukosa. Penambahan NaOH dalam proses deasetilasi menghidrolisis asetil dari N-asetil sehingga N-asetil-D-glukosa (monomer kitin) berubah menjadi 2-amino-D-glukosa (monomer kitosan) (Arulmoorthy *et al.*, 2022). Skema ekstraksi kitosan dari kulit udang dijelaskan pada Gambar 2.2, sedangkan reaksi deasetilasi kitin dijelaskan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.2. Skema Ekstraksi Kitosan dari Kulit Udang.

Salah satu karakterisasi untuk mengidentifikasi kitosan adalah derajat deasetilasi. Analisis ini dapat digunakan untuk membedakan kitin dengan kitosan. Derajat deasetilasi menunjukkan jumlah gugus asetil yang hilang atau menunjukkan kemurnian kitosan. Semakin besar derajat deasetilasi, maka kemurnian kitosan semakin tinggi (Arulmoorthy *et al.*, 2022).



Gambar 2.3. Reaksi Deasetilasi Kitin (Liu *et al.*, 2017).

Penentuan nilai derajat deasetilasi dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya menggunakan spektrofotometer FTIR. Derajat deasetilasi ditentukan menggunakan perbandingan absorbansi amida III pada 1320 cm^{-1} dengan absorbansi amida II pada 1420 cm^{-1} .

Proses ekstraksi kitosan dari fungi dapat dilakukan melalui empat tahapan, yaitu pemanenan biomassa fungi, deproteinasi dan deasetilasi, ekstraksi, serta sentrifugasi dan pencucian. Pada tahap pertama, biomassa fungi yang berbentuk miselium dipanen setelah difermentasi selama kurang lebih empat belas hari. Biomassa ini banyak mengandung kitin yang merupakan prekursor kitosan. Selanjutnya, biomassa fungi di deproteinasi menggunakan asam dan di deasetilasi menggunakan basa untuk menghilangkan protein dan gugus asetil yang terdapat pada kitin. Kitosan kemudian diekstraksi menggunakan pelarut asam seperti asam asetat, asam klorida, atau asam sulfat. Tahap terakhir, ekstrak kitosan disentrifugasi untuk menghilangkan pengotor dan dicuci untuk menetralkan kitosan (Kasongo *et al.*, 2020).

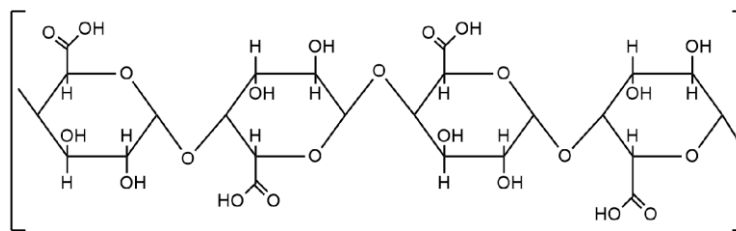
2.1.4. Aplikasi Kitosan dalam Bidang Pengobatan

Selama dua dekade terakhir, kitosan menjadi pusat perhatian di bidang farmasi sebagai nanomaterial biomedis untuk penghantaran obat (*drug delivery*). Nanomaterial kitosan memiliki kemampuan untuk mengatur kecepatan pelepasan obat, memperpanjang efektivitas durasi terapi, mengantarkan obat pada situs yang tepat di dalam tubuh (Abdelgawad and Hudson, 2019). Beberapa obat yang dapat dikirim menggunakan nano kitosan antara lain obat mata, obat hidung, obat paru, vaksin, dan obat kanker (Garg *et al.*, 2019). Nanopartikel kitosan juga memiliki kemampuan meningkatkan viabilitas dan proliferasi sel sehingga sangat potensial untuk digunakan dalam rekayasa jaringan (Azizian *et al.*, 2018).

Nanomaterial kitosan memiliki sifat antijamur dan antimikroba yang dapat melawan berbagai jenis fitopatogen (Chun and Chandrasekaran, 2019). Interaksi antara kitosan dengan fosfolipid pada membran plasma jamur menyebabkan meningkatnya permeabilitas dan induksi pengambilan peptida sehingga dapat menghambat pertumbuhan jamur (Torres-Rêgo *et al.*, 2019). Aktivitas antibakteri kitosan terjadi karena interaksi antara muatan positif kitosan dengan muatan negatif pada permukaan sel bakteri. Interaksi ini mengganggu fungsi membran dan menghambat pengangkutan nutrisi ke dalam sel (Bangun *et al.*, 2018). Kitosan yang memiliki berat molekul besar (lebih dari 10.000 Da) menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih baik daripada kitosan dengan berat molekul lebih kecil (Pan *et al.*, 2019).

2.2. Pektin

Pektin merupakan suatu polimer yang bermuatan negatif yang tersusun atas unit asam-D-galakturonat dengan ikatan α -(1 $\rightarrow$ 4). Sumber utama polimer ini adalah daging dan kulit buah apel, buah jeruk, serta dinding sel alga (Salama *et al.*, 2020). Pektin umumnya digunakan pada industri makanan dan sangat berpotensi untuk digunakan dalam bidang biomedis (Chen *et al.*, 2010). Struktur pektin disajikan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Struktur Pektin (Tian *et al.*, 2020).

2.2.1. Sifat-Sifat Pektin

Gugus karboksil dari unit galakturonat dapat berikatan ionik secara intramolekul membentuk model kotak telur (Salama *et al.*, 2020). Polimer ini merupakan koloid liofilik yang memiliki kecenderungan untuk membentuk gel. Kecenderungan ini tergantung pada derajat esterifikasi. Karakteristik lain dari pektin yaitu stabil terhadap hidrasi (Tian *et al.*, 2020), dapat dimakan, larut dalam air (Paşcalău *et al.*, 2020), dan larut dalam suasana basa (Jamshidzadeh *et al.*, 2020). Gugus karboksil pektin sebagian teresterifikasi oleh gugus metil dan gugus karboksilat bebas dinetralisasi oleh ion natrium, kalium, atau ammonium. Berdasarkan derajat esterifikasinya, pektin dikelompokkan ke dalam dua jenis yaitu pektin dengan metoksil tinggi (*High Methoxyl*) dan pektin dengan metoksil rendah (*Low Methoxyl*). Nilai derajat esterifikasi HM pektin sebesar 60–70 %, sedangkan nilai derajat esterifikasi LM pektin sebesar 20–40%. Garam kation monovalen pektinat dan asam pektat larut dalam air, sedangkan garam kationik divalen dan trivalen pektinat sukar larut dalam air (Raj, 2012).

2.2.2. Aplikasi Pektin dalam Bidang Farmasi

Pektin digunakan sebagai polimer pembawa (*carrier*) dalam sistem pengiriman obat antidiabetes, antihiperlipidemia, dan antikanker (Salama *et al.*, 2020). Polimer ini juga dapat bertindak sebagai pengemulsi, agen pengikat, agen mukoadhesif pendukung pelepasan obat hidung. Berdasarkan hasil penelitian, polimer ini secara khusus digunakan pengirim obat usus besar karena dicerna

secara selektif oleh mikroflora (*Bacteroides ovatus*) yang resisten terhadap enzim amilase dan protease pada gastrointestinal bagian atas (Paşcalău *et al.*, 2020).

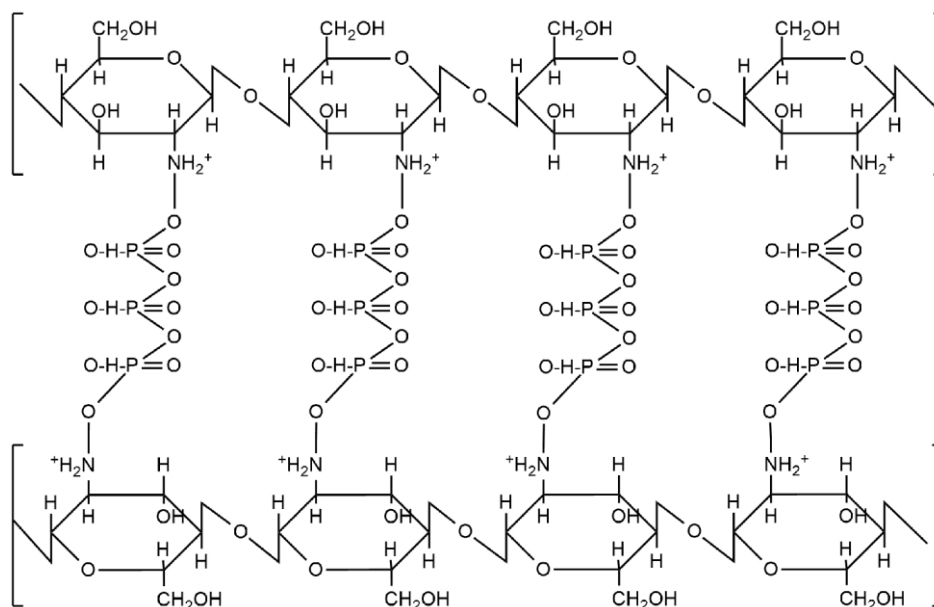
Kompleks polielektrolit pektin dengan kitosan telah digunakan untuk beberapa sediaan farmasi, antara lain *berberine* (Paşcalău *et al.*, 2020), *phenytoin sodium* (Jamshidzadeh *et al.*, 2020), *dicyclohexylcarbodiimide* (Tian *et al.*, 2020), *meclizine hydrochloride* (Salama *et al.*, 2020), *anthocyanin* (Zhao *et al.*, 2020), dan *chlorpromazine hydrochloride* (Luppi *et al.*, 2010). Struktur jaringan kitosan dan pektin dapat menghalangi pembukaan rongga nano kapsul dan sediaan farmasi tertutup dalam rongga sehingga pelepasan sediaan farmasi dapat diatur sesuai dengan fungsinya (Jamshidzadeh *et al.*, 2020). Formulasi tersebut menyebabkan nano kapsul membengkak secara perlahan dan target pelepasan sediaan farmasi dapat tercapai (Pantić *et al.*, 2020).

Pelepasan sediaan farmasi lebih lambat di dalam lambung dibandingkan di dalam usus. Polimer pektin (bersifat asam) menyebabkan nano kapsul sulit terdegradasi dalam suasana asam (Jamshidzadeh *et al.*, 2020). Interaksi elektrostatik dan ikatan hidrogen antara kitosan dengan pektin juga meningkatkan stabilitas nano kapsul dalam suasana asam. Keadaan tersebut mengakibatkan sediaan farmasi lebih mudah diserap oleh tubuh (Zhao *et al.*, 2020).

2.3. Metode Gelasi ionik

Metode gelasi ionik merupakan salah satu teknik untuk menghasilkan nanopartikel dan mikropartikel melalui interaksi elektrostatik antara dua ion di bawah kondisi tertentu (Santana and Salazar, 2020). Metode ini awalnya digunakan untuk sintesis nanomaterial kitosan dengan menggunakan polianion tripolifosfat. Kitosan yang memiliki banyak gugus amino (NH_2) dapat bereaksi dengan ion fosfat untuk membentuk ikatan silang nanomaterial kitosan. Selama proses pembentukan ikatan silang, air dikeluarkan dari partikel sehingga dapat menopang pelepasan obat (Debnath *et al.*, 2011). Interaksi antara kitosan dengan tripolifosfat dijelaskan pada Gambar 2.5.

Reaksi penambahan tripolifosfat dalam kitosan melalui mekanisme reaksi antara. Pada tahap ini ion -NH_3^+ menyubstitusi ion $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ sehingga membentuk rantai manik-manik. Penambahan asam atau ion H^+ dalam reaksi ini menyebabkan pemutusan rantai polimer (pembentukan nanopartikel kitosan) dan pelepasan gugus NH_2 (pengaturan bentuk partikel secara melingkar) (Kunjachan and Jose, 2010). Ketika tripolifosfat ditambahkan ke dalam larutan kitosan, polianion (muatan negatif) berikatan dengan gugus amino (muatan positif) melalui interaksi elektrostatik, yang menyebabkan kitosan mengalami ionisasi gel, mengarah pada pembentukan nanopartikel. Interaksi utama pada konfigurasi ikatan silang adalah *H-link* dan *T-link*. *H-link* merupakan interaksi O^- dan NH_3^+ pada bidang yang sama, sedangkan *T-link* merupakan interaksi tak mengikat atom oksigen dengan NH_3^+ pada bidang yang berbeda (Hoang *et al.*, 2022).



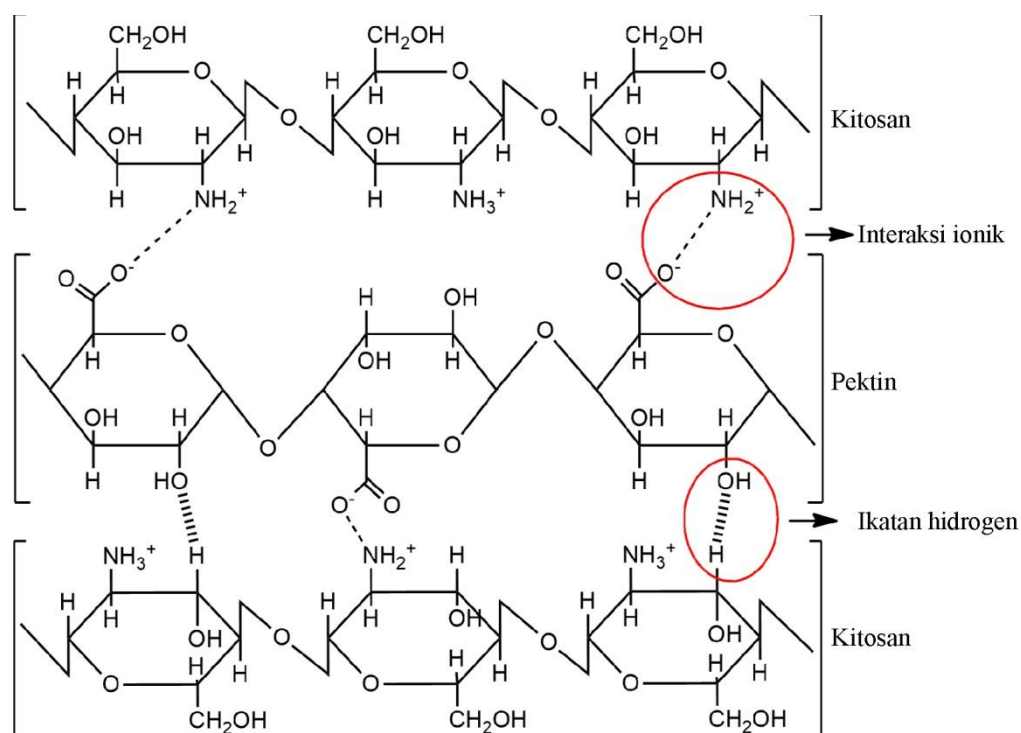
Gambar 2.5. Interaksi Kitosan dengan Tripolifosfat (Kunjachan and Jose, 2010).

