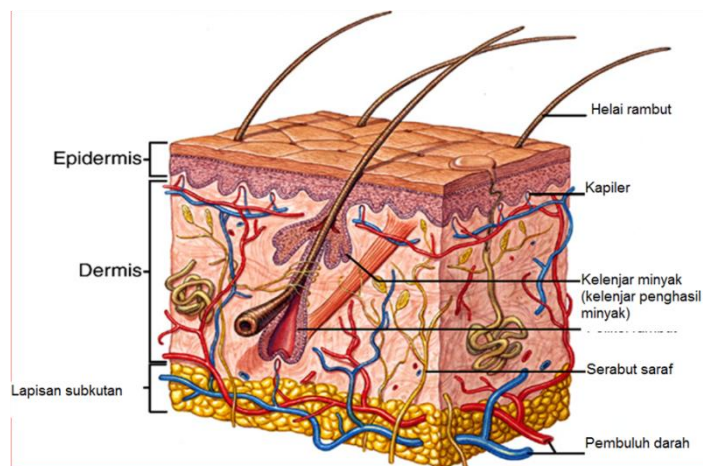


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Anatomi dan Fisiologi Kulit

Kulit adalah organ yang terletak paling luar. Luas kulit orang dewasa 1,5 sampai 2,0 m² dengan berat kira-kira 16% berat badan (4,8 kg pada pria dan 3,2 kg pada wanita). Kulit mempunyai lima fungsi utama yaitu fungsi proteksi, fungsi absorpsi, fungsi ekskresi, fungsi persepsi, dan fungsi termoregulasi (Pearce & Evelyn 2009).



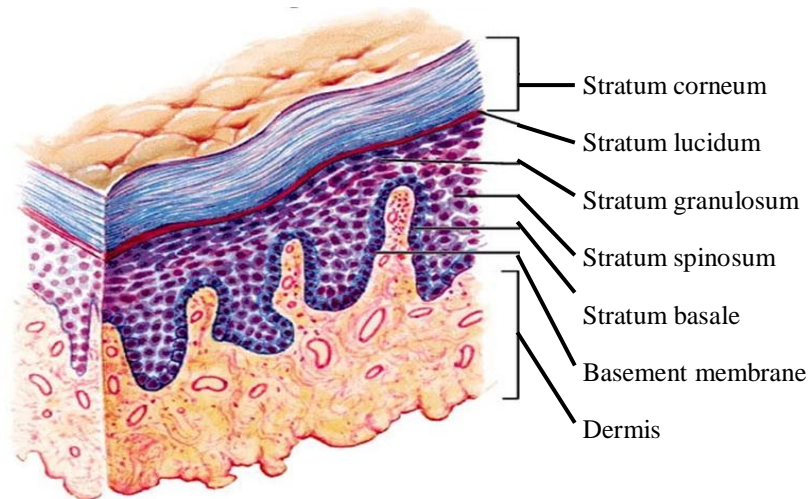
Gambar 1. Anatomi Kulit (Trommer & Neubert 2006)

Kulit terdiri atas tiga lapisan dengan berbagai jenis sel dan fungsinya (Trommer & Neubert 2006). Ketiga lapisan tersebut yaitu:

1. Epidermis

Merupakan lapisan terluar kulit yang tidak terdapat pembuluh darah. Sel-sel epidermis terus menerus mengalami mitosis, dan digantikan dengan sel baru sekurang-kurangnya setiap 30 hari sehari. Bagian epidermis ini tersusun atas jaringan epitel skuamosa bertingkat, yaitu stratum korneum, stratum lusidum, stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum basale. Stratum korneum merupakan lapisan epidermis teratas yang tersusun atas sel mati, tidak memiliki inti sel, mengandung zat keratin (protein), lapisan kulit yang utama digunakan untuk difusi substrat yang larut air dan lemak. Stratum korneum yang utuh menyediakan *barrier* permanen yang disebut dengan struktur “*brick and mortar*”

atau “bata dan semen” yang dianalogikan seperti dinding. Stratum korneum tersusun atas lapisan *lipid bilayer* dari seramid, asam lemak, kolesterol, dan ester kolesterol.



Gambar 2. Lapisan Epidermis Kulit (Trommer & Neubert 2006)

2. Dermis

Dermis adalah suatu lapisan yang tersusun atas jaringan fibrosa dan jaringan ikat elastis yang terletak di bawah epidermis dan berfungsi sebagai penopang struktur dan nutrisi. Permukaan lapisan dermis tersusun atas papila-papila kecil, sedangkan pada lapisan yang lebih dalam terdapat jaringan subkutan dan fasia. Lapisan dermis ini mengandung pembuluh darah, pembuluh limfa, dan saraf yang disuplai oleh saraf sensorik dan motorik.

3. Subkutan (Hipodermis)

Lapisan ini terdiri atas jaringan penghubung, pembuluh darah, dan sel-sel penyimpan lemak yang memisahkan lemak dengan otot, tulang, dan struktur lain. lapisan ini berfungsi sebagai cadangan makanan dan bantalan untuk melindungi tubuh dari benturan-benturan fisik serta berperan dalam pengaturan suhu tubuh.

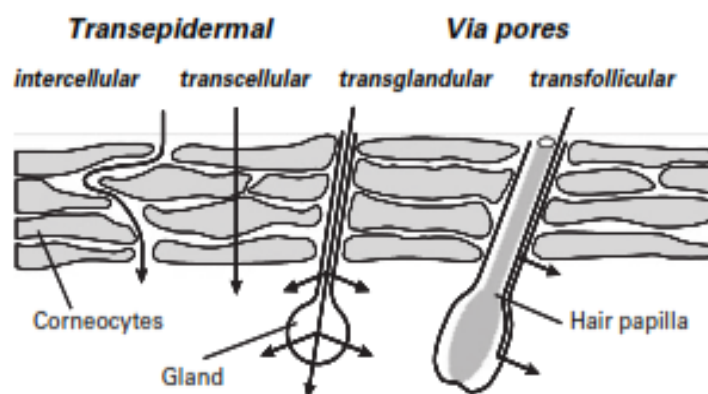
B. Sistem Penghantaran Obat Melalui Kulit

1. Mekanisme Absorpsi Obat Melalui Kulit

Mekanisme absorpsi obat melalui kulit terdiri dari dua jalur utama yaitu: (Trommer & Neubert 2006).

1.1 *Transepidermal.* Merupakan jalur difusi melalui stratum korneum yang terjadi melalui dua mekanisme, yaitu transeelular yang berarti jalur difusi melalui protein didalam sel kemudian melewati daerah yang kaya akan lipid dan jalur paraseluler yang berarti jalur melalui ruang atau celah antar sel. Penetrasi transepidermal berlangsung melalui dua tahap. Pertama, pelepasan obat dari pembawa dan stratum korneum, yang bergantung pada koefisien partisi obat dalam pembawa dan stratum korneum. Kedua, difusi melalui epidermis dan dermis yang dibantu oleh aliran pembuluh darah dalam lapisan dermis. Jalur transepidermal merupakan jalur utama dibandingkan dengan jalur melalui kelenjar-kelenjar lainnya karena luas permukaan epidermal 100 sampai 1000 kali lebih luas dari permukaan kelenjar-kelenjar tersebut.

1.2 *Transappendageal.* Merupakan jalur masuknya obat melalui folikel rambut (transfolikular) dan kelenjar keringat (transglandular) yang disebabkan karena adanya pori-pori diantara kedua kelenjar tersebut, sehingga memungkinkan obat berpenetrasi masuk ke dalam folikel atau kelenjar keringat tersebut.



