

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Radikal Bebas**

Oksigen merupakan atom yang sangat reaktif yang mampu menjadi bagian dari molekul yang berpotensi merusak, yang biasa disebut dengan radikal bebas. Radikal bebas akan menyerang sel sel sehat tubuh, sehingga menyebabkan kehilangan struktur dan fungsi mereka. Radikal bebas akan mengalami tubrukan yang kaya akan energi dengan molekul lain sehingga akan merusak ikatan dalam molekul (Corwin 2007). Ketika hal tersebut terjadi didalam tubuh, maka tubuh akan mengalami kerusakan pada sel, asam nukleat, protein dan lemak dikarenakan serangan terhadap molekul biologi akan menyebabkan kerusakan jaringan sistem imun.

Radikal bebas adalah molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron sehingga menjadi stabil. Reaksi ini akan terus-menerus berlangsung dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit degeneratif seperti DM, hipertensi dan stroke (Aprila *et al.* 2015). Oleh karena itu kita harus memproteksi diri dari radikal bebas dengan antioksidan (Maulana *et al.* 2016). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga dapat membantu melindungi tubuh.

#### **B. Antioksidan**

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron yang memiliki kandungan senyawa polifenol yang tinggi, atau senyawa yang dapat menghambat atau mencegah proses oksidasi molekul lain dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul lain yang reaktif. Oksidasi sendiri merupakan reaksi kimia yang dapat menghasilkan radikal bebas, sehingga memicu reaksi berantai yang dapat merusak sel (Tristantini *et al.* 2016).

Berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dibagi menjadi 2 yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis (Tristantini *et al.* 2016). Antioksidan alami diperoleh dari tumbuhan ataupun hewan terdapat secara alami dalam tubuh sebagai mekanisme pertahanan tubuh normal maupun berasal dari asupan luar tubuh. Umumnya memiliki gugus hidroksi dalam struktur molekulnya. Antioksidan yang berasal dari tumbuhan adalah senyawa fenolik berupa golongan flavonoid, tokoferol dan kumarin. Kumpulan flavonoid sebagai antioksidan memiliki kemampuan untuk merubah atau mereduksi radikal bebas dan sebagai antiradikal bebas (Zuhra *et al.* 2008). Sedangkan antioksidan sintetis merupakan senyawa yang disintesis secara kimia. Antioksidan sintetis yang diizinkan dan umum digunakan pada campuran makanan adalah BHA (*Buthylated Hydroxy Anisole*), BHT (*Butylated Hydroxytoluene*), dan profil galat. Penggunaan antioksidan sintetis saat ini mulai dibatasi karena terbukti memiliki sifat karsinogenik dan beracun terhadap hewan percobaan (Zuhra 2008).

Senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dapat diperoleh dari golongan fenolat, flavonoid dan alkaloid yang merupakan suatu senyawa-senyawa polar. Kemampuan suatu senyawa untuk menghambat reaksi oksidasi dapat dinyatakan dalam persen penghambatan. Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga *Inhibition Concentration* (IC<sub>50</sub>) (Tristantini *et al.* 2016). *Inhibition Concentration* (IC<sub>50</sub>) merupakan konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan % penghambatan 50%. Perhitungan nilai konsentrasi efektif atau IC<sub>50</sub> menggunakan rumus berikut :

$$\% \text{ Antioksidan} = \frac{A_c - A}{A_c} \times 100\% \dots\dots\dots 1$$

Keterangan :

A<sub>c</sub> = Nilai absorbansi kontrol

A = Nilai absorbansi sampel

Apabila nilai IC<sub>50</sub> semakin kecil, maka efektifitas daya hambat dari zat aktif semakin besar. Tingkat aktivitas antioksidan dapat dilihat berdasarkan tabel 1 berikut ini (Badarinath 2010) :

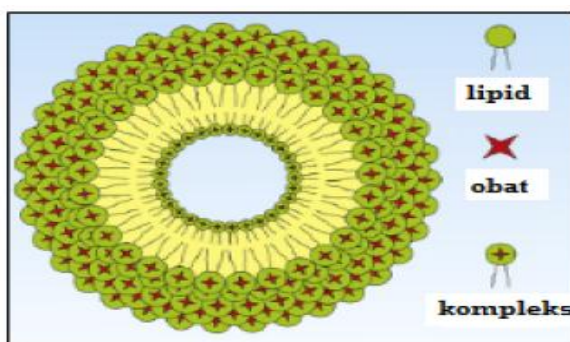
**Tabel 1. Kategori tingkat aktivitas antioksidan**

Nilai IC <sub>50</sub> (ppm)	Tingkat Aktivitas
151-200	Lemah
100-150	Sedang
50-100	Kuat
< 50	Sangat Kuat

### C. Sistem Penghantaran Obat

Sistem penghantaran obat terbaru atau disebut juga dengan *Novel Drug Delivery System* (NDDS) memiliki inovasi yang variatif dalam hal meningkatkan kelarutan bahkan bioavailabilitas obat agar efek terapeutik tercapai dengan maksimal. Penghantaran obat sendiri dipengaruhi oleh zat pembawa, rute pemberian dan target obat. Penghantaran obat telah berkembang menjadi strategi penghantaran obat yang diformulasikan meningkatkan efek terapi melalui pelepasan obat secara terkontrol. Sehingga terdapat berbagai macam percobaan untuk penghantaran obat yang digunakan untuk pelepasan obat dengan ukuran mikro maupun nano yang tidak mampu dilihat kasat mata yang meliputi nanopartikel, nanokapsul, mikrokapsul, liposom, fitosom, niosom dan etosom (Ravichandran 2009).