Enkapsulasi kitosan dengan metotreksat (anti-*rheumatoid arthritis*) menggunakan metode gelasi ionik menghasilkan nanopartikel dengan ukuran 30–38 nm (Jabbari *et al.*, 2020). Metode gelasi ionik juga digunakan untuk enkapsulasi kitosan dengan *Tityus stigmurus Hypotension* (suatu peptida anti-biofilm dan anti-*Candida*). Nanomaterial yang didapat memiliki ukuran sebesar 160 nm (Torres-

Rêgo *et al.*, 2019). Biosensor optik kitosan-emas yang disintesis menggunakan metode *gelasi ionik* memiliki ukuran partikel sebesar 61–109 nm (Majdi *et al.*, 2019). Penelitian ini mengembangkan polianion baru, yaitu pektin, sebagai pengganti tripolifosfat untuk sintesis nano kitosan dengan menggunakan metode gelasi ionik.

2.4. Interaksi Kimia Kitosan dengan Pektin

Kitosan (banyak mengandung ion -NH_3^+) dapat berikatan ionik dengan pektin (banyak mengandung ion -COO^-) membentuk kompleks polielektrolit (Chen *et al.*, 2010). Kompleks polielektrolit ini juga dapat berikatan silang melalui ikatan hidrogen (Jamshidzadeh *et al.*, 2020). Ikatan silang tersebut membentuk mikrogel, pembawa nano (*nanocarriers*), tambalan bukal, dan pelapis tablet (Tian *et al.*, 2020). Skema interaksi kitosan dengan pektin dijelaskan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Interaksi Kitosan dengan Pektin (Kowalonek, 2017).

Berdasarkan Gambar 2.6, terdapat dua interaksi kimia dalam kompleks polielektrolit kitosan–pektin, yaitu interaksi ionik dan interaksi hidrogen intramolekuler. Kation amino kitosan yang terletak pada C-2 cincin piranosa berinteraksi ionik dengan anion karboksilat pektin yang terletak pada C-5 cincin piranosa. Interaksi hidrogen intramolekuler terjadi antara gugus hidroksil C-2 pektin dengan atom hidrogen C-3 kitosan. Analisis FTIR dilakukan untuk konfirmasi kebenaran interaksi ionik dan interaksi hidrogen dalam kompleks polielektrolit tersebut. Interaksi ionik gugus amino kitosan dengan gugus karbonil pektin menyebabkan pergeseran dua puncak bilangan gelombang pada 1564 cm^{-1} (kitosan) dan 1611 cm^{-1} (pektin) ke bilangan gelombang 1598 cm^{-1} atau 1589 cm^{-1} . Pergeseran bilangan gelombang disebabkan karena kuatnya interaksi ionik kompleks polielektrolit tersebut (Chen *et al.*, 2010). Interaksi hidrogen intramolekuler menyebabkan lemahnya tarikan karbonil yang terkonfirmasi oleh puncak serapan pada bilangan gelombang 1709 cm^{-1} (Tian *et al.*, 2020). Interaksi ionik dan interaksi hidrogen juga terkonfirmasi oleh pergeseran puncak serapan 3444 cm^{-1} ke bilangan gelombang yang lebih rendah (Jamshidzadeh *et al.*, 2020).

2.5. Mikroalga *Cyclotella striata*

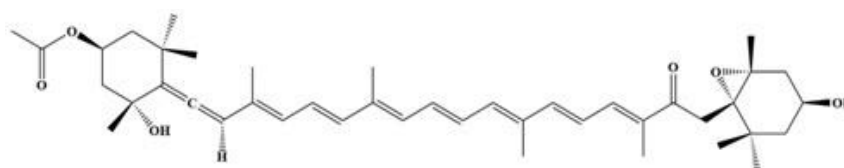
Mikroalga *Cyclotella striata* merupakan salah satu diatom yang memiliki ciri dinding sel silika unik yang disebut dengan frustula (Azaman *et al.*, 2023). Mikroalga ini banyak ditemukan pada lingkungan air tawar, payau, dan laut, serta dapat beradaptasi dengan kondisi tertentu, seperti tingkat cahaya, ketersediaan nutrisi, dan temperatur (Chandel *et al.*, 2023). Dalam perairan laut, *Cyclotella striata* memainkan peran penting sebagai produsen pada jaring makanan dengan mengubah karbon dioksida menjadi bahan organik (Muller-Feuga, 2013).

Cyclotella striata merupakan makhluk hidup dari kingdom *Chromista*, filum *Bacillariophyta*, kelas *Coscinodiscophyceae*, ordo *Thalassiorirales*, famili *Stephanodiscaceae*, genus *Cyclotella*, dan spesies *Cyclotella striata* (Roberts *et al.*, 2020). Seperti kebanyakan mikroalga pada umumnya, *Cyclotella striata* memiliki kandungan utama pigmen karotenoid yang berperan penting dalam

proses fotosintensis dan fotoproteksi. Karotenoid utama yang terdapat pada mikroalga ini adalah fukosantin. Senyawa ini terlibat dalam proteksi foto dan pemanenan cahaya, membantu menghilangkan kelebihan energi, dan melindungi peralatan fotosintesis dari kerusakan akibat tingkat cahaya yang tinggi (Giossi *et al.*, 2020; Sathasivam and Ki, 2018).

2.6. Fukosantin

Fukosantin merupakan karotenoid yang memiliki beberapa sifat bioaktivitas, seperti antioksidan, antikanker, antiperadangan, antiobesitas, antihipertensi, dan antidiabetes. Senyawa ini sangat sensitif terhadap beberapa faktor, seperti cahaya, pH asam, oksigen, panas, dan enzim. Secara umum fukosantin memiliki struktur tidak jenuh sehingga rentan terhadap oksidasi dan isomerisasi (Quan *et al.*, 2013). Struktur fukosantin disajikan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7. Struktur Fukosantin (Quan *et al.*, 2013).

Berdasarkan Gambar 2.7, dalam struktur fukosantin terdapat Sembilan ikatan rangkap terkonjugasi, satu mono-epoksida, dua gugus fungsi hidroksil, dua gugus fungsi karbonil, dan satu ikatan allen atau ikatan rangkap tiga pada C3 dan C4. Keunikan struktur fukosantin tersebut memberikan kontribusi terhadap sifat bioaktivitas seperti yang dijelaskan pada paragraf sebelumnya (Karpínski and Adamczak, 2019).

2.6.1. Isolasi Fukosantin

Isolasi fukosantin dari mikroalga *Cyclotella striata* dilakukan melalui beberapa tahapan, yang meliputi kultivasi, ekstraksi, dan pemurnian. Proses kultivasi

mikroalga diawali dengan inokulasi kultur mikroalga dengan menggunakan sel isolat yang baru sebagai sel pertumbuhan awal. Kemudian inokulum dikultur dalam media air laut dalam jangka waktu tertentu dengan memperhatikan beberapa parameter kultivasi (nutrisi, cahaya, oksigen, dan temperatur). Setelah waktu kultivasi berakhir, dilakukan pemanenan biomassa mikroalga dengan cara sentrifugasi, filtrasi, atau sedimentasi. Ekstraksi fukosantin dari biomassa menggunakan pelarut yang sesuai dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa teknik, diantaranya ekstraksi maserasi, ekstraksi bantuan *vortex*, ekstraksi bantuan soxhlet, ekstraksi bantuan ultrasonik, dan lain-lain. Proses pemurnian fukosantin yang telah diekstraksi bisa menggunakan beberapa teknik kromatografi, seperti kromatografi kolom, kromatografi cair kinerja tinggi preparatif, dan kromatografi kinerja sedang preparatif (Ye *et al.*, 2021). Dalam penelitian ini isolasi fukosantin dari *Cyclotella striata* dilakukan melalui kultivasi dalam media air laut, ekstraksi dalam pelarut etanol, dan pemurnian menggunakan MPLC.

Salah satu karakterisasi yang sederhana untuk validasi struktur fukosantin adalah menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Karakterisasi ini dilakukan dengan cara pemindaian spektrum larutan fukosantin dari panjang gelombang 200–800 nm. Berdasarkan pembacaan oleh detektor yang diteruskan ke display, maka diketahui nilai panjang gelombang maksimum sebagai karakteristik spesifik serapan fukosantin. Mengacu pada laporan Singh (2022), senyawa fukosantin memiliki panjang gelombang maksimum 448 nm. Nilai tersebut dihasilkan dari Sembilan ikatan rangkap terkonjugasi, sepuluh substituen alkil, dan satu ikatan rangkap ekso (Singh *et al.*, 2022).

2.6.2. Sifat Bioaktivitas Fukosantin

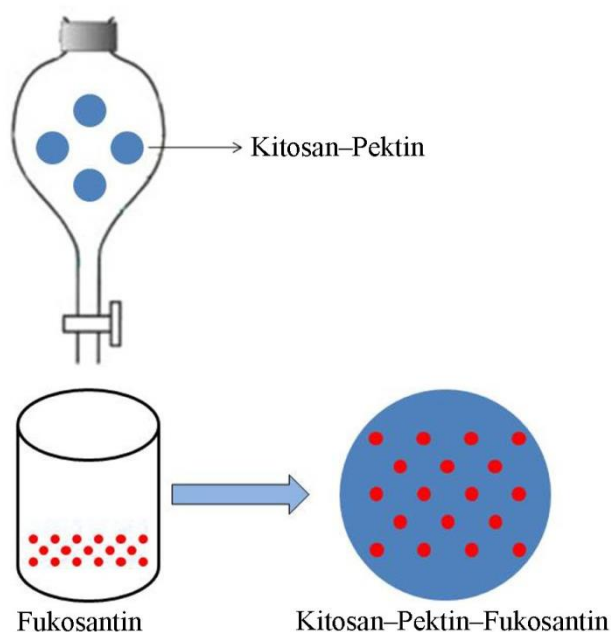
Berdasarkan studi antiobesitas, fukosantin dapat menyebabkan ekspresi protein 1 yang terlepas di jaringan adiposa putih (*white adipose tissue*) perut. Efek ini membantu sekresi sitokin pada jaringan adiposa putih untuk meningkatkan daya tahan insulin dan menurunkan kadar gula darah, sehingga mencegah diabetes (Vo *et al.*, 2018). Karotenoid ini menurunkan ekspresi mRNA heparin *Acetyl-CoA*

Carboxylase (ACC), yang berfungsi mengatur metabolisme asam lemak, sehingga menghalangi produksi asam lemak baru, menghambat transfer gugus asil lemak dari *acyl-CoA* menuju karnitin dan β -oksidasi asam lemak dalam mitokondria. Selain itu, karotenoid ini meningkatkan kadar kolesterol *High-Density Lipoprotein* (HDL) dan non-HDL dengan cara menginduksi ekspresi *Sterol Regulatory Element-Binding Protein* dan mengurangi serapan kolesterol di liver, via pengaturan penurunan reseptor *Low-Density Lipoprotein* (LDL). Karotenoid ini juga menurunkan ekspresi mRNA *Fatty Acid Synthase* (FAS) yang mengkatalisis sintesis asam lemak, mengurangi konsentrasi trigliserida plasmatis dan hepatis secara signifikan, serta mempengaruhi ekspresi gen yang terkait metabolisme lipid (Gammone and D'Orazio, 2015).

2.7. Enkapsulasi Fukosantin dalam Nano Kitosan–pektin

Berdasarkan kajian yang telah diuraikan di atas, batasan penelitian ini yakni melakukan kajian tentang penggunaan pektin sebagai pengganti tripolifosfat dalam sintesis kitosan–pektin menggunakan metode gelasi ionik untuk enkapsulasi sediaan farmasi yang tidak stabil. Sediaan farmasi yang digunakan dalam kajian ini adalah fukosantin. Skema enkapsulasi fukosantin dalam kitosan–pektin disajikan pada Gambar 2.8.

Enkapsulasi fukosantin dalam nano kitosan telah dilakukan menggunakan polianion tripolifosfat dan senyawa glikolipid. Kitosan dilarutkan dalam asam asetat 1% sehingga konsentrasi kitosan sebesar 0,1% dan ditambahkan 0,5 mg glikolipid. Perbandingan kitosan dengan tripolifosfat sebesar 5:2. Setiap 1 mg fukosantin dilarutkan dalam 2 mL larutan tripolifosfat yang selanjutnya ditambahkan setetes demi setetes ke dalam larutan kitosan (Ravi and Baskaran, 2017). Enkapsulasi fukosantin juga dilakukan dalam pembawa lipid berstruktur nano yang (*bacuri butter, tumaca oil, sorbitan monooleate, polysorbate*) dilapisi oleh kitosan. Konsentrasi fukosantin dan kitosan dalam pembawa lipid berstruktur nano masing-masing sebesar 0,05% atau perbandingan antara fukosantin dan kitosan sebesar 1:1 (Cordenonsi *et al.*, 2019).



Gambar 2.8. Skema Enkapsulasi Fukosantin dalam Kitosan–Pektin (da S. Pereira *et al.*, 2021).

Enkapsulasi fukosantin dalam nano kitosan dapat dibuktikan dengan analisis FTIR. Puncak serapan pada bilangan gelombang 1587 cm^{-1} menggambarkan tekukan -NH_2 dalam amina dan tekukan -NH dalam amida yang menunjukkan interaksi ikatan hidrogen gugus -OH terminal fukosantin dengan gugus -NH_3^+ kitosan. Enkapsulasi ini tidak memiliki efek racun karena lemahnya ikatan hidrogen antara kitosan dengan fukosantin (Ravi *et al.*, 2015). Dalam sintesis nano kapsul, kitosan melapisi fukosantin sehingga dapat mencegah degradasi dan isomerisasi. Pelapisan kitosan terhadap fukosantin menyebabkan pembalikan muatan permukaan zeta potensial, dari negatif menjadi positif (Cordenonsi *et al.*, 2019).

Kemampuan farmakokinetik fukosantin terenkapsulasi dipengaruhi oleh karakteristik kimia. Karakteristik tersebut mempengaruhi masuknya nano kapsul ke dalam sel epitel usus. Sel ini dilapisi oleh lapisan lendir bermuatan negatif yang berfungsi sebagai penghalang nutrisi masuk ke dalam usus kecil. Interaksi elektrostatis antara ion karboksilat lapisan lendir dengan ion ammonium kitosan memudahkan fukosantin masuk ke dalam sel epitel usus (Koo *et al.*, 2016).

Selain karakteristik kimia, ukuran partikel nanomaterial juga mempengaruhi kemampuan farmakokinetik fukosantin. Material dalam ukuran nanometer meningkatkan penyerapan sediaan farmasi ke dalam enterosit atau memfasilitasi difusi (Ravi and Baskaran, 2017). Fukosantin juga dapat terserap oleh kulit melalui jalur intraseluler dan kantung rambut. Fukosantin terkumpul di kulit dan larutan reseptor, dan kekuatan penggerak difusi melalui difusi akan berkurang, mengarah pada kondisi aliran jenuh. Secara *in vivo*, fukosantin larut dalam darah, tersapu oleh aliran darah dekat kulit dan di metabolisme selama sirkulasi tersistem (Dai and Kim, 2013).

Degradasi fukosantin meningkat dengan penyimpanan dan laju retensi fukosantin bebas menurun secara cepat dibandingkan dengan fukosantin terenkapsulasi. Fukosantin terenkapsulasi yang disimpan pada suhu 50°C memiliki nilai retensi sekitar 74–48%. Setelah empat minggu penyimpanan, fukosantin terenkapsulasi lebih sensitif terhadap cahaya, dimana memiliki nilai retensi sekitar 63–74%. Dapat disimpulkan bahwa enkapsulasi dapat menghambat atau mengurangi reaksi antara sediaan farmasi dengan agen lingkungan yang menghasilkan penurunan degradasi sediaan farmasi (Oliyaei *et al.*, 2020). Quan telah melaporkan nilai retensi fukosantin bebas dan fukosantin terenkapsulasi setelah 100 hari penyimpanan masing-masing sebesar 75 dan 51% (Quan *et al.*, 2013).