Gambar 3. Jalur Absorpsi Obat Melalui Kulit (Trommer & Neubert 2006)

2. Strategi Penghantaran Obat Melalui Kulit

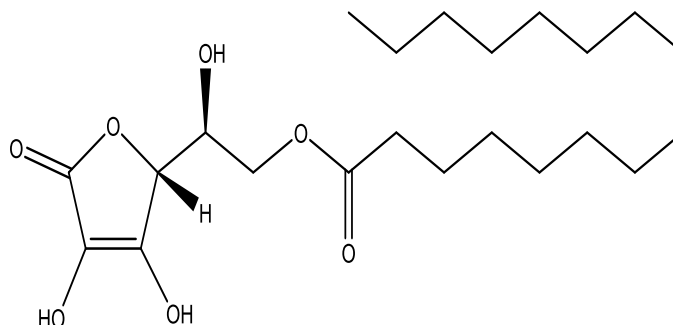
Penggunaan obat di kulit dapat ditujukan untuk mengobati kelainan dermatologis dan vena sistemik

2.1 Topical Delivery. Sasaran dalam penghantaran topikal adalah merancang penampung obat lebih dalam atau hingga kesistem sirkulasi, ditujukan untuk penggunaan secara langsung di kulit pada kerusakan lapisan kutan atau pada manifestasi kutan akibat penyakit, dengan maksud untuk membatasi efek farmakologi atau efek lain pada permukaan kulit atau pada kulit. Absorpsi sistemik mungkin tidak dapat dihindari. Bentuk sediaan farmasi yang dipilih adalah dari jenis formulasi semi solid, dimana jenisnya mendominasi sistem untuk penghantaran topikal, dengan basis yang terdiri dari *wax*, parafin *liquidum*, cera, dan vaselin.

2.2 Regional Delivery. Penggunaan obat di kulit untuk mengobati penyakit atau mengurangi gejala di jaringan yang lebih dalam dibawah tempat pemberian. Sasarannya adalah efek atau aksi farmakologis pada otot, vaskular, persambungan dan lainnya yang terletak di bawah atau disekitar tempat pemberian. Aksinya lebih sedikit dibawah pemberian sistemik. Aktivitas ini memerlukan absorpsi perkutan dan penumpukan. Bentuk sediaan farmasi yang dipilih adalah formulasi dalam bentuk *ointment*, krim, *adhesive patch*, plester, dengan basis yang mengandung minyak lemak, dan lanolin (Mario *et al.* 2007).

2.3 Systemic Delivery. Penghantaran transdermal merupakan pemberian obat di kulit untuk pengobatan penyakit sistemik melalui penetrasi obat ke sirkulasi sistemik dan ditujukan pada pencapaian kadar aktif sistemik dari obat. Meskipun bentuk sediaan *ointment* diterapkan pada jenis terapi ini, *adhesive system* dengan ukuran yang tepat dapat digunakan. Absorpsi perkutan dengan akumulasi obat sistemik yang cukup besar sangat mutlak diperlukan. Bentuk sediaan farmasi yang dipilih adalah yang diformulasi dalam bentuk mikroemulsi, nanopartikel, dan menggunakan reservoir (*patch*).

C. Askorbil Palmitat



Gambar 4. Struktur Askorbil Palmitat (Rowe *et al.* 2009).

Askorbil palmitat dengan rumus kimia $C_{22}H_{38}O_7$ memiliki berat molekul 414,54 $g \cdot mol^{-1}$ dan askorbil palmitat praktis tidak berbau serta merupakan serbuk berwarna putih hingga kekuningan. Kelarutan dari askorbil palmitat yaitu larut dalam metanol 1 dalam 5,5 bagian, dalam etanol 96% 1 dalam 9,3 bagian, dalam aseton 1 dalam 15 bagian, dalam eter 1 dalam 132 bagian, dalam kloroform 1 dalam 3300 bagian, dan sangat sukar larut dalam air (Rowe *et al.* 2009).

Askorbil palmitat merupakan turunan dari asam askorbat yang larut dalam lemak dan memiliki kepolaran yang rendah dengan sifat lebih lipofilik, lebih stabil serta lebih mudah diserap kulit karena memiliki bagian yang hidrofil di satu sisi dan lipofil di sisi lain (Baumann *et al.* 2009). Askorbil palmitat stabil dalam kondisi yang kering, tetapi secara bertahap teroksidasi dan berubah warna ketika terkena cahaya dan kelembaban tinggi. Dalam wadah yang belum dibuka, disimpan di tempat yang dingin, ia memiliki umur simpan setidaknya 12 bulan. Selama pemrosesan, suhu yang lebih besar dari $65^{\circ}C$ harus dihindari. Bahan curah harus disimpan dalam wadah kedap udara pada suhu $8-15^{\circ}C$, dan terlindung dari cahaya (Rowe *et al.* 2009).

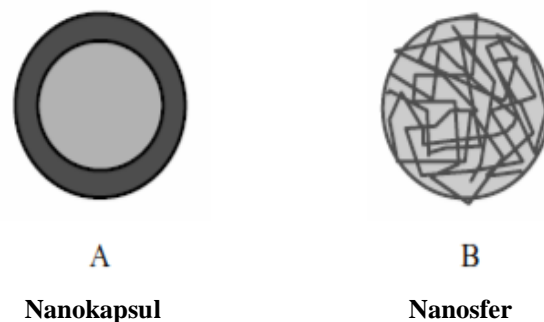
Askorbil palmitat memiliki aktivitas sama seperti asam askorbat yaitu merupakan antioksidan kuat karena dapat menyumbangkan atom hidrogen dan sebagai *scavenger* ROS dan RNS, efektif melawan ion radikal superoksida, dan hidrogen peroksida. Selain itu juga berfungsi sebagai kofaktor biosintesis kolagen sehingga dapat mengembalikan elastisitas kulit dan menyamarkan keriput (Padayatty *et al.* 2003). Aktivitas antioksidan dari askorbil palmitat merupakan

aktivitas dari asam askorbat itu sendiri, karena askorbil palmitat akan dimetabolisme tubuh dan mengalami hidrolisis sehingga akan kembali menjadi bentuk semula yaitu asam askorbat dan asam linoleat. Asam askorbat memiliki fungsi sebagai kofaktor enzim klasik (*hydroxylating enzymes*), agen protektif sebagai hidrosilase pada biosintesis kolagen, dan sebagai radikal askorbil dalam reaksi dengan metal ion transisi (Padayatty *et al.* 2003).

Antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya diklasifikasikan menjadi 2 macam, yaitu antioksidan pencegah dan antioksidan pemutus rantai. Antioksidan pencegah bekerja dengan menghambat pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti enzim katalase, peroksidase, superoksidase dismutase dan transferin. Antioksidan pemutus rantai merupakan senyawa yang menangkap radikal oksigen dengan memutus rangkaian rantai reaksi radikal contohnya vitamin C, vitamin E, asam urat, bilirubin, polifenol, dan sebagainya. Antioksidan pemutus rantai memiliki 2 jalur reaksi. Jalur pertama merupakan jalur transfer atom hidrogen dengan mekanisme radikal oksigen menangkap hidrogen dari antioksidan sehingga terbentuk kompleks antioksidan radikal yang bersifat stabil. Jalur kedua antioksidan mendeaktivasi radikal bebas dengan transfer elektron tunggal. Transfer elektron tunggal sangat dipengaruhi oleh kestabilan pelarut pada muatan tertentu (Huang & Prior 2005).

D. Nanopartikel

Nanopartikel didefinisikan sebagai partikel koloid atau dispersi partikel yang berukuran antara 10-1000 nm. Obat dapat terlarut, terjerap, terenkapsulasi, atau terikat pada pembawa nanopartikel. Nanopartikel dapat dibedakan menjadi nanokapsul dan nanosfer. Nanokapsul adalah sistem nanopartikel ketika obat berada di dalam rongga dan diselimuti oleh membran polimer, sedangkan nanosfer adalah sistem nanopartikel ketika obat secara fisik terdispersi secara seragam pada pembawa nanopartikel. Tujuan utama dalam pembuatan nanopartikel adalah memodifikasi ukuran partikel, sifat permukaan dan profil pelepasan obat agar mencapai selaksi spesifik obat dalam mengoptimalkan efek terapi (Mohanraj & Chen 2006; Singh & Lillard 2009).