### D. Fitosom



**Gambar 1. Struktur fitosom (Ramadon 2016)**

Liposom merupakan suatu bentuk pengembangan dari nano teknologi dalam bidang farmasi yang diaplikasikan pada sistem penghantaran obat. Liposom dapat digunakan sebagai pembawa dari zat aktif dalam pengobatan (Ramadon *et al.* 2016). Dengan molekul obat yang hidrofilik akan terjerap pada bagian inti (*core*) yang merupakan ruang yang terbentuk di antara membran fosfolipid.

Liposom dapat mengenkapsulasi baik senyawa hidrofilik maupun lipofilik. Senyawa senyawa hidrofilik akan terjerap pada bagian tengah dari liposom dan senyawa yang larut lemak akan beragregasi pada bagian lemak. Bagian hidrofilik mengarah ke air dan bagian lipofilik mengarah ke tengah vesikel sehingga membentuk membran lipid bilayer (Ajazuddin 2010).

Penelitian mengenai liposom telah banyak dilakukan untuk senyawa bahan alam. Karena sifatnya yang unik maka liposom dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas produk herbal dengan cara meningkatkan kelarutan, memperbaiki bioavailabilitas, mengubah profil farmakokinetika dan biodistribusi (Ajazuddin 2010). Liposom sebagai NDDS dapat memperbaiki aktivitas terapeutik dan keamanan obat, khususnya dengan menghantarkan obat pada sisi aksi dan mengatur kadar obat pada konsentrasi terapeutik dalam jangka waktu yang diperpanjang. Liposom banyak dikembangkan menjadi sediaan topikal karena sediaan liposom memiliki penetrasi yang baik di kulit (Maghraby *et al.* 2001).

Fitosom merupakan derivat liposom yang telah banyak diteliti dan dikembangkan menjadi sediaan farmasi entah dalam obat ataupun kosmetika. Dari gambar diatas dapat dijelaskan bahwa penyerapan senyawa obat pada fitosom terjadi pada bagian polar fosfolipid. Fitosom berupa formulasi obat yang mengandung senyawa aktif bahan alam (herbal) yang bersifat hidrofilik dengan membentuk kompleks senyawa aktif (*phytoconstituent*) di dalam fosfolipid. Pembuatan fitosom ditujukan untuk meningkatkan absorpsi obat sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas dan efikasi obat (Ajazuddin 2010). Apabila dibandingkan dengan formulasi herbal secara konvensional, keunggulan dari fitosom, antara lain dapat meningkatkan efikasi efek terapeutik karena adanya peningkatan absorpsi oleh fosfatidilkolin sehingga ekstrak yang bersifat polar dapat menembus membran lipid bilayer dengan lebih baik. Selain itu, pembentukan fitosom dapat menurunkan dosis obat yang dimasukkan ke dalam formulasi karena adanya peningkatan absorpsi dan bioavailabilitas obat, fitosom juga memiliki efisiensi penyerapan yang cukup baik dan kompleks yang terbentuk relatif stabil karena proses pembentukan kompleks berlangsung melalui reaksi kimia (Tripathy *et al.* 2013).

Fitosom dibuat melalui reaksi yang melibatkan fosfolipid, baik sintetis maupun yang berasal dari alam, dengan bahan alam dari ekstrak tanaman yang telah distandardisasi dengan rasio yang bervariasi, berkisar antara 0,5 hingga 2. Akan tetapi, biasanya rasio 1:1 merupakan pilihan yang paling banyak digunakan karena menghasilkan kompleks yang lebih stabil (Rasaie *et al.* 2014) Reaksi tersebut melibatkan pelarut-pelarut aprotik seperti aseton dan dioksan kemudian kompleks fitosom dapat diisolasi melalui proses pengendapan atau dengan melakukan liofilisasi menggunakan *spray drying* atau alat lainnya. Fitosom memiliki ukuran yang bervariasi, mulai dari 50 nm dan mencapai 500 µm. Ketika berinteraksi dengan air, fitosom akan membentuk suatu misel dan merupakan karakteristik yang serupa dengan liposom. Fitosom dapat terlarut dengan mudah di dalam pelarut aprotik, dapat larut di dalam lemak dan air serta tidak stabil di dalam alkohol.

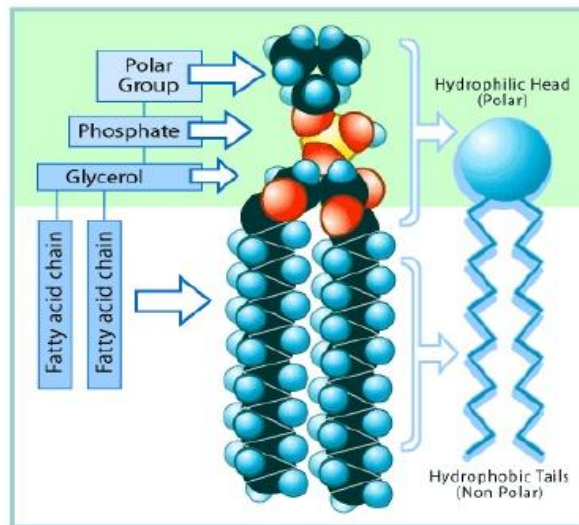
## **E. Komponen Fitosom**

Komponen utama dari fitosom terdiri dari fosfatidilkolin dan kolesterol dengan berbagai variasi konsentrasi. Fosfatidilkolin yang digunakan dapat berupa fosfatidilkolin kedelai, fosfatidilkolin terhidrogenase, fosfatidilkolin dari telur, dipalmitat fosfatidilkolin (Cristina *et al.* 2010).