2.8. Karakterisasi

Karakterisasi merupakan aspek yang sangat penting untuk mendukung data hasil sintesis nanomaterial. Karakterisasi yang dilakukan pada penelitian ini dijelaskan sebagai berikut. Pertama, karakterisasi kitosan dari kulit udang dan fungi yang meliputi FTIR, DSC, dan SEM. Kedua, karakterisasi nano kitosan–pektin yang meliputi ukuran partikel menggunakan PSA, karakterisasi gugus fungsi menggunakan FTIR, serta morfologi permukaan menggunakan SEM dan TEM. Ketiga, karakterisasi fukosantin dari *Cyclotella striata* menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Keempat, karakterisasi nano kitosan–

pektin–fukosantin yang meliputi efisiensi enkapsulasi, stabilitas fukosantin, FTIR, SEM, dan TEM.

2.8.1. *Fourier Transform Infrared*

Salah satu instrumen yang digunakan untuk penentuan struktur kimia adalah spektrofotometer FTIR. Alat ini biasanya digunakan untuk menentukan gugus-gugus fungsi senyawa organik, misalnya alkohol, aldehida, asam karboksilat, dan lain-lain. Mekanisme kerja alat ini menggunakan radiasi sinar infra merah pada rentang bilangan gelombang 0–4000 cm^{-1} . Dalam sintesis nanomaterial, khususnya yang menggunakan bahan biopolimer, spektrofotometer FTIR sering digunakan untuk mengkonfirmasi interaksi kimia dari masing-masing senyawa yang digunakan. Nilai serapan FTIR senyawa kitin, kitosan, pektin, dan fukosantin dijelaskan pada Tabel 2.1.

Hasil analisis FTIR dapat digunakan untuk membedakan antara kitin dan kitosan yang dihasilkan dari kulit udang. Kitosan dan kitin hasil isolasi dari kepiting memiliki beberapa gugus fungsi yang sama, tetapi memberikan nilai serapan bilangan gelombang yang sedikit berbeda. Regangan karbonil pada kitin dan kitosan masing-masing terlihat pada bilangan gelombang 1657 dan 1636 cm^{-1} , sementara tekukan alifatik ($-\text{CH}_2$) kitin dan kitosan masing-masing terlihat pada bilangan gelombang 1417–1379 dan 1412–1384 cm^{-1} . Kitosan juga memiliki puncak serapan spesifik yang tidak dimiliki oleh kitin, antara lain tarikan amina atau NH_2 (3435 cm^{-1}), tarikan alifatik atau $-\text{CH}_2$ (2924 cm^{-1}), vibrasi kompleks gugus NHCO (1261 cm^{-1}), ikatan glikosidik $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (1160 cm^{-1}) (Ahyat *et al.*, 2017).

Arulmoorthy telah melaporkan karakterisasi FTIR kitosan yang diisolasi dari kulit udang. Tarikan amina (NH_2) terlihat pada bilangan gelombang 3425 cm^{-1} , sementara tarikan alifatik (CH) terlihat pada bilangan gelombang 2922 cm^{-1} . Tekukan NH terlihat pada bilangan gelombang 1456–1421 cm^{-1} , tarikan glikosidik ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) terlihat pada bilangan gelombang 1154–1074 cm^{-1} . Tekukan cincin piranosa terlihat pada bilangan gelombang 1315 cm^{-1} , sedangkan tarikan

cincin piranosa terlihat pada bilangan gelombang 898–670 cm^{-1} (Arulmoorthy *et al.*, 2022).

Tabel 2.1. Serapan FTIR Kitin, Kitosan, Pektin, dan Fukosantin

Ciri kelompok	Bilangan Gelombang (cm^{-1})				Referensi
	Kitin	Kitosan	Pektin	Fukosantin	
OH hidroksil	3445	3425	3433	3367	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022; Salama <i>et al.</i> , 2020; Koo <i>et al.</i> , 2016
OH karboksilat	-	-	2969	-	Salama <i>et al.</i> , 2020
Tarikan N-H amina	3264	3425	-	-	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022
Tarikan C-H alifatik	3102	2922	2933	1381	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022; Salama <i>et al.</i> , 2020; Koo <i>et al.</i> , 2016
	-	-	2908	1326	Salama <i>et al.</i> , 2020; Koo <i>et al.</i> , 2016
	-	-	1390	1247	Salama <i>et al.</i> , 2020; Koo <i>et al.</i> , 2016
Tarikan C=O amida	1657	1645	-	-	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022;
C=O karboksilat	-	-	1745	1648	Salama <i>et al.</i> , 2020; Koo <i>et al.</i> , 2016
	-	-	1643	-	Salama <i>et al.</i> , 2020
	-	-	1600	-	Salama <i>et al.</i> , 2020
C=O ester	-	-	1641	-	Salama <i>et al.</i> , 2020
	-	-	1173	-	Salama <i>et al.</i> , 2020
	-	-	1165	-	Salama <i>et al.</i> , 2020
C=O keton	-	-	-	1732	Koo <i>et al.</i> , 2016
Tekukan N-H	1559	1456	-	-	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022
	-	1421	-	-	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022
Amida III	1314	-	-	-	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022
Tarikan C-O-C	-	1154	-	-	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022
	-	1074	-	-	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022
Tekukan cincin	-	1315	-	-	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022
	-	898-670	-	-	Arulmoorthy <i>et al.</i> , 2022
Ikatan C=C=C		-	-	1929	Koo <i>et al.</i> , 2016
C-H alkana	-	-	-	2924	Koo <i>et al.</i> , 2016
	-	-	-	2854	Koo <i>et al.</i> , 2016
C-O ester	-	-	-	1031	Koo <i>et al.</i> , 2016

Struktur pektin dalam spektrum FTIR dapat dijelaskan sebagai berikut. Bilangan gelombang 1646 dan 1420 cm^{-1} menunjukkan adanya garam karboksilat dalam struktur polimer, sementara serapan bilangan gelombang 1173 cm^{-1} menunjukkan adanya tarikan ikatan ester. Vibrasi ikatan metilena (CH) terlihat pada bilangan gelombang 2933, 2908, dan 1390 cm^{-1} (Ghorbani *et al.*, 2020). Gugus karboksilat

dan ester pada polimer pektin terlihat pada bilangan gelombang 1745 dan 1641 cm^{-1} (Tian *et al.*, 2020). Zhao melaporkan tarikan karbonil asam pektat dan asam pektinat dalam rantai polisakarida terlihat pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} (Zhao *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dipublikasikan oleh Salama, gugus hidroksil (OH) alkohol dan asam karboksilat terlihat pada bilangan gelombang 3433 cm^{-1} dan 2969 cm^{-1} . Tarikan C=O ester dan karboksilat terlihat pada bilangan gelombang 1165 dan 1643 cm^{-1} (Salama *et al.*, 2020).

Senyawa fukosantin memiliki beberapa gugus fungsi yang dapat dikarakterisasi oleh FTIR. Puncak serapan pada bilangan gelombang 1929 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan ikatan allena (C=C=C), sedangkan puncak serapan pada bilangan gelombang 3367 cm^{-1} menunjukkan vibrasi tarikan O–H. Keberadaan ikatan C–H alkena terlihat pada bilangan gelombang 2924 dan 2854 cm^{-1} , sementara keberadaan karbonil keton terlihat pada bilangan gelombang 1732 cm^{-1} . Ikatan C–O ester fukosantin terlihat pada bilangan gelombang 1031 cm^{-1} (Koo *et al.*, 2016). Tarikan CH₂ fukosantin terlihat pada bilangan gelombang 1381, 1326, dan 1247 cm^{-1} , sedangkan serapan C=O asetat terlihat pada bilangan gelombang 1648 cm^{-1} (Oliyaie *et al.*, 2020).

2.8.2. *Differential Scanning Calorimetry*

Konsep dasar DSC merupakan perubahan kapasitas panas suatu material terhadap temperatur. Suatu sampel dengan berat tertentu dipanaskan atau didinginkan dan perubahan kapasitas panasnya dicatat sebagai perubahan aliran panas. Analisis ini sering dipakai dalam bidang biomedis, karena dapat mengetahui derajat kemurnian dan perubahan fase suatu material yang digunakan sebagai bahan enkapsulasi (biasanya menggunakan material biopolimer). Keadaan meleleh suatu biopolimer atau disebut *glass transition* indikator terbaik dari sifat biopolimer. Perubahan *glass transition* terjadi karena perbedaan derajat polimerisasi atau modifikasi biopolimer, menunjukkan perubahan sifat biopolimer (PerkinElmer, 2013).

Instrumentasi DSC untuk material padat menggunakan dua panci (panci sampel dan panci referensi) yang diletakkan pada permukaan panas. Sampel dan referensi dipanaskan dengan laju pemanasan linier. Laju pemanasan yang diperlukan untuk memanaskan panci selanjutnya ditetapkan sebagai perubahan temperatur. Laju pemanasan terhadap suhu kemudian diplotkan untuk menghasilkan termogram (Demarest and Frasca, 2015).

Termogram DSC kitosan menunjukkan dua tahap degradasi yang berbeda. Tahap degradasi pertama terjadi antara temperatur 66°C sampai dengan 106°C yang merupakan puncak endoterm (Arulmoorthy *et al.*, 2022). Degradasi ini disebabkan karena penguapan molekul air. Degradasi kedua yang merupakan puncak eksoterm terjadi pada temperatur 345°C. Degradasi tersebut menunjukkan degradasi ikatan glikosida polimer kitosan dan dilanjutkan dengan degradasi cincin piranosa monomer kitosan (Muley *et al.*, 2018). Polimer pektin terdegradasi pada temperatur 76°C. Interaksi kitosan–pektin ditandai dengan transisi endoterm pada temperatur 74°C. Konjugasi kitosan–pektin juga ditandai dengan penurunan intensitas perubahan kapasitas panas pektin (8,08 menjadi 0,23 J/g.K) yang mengindikasikan pengurangan struktur kristalin. Dapat disimpulkan bahwa interaksi kitosan dengan pektin bersifat amorf (Tian *et al.*, 2020). Interaksi antara kitosan dengan pektin memunculkan puncak degradasi intermediet pada temperatur 189°C yang mengindikasikan interaksi antara ion NH_3^+ kitosan dengan ion COO^- pektin. Degradasi intermediet tersebut dikonfirmasi oleh degradasi pada temperatur 261°C yang mengindikasikan rusaknya interaksi elektrostatis antara kitosan dengan pektin (Salama *et al.*, 2020).

2.8.3. *Particle Size Analyzer*

Partikel merupakan objek tiga dimensi yang tidak dapat dijelaskan dengan dimensi tunggal seperti radius atau diameter. Dalam kasus ini ukuran partikel didefinisikan sebagai diameter bola ekuivalen yang memiliki sifat yang sama seperti partikel sebenarnya, contohnya volume atau massa. Perbedaan teknik pengukuran yang menggunakan model bola ekuivalen yang berbeda belum tentu

memberikan hasil diameter partikel yang persis sama. Dengan demikian pengukuran partikel tiga dimensi terdiri dari distribusi statistik partikel yang memiliki ukuran yang berbeda-beda (Panalytical, 2017).

Pengukuran distribusi partikel sangat penting untuk menstabilkan atau meningkatkan karakteristik, kemampuan, atau kualitas suatu partikel. Salah satu metode pengukuran distribusi partikel yaitu metode kisi terinduksi (*Induced Grating*). Sampel diletakkan dalam *batch cell* dan dimasukkan substrat elektroda. Ketika tegangan bolak-balik dikenakan pada elektroda, dielektroforesis meningkatkan konsentrasi partikel dalam area dimana elektroda kiri dan kanan saling berhadapan. Hal tersebut menghasilkan variasi konsentrasi partikel dan membentuk kisi difraksi partikel. Ketika tegangan bolak balik dimatikan, nanopartikel yang terbentuk kisi difraksi partikel mulai menyebar dan ukuran partikel ditentukan dari kecepatan difusi (Corporation, 1996).

Pengukuran partikel telah dilakukan di berbagai macam bidang dan industri, salah satunya bidang farmasi. Ukuran dan bentuk partikel sangat mempengaruhi beberapa sifat fisik penting, diantaranya kecepatan disolusi sediaan farmasi; kecepatan pengiriman obat dari formulasi pengiriman terkontrol; *in vivo* distribusi, deposisi, absorpsi partikel dari sistem koloid yang dirancang untuk pengiriman obat yang ditargetkan; keseragaman dosis, serta stabilitas fisikokimia. Semua sifat fisik tersebut sangat mempengaruhi keamanan dan kemanjuran suatu sediaan farmasi (Shekunov *et al.*, 2007).

Ukuran partikel nanomaterial, khususnya kitosan–pektin dipengaruhi oleh stoikiometri reaksi kompleksasi antara kitosan dengan pektin. Jumlah kitosan berlebih atau jumlah pektin berlebih meningkatkan ukuran partikel nanomaterial tersebut (Salama *et al.*, 2020). Sampai saat ini belum banyak publikasi penelitian sintesis kitosan–pektin yang membahas tentang ukuran partikel material tersebut. Dalam penelitian ini akan dikaji formulasi nanoenkapsulasi yang menghasilkan ukuran partikel yang tepat sehingga meningkatkan efektivitas kemanjuran sediaan farmasi yang tidak stabil.

2.8.4. *Scanning Electron Microscope*

Fungsi utama dari SEM yakni memperbesar suatu objek yang tidak bisa dilihat oleh manusia. Berkas elektron berenergi tinggi yang dikenakan pada suatu permukaan sampel menghasilkan perbesaran lebih tinggi dibandingkan dengan mikroskop cahaya. Peningkatan perbesaran atau resolusi yang lebih tinggi dapat diterima karena elektron memiliki panjang gelombang yang lebih kecil daripada cahaya. Semakin kecil panjang gelombang, maka semakin besar daya pisahnya dan semakin besar detail yang terungkap dalam gambar (Ul-Hamid, 2018). Ketika berkas elektron utama berinteraksi dengan sampel, elektron kehilangan energi diikuti penyebaran secara acak dan absorpsi dalam bentuk tetesan air mata volume spesimen dikenal sebagai volume interaksi. Pertukaran energi antara elektron dan sampel menghasilkan refleksi penyebaran balik berenergi tinggi melalui penyebaran elastik, emisi sekunder berenergi lemah, penyebaran tak elastis, dan emisi radiasi elektromagnetik yang dapat dideteksi oleh masing-masing detektor (Kannan, 2018).

Arulmoorthy telah melaporkan bahwa kitosan yang diisolasi dari kulit udang memiliki bentuk seperti lapisan serpihan dan memiliki struktur banyak pori yang dapat dilihat di beberapa area. Struktur fibril juga terlihat di beberapa bagian kitosan (Arulmoorthy *et al.*, 2022). Morfologi permukaan kitosan dari kulit udang juga telah dilaporkan oleh Borja-Urzola. Tahap demineralisasi menyebabkan kitosan memiliki permukaan halus dan terdistribusi secara homogen di permukaan partikel (Borja-Urzola *et al.*, 2020).