Gambar 5. Perbedaan Nanokapsul dan Nanosfer (Delie & Blanco 2005)

Keuntungan menggunakan nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat yaitu, dapat menghantarkan obat dengan lebih baik ke unit yang kecil dalam tubuh, mengatasi resistensi yang disebabkan oleh *barrier* fisiologi dalam tubuh yang disebabkan sistem penghantaran obat yang langsung dipengaruhi oleh ukuran partikel, meningkatkan efisiensi penghantaran obat dengan meningkatkan kelarutan dalam air obat-obat yang susah larut dalam air sehingga meningkatkan biavailabilitas, dapat ditargetkan sehingga dapat mengurangi toksisitas dan meningkatkan efisiensi distribusi obat, memungkinkan penghantaran obat hasil rekayasa bioteknologi melalui berbagai anatomi tubuh yang ekstrim misalnya sawar otak, cabang saluran sistem pulmonari, *tight junction* dari sel epitel usus, dan memungkinkan penetrasi yang lebih baik pada tumor yang memiliki pori-pori berdiameter 100-1000 nm (Rawat *et al.* 2006).

Kekurangan menggunakan nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat yaitu, nanopartikel susah dalam penanganan dan penyimpanan karena mudah teragregasi, nanopartikel tidak cocok untuk obat dengan dosis besar, karena ukurannya kecil nanopartikel dapat memasuki bagian tubuh yang tidak diinginkan yang dapat menimbulkan akibat yang berbahaya, misalnya dapat menembus membran inti sel dan menyebabkan kerusakan genetik yang tidak diinginkan atau mutasi (Rawat *et al.* 2006).

E. Fitosom

Sistem pembawa yang termasuk ke dalam DDS (*Drug Delivery System*) salah satunya yaitu liposom, dimana liposom merupakan suatu partikel berbentuk

vesikel mikroskopik yang dindingnya tersusun dari molekul lipid lapis ganda yang membungkus kompartemen cairan di dalamnya. Liposom dibuat dari fosfolipid dan kolesterol, jenis fosfolipid yang sering digunakan dalam pembentukan liposom antara lain adalah dari golongan lipid bermuatan negatif, fosfolipid asam seperti dipalmitoil fosfatidilgliserol (DPPG), dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC), golongan lipid bermuatan netral seperti fosfatidiletanolamin. Kolesterol dalam liposom berfungsi untuk meningkatkan stabilitas, menurunkan porositas, mencegah agregasi dan fusi dari liposom (Mayes 2003).

Liposom memiliki ukuran yang beragam, mulai dari nanometer hingga mikrometer yang umumnya dalam rentang 25 nm-2,5 μ m. Liposom merupakan partikel *sferis* yang mengenkapsulasi suatu fraksi pelarut, sehingga pelarut tersebut dapat berdifusi ke bagian dalam. Liposom dapat terdiri dari satu, beberapa atau banyak membran konsentris. Liposom terbentuk dari senyawa lemak polar yang dikarakterisasi dengan bagian lipofilik dan hidrofilik pada molekul yang sama. Ketika berinteraksi dengan air, maka lipid polar berkumpul dan membentuk partikel koloid. Bagian hidrofilik mengarah ke air dan bagian lipofilik mengarah ketengah vesikel sehingga membentuk membran lipid bilayer. 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 (Ajazuddin & Saraf 2010).

Pengembangan sistem fitofosfolipid kompleks atau yang dikenal dengan fitosom dimulai pada tahun 1989 di Italia melalui suatu reaksi kimia antara ekstrak fenolik dengan fosfolipid yang mengandung fosfatidilkolin. Fitosom adalah suatu teknologi nano yang digunakan untuk meningkatkan bioavailabilitas dan memperbaiki farmakokinetika bahan aktif yang terkandung dalam tanaman. Fitosom merupakan pengembangan dari produk herbal konvensional dengan cara mengikat bahan aktif dengan fosfolipid yang memiliki sifat mirip dengan membran sel, sehingga dapat dihasilkan produk yang mempunyai tingkat absorpsi yang lebih baik daripada ekstrak herbal konvensional. Sistem penghantar fitosom

dapat meningkatkan bioavailabilitas zat aktif karena sifatnya yang permeabel dan dapat menembus membran yang kaya akan lipid (Anupama *et al.* 2011).

Fitosom merupakan suatu kompleks yang terbentuk antara fitokonstituen dengan fosfolipid yang memiliki sifat mirip dengan membran sel dimana fosfolipid memiliki kepala yang bersifat polar dan bagian ekor yang bersifat nonpolar. Fitokonstituen akan berikatan dengan bagian kepala dari fosfolipid untuk membentuk kompleks molekul lipid. Fosfolipid yang sering digunakan dalam pembuatan fitosom adalah fosfatidilkolin. Fitosom dibuat dengan mencampurkan fitokonstituen dengan fosfatidilkolin pada perbandingan molar tertentu (biasanya 1:1 hingga 1:3), sehingga akan menghasilkan suatu kompleks yang ikatannya lebih kuat karena 1 molekul fitokonstituen akan diikat oleh 1 molekul fosfatidilkolin. Metode yang dapat digunakan dalam pembuatan nanofitosom antara lain metode *solvent evaporation*, metode *anti-solvent precipitation*, metode refluks, dan metode hidrasi lapis tipis (Freag *et al.* 2013).

Fitosom dibuat melalui reaksi yang melibatkan fosfolipid, baik sintesis maupun yang berasal dari alam, dengan 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. 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 (Tripathy *et al.* 2013)

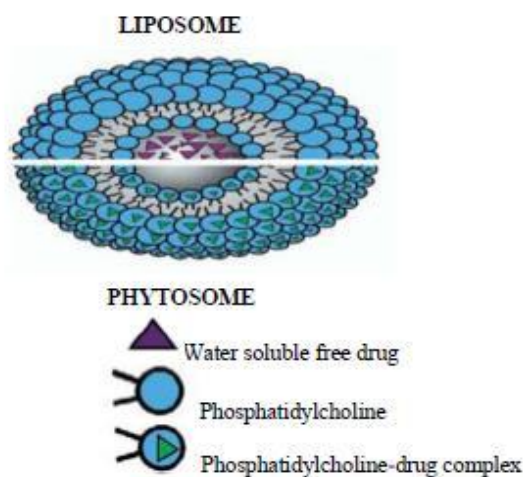
Fitosom dapat dibedakan dengan liposom melalui mekanisme penyerapan senyawa obat, di mana penyerapan molekul obat pada fitosom terjadi pada bagian polar fosfolipid sementara pada liposom, molekul obat yang hidrofilik akan terjerap pada bagian inti (*cavity*) yang merupakan ruang yang terbentuk di antara

membran fosfolipid. Beberapa peneliti mengemukakan bahwa fitosom merupakan alternatif yang lebih baik dibandingkan dengan liposom karena lebih permeabel terhadap membran dan stabilitas yang lebih baik. Oleh karena itu, penggunaan fitosom telah banyak dikembangkan hingga saat ini untuk meningkatkan efikasi bahan aktif terutama yang berasal dari tanaman, baik dalam formulasi sediaan obat maupun kosmetika (Tripathy *et al.* 2013).

1. Karakteristik Fitosom

Fitosom memiliki ukuran partikel yang kecil dan luas permukaan yang besar sehingga fitokonstituen dapat cepat dirilis. Fitosom dapat meningkatkan kelarutan biomembran dan permeabilitas karena struktur yang kompleks antara ekstrak tanaman dan fosfolipid sehingga meningkatkan stabilitas. Fitosom bersifat biokompatibel, *biodegradable* dan non mutagenis secara klinis. Fitosom dapat meminimalkan toksisitas dosis dan memberikan efek terapi yang lebih baik (Mukherjee & Pulok 2015).