### **1. Fosfolipid**

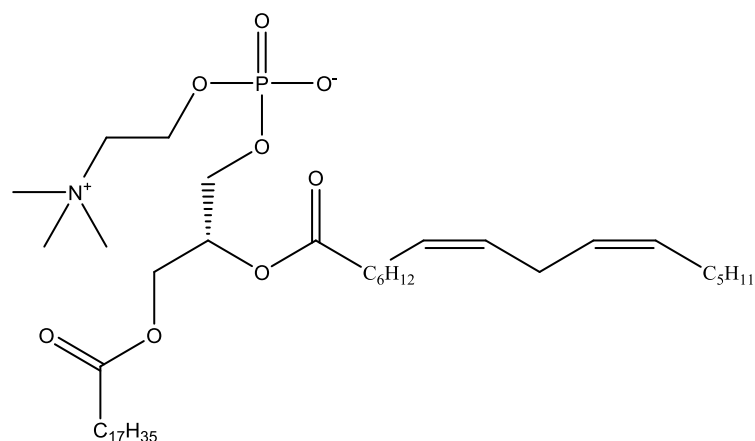
Fosfolipid merupakan bahan pembentuk vesikel dari sistem fitosom. Fosfolipid yang dapat digunakan untuk membuat fitosom cukup beragam, misalnya FosfatidilColin (PC), PC terhidrogenasi ataupun FosfatidilEtanolamin (PE) dengan rentang konsentrasi 0,5-10%. Fosfolipid dapat berasal dari telur, kacang kedelai, semi sintetis atau sintetis (Nandure *et al.* 2013).

Fosfolipid adalah komponen struktural utama membran biologis. Fosfolipid yang paling umum digunakan dalam sediaan liposom adalah fosfatidilkolin (PC). *Phosphatidylcholine* adalah molekul amphipatic yang mengandung yaitu kelompok kepala polar hidrofilik, fosfokolin, jembatan gliserol, sepasang rantai hidrokarbon asil hidrofobik (Maheswaran *et al.* 2013).



**Gambar 2. Struktur komponen fosfatidilkolin**

Fosfatidilkolin adalah senyawa bifungsional, bagian fosfatidil menjadi lipofilik dan bagian kolin bersifat hidrofilik. Fosfatidilkolin terdiri dari, kepala kolin dari molekul fosfatidilkolin mengikat senyawa ini sementara bagian fosfatidil terlarut lipid yang terdiri dari tubuh dan ekor yang kemudian menyelubungi bahan terikat *choline*. *Phytoconstituents* menghasilkan kompleks molekul lipid yang kompatibel dengan fosfolipid, yang juga disebut sebagai kompleks *phyto-phospholipid*. Molekul dilabuhkan melalui ikatan kimia ke kepala kolin polar dari fosfolipid, seperti yang dapat ditunjukkan dengan teknik spektroskopi spesifik.



**Gambar 3. Struktur fosfatidilkolin**

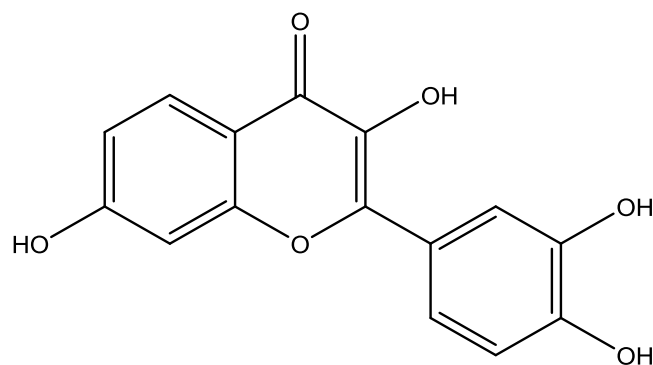
Struktur molekul fosfolipid mencakup kepala yang larut dalam air dan dua ekor yang dapat larut dalam lemak. Fosfatidilkolin memiliki kelarutan ganda,

fosfolipid bertindak sebagai pengemulsi yang efektif dengan menggabungkan aksi pengemulsi fosfolipid dengan senyawa aktif dan terbentuk liposom serta memberikan bioavailabilitas yang secara dramatis ditingkatkan untuk obat terlarut lipid yang dijelaskan oleh penyerapan yang lebih cepat dan lebih baik pada saluran usus.

Fosfolipid yang dapat digunakan untuk persiapan liposom antara lain Dilauryl phosphotidylcholine (DLPC), Dimyristoyl phosphotidyl choline (DMPC), Dipalmitoyl phosphotidyl choline (DPPC), Distearoyl phosphotidyl choline (DSPC), Dioleoyl phosphotidyl choline (DOPC), Dilauryl phosphotidyl ethanolamine (DLPE), Dimyphylylphylidamine (DSPE), Dioleoyl phosphotidyl ethanolamine (DOPE), Dilauryl phosphotidyl glycerol (DLPG), Distearoyl phosphotidyl serine (DSPS) (Maheswaran *et al.* 2013).

## 2. Fisetin

Fisetin memiliki rumus molekul  $C_{15}H_{10}O_6$ , massa molar 286, 2363 g/mol, dan titik lebur  $330^{\circ}C$  (Seguin *et al.* 2013). Kelarutan fisetin yaitu larut dalam alkohol, aseton, asam asetat, DMF, DMSO (dimetil sulfoksida), dan praktis tidak larut dalam air, eter, benzena, kloroform dan petroleum eter (Kashyap *et al.* 2018).



**Gambar 4. Struktur fisetin**

Fisetin dikenal dengan *Natural Brown* yaitu flavonoid tanaman bioaktif penting besar sebagai obat terapi yang berpotensi mencegah atau memediasi radikal bebas serta penyakit lainnya (Sengupta *et al.* 2005). Fisetin merupakan golongan flavonoid yang memiliki 4 gugus hidroksil yang banyak terkandung dalam buah dan sayuran. Fisetin-tetrahydroxyflavone (3,3',4',7) memiliki khasiat sebagai penangkal radikal bebas atau antioksidan (Sengupta *et al.* 2005), juga

bertindak sebagai inhibitor *kinase cyclin dependent* dan dapat menginduksi penangkapan siklus sel kanker (Chen *et al.* 2010). Fisetin sebagai penghambat potensial angiogenesis dan perkembangan tumor melalui sinyal penghambatan. Energi pengikat inhibitor ini ditemukan dalam kisaran  $-5,68$  hingga  $-4,98$  kkal / mol (Kashyap *et al.* 2018).