Analisis SEM dapat digunakan untuk konfirmasi struktur kompleks polielektrolit kitosan–pektin. Keberadaan pektin dalam kompleks polielektrolit memberikan bentuk struktur jaringan interkoneksi tiga dimensi dan porositas yang lebih homogen (Luppi *et al.*, 2010). Hasil yang sama juga telah dilaporkan oleh Chen (2010) bahwa interaksi kitosan–pektin memiliki struktur interkoneksi pori-pori yang seragam. Penambahan reagen ikatan silang seperti kalsium klorida tetap memberikan struktur berpori dalam material tersebut. Morfologi permukaan kompleks polielektrolit juga dipengaruhi oleh pH larutan (Chen *et al.*, 2010). Pascalau (2020) telah melaporkan enkapsulasi berberine dengan kompleks

polielektrolit kitosan–pektin-*bovine serum albumin* (BSA). Kompleks polielektrolit memiliki morfologi permukaan yang lebih halus pada pH 6,8 dibandingkan pH 5,6. Reagen BSA yang memiliki titik isoelektrik negatif menarik ion positif dari berberin. Intensitas interaksi tersebut akan meningkat seiring dengan kenaikan pH (Paşcalău *et al.*, 2020).

2.8.5. *Transmission Electron Microscope*

Teknik perbesaran suatu objek selain menggunakan SEM juga dapat dilakukan menggunakan TEM. Instrumen ini juga menggunakan berkas elektron sebagai sumber energi utama. Berkas elektron ditransmisikan ke dalam sampel ultra tipis, berinteraksi dengan sampel dan melewati sampel. Interaksi elektron yang ditransmisikan ke dalam sampel menghasilkan gambar, diperbesar dan difokuskan ke suatu perangkat pencitraan misalnya kamera *charged couple device* (Lin *et al.*, 2011). Berkas elektron yang dihasilkan dari pemanasan filamen tungsten diteruskan ke lensa condenser elektromagnetik, lensa objektif, lensa intermediet, dan lensa proyektor. Berkas elektron terfokus ditransmisikan ke spesimen, dimuat pada kisi yang dimasukkan di jalur dan dimanipulasi oleh goniometer. Bagian dari berkas diabsorpsi, disebar, dan ditransmisikan melalui lubang objektif dan diproyeksikan oleh lensa proyektor setelah dikoreksi lensa intermediet. Variasi spasial gambar kemudian diperbesar oleh lensa magnetik sampai dicatat oleh sensor *charged couple device* (Kannan, 2018).

Penafsiran citra gambar material menggunakan TEM memberikan informasi yang berharga tentang morfologi, ukuran dan distribusi ukuran nanomaterial biopolimer. Teknik ini merupakan instrumen yang ampuh untuk mendukung teknik pengukuran partikel konvensional seperti PSA (Maciel *et al.*, 2017; Salama *et al.*, 2020). Beberapa pendekatan yang dapat dilakukan menggunakan instrumentasi ini antara lain optimasi formulasi nanomaterial, konfigurasi internal nanomaterial dan interaksi nano kapsul dengan situs target (Assadpour *et al.*, 2020).

2.8.6. *Medium-Pressure Liquid Chromatography*

Kromatografi cair tekanan sedang atau MPLC merupakan salah satu jenis kromatografi cair yang bekerja pada tekanan yang lebih rendah dari kromatografi tekanan tinggi. Fase gerak pada MPLC melaju dibawah tekanan antara 100 hingga 500 psi. Rentang tekanan tersebut memberikan resolusi pemisahan dan efisiensi yang lebih baik daripada kromatografi kolom konvensional namun biaya yang diperlukan lebih murah dibandingkan HPLC. Senyawa-senyawa yang dapat dipisahkan menggunakan MPLC adalah senyawa-senyawa organik kecil dan peptida. Alat ini juga dapat digunakan untuk memisahkan senyawa yang sensitif terhadap tekanan dan suhu tinggi karena bekerja pada tekanan dan suhu yang lebih rendah dibandingkan HPLC (Fekete *et al.*, 2022). Proses pemisahan senyawa menggunakan MPLC dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Persiapan sampel, sampel kompleks dilarutkan dalam pelarut organik (metanol, etanol, dan asetonitril) ataupun air. Larutan tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom MPLC.
2. Pengemasan kolom, kolom MPLC yang berupa gel silika atau adsorben yang lain dikemas dengan fase diam yang menyediakan luas permukaan untuk proses pemisahan.
3. Fase gerak, pelarut atau campuran pelarut dipompa melalui kolom dengan tekanan antara 100 hingga 500 psi. Fase gerak ini berinteraksi dengan senyawa target dan fase diam yang dipengaruhi oleh retensi dan elusinya.
4. Pemisahan, ketika fase gerak mengalir melalui kolom, senyawa target berinteraksi dengan fase diam. Waktu retensi senyawa target dipengaruhi oleh polaritas, ukuran, dan afinitasnya terhadap fase diam.
5. Elusi, fase gerak mengubah komposisi sampel kompleks yang memungkinkan senyawa target terelusi dan terpisah dari kolom.
6. Pengumpulan, senyawa yang dipisahkan dikumpulkan ketika dielusi dari kolom menggunakan pengumpul fraksi dan pemantauan kromatogram.
7. Pemurnian, fraksi yang dikumpulkan selanjutnya dapat dimurnikan lebih lanjut menggunakan teknik tambahan, misalnya HPLC, untuk mencapai kemurnian yang diinginkan (Liang *et al.*, 2015).

Salah satu contoh pemurnian senyawa menggunakan MPLC adalah pemurnian fukosantin dari mikroalga. Sebelum memasuki tahap pemurnian, dilakukan ekstraksi senyawa karotenoid yang ada pada mikroalga menggunakan pelarut etanol atau metanol. Ekstrak kasar yang dihasilkan selanjutnya dipisahkan dengan teknik ekstraksi fase padat menggunakan kromatografi kolom gel silika. Pemurnian lebih lanjut menggunakan MPLC biasanya melibatkan penggunaan kolom gel silika atau polistirena-divinil benzena yang dikemas dengan fase diam. Fukosantin ditahan secara selektif dan kemudian dielusi menggunakan gradien pelarut yang meningkatkan polaritasnya. Fukosantin yang dielusi lalu dikumpulkan dan dianalisis identitas dan penurniannya. Keunggulan pemurnian fukosantin dengan MPLC adalah peningkatan efisiensi dan resolusi pemisahan dibandingkan dengan kromatografi kilat, kemampuan untuk menangani senyawa yang lebih besar dibandingkan HPLC, hemat biaya, serta mudah diakses (Zhao *et al.*, 2022).

2.8.7. Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis pada dasarnya melibatkan pengukuran jumlah cahaya yang diserap atau ditransmisikan oleh sampel pada panjang gelombang ultraviolet atau UV dan cahaya tampak yang berbeda. Teknik ini memungkinkan untuk dilakukan kuantifikasi dan identifikasi zat yang ada pada sampel. Instrumentasi spektrofotometer UV-Vis terdiri atas sumber cahaya, sistem pemilihan panjang gelombang, sistem analisis sampel, dan sistem deteksi. Sumber cahaya memancarkan spektrum sinar UV dan tampak yang luas, selanjutnya disaring untuk memilih panjang gelombang tertentu. Sampel ditempatkan pada jalur cahaya yang dipilih, dan jumlah cahaya yang diserap atau ditransmisikan diukur oleh sistem deteksi. Sistem deteksi diubah menjadi sinyal listrik yang kemudian diproses menghasilkan nilai serapan atau transmisi pada panjang gelombang tertentu. Nilai serapan atau transmisi tersebut diplot terhadap panjang gelombang untuk menghasilkan spektrum serapan. Spektrum serapan ini yang digunakan untuk mengukur atau mengidentifikasi zat yang terdapat pada sampel (Tom, 2021).

Spektrofotometer UV-Vis merupakan salah satu alat yang digunakan untuk penentuan struktur senyawa organik. Ciri khas senyawa organik yang ditampakkan oleh spektrofotometer UV-Vis adalah perbedaan panjang gelombang maksimum yang dihasilkan oleh tiap-tiap senyawa organik. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang dimana penyerapan cahaya oleh senyawa paling tinggi. Penentuan panjang gelombang maksimum dapat dilakukan sebagai berikut. Pertama, serapan senyawa diukur pada rentang panjang gelombang tertentu untuk memperoleh grafik serapan terhadap panjang gelombang. Selanjutnya puncak serapan yang paling tinggi ditentukan dan diidentifikasi dan ditentukan panjang gelombangnya secara spesifik. Panjang gelombang yang sesuai dengan serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum senyawa. Nilai panjang gelombang maksimum tersebut dibandingkan dengan hasil perhitungan secara teoritis (Pratiwi and Nandiyanto, 2021).

Mengacu pada Gambar 2.7, struktur fukosantin terdiri atas sembilan ikatan rangkap terkonjugasi, sepuluh substituen alkil, dan satu ikatan rangkap ekso. Jika masing-masing komponen dimasukkan ke dalam Persamaan (3), maka akan menghasilkan nilai panjang gelombang maksimum sebesar 448 nm. Dengan kata lain, secara teoritis, panjang gelombang maksimum fukosantin yang diperoleh dari hasil analisis spektrofotometer UV-Vis adalah 448 nm. Nilai tersebut sama dengan laporan Sulistiyani (2021) yang menyatakan bahwa fukosantin dari alga coklat memiliki panjang gelombang maksimum 448 nm (Sulistiyani *et al.*, 2021). Hasil tersebut menjadi salah satu dasar untuk identifikasi dan karakterisasi fukosantin yang diisolasi dari mikroalga *Cyclotella striata*.

2.8.8. Efisiensi Enkapsulasi

Enkapsulasi merupakan suatu teknik mengurung partikel padat atau tetesan cairan dalam cangkang *inert*. Teknik ini bertujuan untuk melindungi substrat sensitif dari lingkungan luar, menutupi sifat organoleptik (rasa dan warna), mendapatkan pengiriman terkontrol dari substansi obat, penanganan yang aman dari material toksik, mendapatkan pengiriman yang ditargetkan dan menghindari efek samping.

Suatu kapsul terdiri dari dua komponen, yaitu material inti (memuat suatu bahan aktif) dan material pelapis (melindungi material inti) (Jyothi *et al.*, 2010). Salah satu parameter yang dapat mengetahui keberhasilan enkapsulasi yaitu efisiensi enkapsulasi (EE) yang didefinisikan sebagai persentase suatu bahan aktif yang berhasil terjerat dalam nanomaterial (Li *et al.*, 2016).

Penentuan EE sediaan farmasi yang tidak stabil seperti fukosantin dapat dilakukan menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC) menggunakan fase gerak metanol dengan laju aliran 1 mL/menit, waktu retensi 2,34 menit dan temperatur kolom 30°C. Konsentrasi fukosantin ditentukan menggunakan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm (Quan *et al.*, 2013). Penentuan EE fukosantin yang dienkapsulasi dengan kitosan menggunakan HPLC juga telah dipublikasikan oleh Koo (2013) dan Vo (2018). Nilai EE fukosantin dalam material kitosan sebesar 90–95 %. Sifat lipofilisitas fukosantin merupakan faktor utama yang mempengaruhi keberhasilan enkapsulasi fukosantin (Koo *et al.*, 2016; Vo *et al.*, 2018). Pelapisan fukosantin oleh kitosan yang memungkinkan terjadinya perubahan struktur material tidak mengurangi afinitas lipofilisitas fukosantin (Cordenonsi *et al.*, 2019).

Selain menggunakan HPLC, penentuan EE pada senyawa-senyawa karotenoid juga dapat dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Lestari (2020) telah melaporkan penentuan EE beta karoten yang dienkapsulasi dalam nano kitosan-pati. Secara prinsip, penentuan EE menggunakan spektrofotometer UV-Vis diawali dengan melarutkan padatan hasil enkapsulasi dalam pelarut etanol pada konsentrasi tertentu (konsentrasi secara teoritis). Selain itu, juga disediakan beberapa larutan standar beta karoten dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Larutan standar tersebut dilakukan pembacaan absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum untuk menghasilkan kurva kalibrasi standar. Selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi sampel uji pada panjang gelombang maksimum yang sama. Hasil pembacaan absorbansi dikonversikan menjadi konsentrasi enkapsulasi yang sebenarnya menggunakan persamaan regresi linier yang didapatkan dari kurva kalibrasi standar. Nilai EE didapatkan dengan membandingkan konsentrasi yang

sebenarnya dengan konsentrasi secara teoritis (Lestari *et al.*, 2020). Dalam penelitian ini, penentuan EE dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Beberapa pertimbangan yang mendasari penentuan EE menggunakan spektrofotometer antara lain biaya yang murah, preparasi dan proses analisis yang mudah, hasil analisis yang cepat, interpretasi data yang mudah dan pelarut yang digunakan tidak banyak (Cosby *et al.*, 2020).

2.8.9. Stabilitas Fukosantin

Fukosantin merupakan karotenoid yang tidak stabil terhadap panas dan asam karena di dalam strukturnya terdapat banyak ikatan rangkap sehingga sangat rentan terdegradasi. Stabilitas fukosantin dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya pH, temperatur, dan paparan oksigen. Berdasarkan kajian yang telah dilakukan, fukosantin lebih stabil ketika disimpan dalam kondisi gelap dan pigmennya lebih stabil ketika disimpan dalam suasana basa (pH 9) (SiewLing *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2018). Salah satu cara untuk meningkatkan stabilitas fukosantin adalah mengenkapsulasinya dengan beberapa biopolymer seperti maltodekstrin, isolat protein, kitosan, dan lain-lain.

Analisis stabilitas fukosantin dapat dijelaskan melalui langkah-langkah berikut ini. Pertama, disiapkan larutan fukosantin murni yang telah diketahui konsentrasinya dan sampel yang akan diuji stabilitasnya. Kajian stabilitas fukosantin dapat dilakukan pada beberapa aspek, diantaranya, stabilitas kimia (temperatur, oksidasi, dan pH), stabilitas fisika (cahaya dan kelembaban), stabilitas biologi (metabolic dan pencernaan), serta stabilitas formulasi atau stabilitas enkapsulasi. Selanjutnya, dilakukan metode analitik yang dapat menggunakan HPLC dan spektrofotometer UV-Vis. Langkah terakhir adalah data analisis dan optimasi (Zhao *et al.*, 2019).

Koo (2016) telah melaporkan hasil analisis stabilitas fukosantin dalam kitosan–kasein selama empat minggu dan dibandingkan dengan fukosantin yang tidak dienkapsulasi. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa setelah empat minggu konsentrasi fukosantin yang tersisa dalam kitosan–kasein lebih dari 80%. Disisi

lain, konsentrasi fukosantin yang tidak terenkapsulasi berkurang lebih dari 30% setelah empat minggu penyimpanan (Koo *et al.*, 2016). Kajian stabilitas fukosantin yang dienkapsulasi dalam nano gel kitosan–glikolipid juga telah dilaporkan oleh Ravi (2015) menggunakan parameter kinetika kimia. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa terjadi peningkatan waktu paruh oksidasi fukosantin sembilan kali lebih lama setelah dienkapsulasi dalam nano gel kitosan–glikolipid. Waktu paruh oksidasi fukosantin dalam nano gel kitosan–glikolipid adalah 45 hari, sedangkan waktu paruh fukosantin yang tidak dienkapsulasi adalah 5 hari (Ravi and Baskaran, 2015). Berdasarkan hasil kajian tersebut, dapat disimpulkan bahwa stabilitas fukosantin dapat ditingkatkan melalui proses enkapsulasi dalam matriks konjugasi. Dalam kajian ini, salah satu karakterisasi yang dilakukan adalah analisis stabilitas fukosantin yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh enkapsulasi terhadap stabilitasnya.