2. Sifat Fisika dan Kimia Fitosom



Gambar 6. Struktur Fitosom dan Liposom (Patel *et al.* 2009)

Pembuatan fitosom dengan mereaksikan jumlah stokiometri antara fosfolipid dan bahan aktif tanaman yang tepat dalam pelarut yang tepat. Interaksi antara keduanya yaitu adanya pembentukan ikatan hidrogen antara kepala polar dari fosfolipid dan sifat polar dari bahan aktif tanaman. Ketika diberi air, fitosom akan membentuk misel seperti bentuk liposom, pada gambar 6 terlihat bahan aktif

tanaman dengan liposom akan menempel dan mengambang di lapisan membran fosfolipid saja, sementara fitosom, bahan aktif tanaman akan berikatan dengan kepala polar dari fosfolipid dan akan terjepit dalam struktur fosfolipid (Ghandii *et al.* 2012). Fitosom dapat meningkatkan kapasitas untuk dapat melewati biomembran yang terbuat dari lipid sehingga dapat mencapai efek sistemik. Dibandingkan dengan liposom, fitosom ditandai dengan rasio ekstrak tanaman dengan fosfolipid dengan stokiometri 1:1 sampai 1:3. Bagian kompleksasi antara ekstrak tanaman dengan fosfatidilkolin dari fitosom dapat dilihat menggunakan analisis spektroskopik yaitu FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopic*) dan *multinuclear magnetic resonance* (Mukherjee & Pulok 2015).

3. Keuntungan Fitosom

Fitosom memiliki kemampuan dalam meningkatkan absorpsi dikarenakan adanya peningkatan bioavailabilitas dari fitokonstituen yang disebabkan adanya bentuk kompleksasi antara fitokonstituen dengan fosfolipid sehingga terjadinya peningkatan absorpsi. Fitosom memiliki stabilitas yang lebih baik daripada liposom, karena liposom hanya berikatan sementara dengan bahan aktif tanaman. Dosis yang dibutuhkan untuk menghasilkan efek yang diinginkan dapat dikurangi, karena bioavailabilitas yang meningkat. Fitosom dapat berpenetrasi ke dalam kulit dengan mudah, serta bahan aktif tanaman yang dikelilingi oleh fosfolipid dapat mencegah rusaknya bahan aktif tanaman dari enzim pencernaan dan bakteri yang terdapat dalam usus sehingga dapat membantu bahan aktif tanaman tepat secara utuh kesasarannya (Ghandii *et al.* 2012).

F. Komponen Fitosom

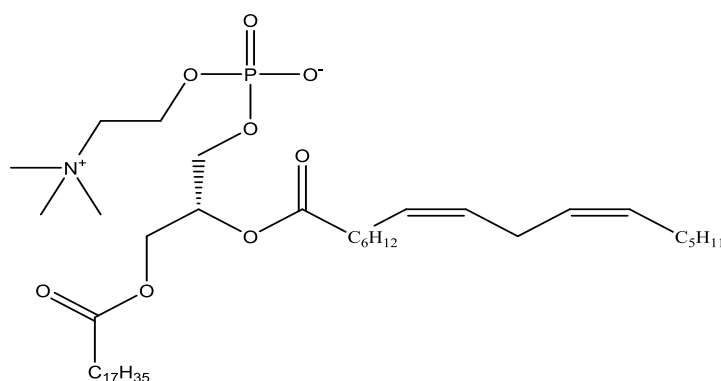
1. Fosfolipid

Fosfolipid merupakan molekul amfifatik yang memiliki kelarutan yang besar di dalam air maupun minyak. Fosfolipid mempunyai bagian polar dan bagian non-polar. Fosfolipid yang dapat digunakan untuk membuat fitosom cukup beragam, diantaranya fosfatidilkolin, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin dan kardiopin dengan rentang konsentrasi 0,5-10%. Fosfolipid dapat berasal dari telur, kacang kedelai, semi sintetik atau sintetik (Nandure *et al.*

2013). Fosfolipid yang mengandung fosfatidilkolin dalam membran dapat mempengaruhi fluiditas membran. Interaksi yang terjadi antara fosfolipid dengan fitokonstituen dikarenakan adanya ikatan hidrogen antara fitokonstituen dengan bagian polar fosfolipid. Bagian kepala fosfolipid yaitu kolin akan mengikat senyawa yang larut air atau fitokonstituen dan bagian fosfolipid yang bersifat non polar akan melindungi kolin yang mengikat senyawa polar (Khan *et al.* 2013).

2. Fosfatidilkolin

Fosfatidilkolin terdiri dari kepala fosfokolin dan ekor yang terdiri dari dua asam lemak, Pada gambar 7 merupakan struktur dasar dari fosfatidilkolin yaitu 1,2-diasil-sn-gliserol-3-fosfokolin. Bagian fosfatidilkolin di kepala fosfatidilkolin merupakan bagian polar, sedangkan bagian ekor merupakan bagian yang non polar (Jackson *et al.* 2005). 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 (Bombardelli *et al.* 1989).

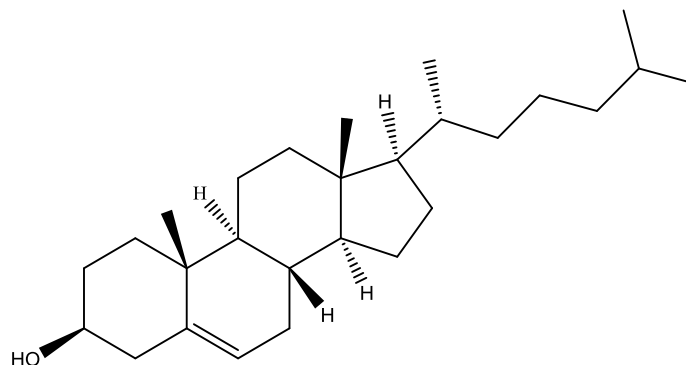


Gambar 7. Struktur Fosfatidilkolin (Jackson *et al.* 2005).

Fosfatidilkolin bersumber dari kedelai, jagung, dan kuning telur. Fosfatidilkolin yang bersumber dari kedelai mengandung fosfolipid sebesar 60-70%. Fosfatidilkolin dapat berikatan dengan membran sel. Bagian yang spesifik dari fosfatidilkolin yaitu kepala yang bagian polar dapat mengikat senyawa lain

sementara bagian ekor berikatan dengan lipid. Bagian kepala dan ekor keduanya terikat dengan kolin (Singh *et al.* 2014).

3. Kolesterol



Gambar 8. Struktur Molekul Kolesterol (Rowe *et al.* 2006)

Kolesterol memiliki rumus empiris $C_{27}H_{46}OH$ dan berat molekul $386,67 \text{ g.mol}^{-1}$ serta memiliki titik didih sebesar 360°C dan titik lebur dari kolesterol adalah $147\text{-}150^\circ\text{C}$. Kolesterol digunakan pada konsentrasi 0,3-5,0% b/b sebagai zat pengemulsi pada kosmetik dan formula topikal. Kolesterol mampu menyerap air pada sediaan salep dan memiliki aktivitas sebagai emolien, senyawa ini dapat berwarna putih atau kekuningan (samar), hampir tidak berbau, berbentuk mutiara, jarum, bubuk atau butiran. Kolesterol dapat berubah warna menjadi kuning atau kecoklatan pada paparan cahaya udara yang berkepanjangan. Kolesterol larut dalam aseton, larut 1 dalam 4,5 bagian kloroform, larut dalam minyak nabati dan praktis tidak larut dalam air. Senyawa ini stabil dan harus disimpan dalam wadah tertutup, dan terlindung dari cahaya (Rowe *et al.* 2006).

4. Kloroform

Kloroform dikenal sebagai triklorometana, metana triklorida, trikloroform, metal triklorida, dan formil triklorida. Kloroform memiliki rumus molekul dan massa molekul relatif masing-masing adalah CHCl_3 dan $119,4 \text{ g.mol}^{-1}$. Kloroform jernih, tidak berwarna, cairan, mudah menguap, dengan bau khas eterik pada suhu ruang. Kloroform sedikit larut dalam air, mudah larut dalam karbon, karbon disulfida, dan dapat bercampur dengan alkohol, eter, benzene, karbon tetraklorida,

dan minyak yang mudah menguap. Kloroform stabil dibawah suhu dan tekanan normal dalam wadah tertutup (Rowe *et al.* 2006).