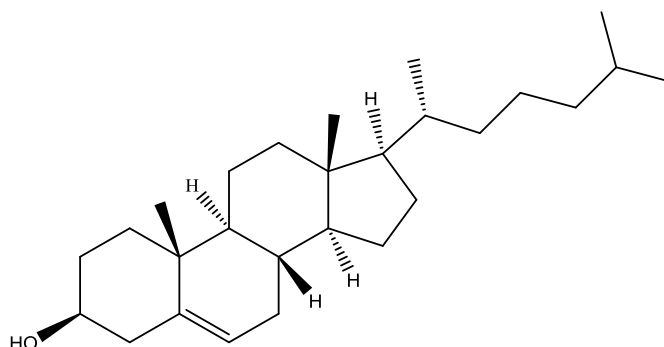
Fisetin sebagai antioksidan dengan mekanisme kerja secara efektif melindungi DNA dari kerusakan oksidatif akibat adanya OH, pada bagian 3', 4'-dihidroxy pada cincin B fisetin dianggap memiliki peran penting, karena dapat dioksidasi menjadi bentuk ortobenzoquinon yang stabil (Wang *et al.* 2016). Sifat antioksidan fisetin telah diperiksa dengan perhitungan berbasis voltametri dan kimia-kuantum (Markovic *et al.* 2009). Nilai konsentrasi aktivitas setara (TEAC) trolox dari fisetin telah dilaporkan  $2,80 \pm 0,06$  (Ishige *et al.* 2001). Fisetin ditemukan sebagai molekul planar yang memberikan efek konjugasi silang. Energi disosiasi ikatan hidroksil (OH) dan momen dipol menentukan bahwa fisetin memiliki kapasitas antioksidan yang tinggi. Telah dilaporkan bahwa fisetin sangat mengikat antara kepala kutub dan ekor hidrofobik dari fosfolipid di sekitar daerah antarmuka liposom fosfatidilkolin telur (Sengupta *et al.* 2004). Wilayah ini mudah tersedia untuk radikal bebas dan berfungsi sebagai tempat reaksi untuk aktivitas antioksidan dari molekul fisetin dan menghambat peroksidasi lipid. Kapasitas antioksidan yang tinggi dikonfirmasi oleh perhitungan semi *empirical* untuk fisetin, dengan efektivitas untuk mengekstraksi OH dari media sekitarnya diperkirakan akan menurun dalam urutan 3-OH > 3'-OH > 4'-OH > 7-OH (Sengupta 2004).

Fisetin termasuk obat golongan BCS kelas II karena memiliki kelarutan 0,002 mg/ml atau 10,45  $\mu\text{g/ml}$  (Mignet *et al.* 2012) dengan absorpsi dan bioavailabilitas yang rendah sekitar 10% (Dang *et al.* 2014). Senyawa fisetin dapat ditemui dalam berbagai makanan buah bahkan sayuran yang biasa kita konsumsi, misalnya dalam buah strawberry, anggur, kesemek, bawang dan mentimun pada konsentrasi 2-160  $\mu\text{m/g}$  (Regelle *et al.* 2012).



### 3. Kolesterol

Kolesterol memiliki rumus empiris  $C_{27}H_{46}OH$  dan berat molekul 386,67 gram/mol serta memiliki titik lebur  $147-150^{\circ}C$ . Kolesterol digunakan pada konsentrasi 0,3-5% b/b sebagai zat pengemulsi pada kosmetik dan formulasi topikal. Kolesterol mampu menyerap air pada sediaan salep dan memiliki aktivitas sebagai emolien. Senyawa ini dapat berwarna putih atau kekuningan, hampir tidak berbau, berbentuk mutiara, jarum, bubuk atau butiran. Kolesterol dapat berubah warna menjadi kuning pada paparan cahaya matahari atau udara yang berkepanjangan. Kolesterol larut dalam aseton, larut 1 : 4,5 dalam kloroform, larut dalam minyak nabati, dan praktis tidak larut dalam air.

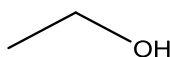


**Gambar 5. Struktur kolesterol**

Senyawa ini stabil dan harus disimpan dalam wadah tertutup, terlindung dari cahaya. Pengaruh kolesterol terhadap stabilitas fitosom adalah untuk pengepakan barisan molekul fosfolipid pada lipid lapis fitosom sehingga molekul protein tidak mudah berpenetrasi ke permukaan fitosom (Leekumjron 2004). Kolesterol merupakan molekul ampifilik, dimana gugus OH-nya akan mengarah pada fase air, dan rantai alifatiknya akan mengarah pada rantai hidrokarbon dari surfaktan.

### 4. Etanol

Etanol memiliki struktur kimia  $C_2H_6O$ , dengan massa relatif 46,07 gram/mol. Etanol digunakan untuk melarutkan banyak obat yang tidak larut dalam air dan terkait senyawa.



**Gambar 6. Struktur etanol**

Etanol dengan kadar yang tinggi memiliki kekurangan yaitu dapat menyebabkan kulit kering, iritasi atau bahkan bisa menyebabkan kerusakan pada kulit, sehingga penggunaan etanol untuk sediaan etosom hanya di batasi dengan konsentrasi 20-45% (Nandure *et al.* 2013). Pelarut yang dapat melarutkan zat aktif serta komponen lain yang larut terhadap etanol, dan yang penggunaannya harus sesuai dengan ketentuan atau *range*.