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan dari Juli 2021 sampai dengan Desember 2023 di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung. Karakterisasi dan analisis dilakukan di beberapa instansi, antara lain FTIR, SEM, DSC, UV-Vis (Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung); TEM (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada) dan PSA Diethelm Keller Siber Hegner (DKSH) Indonesia.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi gelas beaker (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), petri dish, mikropipet (Volac Smart Gen-Next Pipette 100-1000 uL), neraca analitik (Ohaus-Pioneer), oven (Jisico J-300S), *magnetic stirrer hotplate* (Sojiky), *autoclave* (Tomy SX-700), *rotary evaporator* (Buchi R-210), *Centrifuge* (Tomy CAX-370), *Ultrasonic Bath* (Branson Ultrasonic Cleaner model 1510), *freeze dryer* (Labfreez FD-10-MR), FTIR (Agilent Technologies Cary 630), MPLC (BUCHI sepacore Flash System X50), Spektrofotometer Uv-Vis (Agilent Technologies Cary 100 UV-Vis), DSC (Hitachi X-DSC 7000 Series), SEM (Zeiss Evo MA10), TEM (Jeol Jem-1400) dan PSA (Mastersizer Malvern Panalytical).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kulit udang dikumpulkan dari gudang lelang, tempat pelelangan ikan Lempasing Bandar Lampung. Isolat fungi *Fusarium sp.* 20CB07 merupakan deposit dari Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung.

Mikroalga *Cyclotella striata* dari koleksi Laboratorium Biokimia Gedung Riset dan Inovasi Institut Teknologi Bandung yang berasal dari Tanjung Bidadari Kepulauan Seribu. Kitosan standar $[C_6H_{11}NO_4]_N$ dari FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation; pektin ($C_6H_{10}O_7$) (*food grade*) dari CP Kelco; asam klorida (HCl), natrium hidroksida (NaOH), asam asetat (CH_3COOH), natrium tripolifosfat ($Na_5P_3O_{10}$), kalium nitrat (KNO_3), natrium metasilikat (Na_2SiO_3), besi(III) klorida ($FeCl_3$), etanol (CH_3OH), *malt extract agar* (MEA) dari Merck KGaA; kolom silika (40 m 40 g Buchi Reveleris) dari PT Buchi Indonesia, *triple superphosphate* (TSP), garam dapur (NaCl), beras diperoleh dari pasar koga Bandar Lampung.

3.3. Pengambilan Sampel Kulit Udang

Biomaterial kulit udang putih (*Penaeus merguensis de Man*) (20 kg) dikumpulkan dari gudang lelang, tempat pelelangan ikan Lempasing Bandar Lampung. Biomaterial dikemas dalam wadah plastik besar dan disimpan dalam *freezer* pada temperatur $-25^{\circ}C$ hingga dilakukan preparasi.

3.4. Preparasi Sampel Kulit Udang

Biomaterial kulit udang yang telah dipisahkan dari daging dibersihkan menggunakan air untuk menghilangkan pasir, lumpur, dan partikel lainnya. Kulit udang bersih dikeringkan menggunakan oven pada temperatur $60^{\circ}C$ selama 24 jam. Kulit udang kering digiling menjadi serbuk kasar menggunakan mesin blender dan diayak menggunakan ayakan ukuran 56 mesh. Serbuk kasar siap digunakan untuk ekstraksi kitosan.

3.5. Ekstraksi kitosan dari Kulit Udang

Ekstraksi kitosan dari kulit udang dilakukan berdasarkan metode yang telah dilaporkan oleh Said Al Hoqani dengan sedikit modifikasi. Ekstraksi kitosan

dilakukan melalui proses deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi. Langkah pertama, 100 g serbuk kulit udang dimasukkan ke dalam gelas beker 2 liter untuk deproteinasi. Sampel direaksikan dengan NaOH (3,5%; 1:10 b/v) pada temperatur 60°C dengan pengadukan konstan selama 2 jam. Sampel yang telah di deproteinasi disaring dan dicuci dengan aquades serta dikeringkan menggunakan oven pada 60°C selama 24 jam. Selanjutnya sampel yang dihasilkan dari deproteinasi kulit udang di demineralisasi menggunakan HCl (1.25N; 1:10 b/v) dengan pengadukan konstan selama 2 jam pada temperatur 60°C. Setelah demineralisasi, sampel disaring dan dicuci dengan aquades serta dikeringkan menggunakan oven pada 60°C selama 24 jam. Sebanyak 8,7 g kitin ditambahkan 130 mL NaOH 60% dan diaduk selama 6 jam pada temperatur 90°C. Sampel dicuci dengan aquades hingga netral dan dikeringkan menggunakan oven pada temperatur 60°C selama 18 jam (Said Al Hoqani *et al.*, 2020). Rendemen kitin dan kitosan ditentukan menggunakan Persamaan (1) dan Persamaan (2).

$$R_{\text{kitin}} = \frac{W_{\text{kitin}}}{W_{\text{KU}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$R_{\text{kitosan}} = \left(\frac{W_{\text{kitosan}}}{W_{\text{kitin}}} \times 100\% \right) \times R_{\text{kitin}} \quad (2)$$

Dimana R_{kitin} adalah rendemen kitin, R_{kitosan} adalah rendemen kitosan, W_{kitin} adalah berat kitin, W_{KU} adalah berat kulit udang, dan W_{kitosan} adalah berat kitosan.

3.6. Sintesis Nano Kitosan–pektin

Sintesis nano kitosan–pektin dilakukan dengan metode gelasi ionik yang mengacu pada penelitian Abdel-Hafez. Sampel kitosan yang digunakan adalah kitosan yang diekstraksi dari kulit udang. Langkah pertama, 200 mg kitosan dimasukkan ke dalam 200 mL asam asetat 1,5% (v/v) sehingga konsentrasinya setara dengan 1 mg/mL. Kitosan dalam larutan asam asetat distirer selama 1 jam dan kemudian diletakkan dalam *ultrasonik bath* selama 1 jam. Selanjutnya 250, 500 dan 750 mg pektin ditambahkan aquades 100 mL sehingga konsentrasinya setara dengan 2,5; 5; dan 7,5 mg/mL. Pektin dalam aquades distirer selama 1 jam dan kemudian diletakkan dalam *ultrasonik bath* selama 1 jam. Sebanyak 50 mL larutan kitosan

ditambahkan 20 mL larutan pektin secara *dropwise* sembari distirer selama 1 jam. Perbandingan massa kitosan–pektin adalah 1:1, 1:2, dan 1:3. Sintesis nano kitosan–pektin diulangi menggunakan metode yang sama untuk perbandingan massa 2:1 dan 3:1. Sampel disimpan pada temperatur -25°C dan dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer* (Abdel-Hafez *et al.*, 2018).

3.7. Isolasi Fukosantin dari Mikroalga *Cyclotella striata*

Preparasi mikroalga *Cyclotella striata* meliputi kultivasi indukan *Cyclotella striata* dan pemanenan. Pada tahap kultivasi, stok kultur indukan *Cyclotella striata* ditanam di media air laut buatan dengan konsentrasi 22 ppt (*part per trillion*) yang telah disterilisasi menggunakan *autoclave* pada temperatur 121°C dan tekanan 1,2 MPa. Selanjutnya ditambahkan larutan KNO₃ (1,8 mL/900 mL), FeCl₃ (1,8 mL/900 mL), TSP (23 mL/900 mL) dan Na₂SiO₃ (138 mL/900 mL). kondisi cahaya diatur 12 jam terang dan 12 jam gelap (Kusumaningtyas *et al.*, 2017). Tahap terakhir, pada hari ke-14 setelah kultivasi, kultur mikroalga dalam air laut disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan pellet diatom *Cyclotella striata*. Ekstraksi fukosantin dari mikroalga *Cyclotella striata* dilakukan menggunakan pelarut etanol. Sebanyak 6 g biomassa diekstrak dengan 18 mL etanol sehingga perbandingan biomassa: etanol adalah 1:3. Larutan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan yang sama pada temperatur 4°C. Proses ekstraksi dilakukan sebanyak dua kali untuk memperoleh hasil yang optimal (Li *et al.*, 2019; Medina *et al.*, 2019). Pemurnian fukosantin dilakukan dengan menggunakan MPLC. Sebanyak 1 mL ekstrak etanol dari *Cyclotella striata* diinjeksikan ke dalam MPLC dengan laju alir 25 mL/menit. Sampel selanjutnya difraksinasi menggunakan kolom SiO₂ sebagai fase diam dan etanol sebagai fase gerak. Detektor yang digunakan adalah *Photodiode Array* (PDA) pada panjang gelombang 220, 254, dan 364 nm. Proses pemurnian dilakukan selama 6 menit. Fraksi yang diperoleh selanjutnya dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Penentuan panjang gelombang maksimum fukosantin secara teoritis dihitung menggunakan Persamaan (3).

$$\lambda_{\max} = 114 + 5 M + n(48 - 1,7n) - 16,5R_{\text{endo}} - 10R_{\text{ekso}} \quad (3)$$

Dimana $\lambda_{\max}$ adalah panjang gelombang maksimum, M adalah substituen alkil, n adalah ikatan rangkap terkonjugasi, R_{endo} adalah ikatan rangkap endo, dan R_{ekso} adalah ikatan rangkap ekso.

3.8. Enkapsulasi Fukosantin dalam Nano Kitosan–pektin

Enkapsulasi fukosantin dalam kitosan–pektin dilakukan mengacu pada penelitian yang telah dilaporkan oleh Koo (2023) dengan modifikasi. Larutan fukosantin dibuat dengan melarutkan padatan fukosantin ke dalam etanol sehingga konsentrasinya 200 ppm. Sebanyak 200 mL larutan nano kitosan–pektin ditambahkan ke dalam larutan 15 mL fukosantin secara *dropwise* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama satu jam. Larutan nano kitosan–pektin–fukosantin selanjutnya dibekukan menggunakan *freezer* selama 40 jam dan dikeringkan menggunakan *freeze dryer* (Koo *et al.*, 2023). Padatan nano kitosan–pektin–fukosantin kemudian dianalisis efisiensi enkapsulasi dan uji stabilitas. Nilai kapasitas pemuatan ditentukan dengan menggunakan Persamaan (4) dan Persamaan (5):

$$W_F = V_F \times [F] \quad (4)$$

$$KP = \frac{W_F}{W_S} \quad (5)$$

Dimana W_F adalah berat fukosantin, KP adalah kapasitas pemuatan, V_F adalah volume fukosantin, $[F]$ adalah konsentrasi fukosantin, W_S adalah berat kering nano kitosan–pektin–fukosantin.

3.8.1. Analisis Efisiensi Enkapsulasi Fukosantin

Analisis efisiensi enkapsulasi diperoleh sebagai perbandingan massa fukosantin terenkapsulasi dengan total massa fukosantin yang digunakan (Oliyaei *et al.*, 2020). Karakterisasi ini digunakan untuk sampel nano kitosan–pektin–fukosantin. Sebanyak 15 mg sampel dilarutkan dalam 5 mL etanol dan disonikasi selama 30

menit. Sampel diambil 3 mL dan absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 448 nm. Konsentrasi fukosantin faktual ditentukan dengan kurva kalibrasi standar berdasarkan pengukuran absorbansi larutan standar fukosantin dengan konsentrasi 0, 25, 50, 100, dan 200 ppm. Persamaan regresi linier ditentukan berdasarkan Persamaan (6) – Persamaan (9).

$$y = ax + b \quad (6)$$

$$a = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (7)$$

$$b = \frac{\sum y - a(\sum x)}{n} \quad (8)$$

$$R^2 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}} \quad (9)$$

Dimana, y adalah absorbansi, x adalah konsentrasi larutan standar fukosantin, a adalah slope, b adalah intersep, n adalah jumlah larutan standar, dan R^2 adalah koefisien determinasi. Nilai efisiensi enkapsulasi fukosantin ditentukan dengan menggunakan Persamaan (10) – Persamaan (13).

$$W_T = W_s \times KP \quad (10)$$

$$[F] = \frac{\text{abs} - 0,00091}{0,00591} \quad (11)$$

$$W_R = [F] \times V \quad (12)$$

$$EE = \frac{W_R}{W_T} \times 100\% \quad (13)$$

Dimana W_T adalah berat teoritis fukosantin, $[F]$ konsentrasi faktual fukosantin, W_R adalah berat faktual fukosantin, EE adalah efisiensi enkapsulasi, W_s adalah berat kitosan–pektin–fukosantin yang digunakan untuk uji efisiensi enkapsulasi, KP adalah kapasitas pemuatan, abs adalah absorbansi larutan, dan V adalah volume etanol.

3.8.2. Analisis Stabilitas Fukosantin

Uji stabilitas fukosantin dilakukan dengan menggunakan dua sampel, yaitu fukosantin yang tidak dienkapsulasi dan fukosantin yang dienkapsulasi dalam kitosan–pektin. Sebanyak 10 mg fukosantin dilarutkan dalam 50 mL etanol untuk memperoleh konsentrasi 200 ppm. Larutan fukosantin dibiarkan pada temperatur ruang selama lima hari. Pada interval waktu tertentu diambil 3 mL dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 350–700 nm. Pengujian stabilitas fukosantin dalam nano kitosan–pektin dilakukan dengan memodifikasi metode Spada (2012) temperatur ruang. Sebanyak 50 mg sampel dimasukkan ke dalam botol vial, ditutup dengan alumunium foil dan disimpan selama dua minggu. Pada interval waktu tertentu, sebanyak 3 mg sampel diambil, konsentrasi fukosantin ditentukan sebagaimana dijelaskan pada sub bab 2.6 (Spada *et al.*, 2012). Degradasi fukosantin dihitung menggunakan Persamaan (14) dan waktu paruh oksidasi fukosantin dihitung menggunakan Persamaan (15).

$$\eta_t = \frac{W_t}{W_0} \times 100\% \quad (14)$$

$$N_t = N_0 \left(\frac{1}{2} \right)^{\frac{t}{t_{1/2}}} \quad (15)$$

Dimana, η_t adalah konsentrasi fukosantin pada waktu tertentu, W_t adalah berat fukosantin pada waktu tertentu W_0 adalah berat awal fukosantin, N_t adalah banyaknya fukosantin pada akhir pengujian, N_0 adalah banyaknya fukosantin pada awal pengujian, t adalah waktu oksidasi, dan $t_{1/2}$ adalah waktu paruh oksidasi.

3.9. Karakterisasi

Karakterisasi yang dilakukan pada penelitian ini dijelaskan sebagai berikut. Pertama, karakterisasi kitosan (kitosan kulit udang dan kitosan fungi) yang meliputi karakteristik gugus fungsi dan pengukuran derajat deasetilasi menggunakan FTIR, karakterisasi termal menggunakan DSC, dan karakteristik morfologi permukaan menggunakan SEM. Kedua, karakterisasi nano kitosan–pektin yang meliputi karakteristik ukuran partikel menggunakan PSA,

karakteristik gugus fungsi menggunakan FTIR serta karakteristik morfologi permukaan menggunakan SEM dan TEM. Ketiga, karakterisasi ukuran partikel nano kitosan–TPP menggunakan PSA. Keempat, karakterisasi fukosantin menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Kelima, karakterisasi nano kitosan–pektin–fukosantin yang meliputi analisis efisiensi enkapsulasi, stabilitas fukosantin, karakteristik gugus fungsi menggunakan FTIR, serta morfologi permukaan menggunakan SEM dan TEM. Analisis yang lain dijelaskan pada bagian di bawah ini.