G. Metode Pembuatan Nanofitosom

Nanofitosom dapat dibuat dengan menggunakan beberapa metode yaitu *anti-solvent precipitation*, *solvent evaporation*, metode refluks, dan hidrasi lapis tipis.

1. Metode Anti-Solvent Precipitation

Metode ini digunakan para peneliti dalam pembuatan fitosom dengan menambahkan n-hexan sebagai pelarut untuk mengendapkan bentuk kompleks yang telah terbentuk antara fosfolipid dan fitokonstituen dari pelarut organik (Patel *et al.* 2009). 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). Penggunaan pelarut aprotik digunakan oleh para peneliti untuk pembuatan fitosom seperti metilen klorida, etil asetat, dioksan dan lain sebagainya yang digunakan untuk membuat fitosom, tetapi sebagian besar telah diganti penggunaan pelarut aprotik dengan menggunakan etanol. Terlepas dari pelarut yang digunakan berbeda, hal yang terpenting dalam pembentukan fitosom yaitu berdasarkan ratio molar antara fosfolipid dan fitokonstituen (Khan *et al.* 2013).

2. Metode Solvent Evaporation

Metode ini dilakukan dengan cara melarutkan fosfolipid dan ekstrak yang ditempatkan pada labu yang sama dengan menggunakan sejumlah pelarut yang sesuai seperti tetrahidrofur atau etanol kemudian disonikasi selama 30 menit hingga seluruhnya larut. Larutan yang terdapat dalam labu alas bulat dievaporasi pada *rotary evaporator* rpm 40 pada suhu 45°C hingga semua solven menguap dan menghasilkan lapisan tipis *dry film* pada dasar tabung. Selanjutnya lapisan tipis *dry film* tersebut dibiarkan pada temperatur ruang selama semalam sebelum

dihidrasi, untuk memastikan bahwa pelarut organik telah menguap seluruhnya. Lapisan film kemudian dihidrasi dengan 20,0 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).

3. 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 *hair dryer*. *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).

4. Hidrasi Lapis Tipis

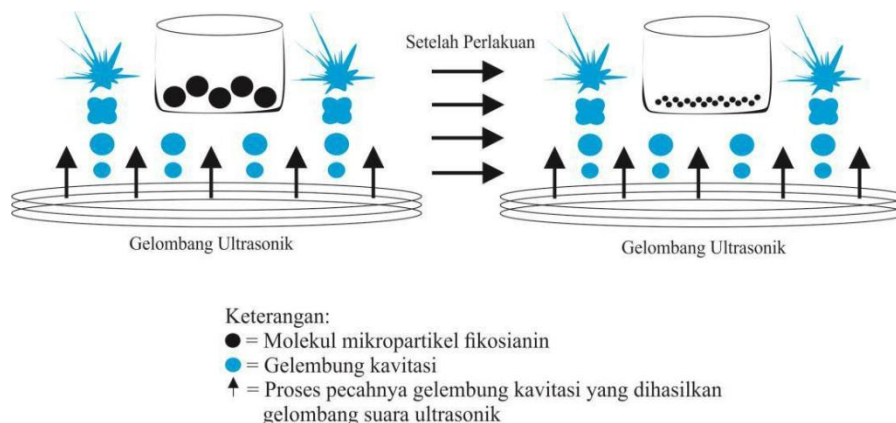
Metode hidrasi lapis tipis dapat dibuat dengan cara yang sederhana dengan menggunakan peralatan laboratorium. Metode ini merupakan pembuatan film tipis dengan hidrasi dan diubah keukuran yang diinginkan dengan metode sonikasi, hidrasi ini dilakukan untuk mengembangkan vesikel dan mengoptimalkan penjerapan obat. Vesikel yang telah disonikasi dihomogenkan dengan cara diekstrusi melalui membran polikarbonat. Campuran bahan vesikel yang terbentuk yaitu fosfolipid dan surfaktan dilarutkan dalam pelarut organik (dieter ether, kloroform atau metanol) dalam labu alas bulat, pelarut organik diuapkan di atas suhu kamar, kemudian dimurnikan pada suhu 50°C dengan menggunakan *Rotary Evaporator*. Vesikel multilamellar yang dihasilkan dapat diproses lebih lanjut melalui sonifikasi, atau penanganan lain untuk mengoptimalkan penjerapan obat (Maryana *et al.* 2016).

Sonikasi merupakan salah satu metode yang sangat efektif, dikarenakan pengaruh waktu sonikasi yang berdampak pada penurunan ukuran partikel pada sediaan. Kavitasi yang muncul akibat gelombang ultrasonik merupakan proses

pecahnya gelembung pada fluida akibat penurunan tekanan secara tiba-tiba (Brennen 2014). Semakin lama waktu sonikasi, ukuran partikel akan semakin mengecil dan homogen sehingga menghasilkan sediaan yang lebih stabil. Hal ini membuktikan bahwa gelombang kejut pada metode sonikasi dapat memisahkan penggumpalan partikel (Mason & Lorimer 2014).

Cara kerja metode ultrasonik dalam mengekstraksi gelombang ultrasonik terbentuk dari pembangkitan ultrason secara lokal dari kavitas mikro pada sekeliling bahan yang akan diekstraksi sehingga terjadi pemanasan pada bahan tersebut, sehingga melepaskan senyawa ekstrak. Efek ganda yang dihasilkan, yaitu penghancuran dinding sel sehingga membebaskan kandungan senyawa yang ada di dalamnya dan pemanasan lokal pada cairan dan meningkatkan difusi ekstrak. Energi kinetik dilewatkan ke seluruh bagian cairan, diikuti dengan munculnya gelembung kavitas pada dinding atau permukaan sehingga meningkatkan transfer massa antara permukaan padat-cair. Efek mekanik yang ditimbulkan adalah meningkatkan penetrasi dari cairan menuju dinding membran sel, mendukung pelepasan komponen sel, dan meningkatkan transfer massa (Keil 2007). Kavitas ultrasonik menghasilkan daya patah yang akan memecah dinding sel secara mekanis dan meningkatkan transfer material (Liu *et al.* 2010).

Berdasarkan kinetika kimia, ultrasonik dapat meningkatkan kereaktifan kimia pada suatu sistem yang secara efektif bertindak sebagai katalis untuk lebih mereaktifkan atom-atom dan molekul dalam sistem. Pada reaksi yang menggunakan bahan padat, ultrasonik ini berfungsi untuk memecah padatan dari energi yang ditimbulkan akibat pecahnya gelembung kavitas. Proses timbulnya kavitas pada sonikator *cleaner* ditunjukkan pada Gambar 9. Dampaknya ialah luas permukaan padatan lebih besar sehingga laju reaksi meningkat. Semakin lama waktu sonikasi, ukuran partikel cenderung lebih homogen dan mengecil yang akhirnya menuju ukuran mikropartikel yang stabil serta penggumpalan pun semakin berkurang. Hal ini disebabkan karena gelombang kejut pada metode sonikasi dapat memisahkan penggumpalan partikel (aglomerasi) dan terjadi dispersi sempurna dengan penambahan surfaktan sebagai penstabil (Mason & Lorimer 2014).



Gambar 9. Mekanisme Kavitasi Pada Sonikator (Chen *et al.* 2013)

H. Uji DPPH

Metode DPPH merupakan metode yang paling banyak digunakan dalam mengevaluasi aktivitas antioksidan suatu senyawa. Metode ini mudah, cepat, dan akurat untuk pengujian aktivitas antioksidan suatu senyawa. Metode DPPH menggunakan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil sebagai sumber radikal bebas, yang dapat mendonorkan atom hidrogen (Marinova & Batchvarov 2011). DPPH merupakan radikal bebas nitrogen organik yang memiliki sifat sangat stabil, bereaksi dengan senyawa yang dapat menyumbangkan hidrogen atom dan memiliki penyerapan maksimum UV-Vis pada 515-517 nm. Metode ini didasarkan pada penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan melalui reaksi reduksi, dan dekolerasi dari larutan DPPH dalam metanol atau etanol (Ndhlala *et al.* 2010). Ketika larutan DPPH dicampur dengan suatu zat yang dapat menyumbangkan atom hidrogen, maka akan membuat warna violet pada larutan DPPH berkurang atau hilang. Perubahan ini dapat diukur secara stokiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Molyneux 2004).