### **5. Kloroform**

Kloroform dikenal sebagai triklorometana, metana triklororida, trikloroform, metil triklorida, dan formil triklorida. Kloroform memiliki rumus molekul  $\text{CHCl}_3$  dan massa relatif 119,4 gram/mol. Kloroform jernih, tidak berwarna, cairan mudah menguap dengan bau khas eterik pada suhu ruang. Kloroform sedikit larut dalam air, mudah larut dalam disulfida dan dapat bercampur dengan alkohol, eter, benzen, karbon terraklorida dan minyak yang mudah menguap. Kloroform stabil di bawah suhu dan tekanan normal dalam wadah tertutup (Akron 2002).

## **F. Metode Pembuatan Nano Fitosom**

Metode pembuatan yang dipilih harus sesuai dengan penggunaan fitosom, metode pembuatan berpengaruh pada jumlah bilayer, ukuran, kapasitas distribusi dan efisiensi penjerapan pada fase air dan permeabilitas membran dari vesikel (Leekumjron 2004). Beberapa metode pembuatann nano fitosom antara lain :

### **1. Lipid Film Hydration (Hidrasi Lapis Tipis)**

Metode pembuatan fitosom dengan cara hidrasi lapis tipis dapat dibuat dengan cara yang sederhana dengan peralatan laboratorium yang biasa yaitu labu alas bulat melibatkan pengeringan atau pembentukan lapis tipis pada dasar labu alas bulat. Sejumlah zat obat dengan fosfatidilkolin yang dicampur dengan kolesterol kemudian dievaporator dengan *rotary evaporation* agar lipid terdeposit dari pelarut organik dalam bentuk lapis tipis pada permukaan dinding labu. Sejumlah larutan dapar ditambahkan dan lipid akan terhidrasi atau terjadi transisi lipid (Priyanka *et al.* 2016). Vesikel multilamellar yang dihasilkan dapat diproses

lebih lanjut melalui sonifikasi, ekstrusi atau penanganan lain untuk mengoptimalkan penjerapan obat (Verma 2010).

## **2. Metode Refluks**

Bahan satu persatu ditimbang sesuai dengan presentase yang ada, larutan fosfatidilkolin dan ekstrak dimasukkan kedalam labu alas bulat. Seluruh larutan tersebut di refluks selama 3 jam pada suhu 70°C. Setelah 3 jam, larutan tersebut didinginkan dan dituangkan kedalam petri *dish* dan dikeringkan menggunakan *hairdryer*. Petri *dish* dibiarkan terbuka semalaman untuk menguapkan residu etanol. Selanjutnya dilakukan hidrasi menggunakan aquabidestilata. Kemudian dilakukan pengecilan ukuran partikel dengan ultrasonikasi selama 30 menit (Maheswaran *et al.* 2013).

## **3. Metode Solvent Evaporator**

Metode ini dilakukan dengan cara sejumlah tertentu obat dan fosfolipid dapat diambil dalam labu dasar bulat dievaporasi pada *rotary evaporator* dengan pelarut khusus pada suhu 50 hingga 60°C selama 2 jam (Priyanka *et al.* 2016) hingga semua solven menguap dan menghasilkan lapisan tipis *dry film* pada dasar labu. Selanjutnya lapisan tipis *dry film* tersebut dibiarkan pada temperatur ruang selama semalam sebelum dihidrasi, untuk memastikan bahwa pelarut organik telah menguap seluruhnya. Campuran dipekatkan dengan 5 hingga 10 ml aquabidestilata pada *rotary* dengan 90 rpm suhu 45°C. Selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran partikel dengan ultrasonikasi selama 30 menit. Lamanya proses pembuatan dilakukan dengan menjaga suhu dan waktu yang tetap untuk mendapatkan maksimum efisiensi penjerapan (Khan *et al.* 2013).

## **4. Metode Anti-Solvent Precipitation**

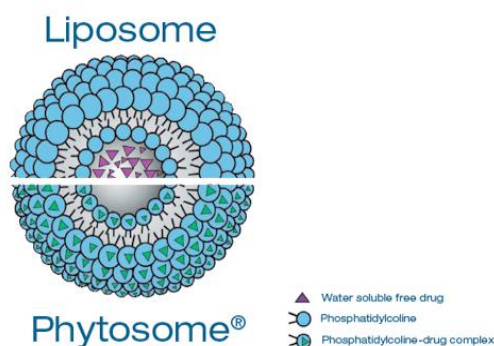
Metode ini digunakan untuk membuat nano fitosom, dengan cara sejumlah bahan aktif bersama fosfatidilkolin dimasukkan ke dalam labu alas bulat 100 ml dan direfluks dengan 20 ml pelarut organik (dieter ether, kloroform atau metanol, diklorometana) pada suhu tidak melebihi 60°C selama 2 jam (Khan *et al.* 2013). Heksana (20 ml) ditambahkan pelan-pelan dengan pengadukan terus menerus untuk mendapatkan endapan yang akan disaring dan dikumpulkan dan disimpan dalam desikator vakum dalam waktu semalam. Endapan kering digerus dalam mortir dan disaring dengan ayakan *mesh* 100. Serbuk halus dimasukkan ke dalam

botol kaca berwarna kuning dan disimpan pada suhu kamar (Maiti *et al.* 2007). Kompleksasi fitokonstituen dengan fosfolipid telah dilakukan dengan beberapa rasio molar yang berbeda mulai dari 0,5:1 sampai 3:1. Sebagian besar dari hasil penelitian didapatkan perbandingan molar dengan 1:1 dianggap perbandingan yang bagus untuk membentuk kompleksasi antara fosfolipid dan fitokonstituen (Khan *et al.* 2013).