3.9.1. *Fourier Transform Infrared*

Karakterisasi FTIR digunakan untuk mengetahui bagaimana struktur dari kitosan dan perbedaannya terhadap nano kitosan yang berikatan silang. Karakterisasi ini meliputi sampel kitosan dari kulit udang, kitosan standar, pektin, nano kitosan–pektin, fukosantin dan nano kitosan–pektin–fukosantin. Sampel dianalisis menggunakan FTIR (Agilent Technologies cary 630, United Stated) pada rentang 4000–700 cm⁻¹. Sampel ditekan menggunakan *hydraulic press*. Nilai derajat deasetilasi kitosan dihitung menggunakan Persamaan (16) dan Persamaan (17).

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0,3822 + 0,03133DA \quad (16)$$

$$DD = 100 - DA \quad (17)$$

Dimana DA adalah derajat asetilasi, DD adalah derajat deasetilasi, A_{1320} adalah absorbansi pada 1320 cm⁻¹, A_{1420} adalah absorbansi pada 1420 cm⁻¹ (Tolesa *et al.*, 2019). Derajat esterifikasi pektin ditentukan menggunakan Persamaan (18).

$$DE = \left(\frac{A_{1744}}{A_{1744} + A_{1647}} \right) \times 100\% \quad (18)$$

Dimana DE adalah derajat esterifikasi, A_{1744} adalah absorbansi pada bilangan gelombang 1744 cm⁻¹ dan A_{1647} adalah absorbansi pada bilangan gelombang 1647 cm⁻¹.

3.9.2. *Differential Scanning Calorimetry*

Alat DSC digunakan untuk mengetahui sifat termal dari campuran (*melting* dan *transition glas*). Karakterisasi digunakan untuk sampel kitosan dari kulit udang, kitosan dari fungi, dan kitosan standar. Sampel dimasukkan ke dalam wadah dan dianalisis di bawah aliran gas nitrogen. Sifat termal kitosan hasil isolasi dan kitosan standar diukur menggunakan DSC (Hitachi X-DSC 7000, Japan). Sampel kering (5 mg) diletakkan pada *stainless steel pan* tertutup. Analisis dilakukan di bawah aliran nitrogen 20 mL/min dengan kecepatan pemanasan 30 hingga 600°C pada kecepatan 10°C/min (Vinodhini *et al.*, 2017).

3.9.3. *Particle Size Analyzer*

Nilai rentang (lebar distribusi ukuran partikel) dan diameter volume rata-rata nanomaterial dikarakterisasi menggunakan metode *electrophoretic light scattering Particle Size Analyzer* (Mastersizer Malvern Panalytical). Sampel yang digunakan untuk karakterisasi ini adalah nano kitosan–pektin. Penentuan ukuran partikel rata-rata dilakukan menggunakan Persamaan 19.

$$\bar{d} = \frac{\sum d \times I}{\sum I} \quad (19)$$

Dimana $\bar{d}$ adalah ukuran partikel rata-rata, d adalah ukuran partikel, dan I adalah intensitas.

3.9.4. *Scanning Electron Microscope*

Analisis SEM digunakan untuk mengetahui morfologi permukaan nanomaterial. Karakterisasi ini meliputi sampel kitosan dari kulit udang, kitosan standar, nano kitosan–pektin, dan nano kitosan–pektin–fukosantin. Morfologi permukaan kitosan kulit udang dan kitosan standar diperiksa menggunakan SEM (ZEISS EVO MA10, Germany). Sampel diletakkan pada potongan aluminium menggunakan keran dua sisi, dilapisi dengan film emas (10 nm) dan diperiksa

pada voltage 20 kV (Oliyaei *et al.*, 2020). Analisis SEM untuk sampel nano kitosan–pektin dan nano kitosan–pektin fukosantin dilakukan dengan cara sebagai berikut. Larutan sampel diencerkan lima kali dan ditetaskan dalam *aluminium holder pan*. Sampel selanjutnya dilapisi dengan film emas (10 nm) dan diperiksa pada voltage 20 kV (Kumar *et al.*, 2015).

3.9.5. *Transmission Electron Microscope*

Analisis TEM digunakan untuk mengetahui morfologi dan ukuran partikel dari nanomaterial. Sampel yang digunakan untuk karakterisasi ini meliputi nano kitosan–pektin dan nano kitosan–pektin–fukosantin. sebanyak 20 μL sampel ditambahkan 20 μL uranil asetat untuk pewarnaan negatif. Selanjutnya, 8 μL sampel diendapkan dalam kotak tembaga yang dilapisi dengan film *Formvar*. Kelebihan cairan dihilangkan menggunakan kertas saring. Gambar diambil menggunakan TEM Jem-1400 yang beroperasi pada 100 kV. Gambar diproses pada AMT ik CCD (AMT, Woburn, MA, USA) menggunakan perangkat lunak AMTV602 (AMT, Woburn, MA, USA) (Maciel *et al.*, 2017).

V. KESIMPULAN

5.1. Simpulan

Telah dilakukan sintesis nano kitosan–pektin untuk enkapsulasi fukosantin. Biomaterial yang digunakan untuk ekstraksi kitosan adalah kulit udang dengan nilai rendemen kitosan yang diperoleh sebesar 16,24% dan nilai derajat deasetilasi sebesar 80,28%.

Kitosan yang didapatkan selanjutnya digunakan untuk sintesis nano kitosan–pektin. Hasil analisis PSA memperlihatkan partikel nano kitosan–pektin yang paling kecil diperoleh pada perbandingan massa 1:2 dengan ukuran partikel rata-rata sebesar 173 nm.

Fukosantin yang digunakan untuk enkapsulasi diisolasi dari mikroalga *Cyclotella striata*. Hasil kromatogram MPLC pemurnian ekstrak fukosantin dari mikroalga menunjukkan bahwa senyawa yang diduga sebagai fukosantin terdapat pada fraksi 8 dan fraksi 9 dengan panjang gelombang maksimum 448 nm.

Hasil analisis efisiensi enkapsulasi nano kitosan–pektin–fukosantin menunjukkan nilai efisiensi enkapsulasi sebesar 75,19%. Enkapsulasi fukosantin dalam nano kitosan–pektin meningkatkan waktu paruh oksidasi 133 jam lebih lama dibandingkan dengan fukosantin yang tidak dienkapsulasi.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian, nano kitosan–pektin dapat dijadikan sebagai matriks konjugasi enkapsulasi senyawa-senyawa antioksidan. Pada hasil penelitian ini

ada beberapa kelemahan dari penggunaan pektin dalam sintesis nano kitosan, dimana dibutuhkan kehati-hatian dalam proses pengeringan menggunakan *freeze dryer*. Proses pengeringan dapat menyebabkan terjadinya aglomerasi dari pektin sehingga menyebabkan perubahan ukuran partikel. Disarankan untuk mengeringkan nano kitosan dengan metode *spray drying*.

Pada proses enkapsulasi didapatkan hasil stabilitas fukosantin dari proses *dropwise* dari nano kitosan–pektin ke dalam larutan fukosantin, dimana tidak semua fukosantin terenkapsul dalam nano kitosan–pektin sehingga menyebabkan kestabilan penyimpanannya relatif singkat. Disarankan untuk mengenkapsulasi fukosantin menggunakan teknik nano *softgel*.

Dari kedua kelemahan tersebut, perlu dilakukan kajian yang lebih lanjut untuk menghindari aglomerasi partikel selama proses sintesis nano kitosan berlangsung dan meningkatkan kestabilan fukosantin dalam matriks konjugasi tersebut. Kajian lebih lanjut juga dapat dilakukan untuk pengembangan dalam upaya meningkatkan stabilitas senyawa-senyawa antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelgawad, A. M., and Hudson, S. M. 2019. Chitosan Nanoparticles: Polyphosphates Cross-Linking and Protein Delivery Properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, **136**, 133–142.
- Abdel-Hafez, S. M., Hathout, R. M., and Sammour, O.A. 2018. Tracking the Transdermal Penetration Pathways of Optimized Curcumin-Loaded Chitosan Nanoparticles via Confocal Laser Scanning Microscopy. *Int. J. Biol. Macromol.*, **108**, 753–764.
- Abdou, E. S., Elkholy, S. S., Elsabee, M. Z., and Mohamed, E. 2008. Improved Antimicrobial Activity of Polypropylene and Cotton Nonwoven Fabrics by Surface Treatment and Modification with Chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.*, **108**, 2290–2296.
- Abo Elsoud, M. M., and El Kady, E. M. 2019. Current Trends in Fungal Biosynthesis of Chitin and Chitosan. *Bull. Natl. Res. Cent.*, **43**(59).
- Ahyat, N. M., Mohamad, F., Ahmad, A., and Azmi, A. A. 2017. Chitin and Chitosan Extraction from *Portunus pelagicus*. *Malays. J. Anal. Sci.*, **21**, 770–777.
- Aisah, S., Nahrowi, R., Setiawan, W.A., Setiawan, F., Mulyono, M., Juliasih, N. L. G. R., Hendri, John, Yuwono, S. D., and Setiawan, A. 2024. Antibacterial Activity of Nano Chitosan Derived from Mangrove Fungus Endophyte, *Fusarium sp.* 20CB07. *AACL Bioflux*, **17**, 449–463.
- Antonino, R. S. C. M. D. Q., Fook, B. R. P. L., Lima, V. A. D. O., Rached, R. Í. D. F., Lima, E. P.N., Lima, R. J. D. S., Covas, C. A. P., and Fook, M. V. L. 2017. Preparation and Characterization of Chitosan Obtained from Shells of Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Mar. Drugs*, **15**(5), 141.
- Arulmoorthy, M. P., Anbarasi, G., Srinivasan, M., and Vishnupriya, B. 2022. Biosynthesis and Characterization of Chitosan Based Hydrogel: A Potential *in vitro* Wound Healing Agent. *Mater. Today Proc.*, **48**(2), 263–275.

- Ashenafi, E. L., Nyman, M. C., Shelley, J. T., and Mattson, N. S. 2023. Spectral Properties and Stability of Selected Carotenoid and Chlorophyll Compounds in Different Solvent Systems. *Food Chem. Adv.*, **2**, 100178.
- Assadpour, E., Rostamabadi, H., and Jafari, S. M. 2020. Introduction to Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients. *Academic press*, **4**, 1–50.
- Azaman, S. N. A., Yusoff, F. M., and Rahim, N. M. A. 2023. Growth and Morphological Features of Locally Isolated Microalgae *Cyclotella* and *Pavlova*. *Malaysian J. Microsc.*, **19**, 73–84.
- Azizian, S., Hadjizadeh, A., and Niknejad, H. 2018. Chitosan-Gelatin Porous Scaffold Incorporated with Chitosan Nanoparticles for Growth Factor Delivery in Tissue Engineering. *Carbohydr. Polym.*, **202**, 315–322.
- Bangun, H., Tandiono, S., and Arianto, A. 2018. Preparation and Evaluation of Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles Suspension as an Antibacterial Agent. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **8**, 147–156.
- Bombaldi de Souza, F. C., Bombaldi de Souza, R. F., Drouin, B., Mantovani, D., and Moraes, Â.M. 2019. Comparative Study on Complexes Formed by Chitosan and Different Polyanions: Potential of Chitosan-Pectin Biomaterials as Scaffolds in Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, **132**, 178–189.
- Borja-Urzola, A. del C., García-Gómez, R. S., Flores, R., and Durán-Domínguez-de-Bazúa, M. del C. 2020. Chitosan from Shrimp Residues with a Saturated Solution of Calcium Chloride in Metanol and Water. *Carbohydr. Res.*, **497**, 108116.
- Boudouaia, N., Bengharez, Z., and Jellali, S. 2019. Preparation and Characterization of Chitosan Extracted from Shrimp Shells Waste and Chitosan Film: Application for Eriochrome black T Removal from Aqueous Solutions. *Appl. Water Sci.*, **9**, 91.
- Chandel, P., Mahajan, D., Thakur, K., Kumar, R., Kumar, S., Brar, B., Sharma, D., and Sharma, A.K. 2023. A Review on Plankton as a Bioindicator: A Promising Tool for Monitoring Water Quality. *World Water Policy*, **10**(1), 213–232.
- Chen, P. H., Kuo, T. Y., Kuo, J. Y., Tseng, Y. P., Wang, D. M., Lai, J. Y., and Hsieh, H.J. 2010. Novel Chitosan-Pectin Composite Membranes with Enhanced Strength, Hydrophilicity and Controllable Disintegration. *Carbohydr. Polym.*, **82**, 1236–1242.

- Chun, H., Kim, C. H., and Cho, Y. H. 2014. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 Using External Ionic Gelation Method. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, **34**, 692–699.
- Chun, S. C., and Chandrasekaran, M. 2019. Chitosan and Chitosan Nanoparticles Induced Expression of Pathogenesis-Related Proteins Genes Enhances Biotic Stress Tolerance in Tomato. *Int. J. Biol. Macromol.*, **125**, 948–954.
- Corazzari, I., Nisticò, R., Turci, F., Faga, M. G., Franzoso, F., Tabasso, S., and Magnacca, G. 2015. Advanced Physico-Chemical Characterization of Chitosan by Means of TGA Coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal Degradation and Water Adsorption Capacity. *Polym. Degrad. Stab.*, **112**, 1–9.
- Cordenonsi, L. M., Faccendini, A., Catanzaro, M., Bonferoni, M. C., Rossi, S., Malavasi, L., Platcheck Raffin, R., Scherman Schapoval, E. E., Lanni, C., Sandri, G., and Ferrari, F. 2019. The Role of Chitosan as Coating Material for Nanostructured Lipid Carriers for Skin Delivery of Fucoxanthin. *Int. J. Pharm.*, **567**, 118487.
- Corporation, S., 1996. Particle Size Analyzers. *Met. Powder Rep.*, **51**, 42.
- Cosby, L. E., Lee, K. H., Knobloch, T. J., Weghorst, C. M., and Winter, J. O. 2020. Comparative Encapsulation Efficiency of Lutein in Micelles Synthesized via Batch and High Throughput Methods. *Int. J. Nanomedicine*, 8217–8230.
- Crognale, S., Russo, C., Petruccioli, M., and D’annibale, A. 2022. Chitosan Production by Fungi: Current State of Knowledge, Future Opportunities and Constraints. *Fermentation*, **8**(2), 76.
- Cupo, A., Landi, S., Morra, S., Nuzzo, G., Gallo, C., Manzo, E., Fontana, A., and D’ippolito, G. 2021. Autotrophic vs. Heterotrophic Cultivation of the Marine Diatom *Cyclotella Cryptica* for Epa Production. *Mar. Drugs*, **19**(7), 355.
- da S. Pereira, A., Souza, C. P. L., Moraes, L., Fontes-Sant’Ana, G. C., and Amaral P. F. F. 2021. Polymers as Encapsulating Agents and Delivery Vehicles of Enzymes. *Polymers*, **13**(23), 4061.
- Dai, J., and Kim, J.C. 2013. Chemical Stability and Skin Permeation of Fucoxanthin-Loaded Microemulsions. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **23**, 597–601.
- Debnath, S., Suresh Kumar, R., and Niranjana Babu, M. 2011. Ionotropic Gelation-A Novel Method to Prepare Chitosan Nanoparticles. *Res. J. Pharm. Technol.*, **4**, 492–495.