Spektrofotometer UV-Vis memiliki prinsip kerja penyerapan radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang UV-Vis oleh suatu molekul yang dapat menyebabkan eksitasi elektron dalam orbital molekul tersebut dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Syarat senyawa yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis adalah mempunyai gugus kromofor dan

auksokrom dan memiliki serapan pada panjang gelombang UV-Vis (Sastroamidjojo 2001). Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persen penghambatan. Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisiensi atau *Efficient Concentration* (EC_{50}) atau *Inhibition Concentration* (IC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan % penghambatan 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga EC_{50} atau IC_{50} yang rendah (Molyneux 2004).

Tabel 1. Tingkat Kekuatan Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Nilai IC_{50}	Aktivitas antioksidan
< 50 $\mu\text{g/mL}$	Sangat kuat
50-100 $\mu\text{g/mL}$	Kuat
101-150 $\mu\text{g/mL}$	Sedang
> 150 $\mu\text{g/MI}$	Lemah

I. Verifikasi metode

Verifikasi merupakan suatu uji kinerja metode standar. Metode standar adalah metode yang dikembangkan dan ditetapkan oleh suatu organisasi atau badan standardisasi nasional suatu Negara. Metode standar ini diterima secara luas, misalnya : ISO, ASTM, BSN, SNI dan lain sebagainya. Verifikasi ini dilakukan terhadap suatu metode standar sebelum diterapkan di laboratorium. Verifikasi sebuah metode bertujuan untuk membuktikan bahwa laboratorium yang bersangkutan mampu melakukan pengujian dengan metode tersebut dengan hasil yang valid. Disamping itu juga bertujuan untuk membuktikan bahwa laboratorium memiliki data kinerja. Hal ini dikarenakan laboratorium yang berbeda memiliki kondisi dan kompetensi personil serta kemampuan peralatan yang berbeda. Sehingga kinerja antara satu laboratorium dengan laboratorium lainnya berbeda.

Parameter yang digunakan untuk verifikasi metode analisis antara lain :

1. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik,

proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseeksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (Harmita 2004). Penentuan uji linearitas dilakukan dengan larutan baku yang terdiri dari 5 konsentrasi yang naik dengan rentang 50-100% dari rentang komponen uji. Kemudian data diolah dengan regresi linear, sehingga dapat diperoleh respon linier terhadap konsentrasi larutan baku dengan nilai koefisien korelasi yang diharapkan mendekati angka 1 untuk suatu metode analisis yang baik. Sebagai parameter adanya hubungan linier, digunakan koefisien korelasi pada analisis regresi linear $y = a + bx$. Nilai a pada regresi linear menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita 2004).

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

Batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibanding dengan blangko (Harmita 2004). Batas deteksi dinyatakan dalam konsentrasi analit dalam sampel dan dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan rumus :

$$\text{LOD} = \frac{3,3 S_{y/x}}{b} \dots\dots\dots 1$$

Batas kuantitasi merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama serta dapat dikuantifikasi dengan penentuan kuantitatif senyawa yang terdapat dalam konsentrasi rendah dalam matriks (Harmita 2004). Limit ini dapat diukur secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan rumus :

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

Keterangan :

$S_{y/x}$: simpangan baku residual dari serapan

b : slope persamaan regresi linear kurva kalibrasi

J. Analisis dan Karakterisasi Fitosom

1. PSA (*Particle Size Analyzer*)

Ukuran dan distribusi partikel dari fitosom dapat menggunakan alat PSA. Ukuran dan distribusi partikel merupakan karakteristik yang paling penting dalam sistem nanopartikel. Hal ini dapat digunakan untuk memperkirakan distribusi secara *in vivo*, biologis, toksisitas, dan kemampuan untuk *targeting* dari sistem nanopartikel. Pelepasan obat juga dipengaruhi dari ukuran partikel, semakin kecil ukuran partikel maka semakin besar luas area permukaannya. Semakin banyak obat yang bergabung menjadi satu atau mendekati permukaan partikel, akan menyebabkan pelepasan obat yang cepat. Partikel yang lebih besar memiliki inti yang besar di mana akan memungkinkan lebih banyak obat yang dapat dienkapsulasi dan sedikit demi sedikit berdifusi keluar. Partikel-partikel yang memiliki ukuran kecil juga memiliki resiko tinggi mengalami agregasi selama penyimpanan dan distribusi (Mohanraj & Chen 2006).

Metode yang dapat digunakan dalam penentuan ukuran dan distribusi partikel seperti *Dynamic Light Scattering* (DLS), *Static Light Scattering* (SLS), ultrasonik spektroskopi, turbidimetri, NMR, *Coulter counter*, penyaringan, dan lain sebagainya (Haskell 2006). Distribusi partikel dapat dilihat dari nilai PDI (*Polydispersity Index*) atau indeks polidispersitas. Indeks polidispersitas adalah parameter yang menyatakan distribusi ukuran partikel dari sistem mikropartikel, pada rentang 0,01 – 0,7 untuk kategori monodispersi, apabila nilai indeks polidispersitas > 0,7 maka termasuk kategori polidispersi. Nilai ini menunjukkan hasil perhitungan dari berat rata-rata molekul dibagi dengan jumlah rata-rata berat molekul, semakin mendekati nol berarti distribusinya semakin baik. Dari hasil pengukuran akan diperoleh ukuran rata-rata partikel dan indeks polidispersitas partikel yang menggambarkan distribusi ukuran partikel (Nidhin *et al.* 2008).

PSA dapat mengukur diameter, distribusi, bobot molekul, dan zeta potensial mikropartikel. Pengukuran PSA yang multifungsi dan dapat mengukur partikel yang sangat kecil (0,15 nm – 10 μ m) menjadikan PSA lebih banyak digunakan pada penelitian karakterisasi nanopartikel. PSA dapat mendeteksi atau menangkap hamburan cahaya dinamis DLS yang dihasilkan oleh partikel saat

gerak *Brown* yang disebabkan karena energi termal pelarut. Cahaya monokromatik yang dihasilkan PSA akan mengenai larutan partikel yang menyebabkan partikel berfluktuasi dengan kecepatan yang bergantung dari ukuran partikel tersebut. Fluktuasi partikel akan lebih cepat pada partikel yang berukuran kecil, sedangkan pada partikel besar mengalami fluktuasi yang lebih lambat (Skoog *et al.* 2007).

Kelebihan penggunaan PSA untuk mengetahui ukuran partikel adalah lebih akurat dan mudah digunakan, pengukuran partikel dengan menggunakan PSA lebih akurat jika dibandingkan dengan pengukuran partikel dengan alat lain seperti TEM (*Transmission Electron Microscopy*), ataupun SEM (*Scanning Electron Microscopy*). Hal ini dikarenakan partikel dari sampel yang diuji didispersikan ke dalam sebuah media sehingga ukuran partikel yang terukur merupakan ukuran partikel tunggal. Hasil pengukuran dalam bentuk distribusi, sehingga dapat menggambarkan keseluruhan kondisi sampel, dalam artian penyebaran ukuran rata-rata partikel dalam suatu sampel. Rentang pengukuran dari 0,6 nanometer hingga 7 mikrometer (Rusli 2011).