## 5. Sonikasi

Penggunaan gelombang ultrasonik (sonikasi) dalam pembentukan materi berukuran nano sangatlah efektif. Suatu fase air ditambahkan ke dalam campuran surfaktan-kolesterol pada gelas *vial*. Campuran surfaktan-kolesterol disonifikasi selama beberapa waktu tertentu sehingga dihasilkan vesikel kecil, uniform dan unilamellar. Vesikel fitosom yang dihasilkan ini umumnya ukurannya sangat besar dibandingkan liposom, diameternya tidak lebih kecil daripada 100 nm (Arora 2007). Gelombang ultrasonik merupakan gelombang longitudinal yang memiliki frekuensi lebih dari 20 kHz. Penggunaan gelombang ultrasonik sangat efektif dalam pembentukan ukuran partikel menjadi bentuk nano. Gelombang ini juga sering dimanfaatkan dalam bidang lain antaranya yaitu dalam bidang instrumentasi, kesehatan dan sebagainya. Salah satu yang terpenting dari aplikasi sonikasi ini adalah pemanfaatannya dalam menimbulkan efek kavitasi akustik. Efek ini yang digunakan dalam pembuatan bahan berukuran nano dengan metode emulsifikasi (Nakahira 2007).

## G. Perbedaan Liposom dan Fitosom



Gambar 7. Perbedaan susunan liposom dengan fitosom

Fitosom dan liposom secara struktural keduanya sangat berbeda seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7. Tidak seperti fitosom, liposom dibentuk dengan mencampur yang zat larut dalam air dengan fosfatidilkolin. Tidak ada ikatan kimia terbentuk dan molekul fosfatidilkolin mengelilingi zat yang larut dalam air. Terdapat ratusan atau bahkan ribuan fosfatidilkolin molekul yang mengelilingi senyawa yang larut dalam air. Fitosom secara umum menggunakan rasio perbandingan antara fosfatidilkolin dengan komponen tanaman yaitu 1: 1 atau 2: 1 (Bombardelli *et al.* 2007). Fitosom adalah unit dari beberapa molekul dan ini menjadi perbedaan sehingga fitosom adalah jauh lebih baik diserap daripada liposom. Fitosom juga lebih unggul daripada liposom dalam produk perawatan kulit sementara liposom, banyak agregat molekul fosfolipid yang bisa menyertai molekul *phytoactive* lain tetapi tanpa ikatan khusus dengan mereka (Gupta *et al.* 2007). Sistem fitosom telah banyak diteliti dan terbukti bahwa mereka jauh lebih baik diserap dan secara substansial lebih besar kemanjuran klinis.

## H. Verifikasi Metode

Tujuan utama yang harus dicapai dari suatu kegiatan analisis kimia adalah dihasilkan data hasil uji yang valid. Data yang valid diperoleh dari metode yang valid sehingga perlu dilakukan validasi dan verifikasi metode analisis. Verifikasi metode analisis adalah tindakan pencegahan terjadinya kesalahan dalam kegiatan laboratorium mulai dari tahap pra analitik, analitik sampai dengan melakukan pencegahan ulang setiap tindakan dan untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Ravichandran 2010). Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam verifikasi metode sebagai berikut :

### 1. Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Kisaran adalah pernyataan batas rendah dan batas tinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan

dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Nilai koefisien relasi merupakan indikator kualitas dari parameter linieritas yang menggambarkan respon analitik (luas area) terhadap konsentrasi yang diukur.

Cara penentuan linieritas dinyatakan dalam garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit, sehingga diperoleh hubungan  $Y = a + bx$ . Hubungan linier yang ideal dicapai jika  $b=0$  dan  $r = +/- 1$ , sedangkan nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

## 2. Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantitation (LOQ)

LOQ merupakan batas analisis yang menunjukkan hubungan linear antara konsentrasi dan serapan yang dapat dikuantifikasi. LOD dan LOQ dapat dihitung dengan secara statistik melalui garis *regresi linier* dari kurva kalibrasi dengan rumus :

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_{y/x}}{b} \dots\dots\dots 2$$

$$\text{LOD} = \frac{3,3 S_{y/x}}{b} \dots\dots\dots 3$$

Dimana  $S_{y/x}$  adalah simpangan baku residual dari serapan dan  $B$  adalah slope persamaan regresi linear kurva kalibrasi

LOD dan LOQ menggunakan metode perhitungan berdasarkan simpangan baku respon dan kemiringan (*slope*) kurva baku. Simpangan baku respon dapat ditentukan berdasarkan simpangan blanko pada simpangan baku residual garis *regresi linier* atau intersep- $y$  pada garis regresi. Batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi serta memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko, sedangkan batas kuantifikasi merupakan parameter yang diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi cermat dan seksama (Harmita 2004).

## I. Karakterisasi Fitosom

### 1. PSA (Particle Size Analyzer)

Para peneliti mulai menggunakan *Laser Diffraction* (LAS) dalam pengembangan nanoteknologi. Metode ini dinilai lebih akurat untuk analisis bila dibandingkan dengan metode analisis gambar maupun metode ayakan (*sieve analyses*), terutama untuk sampel-sampel dalam orde nanometer maupun

submikron. Contoh alat yang menggunakan metode LAS adalah *Particle Size Analyzer* (PSA). Alat ini menggunakan prinsip *Dynamic Light Scattering* (DLS). Metode ini juga dikenal sebagai *Quasi-Elastic Light Scattering* (QELS). Alat ini berbasis *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS). Metode LAS bisa dibagi dalam dua metode :

- a. Metode basah : metode ini menggunakan media pendispersi untuk mendispersikan material uji.
- b. Metode kering : metode ini memanfaatkan udara atau aliran udara untuk melarutkan partikel dan membawanya ke *sensing zone*. Metode ini baik digunakan untuk ukuran yang kasar, dimana hubungan antarpartikel lemah dan kemungkinan untuk beraglomerasi kecil (Lalatendu *et al.* 2004).