- Demarest, S.J., and Frasca, V. 2015. Differential Scanning Calorimetry in the Biopharmaceutical Sciences. *Biophys. Charact. Proteins Dev. Biopharm.*, 287–306.
- Din, N. A. S., Alayudin, M., Sajda, A., Sofian-Seng, N. S., Rahman, H. A., Razali, M. N. S., Lim, S. J., and Mustapha, W. W. A. 2022. Brown Algae as Functional Food Source of Fucoxanthin: A Review. *Foods*, **11**, 2235.
- Darwesh, O. M., Sultan, Y. Y., Seif, M. M., and Marrez, D. A. 2018. Bio-Evaluation of Crustacean and Fungal Nano-Chitosan for Applying as Food Ingredient. *Toxicol. Rep.*, **5**, 348-356.
- Eivazzadeh-Keihan, R., Noruzi, E. B., Mehrban, S. F., Aliabadi, H. A. M., Karimi, M., Mohammadi, A., Maleki, A., Mahdavi, M., Larijani, B., and Shalan, A.E. 2022. Review: The Latest Advances in Biomedical Applications of Chitosan Hydrogel as a Powerful Natural Structure with Eye-Catching Biological Properties. *J. Mater. Sci.*, **57**, 3855–3891.
- Enck, K., Tamburrini, R., Deborah, C., Gazia, C., Jost, A., Khalil, F., and Opara, E. C. 2021. Effect of Alginate Matrix Engineered to Mimic the Pancreatic Microenvironment on Encapsulated Islet Function. *Biotechnol. Bioeng.*, **118**(3), 1177–1185.
- Faisal, M., Elhussieny, A., Ali, K. A., Samy, I., and Everitt, N. M. 2018. Extraction of Degradable Bio Polymer Materials from Shrimp Shell Wastes by Two Different Methods. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, **464**, 012004.
- Fekete, S., Fogwill, M., and Lauber, M. A. 2022. Pressure-Enhanced Liquid Chromatography, A Proof of Concept: Tuning Selectivity with Pressure Changes and Gradients. *Anal. Chem.*, **94**(22), 7877–7884.
- Gammone, M.A., and D’Orazio, N., 2015. Anti-Obesity Activity of the Marine Carotenoid Fucoxanthin. *Mar. Drugs*, **13**, 2196–2214.
- Garg, U., Chauhan, S., Nagaich, U., and Jain, N. 2019. Current Advances in Chitosan Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting. *Adv. Pharm. Bull.*, **9**, 195–204.
- Gatamaneni, B. L., Orsat, V., and Lefsrud, M. 2018. Factors Affecting Growth of Various Microalgal Species. *Environ. Eng. Sci.*, **35**(10), 1037–1048.
- Ghorbani, M., Roshangar, L., and Soleimani Rad, J. 2020. Development of Reinforced Chitosan/Pectin Scaffold by Using the Cellulose Nanocrystals as Nanofillers: An Injectable Hydrogel for Tissue Engineering. *Eur. Polym. J.*, **130**, 109697.

- Ghormade, V., Pathan, E. K., and Deshpande, M. V. 2017. Can Fungi Compete with Marine Sources for Chitosan Production? *Int. J. Biol. Macromol.*, **104**, 1415–1421.
- Gill, P., Moghadam, T. T., and Ranjbar, B. 2010. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *J. Biomol. Tech.*, **21**, 167–193.
- Giossi, C., Cartaxana, P., and Cruz, S. 2020. Photoprotective Role of Neoxanthin in Plants and Algae. *Molecules*, **25**(20), 4617.
- Gundermann, K., Wagner, V., Mittag, M., and Büchel, C. 2019. Fucoxanthin-Chlorophyll Protein Complexes of the Centric Diatom *Cyclotella meneghiniana* Differ in Lhcx1 and Lhcx6_1 Content. *Plant Physiol.*, **179**, 1779–1795.
- Guo, B., Liu, B., Yang, B., Sun, P., Lu, X., Liu, J., and Chen, F. 2016. Screening of Diatom Strains and Characterization of *Cyclotella cryptica* as a Potential Fucoxanthin Producer. *Mar. Drugs*, **14**(7), 125.
- Hendri, J., dan Laila, A. 2013. Kitin kitosan. *Lembaga Penelitian Universitas Lampung*, 112 pp.
- Hoang, N. H., Thanh, T. Le, Sangpueak, R., Treekoon, J., Saengchan, C., Thepbandit, W., Papathoti, N. K., Kamkaew, A., and Buensanteai, N. 2022. Chitosan Nanoparticles-Based Ionic Gelation Method: A Promising Candidate for Plant Disease Management. *Polymers*, **14**(4), 662.
- Hosney, A., Ullah, S., and Barčauskaitė, K. 2022. A Review of the Chemical Extraction of Chitosan from Shrimp Wastes and Prediction of Factors Affecting Chitosan Yield by Using an Artificial Neural Network. *Mar. Drugs*, **20**(11), 675.
- Hu, X., Tian, Z., Li, X., Wang, S., Pei, H., Sun, H., and Zhang, Z. 2020. Green, Simple, and Effective Process for the Comprehensive Utilization of Shrimp Shell Waste. *ACS Omega*, **5**, 19227–19235.
- Huq, T., Khan, A., Brown, D., Dhayagude, N., He, Z., and Ni, Y. 2022. Sources, Production and Commercial Applications of Fungal Chitosan: A Review. *J. Bioresour. Bioprod.*, **7**, 85–98.
- Jabbari, N., Eftekhari, Z., Roodbari, N. H., and Parivar, K. 2020. Evaluation of Encapsulated Eugenol by Chitosan Nanoparticles on the Aggressive Model of Rheumatoid Arthritis. *Int. Immunopharmacol.*, **85**, 106554.
- Jamshidzadeh, F., Mohebbali, A., and Abdouss, M. 2020. Three-Ply Biocompatible pH-Responsive Nanocarriers Based on HNT Sandwiched by

- Chitosan/Pectin Layers for Controlled Release of Phenytoin Sodium. *Int. J. Biol. Macromol.*, **150**, 336–343.
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., and Srawan, G. Y., 2010. Microencapsulation Techniques, Factors Influencing Encapsulation Efficiency. *J. Microencapsul.*, **27**, 187–197.
- Kang, B. R., Park, J. S., Ryu, G. R., Jung, W. J., Choi, J. S., and Shin, H. M., 2022. Effect of Chitosan Coating for Efficient Encapsulation and Improved Stability under Loading Preparation and Storage Conditions of Bacillus Lipopeptides. *Nanomaterials*, **12**(23), 4189.
- Kannan, D. M. 2018. Scanning Electron Microscopy: Principle, Components and Applications. in a Textbook on Fundamentals and Applications of Nanotechnology. *Daya Publishing House*, 81–92.
- Kannan, D. M. 2018. Transmission Electron Microscope – Principle, Components and Applications, in a Textbook on Fundamentals and Applications of Nanotechnology. *Daya Publishing House*, 93–102.
- Karim, N., Shishir, M. R. I., and Chen, W. 2020. Surface Decoration of Neohesperidin-Loaded Nanoliposome Using Chitosan and Pectin for Improving Stability and Controlled Release. *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 2903–2914.
- Karim, N., Shishir, M. R. I., Li, Y., Zineb, O. Y., Mo, J., Tangpong, J., and Chen, W. 2022. Pelargonidin-3-O-Glucoside Encapsulated Pectin-Chitosan-Nanoliposomes Recovers Palmitic Acid-Induced Hepatocytes Injury. *Antioxidants*, **11**(4), 623.
- Karpiński, T. M., and Adamczak, A. 2019. Fucoxanthin—an Antibacterial Carotenoid. *Antioxidants*, **8**(8), 239.
- Kasongo, K. J., Tubadi, D. J., Bampole, L. D., Kaniki, T. A., Kanda, N. J. M., and Lukumu, M. E. 2020. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from *Termitomyces titanicus*. *SN Appl. Sci.*, **2**, 406.
- Khaw, Y.S., Yusoff, F. M., Tan, H. T., Noor Mazli, N. A. I., Nazarudin, M. F., Shaharuddin, N. A., Omar, A. R., and Takahashi, K. 2022. Fucoxanthin Production of Microalgae under Different Culture Factors: A Systematic Review. *Mar. Drugs*, **20**(10), 529.
- Kim, S. M., Jung, Y. J., Kwon, O. N., Cha, K. H., Um, B. H., Chung, D., and Pan, C. H. 2012. A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from The Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **166**, 1843–1855.

- Koo, S. Y., Hwang, K. T., Hwang, S., Choi, K. Y., Park, Y. J., Choi, J.-H., Truong, T. Q., and Kim, S. M. 2023. Nanoencapsulation Enhances the Bioavailability of Fucoxanthin in Microalga *Phaeodactylum tricornutum* extract. *Food Chem.*, **403**, 134348.
- Koo, S. Y., Mok, I. K., Pan, C. H., and Kim, S.M. 2016. Preparation of Fucoxanthin-Loaded Nanoparticles Composed of Casein and Chitosan with Improved Fucoxanthin Bioavailability. *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 9428–9435.
- Kou, S. G., Peters, L. M., and Mucalo, M. R. 2021. Chitosan: A Review of Sources and Preparation Methods. *Int. J. Biol. Macromol.*, **169**, 85–94.
- Kowalonek, J. 2017. Studies of Chitosan/Pectin Complexes Exposed to UV Radiation. *Int. J. Biol. Macromol.*, **103**, 515–524.
- Kumar, S. P., Birundha, K., Kaveri, K., and Devi, K. T. R. 2015. Antioxidant Studies of Chitosan Nanoparticles Containing Naringenin and Their Cytotoxicity Effects in Lung Cancer Cells. *Int. J. Biol. Macromol.*, **78**, 87–95.
- Kunjachan, S., and Jose, S. 2010. Understanding the Mechanism of Ionic Gelation for Synthesis of Chitosan Nanoparticles Using Qualitative Techniques. *Asian J. Pharm.*, **4**, 148–153.
- Kusumaningtyas, P., Nurbaiti, S., Suantika, G., Amran, M. B., and Nurachman, Z. 2017. Enhanced Oil Production by the Tropical Marine Diatom *Thalassiosira* Sp. Cultivated in Outdoor Photobioreactors. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **182**, 1605–1618.
- Leichner, C., Jelkmann, M., Prüfert, F., Laffleur, F., and Bernkop-Schnürch, A. 2019. Intestinal Enzyme Delivery: Chitosan/Tripolyphosphate Nanoparticles Providing a Targeted Release behind the Mucus Gel Barrier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **144**, 125–131.
- Lestari, A. D. N., Siswanta, D., Martien, R., and Mudasir, M. 2020. Synthesis, Characterization, and Stability Evaluation of β -Carotene Encapsulated in Starch-Chitosan / Tripolyphosphate Matrices. *Indones. J. Chem.*, **20**(4), 929–940.
- Li, C., Li, X., Li, S., Weng, Y., Wang, K., Zhang, T., Chen, S., Lu, X., Jiang, Y., Xu, J., and Liang, X. 2016. Development and Validation of a Method for Determination of Encapsulation Efficiency of CPT-11/DSPE-mPEG2000 Nanoparticles. *Med. Chem.*, **6**(5), 345–348.
- Li, M., Jin, Y., Wang, Y., Meng, L., Zhang, N., Sun, Y., Hao, J., Fu, Q., and Sun, Q. 2019. Preparation of Bifidobacterium Breve Encapsulated in Low

- Methoxyl Pectin Beads and Its Effects on Yogurt Quality. *J. Dairy Sci.*, **102**, 4832–4843.
- Liang, Z., Li, B., Liang, Y., Su, Y., and Ito, Y. 2015. Separation and Purification of Two Minor compounds from *Radix isatidis* by integrative MPLC and HSCCC with preparative HPLC. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, **38**(5), 647–653.
- Lin, R., Zheng, J., and Ma, J. X., 2011. Transmission Electron Microscopy, in PEM Fuel Cell Diagnostic Tools. *CRC Press*, 333–350.
- Liu, C., Tan, Y., Xu, Y., McCleiments, D. J., and Wang, D. 2019. Formation, Characterization, and Application of Chitosan/Pectin-Stabilized Multilayer Emulsions as Astaxanthin Delivery Systems. *Int. J. Biol. Macromol.*, **140**, 985–997.
- Liu, C., Wang, G., Sui, W., An, L., and Si, C. 2017. Preparation and Characterization of Chitosan by a Novel Deacetylation Approach Using Glycerol as Green Reaction Solvent. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **5**, 4690–4698.
- Liu, Z., Liu, Q., Zhang, D., Wei, S., Sun, Q., Xia, Q., Shi, W., Ji, H., and Liu, S. 2021. Comparison of the Proximate Composition and Nutritional Profile of Byproducts and Edible Parts of Five Species of Shrimp. *Foods*, **10**(11), 2603.
- Lorevice, M. V., Otoni, C. G., de Moura, M. R., and Mattoso, L. H. C. 2016. Chitosan Nanoparticles on the Improvement of Thermal, Barrier, and Mechanical Properties of High-and Low-Methyl Pectin Films. *Food Hydrocol.*, **52**, 732–740.
- Lourenço-Lopes, C., Silva, A., Garcia-Oliveira, P., Soria-Lopez, A., Echave, J., Grosso, C., and Prieto, M. A. 2023. Kinetic Extraction of Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida* Using Ethanol as a Solvent. *Mar. Drugs*, **21**(7), 414.
- Luppi, B., Bigucci, F., Abruzzo, A., Corace, G., Cerchiara, T., and Zecchi, V. 2010. Freeze-Dried Chitosan/Pectin Nasal Inserts for Antipsychotic Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **75**, 381–387.
- Maciel, V. B. V., Yoshida, C. M. P., Pereira, S. M. S. S., Goycoolea, F. M., and Franco, T. T. 2017. Electrostatic Self-Assembled Chitosan-Pectin Nano- and Microparticles for Insulin Delivery. *Molecules*, **22**(10), 1707.
- Majdi, H., Salehi, R., Pourhassan-Moghaddam, M., Mahmoodi, S., Poursalehi, Z., and Vasilescu, S. 2019. Antibody Conjugated Green Synthesized Chitosan-Gold Nanoparticles for Optical Biosensing. *Colloids Interface Sci., Commun.*, **33**, 100207.