2. Zeta Potensial

Zeta potensial dari sebuah nanopartikel biasanya digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Partikel-partikel yang terdiri dari molekul heteroatomik biasanya memiliki muatan permukaan yang mungkin menjadi positif atau negatif, tergantung pada orientasi dan ionisasi komponen partikel. Interaksi elektrostatik antara partikel akan menentukan kecenderungan agregasi dan fenomena tolak menolak. Zeta potensial adalah ukuran permukaan muatan partikel yang tersebar dalam kaitannya dengan medium pendispersi. Partikel harus memiliki muatan atau zeta potensial yang tinggi dibandingkan dengan medium pendispersi untuk mencegah agregasi. Kekuatan tolak menolak yang dibawa oleh muatan ion serupa pada partikel permukaan akan mencegah gaya tarik menarik yang ditentukan oleh ikatan hidrogen dan ikatan van der Waals. Dengan mengendalikan zeta potensial akan didapatkan kondisi yang ideal untuk terjadi agregasi (Vaughn & Williams 2007). Nanopartikel yang memiliki nilai zeta potensial lebih besar dari +30 mV

atau kurang dari -30mV menunjukkan sistem koloid yang stabil sehingga besarnya muatan partikel dapat mencegah agregasi partikel berdasarkan adanya gaya tolak menolak elektrostatik (Singh & Lillard 2009).

Potensial zeta memiliki peran dalam stabilitas fisik, potensial zeta nanopartikel juga mempengaruhi efektivitasnya sebagai sistem penghantaran obat. Partikel bermuatan negatif dapat dengan cepat dibersihkan oleh makrofag. Selain itu sistem retikuloendotelial, terutama di hati dan limpa, menjadi kendala utama untuk pentargetan aktif karena kemampuannya untuk mengenali sistem ini, menghapusnya dari sirkulasi sistemik, dan akibatnya menghindari pengiriman efektif obat nano ke organ lain (Honary & Zahir 2013).

3. Analisis Morfologi Nanopartikel

Bentuk dan keadaan permukaan nanopartikel penting untuk diketahui karena hal ini dapat memberikan informasi tentang sifat pelepasan obat. Untuk melihat permukaan nanopartikel dapat digunakan mikroskop elektrom pemindaian SEM (*Scanning Electron Microscopy*), mikroskop elektron transmisi TEM (*Transmission Electron Microscopy*), mikroskop daya atom AFM (*Atomic Force Microscopy*). Pada SEM elektron yang di tembakkan ke permukaan sampel akan menghasilkan hamburan elektron yang akan ditangkap dan diolah oleh detektor, sedangkan pada TEM sampel yang dipreparasi sangat tipis, sehingga elektron menembus sampel (transmisi), elektron yang tembus akan ditangkap dan diolah oleh detektor (Haskell 2006).

Analisis SEM digunakan untuk menentukan morfologi, bentuk, dan ukuran partikel. Ukuran partikel dari suatu mikropartikel mempengaruhi laju pelepasan bahan aktif. Penurunan ukuran partikel, akan berdampak pada peningkatan rasio antara luas permukaan dengan volume partikel mikropartikel, umumnya peningkatan ini juga akan diikuti peningkatan fluks bahan aktif. Partikel yang memiliki ukuran yang lebih kecil mengalami pengerasan yang lebih cepat karena jarak yang pendek untuk menguapnya suatu *solvent*, dan ini akan mengakibatkan distribusi obat lebih seragam (Varde & Pack 2006).

SEM adalah analisis untuk penggambaran sampel dengan perbesaran hingga puluhan ribu kali. SEM bekerja dengan memanfaatkan elektron sebagai

sumber cahaya untuk menembak sampel. Sampel yang ditembak akan menghasilkan penggambaran dengan ukuran hingga ribuan kali lebih besar. Prinsip kerja SEM adalah menembakkan permukaan benda dengan berkas elektron berenergi tinggi. Permukaan benda yang dikenai berkas akan memantulkan kembali berkas tersebut atau menghasilkan elektron sekunder ke segala arah. Ada satu arah berkas dipantulkan dengan intensitas tertinggi. Detektor di dalam SEM mendeteksi elektron yang dipantulkan dan menentukan lokasi berkas yang dipantulkan dengan intensitas tertinggi. Arah tersebut memberikan informasi profil permukaan benda seperti tingkat kemiringan dan arah kemiringan. Syarat agar SEM dapat menghasilkan citra yang tajam permukaan benda harus bersifat sebagai pemantul elektron atau dapat melepaskan elektron sekunder ketika ditembak dengan berkas elektron. Benda yang bersifat sebagai pemantul elektron yaitu benda logam, karena itu benda yang akan diuji harus dilapisi dengan logam, kecuali jika benda yang akan diuji merupakan senyawa logam (Mikrajudin & Khairurrijal 2009).

TEM adalah sebuah mikroskop elektron yang cara kerjanya mirip dengan cara kerja proyektor *slide*, di mana elektron ditembuskan ke dalam obyek pengamatan dan pengamat mengamati hasil tembusnya pada layar. Sampel yang disiapkan pada TEM sangat tipis sehingga elektron dapat menembusnya kemudian hasil dari tembusan elektron tersebut yang diolah menjadi gambar, sinar elektron mengiluminasi spesimen dan menghasilkan sebuah gambar di atas layar pospor. Gambar dilihat sebagai sebuah proyeksi dari spesimen (Karlik 2001). TEM digunakan untuk menganalisis mikrostruktur, identifikasi defek, analisis interfasa, struktur kristal, tatanan atom pada kristal, serta analisis elemen skala nanometer (Respati 2008). TEM mampu menghasilkan resolusi hingga 0,1 nm atau 1 Å yang sama dengan perbesaran sampai satu juta kali (Karlik 2001).

4. Persen EE (*Entrapment Efficiency*)

Entrapment efficiency adalah suatu karakterisasi nanopartikel yang menggambarkan kandungan atau jumlah obat yang terjerap di dalam polimer. *Entrapment efficiency* digambarkan dengan rasio perbandingan kandungan obat sebenarnya (hasil analisis) dengan kandungan obat secara teoritis (Hire *et al.*

2014). Efisiensi penjerapan dari bahan aktif tanaman dapat diperoleh dengan menghitung jumlah bahan aktif tanaman yang terperangkap didalam fitosom (Rasaie *et al.* 2014). Untuk menetapkan jumlah bahan aktif tanaman yang terperangkap dalam fitosom yaitu dengan cara sejumlah fitosom di di sentrifugasi selama 50 menit pada 50.000 rpm dan suhu 4°C dengan tujuan untuk memisahkan obat yang tidak terjerap. Jumlah obat bebas (FD₀) ditentukan pada supernatan. Supernatan hasil sentrifugasi ditetapkan kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis kemudian dilakukan perhitungan persentase penjerapan dengan rumus berikut (Pham *et al.* 2012).

Efisiensi penjerapan (%EE) dihitung dengan rumus :

$$\% EE = \frac{TD-FD}{TD} \times 100\% \dots\dots\dots 3$$

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

Spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran energi cahaya oleh suatu sistem kimia pada panjang gelombang tertentu (Day & Underwood 2002). Sinar ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200 - 400 nm, dan sinar tampak (*visible*) mempunyai panjang gelombang 400 - 750 nm. Pengukuran spektrofotometri menggunakan alat spektrofotometer yang melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif. Spektrum UV-Vis sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Gandjar & Rohman 2007).

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum ultraviolet dan *visible* tergantung pada stuktur elektronik dari molekul. Serapan ultraviolet dan *visible* dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat transisi-transisi antara tingkatan-tingkatan tenaga elektronik. Proses serapan pada sampel yang mengakibatkan transisi, maka serapan radiasi ultraviolet atau *visible* sering

dikenal sebagai spektroskopi elektronik. Transisi-transisi tersebut biasanya antara orbital ikatan antara orbital ikatan atau orbital pasangan bebas dan orbital non ikatan tak jenuh atau orbital anti ikatan. Panjang gelombang serapan merupakan ukuran dari pemisahan tingkatan-tingkatan tenaga dari orbital yang bersangkutan. Spektrum ultraviolet adalah gambar antara panjang gelombang atau frekuensi serapan lawan intensitas serapan (transmitansi atau absorbansi). Data yang didapatkan berupa gambar grafik antara panjang gelombang pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y (Sastrohamidjojo 2001).