Pengukuran partikel dengan menggunakan PSA biasanya menggunakan metode basah. Metode ini dinilai lebih akurat jika dibandingkan dengan metode kering ataupun pengukuran partikel dengan metode ayakan dan analisis gambar. Sampel-sampel dalam orde nanometer dan *submicron* yang biasanya memiliki kecenderungan aglomerasi yang tinggi lebih tepat menggunakan metode basah. Hal ini dikarenakan partikel didispersikan ke dalam media sehingga partikel tidak saling beraglomerasi (menggumpal). Metode basah ukuran partikel yang terukur adalah ukuran dari *single particle*. Metode basah juga memberikan hasil pengukuran dalam bentuk distribusi, sehingga hasil pengukuran dapat diasumsikan sudah menggambarkan keseluruhan kondisi sampel (Lalatendu *et al.* 2004).

## **2. Zeta potensial**

Potensial zeta adalah ukuran umum dari besarnya muatan elektrostatis partikel dalam dispersi, dan sangat sesuai dalam studi stabilitas suspensi nanopartikel. Potensial zeta merupakan ukuran permukaan muatan partikel yang tersebar dalam kaitannya dengan medium pendispersi. Partikel harus memiliki muatan atau zeta potensial yang tinggi dibanding dengan medium pendispersi untuk mencegah agregasi. Kekuatan tolak menolak yang dibawa oleh muatan ion serupa pada partikel permukaan akan mencegah tarik menarik yang ditentukan oleh adanya ikatan hidrogen dan ikatan *van der waals*. Zeta potensial yang

dikendalikan akan didapatkan kondisi yang ideal untuk terjadinya agregasi (Vaughn *et al.* 2007). Potensial zeta di atas nilai absolut dari 30 mV dianggap perlu untuk menjamin stabilitas koloid yang baik. Partikel bermuatan dalam dispersi cair dikelilingi oleh ion dalam lapisan ganda listrik. Lapisan ganda cair ini terdiri dari bagian dalam (*stern layer*) dengan ion berlawanan (dari permukaan partikel) yang terikat relatif kuat, dan wilayah luar dengan ion yang terikat kurang kuat. Potensial zeta adalah potensial listrik di bidang terluar (*slipping plane*), yaitu pada permukaan lapisan cair ganda stationer.

Zeta potensial dari sebuah nanopartikel biasanya digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Nanopartikel memiliki muatan permukaan yang menarik lapisan tipis ion muatan yang berlawanan dengan permukaan nanopartikel. Lapisan ganda ion bersama dengan nanopartikel berdifusi seluruh solusi (Sinko 2012).

Sampel ideal analisis potensial zeta memiliki ukuran yang relatif seragam. Konsentrasi yang tinggi secara efektif menghamburkan cahaya 650 nm. Memiliki konsentrasi garam yang rendah (konduktivitas < 1 Ms/cm), dan tergantung pada *dispersant* kutub partikulat (misalnya air kemurnian tinggi) (Ronson 2012).

### 3. Efisiensi Penjerapan

Efisiensi penjerapan untuk mengetahui % obat yang terjerap dalam pembawa fitosom. Obat yang tidak terjerap dapat dihilangkan atau dipisahkan dengan berbagai teknik, di antaranya :

**3.1 Dialisis.** Dispersi cairan fitosom didialisis dalam tabung dialisis dengan menggunakan buffer fosfat atau normal saline atau larutan glukosa.

**3.2 Gel Filtration.** Obat yang tidak terjerap dihilangkan dari fitosom menggunakan filtrasi gel melalui kolom sephadex-G-50 dan dielusi dengan buffer garam fosfat atau normal salin.

**3.3 Sentrifugasi.** Fitosom disentrifugasi dan supernatan dipisahkan. Pellet yang diperoleh dicuci kemudian disuspensikan kembali untuk mendapatkan fitosom yang bebas dari obat terjerap. Efisiensi penjerapan vesikel ditentukan dengan memisahkan obat bebas dari vesikel penjerap obat dengan menggunakan



teknik ultrasentrifugasi. Fitosom disentrifugasi selama 50 menit pada 3000 rpm dan suhu 4° C dengan tujuan untuk memisahkan obat yang tidak terjerap. Jumlah obat bebas (FD<sub>0</sub>) ditentukan pada supernatan. Supernatan hasil sentrifugasi ditetapkan kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Efisiensi penjerapan (%EE) dihitung dengan rumus :

$$\%EE = \frac{TD - FD}{TD} \times 100\% \dots\dots\dots 4$$

Dimana TD adalah total jumlah fisetin yang terdapat dalam formula dan FD adalah jumlah senyawa fisetin yang terdeteksi pada supernatan (tidak terjerap).

#### 4. Uji DPPH

DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*) merupakan metode radikal bebas yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan suatu senyawa dari bahan alam atau tanaman. Metode ini dipilih karena sederhana, mudah, akurat, cepat, dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk evaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa bahan alam sehingga digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron (Molyneux 2004). Metode ini tidak memerlukan banyak reagen dan mudah dalam preparasi sampelnya (Badarinath *et al.* 2010), juga tidak memerlukan substrat karena radikal bebas sudah tersedia secara langsung (Nur 2013). DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*) merupakan senyawa radikal bebas yang bersifat stabil dan beraktivitas dengan cara mendelokalisasikan elektron bebas pada suatu molekul, sehingga molekul tersebut tidak reaktif sebagaimana radikal bebas yang lain. Proses delokalisasi ini ditunjukkan dengan adanya warna ungu pekat yang dapat dikarakterisasi pada pita absorbansi dalam pelarut etanol p.a (pro analis) maupun metanol p.a (pro analis) pada panjang gelombang 517 nm (Molyneux 2004).

Prinsip kerja dari pengukuran ini adalah adanya radikal bebas stabil yaitu DPPH yang dicampurkan dengan senyawa antioksidan yang memiliki kemampuan mendonorkan hidrogen, sehingga radikal bebas dapat diredam (Cholisoh 2008). Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah IC<sub>50</sub> (*Inhibition Concentration 50%*). IC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi larutan sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50%

(Molyneux 2004). Nilai  $IC_{50}$  didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50%. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka aktivitas peredaman radikal bebas semakin tinggi.