- Marei, N. H., El-Samie, E. A., Salah, T., Saad, G. R., and Elwahy, A. H. M. 2016. Isolation and Characterization of Chitosan from Different Local Insects in Egypt. *Int. J. Biol. Macromol.*, **82**, 871–877.
- Medina, E., Cerezal, P., Morales, J., and Ruiz-Domínguez, M. C. 2019. Fucoxanthin from Marine Microalga *Isochrysis galbana*: Optimization of Extraction Methods with Organic Solvents. *DYNA*, **86**, 174–178.
- Merz, C. R., Arora, N., Welch, M., Lo, E., and Philippidis, G. P. 2023. Microalgal Cultivation Characteristics Using Commercially Available Air-Cushion Packaging Material as a Photobioreactor. *Sci. Rep.*, **13**, 3792.
- Muley, A. B., Chaudhari, S. A., Mulchandani, K. H., and Singhal, R. S., 2018. Extraction and Characterization of Chitosan from Prawn Shell Waste and Its Conjugation with Cutinase for Enhanced Thermo-Stability. *Int. J. Biol. Macromol.*, **111**, 1047–1058.
- Muller-Feuga, A. 2013. Microalgae for Aquaculture: The Current Global Situation and Future Trends. *Handb. Microalgal Cult. Appl. Phycol. Biotechnol.*, 615–627.
- Nahrowi, R., Solehati, S., Widyastuti, W., Juliasih, N. L. G. R., Pandiangan, K. D., Setiawan, A., and Hendri, J. 2024. New Encapsulation of Fucoxanthin Isolated from *Cyclotella striata* by Nano Chitosan–Pectin using Ionic Gelation Method. *Sci. Technol. Indones.*, **9**(3), 517–528.
- Najjar, Y. S., and Abu-Shamleh, A. 2020. Harvesting of Microalgae by Centrifugation for Biodiesel Production: A Review. *Algal Res.*, **51**, 102046.
- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., and Ragadhita, R. 2019. How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. *Indones. J. Sci. Technol.*, **4**(1), 97–118.
- Negi, A., and Kesari, K. K. 2022. Chitosan Nanoparticle Encapsulation of Antibacterial Essential Oils. *Micromachines*, **13**(8), 1265.
- Oliyai, N., Moosavi-Nasab, M., Tamaddon, A. M., and Fazaeli, M. 2020. Encapsulation of Fucoxanthin in Binary Matrices of Porous Starch and Halloysite. *Food Hydrocoll.*, **100**, 105458.
- Pajot, A., Huynh, G. H., Picot, L., Marchal, L., and Nicolau, E. 2022. Fucoxanthin from Algae to Human, an Extraordinary Bioresource: Insights and Advances in up and Downstream Processes. *Mar. Drugs*, **20**(4), 222.
- Pan, C., Qian, J., Fan, J., Guo, H., Gou, L., Yang, H., and Liang, C. 2019. Preparation Nanoparticle by Ionic Cross-Linked Emulsified Chitosan and

Its Antibacterial Activity. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, **568**, 362–370.

- Panalytical, M., 2017. A Basic Guide to Particle Characterization. *White Pap.*, 24 pp.
- Pantić, M., Horvat, G., Knez, Ž., and Novak, Z. 2020. Preparation and Characterization of Chitosan-Coated Pectin Aerogels: Curcumin Case Study. *Molecules*, **25**(5), 1187.
- Pașcalău, V., Bogdan, C., Pall, E., Matroș, L., Pandrea, S. L., Suci, M., Borodi, G., Iuga, C. A., Știufiuc, R., Topală, T., Pavel, C., Popa, C., and Moldovan, M. L. 2020. Development of BSA Gel/Pectin/Chitosan Polyelectrolyte Complex Microcapsules for Berberine Delivery and Evaluation of Their Inhibitory Effect on *Cutibacterium acnes*. *React. Funct. Polym.*, **147**, 104457.
- Passos, M. L. C., and Saraiva, M. L. M. F. S. 2019. Detection in UV-Visible Spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, **135**, 896–904.
- Passos, M., and Saraiva, M. 2019. Detection in UV-Visible Spectrophotometry: Detectors, Detection Systems, and Detection Strategies. *Measurement*, **135**, 896–904.
- PerkinElmer, 2013. Differential Scanning Calorimetry (DSC) (Frequently asked questions). *PerkinElmer*, 1–8.
- Pratiwi, R. A., and Nandiyanto, A. B. D. 2021. How to Read and Interpret UV-Vis Spectrophotometric Results in Determining the Structure of Chemical Compounds. *Indones. J. Educ. Res. Technol.*, **2**, 1–20.
- Primdahl, K. G., Hansen, F. A., Solum, E. J., Nolsøe, J. M. J., and Aursnes, M. 2022. Introduction to Preparative Chromatography: Description of a Setup with Continuous Detection. *J. Chem. Educ.*, **99**, 2372–2377.
- Priyadarshi, R., and Rhim, J. W. 2020. Chitosan-Based Biodegradable Functional Films for Food Packaging Applications. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **62**, 102246.
- Quan, J., Kim, S. M., Pan, C. H., and Chung, D. 2013. Characterization of Fucoxanthin-Loaded Microspheres Composed of Cetyl Palmitate-Based Solid Lipid Core and Fish Gelatin-Gum Arabic Coacervate Shell. *Food Res. Int.*, **50**, 31–37.
- Quiñones, J. P., Peniche, H., and Peniche, C. 2018. Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery. *Polymers*, **10**(3), 235.

- Rahman, N. A., Katayama, T., Wahid, M. E. A., Kasan, N. A., Khatoon, H., Yamada, Y., and Takahashi, K. 2020. Taxon- and Growth Phase-Specific Antioxidant Production by *Chlorophyte*, *Bacillariophyte*, and *Haptophyte* Strains Isolated from Tropical Waters. *Frontiers in Bioeng. and Biotech.*, **8**, 581628.
- Raj, S. 2012. A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses. *Sci. Rep.*, **1**(12), 550.
- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., and Cesàro, A. 2013). Chitosan Nanoparticles: Preparation, Size Evolution and stability. *Int. J. Pharm.*, **455**(1–2), 219–228.
- Ravi, H., and Baskaran, V. 2015. Biodegradable Chitosan-Glycolipid Hybrid Nanogels: A Novel Approach to Encapsulate Fucoxanthin for Improved Stability and Bioavailability. *Food Hydrocoll.*, **43**, 717–725.
- Ravi, H., and Baskaran, V. 2017. Chitosan-Glycolipid Nanocarriers Improve the Bioavailability of Fucoxanthin via Up-Regulation of PPAR γ and SRB1 and Antioxidant Activity in Rat Model. *J. Funct. Foods*, **28**, 215–226.
- Ravi, H., Arunkumar, R., and Baskaran, V. 2015. Chitosan-Glycolipid Nanogels Loaded with Anti-Obese Marine Carotenoid Fucoxanthin: Acute and Sub-Acute Toxicity Evaluation in Rodent Model. *J. Biomater. Appl.*, **30**, 420–434.
- Roberts, W. R., Downey, K. M., Ruck, E. C., Traller, J. C., and Alverson, A. J. 2020. Improved Reference Genome for *Cyclotella cryptica* CCMP332, a Model for Cell Wall Morphogenesis, Salinity Adaptation, and Lipid Production in Diatoms (*Bacillariophyta*). *G3 Genes, Genomes, Genet.*, **10**, 2965–2974.
- Safitri, E., Omaira, Z., Nazaruddin, N., Mustafa, I., Saleha, S., Idroes, R., Ginting, B., Iqhrammullah, M., Alva, S., and Paristiowati, M. 2022. Fabrication of an Immobilized Polyelectrolyte Complex (PEC) Membrane from Pectin-Chitosan and Chromoionophore ETH 5294 for pH-Based Fish Freshness Monitoring. *Coatings*, **12**(10), 88.
- Said Al Hoqani, H. A., AL-Shaqsi, N., Hossain, M. A., and Al Sibani, M. A. 2020. Isolation and Optimization of the Method for Industrial Production of Chitin and Chitosan from Omani Shrimp Shell. *Carbohydr. Res.*, **492**, 108001.
- Salama, A. H., Elmotasem, H., and Salama, A. A. A. 2020. Nanotechnology Based Blended Chitosan-Pectin Hybrid for Safe and Efficient Consolidative Antiemetic and Neuro-Protective Effect of Meclizine Hydrochloride in Chemotherapy Induced Emesis. *Int. J. Pharm.*, **584**, 119411.

- Santana, S. P., and Salazar, N. F. 2020. Ionotropic Gelation Method in the Synthesis of Nanoparticles/Microparticles for Biomedical Purposes. *Polym. Int.*, **69**, 443–447.
- Santos, V. P., Marques, N. S. S., Maia, P. C. S. V., de Lima, M. A. B., Franco, L. de O., and de Campos-Takaki, G. M. 2020. Seafood Waste as Attractive Source of Chitin and Chitosan Production and Their Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1–17.
- Sarma, S., Agarwal, S., Bhuyan, P., Hazarika, J., and Ganguly, M. 2022. Resveratrol-Loaded Chitosan-Pectin Core-Shell Nanoparticles as Novel Drug Delivery Vehicle for Sustained Release and Improved Antioxidant Activities. *R. Soc. Open Sci.*, **9**, 210784.
- Sathasivam, R., and Ki, J. S. 2018. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. *Mar. Drugs*, **16**(10), 26.
- Shekunov, B. Y., Chattopadhyay, P., Tong, H. H. Y., and Chow, A. H. L. 2007. Particle Size Analysis in Pharmaceuticals: Principles, Methods and Applications. *Pharm. Res.*, **24**, 203–227.
- SiewLing, H., PooiYi, C., KwanKit, W., and ChingLee, W. 2010. Stability Studies of Fucoxanthin from *Sargassum binderi*. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, **4**, 4580–4584.
- Singh, K., Krishna Paidi, M., Kulshrestha, A., Bharmoria, P., Kumar Mandal, S., and Kumar, A. 2022. Deep Eutectic Solvents Based Biorefining of Value-Added Chemicals from the Diatom *Thalassiosira andamanica* at Room Temperature. *Sep. Purif. Technol.*, **298**, 121636.
- Sorasitthiyanukarn, F. N., Muangnoi, C., Rojsitthisak, Pranee, Rojsitthisak, and Pornchai, 2024. Stability and Biological Activity Enhancement of Fucoxanthin through Encapsulation in Alginate/Chitosan Nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.*, **263**, 130264.
- Spada, J. C., Noreña, C. P. Z., Marczak, L. D. F., and Tessaro, I. C. 2012. Study on the Stability of β -Carotene Microencapsulated with Pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) Starch. *Carbohydr. Polym.*, **89**, 1166–1173.
- Sreekumar, S., Goycoolea, F. M., Moerschbacher, B. M., and Rivera-Rodriguez, G. R. 2018. Parameters Influencing the Size of Chitosan-TPP Nano-and Microparticles. *Sci. Rep.*, **8**(1), 4695.
- Sriamornsak, P., and Dass, C. R., 2022. Chitosan Nanoparticles in Atherosclerosis—Development to Preclinical Testing. *Pharmaceutics*, **14**(5), 935.

- Stachowiak, B., and Szulc, P. 2021. Astaxanthin for The Food Industry. *Molecules*, **26**(9), 2666.
- Sulistiyan, Y., Sabdono, A., Afiati, N., and Haeruddin, 2021. Fucoxanthin Identification and Purification of Brown Algae Commonly Found in Lombok Island, Indonesia. *Biodiversitas*, **22**, 1527–1534.
- Sun, X., Xu, Y., Zhao, L., Yan, H., Wang, S., and Wang, D. 2018. The Stability and Bioaccessibility of Fucoxanthin in Spray-Dried Microcapsules Based on Various Biopolymers. *RSC Adv.*, **8**, 35139–35149.
- Suryawanshi, N., Jujjavarapu, S. E., and Ayothiraman, S. 2019. Marine Shell Industrial Wastes—an Abundant Source of Chitin and Its Derivatives: Constituents, Pretreatment, Fermentation, and Pleiotropic Applications-a Revisit. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, **16**, 3877–3898.
- Tian, L., Singh, A., and Singh, A. V. 2020. Synthesis and Characterization of Pectin-Chitosan Conjugate for Biomedical Application. *Int. J. Biol. Macromol.*, **153**, 533–538.
- Tolesa, L. D., Gupta, B. S., and Lee, M. J. 2019. Chitin and Chitosan Production from Shrimp Shells Using Ammonium-Based Ionic Liquids. *Int. J. Biol. Macromol.*, **130**, 818–826.
- Tom, J. 2021. UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>. Diakses pada 20 Mei 2024.
- Torres-Rêgo, M., Gláucia-Silva, F., Rocha Soares, K. S., de Souza, L. B. F. C., Damasceno, I. Z., Santos-Silva, E. dos, Lacerda, A. F., Chaves, G. M., and Silva-Júnior, A. A. da, Fernandes-Pedrosa, M. de F. 2019. Biodegradable Cross-Linked Chitosan Nanoparticles Improve Anti-Candida and Anti-Biofilm Activity of TistH, a Peptide Identified in the Venom Gland of the *Tityus stigmurus* Scorpion. *Mater. Sci. Eng. C*, **103**, 109830.
- Ul-Hamid, A. 2018. A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy. A Beginners' Guid. to Scanning Electron Microsc. *Springer Cham*, C –C1.
- Vasylchenko, O. A., and Abramova, M. V. 2015. Comparative Analysis of Sources for Chitosan Obtaining. *Probl. Environ. Biotechnol.*, **1**.
- Vinodhini, P. A., Sangeetha, K., Thandapani, G., Sudha, P. N., Jayachandran, V., and Sukumaran, A. 2017. FTIR, XRD and DSC Studies of Nanochitosan, Cellulose Acetate and Polyethylene Glycol Blend Ultrafiltration Membranes. *Int. J. Biol. Macromol.*, **104**, 1721–1729.

- Vo, D. T., Saravana, P. S., Woo, H. C., and Chun, B. S., 2018. Fucoxanthin-Rich Oil Encapsulation Using Biodegradable Polyethylene Glycol and Particles from Gas-Saturated Solutions Technique. *J. CO₂ Util.*, **26**, 359–369.
- Wijayadi, L. J., and Rusli, T. R. 2019. Characterized and Synthesis of Chitosan Nanoparticle as Nanocarrier System Technology. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, **508**, 012143.
- Ye, Y., Sun, J., Wang, L., Zhu, J., Cui, W., Hou, H., Zhang, J., Zhou, C., and Yan, X. 2021. Isolation and Purification of Fucoxanthin from Brown Seaweed *Sargassum horneri* Using Open ODS Column Chromatography and Ethanol Precipitation. *Molecules*, **26**(13), 3777.
- Yip, W. H., Joe, L. S., Mustapha, W. A. W., Maskat, M. Y., and Said, M. 2014. Characterisation and Stability of Pigments Extracted from *Sargassum binderi* Obtained from Semporna, Sabah. *Sains Malays.*, **43**(9), 1345–1354.
- Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., Kong, R., Han, C., and Liu, Z. 2015. Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient. Evidence-based Complement. *Altern. Med.*, **2015**, 723515.
- Zhao, D., Yu, D., Kim, M., Gu, M. Y., Kim, S. M., Pan, C. H., Kim, G. H., and Chung, D. 2019. Effects of Temperature, Light, and pH on the Stability of Fucoxanthin in an Oil-in-Water Emulsion. *Food Chem.*, **291**, 87–93.
- Zhao, X., Gao, L., and Zhao, X. 2022. Rapid Purification of Fucoxanthin from *Phaeodactylum tricornutum*. *Molecules*, **27**(10), 3189.
- Zhao, X., Zhang, X., Tie, S., Hou, S., Wang, H., Song, Y., Rai, R., and Tan, M. 2020. Facile Synthesis of Nano-Nanocarriers from Chitosan and Pectin with Improved Stability and Biocompatibility for Anthocyanins Delivery: An *in vitro* and *in vivo* study. *Food Hydrocoll.*, **109**, 106114.