Senyawa antioksidan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning. Saat elektron berpasangan oleh adanya antioksidan, maka absorbansinya menurun secara stoikiometri sesuai jumlah elektron yang berpasangan. Perubahan absorbansi akibat reaksi tersebut digunakan untuk menguji kemampuan suatu senyawa sebagai penangkal radikal bebas (antioksidan) (Dehpour *et al* 2009).

## J. Landasan Teori

Fisetin merupakan senyawa golongan flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan. Namun kelarutan dan laju disolusi senyawa ini di dalam air senyawa fisetin ini kurang baik. Fisetin praktis tidak larut dalam air, tetapi mudah larut dalam etanol, metanol, aseton dan DMF (dimetil formamida), DMSO (dimetil sulfoksida). Fisetin bersifat tidak stabil terhadap pemanasan. Fisetin termasuk dalam BCS kelas II dimana fisetin memiliki kelarutan yang rendah dan permeabilitasnya yang tinggi, dengan data kelarutan sekitar 0,002 mg/ml serta data bioavailabilitas 10-44% (Odeh *et al.* 2011).

Fitosom merupakan sistem penghantaran obat yang dapat menghantarkan obat ke bagian dalam kulit atau hingga sirkulasi sistemik melalui stratum korneum. Sifat deformabilitas yang tinggi diperoleh karena komponen penyusunnya adalah fosfolipid dan kolesterol. Fosfolipid merupakan bahan pembentuk vesikel dari sistem fitosom. Fosfolipid yang dapat digunakan untuk membuat fitosom cukup beragam, misalnya *FosfatidilColin* (PC), PC terhidrogenasi ataupun *FosfatidilEtanolamin* (PE) dengan rentang konsentrasi 0,5-10% (Nandure *et al.* 2013). Kolesterol yang bisa digunakan sebagai komponen dalam fitosom yaitu dengan konsentrasi sekitar 0,3-5% b/b, sebagai zat penstabil, zat pengemulsi pada kosmetik dan formula sediaan topikal.

Penelitian Rasaie (2014) dihasilkan sistem fitosom dengan zat aktif yang memiliki afinitas tinggi terhadap fosfatidilkolin. Titik leleh kolesterol juga mengalami penurunan hal ini dikaitkan dengan pembentukan struktur bilayer pada fitosom yang mengubah pembentukan struktur menjadi teratur. Sehingga penambahan kolesterol perlu sebagai penstabil dari sistem fitosom sendiri. Namun juga ada yang mengungkapkan jika sediaan menjadi tidak stabil jika tanpa komponen kolesteol dalam jangka waktu lebih dari 21 hari dari pembuatan.

Metode hidrasi lapis tipis yaitu dilakukan dalam labu alas bulat pelarut diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C kecepatan 65 rpm sampai terbentuk lapisan tipis pada dinding labu. Lapisan tipis pada dinding labu dihidrasi dengan 20 ml larutan dapar fosfat pH 7,4 lalu nyalakan *rotary evaporator* tanpa vakum selama 15 menit suhu 40°C kecepatan 60 rpm sampai terbentuk vesikel yang homogen. Kemudian dilakukan sonikasi dengan sonikator tipe *probe* selama 15 menit untuk menghomogenkan serta memperkecil ukuran vesikel.

*Sonikasi* merupakan vibrasi suara dengan frekuensi melebihi batas pendengaran manusia yaitu di atas 20 KHz (Tipler 1998). Ultrasonikasi merupakan salah satu teknik paling efektif dalam pencampuran, proses reaksi, dan pemecahan bahan dengan bantuan energi tinggi (Pirrung 2007). Batas atas rentang ultrasonik mencapai 5 MHz untuk gas dan 500 MHz untuk cairan dan padatan (Mason *et al.* 2002).

Pengukuran partikel dilakukan dengan *Particle Size Analyzer* (PSA). Persyaratan parameter ini adalah partikel mempunyai ukuran 50-1000 nm dan stabil pada periode waktu tertentu (Muller *et al.* 2000). Potensial zeta diukur dengan menggunakan *zetasizer*. Potensial zeta mempunyai aplikasi praktis dalam stabilitas sistem yang mengandung partikel-partikel terdispersi, karena potensial ini mengatur derajat tolak-menolak antara partikel-partikel terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan (Sinko 2012). Besarnya potensi zeta dapat memprediksi stabilitas koloid. Nanopartikel dengan nilai Potensial Zeta lebih besar dari +25 mV atau kurang dari -25 mV biasanya memiliki derajat stabilitas

tinggi. Dispersi dengan nilai potensial zeta rendah akan menghasilkan agregat karena atraksi *Van Der Waals* antar partikel (Ronson 2012).

Ukuran partikel yang kurang dari 100 nanometer, sifat partikel tersebut akan berubah. Berkurangnya ukuran partikel akan meningkatkan kelarutan obat sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas obat dalam tubuh. Berkurangnya ukuran partikel dapat mempengaruhi efisiensi distribusi obat dalam tubuh karena dengan berkurangnya ukuran partikel maka akan meningkatkan luas permukaan partikel. Berkurangnya ukuran partikel juga meningkatkan disolusi dan kejenuhan larutan yang berhubungan dengan peningkatan kinerja obat secara *in vivo*. Sifat-sifat nanopartikel secara umum tidak sama dengan senyawa obat tersebut dalam ukuran partikel yang lebih besar (Rachmawati 2007).

#### **K. Hipotesis**

1. Nanofitosom fisetin dapat dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.
2. Variasi konsentrasi fosfatidilkolin semakin besar memiliki pengaruh terhadap ukuran partikel dan efisiensi penjerapan partikel nanofitosom fisetin.
3. Profil karakterisasi fisetin seperti ukuran partikel dan efisiensi penjerapan dapat diketahui setelah dibuat sediaan nanofitosom.
4. Nanofitosom fisetin tidak stabil selama proses penyimpanan