K. Landasan Teori

Askorbil palmitat merupakan turunan dari asam askorbat yang larut dalam lemak dan memiliki kepolaran yang rendah dengan sifat lebih lipofilik, lebih stabil serta lebih mudah diserap kulit karena memiliki bagian yang hidrofil di satu sisi dan lipofil di sisi lain. Askorbil palmitat merupakan asam askorbat dengan penambahan ester yang menjadikannya lebih stabil terhadap oksidasi dan lebih mudah terabsorpsi (Baumann 2009). Askorbil palmitat memiliki aktivitas sama seperti asam askorbat yaitu merupakan antioksidan kuat karena dapat menyumbangkan atom hidrogen dan sebagai *scavenger* ROS dan RNS, efektif melawan ion radikal superoksida, dan hidrogen peroksida, selain itu juga berfungsi sebagai kofaktor biosintesis kolagen sehingga dapat mengembalikan elastisitas kulit dan menyamarkan keriput (Padayatty *et al.* 2003).

Fitosom adalah suatu teknologi nano yang digunakan untuk meningkatkan bioavailabilitas dan memperbaiki farmakokinetika bahan aktif yang terkandung dalam tanaman. Fitosom merupakan pengembangan dari produk herbal konvensional dengan cara mengikat bahan aktif dengan fosfolipid yang memiliki sifat mirip dengan membran sel, sehingga dapat dihasilkan produk yang mempunyai tingkat absorpsi yang lebih baik daripada ekstrak herbal konvensional. Sistem penghantar fitosom dapat meningkatkan bioavailabilitas zat aktif karena sifatnya yang permeabel dan dapat menembus membran yang kaya akan lipid (Anupama *et al.* 2011). Fitosom merupakan suatu kompleks yang

terbentuk antara fitokonstituen dengan fosfolipid yang memiliki sifat mirip dengan membran sel. Fitosom dibuat dengan mencampurkan fitokonstituen dengan fosfatidilkolin pada perbandingan molar tertentu (biasanya 1:1 hingga 1:3), sehingga akan menghasilkan suatu kompleks yang ikatannya lebih kuat karena 1 molekul fitokonstituen akan diikat oleh 1 molekul fosfatidilkolin. Fitosom memiliki ukuran yang bervariasi, mulai dari 50 nm dan mencapai 500 μm . Fitosom dapat terlarut dengan mudah di dalam pelarut aprotik, dapat larut di dalam lemak dan air serta tidak stabil di dalam alkohol (Tripathy *et al.* 2013).

Penelitian yang sudah banyak dilakukan untuk melihat pengaruh variasi konsentrasi fosfatidilkolin terhadap ukuran partikel dan efisiensi penyerapan antara lain, dibuat variasi konsentrasi dengan perbandingan fosfatidilkolin dan ekstrak kulit buah kakao 0,5 : 1 (g) dan 0,75 : 1 (g) secara berturut-turut menghasilkan ukuran nanopartikel dan efisiensi penyerapan sebesar 184,99 nm 95,597% dan 199,97 nm 99,182% (Tahir *et al.* 2016). Nanofitosom yang diformulasikan dengan membuat tiga variasi perbandingan katekin : fosfatidilkolin : kolesterol mulai dari 1:1:0,2 (F1), 1:2:0,2 (F2), dan 1:3:0,2 (F3) hasil evaluasi menunjukkan bahwa ukuran partikel nano-fitosom sekitar 52,1-101,9 nm dengan nilai indeks polidispersitas 0,309-0,404. Efisiensi penyerapan berkisar antara 6,7266%-11,4317%. Analisis data menunjukkan bahwa terdapat pengaruh konsentrasi fosfatidilkolin terhadap efisiensi penyerapan secara signifikan $p < 0,05$ (Husni & Puspitaningrum 2017). Fosfolipid yang dapat digunakan untuk membuat fitosom cukup beragam, diantaranya fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, dan kadiolipin dengan rentang konsentrasi 0,5-10%. Fosfolipid dapat berasal dari telur, kacang kedelai, semi sintetik atau sintetik (Nandure *et al.* 2013).

Metode yang dapat digunakan dalam pembuatan nanofitosom antara lain metode *solvent evaporation*, metode *anti-solvent precipitation*, metode refluks, dan metode hidrasi lapis tipis (Freag *et al.* 2013). Metode hidrasi lapis tipis dapat dibuat dengan cara yang sederhana dengan menggunakan peralatan laboratorium. Metode ini merupakan pembuatan film tipis dengan hidrasi dan diubah keukuran yang diinginkan dengan metode sonikasi, hidrasi ini dilakukan untuk mengembangkan vesikel dan mengoptimalkan penyerapan obat. Vesikel yang

telah disonikasi dihomogenkan dengan cara diekstrusi melalui membran polikarbonat. Campuran bahan vesikel yang terbentuk yaitu fosfolipid dan surfaktan dilarutkan dalam pelarut organik (dieter ether, kloroform atau metanol) dalam labu alas bulat, pelarut organik diuapkan di atas suhu kamar, kemudian dimurnikan pada suhu 50°C dengan menggunakan *Rotary Evaporator*. Vesikel multilamellar yang dihasilkan dapat diproses lebih lanjut melalui sonifikasi, atau penanganan lain untuk mengoptimalkan penyerapan obat (Maryana *et al.* 2016). Banyak Penelitian yang sudah dilakukan untuk membuat nanofitosom menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi antara lain, pembuatan fitosom ekstrak daun teh hijau menggunakan metode hidrasi lapis tipis (Anwar & Farhana 2018). Niosom yang dibuat dengan metode klasik hidrasi lapis tipis (Shahiwala & Misra 2002), dan pembuatan fitosom silymarin menggunakan metode hidrasi lapis tipis (Maryana *et al.* 2016).

Sonikasi merupakan salah satu metode yang sangat efektif, dikarenakan pengaruh waktu sonikasi yang berdampak pada penurunan ukuran partikel pada sediaan. Kavitasi yang muncul akibat gelombang ultrasonik merupakan proses pecahnya gelembung pada fluida akibat penurunan tekanan secara tiba-tiba (Brennen 2014). Semakin lama waktu sonikasi, ukuran partikel akan semakin mengecil dan homogen sehingga menghasilkan sediaan yang lebih stabil. Hal ini membuktikan bahwa gelombang kejut pada metode sonikasi dapat memisahkan penggumpalan partikel (Mason & Lorimer 2014).

Ukuran dan distribusi partikel dari fitosom dapat menggunakan alat *Particel Size Analyzer* (PSA). Ukuran dan distribusi partikel merupakan karakteristik yang paling penting dalam sistem nanopartikel. Hal ini dapat digunakan untuk memperkirakan distribusi secara *in vivo*, biologis, toksisitas, dan kemampuan untuk *targeting* dari sistem nanopartikel. 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 *zetalyzer*, potensial zeta digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Potensial

zeta memiliki peran dalam stabilitas fisik, potensial zeta nanopartikel juga mempengaruhi efektivitasnya sebagai sistem penghantaran obat. Potensial zeta adalah ukuran permukaan muatan partikel yang tersebar dalam kaitannya dengan medium pendispersi. Nanopartikel yang memiliki nilai zeta potensial lebih besar dari +30 mV atau kurang dari -30mV menunjukkan sistem koloid yang stabil sehingga besarnya muatan partikel dapat mencegah agregasi partikel berdasarkan adanya gaya tolak menolak elektrostatik (Singh & Lillard 2009).

Pelepasan obat dipengaruhi dari ukuran partikel, semakin kecil ukuran partikel maka semakin besar luas area permukaannya. Semakin banyak obat yang bergabung menjadi satu atau mendekati permukaan partikel, akan menyebabkan pelepasan obat yang cepat. Partikel yang lebih besar memiliki inti yang besar di mana akan memungkinkan lebih banyak obat yang dapat dienkapsulasi dan sedikit demi sedikit berdifusi keluar. Partikel-partikel yang memiliki ukuran kecil juga memiliki resiko tinggi mengalami agregasi selama penyimpanan dan distribusi (Mohanraj & Chen 2006). Banyak Penelitian yang menunjukkan hasil bahwa sistem pembawa nanofitosom dapat menghasilkan stabilitas yang baik diantaranya yaitu, *Phytosome-loaded* maltodextrin dari ekstrak daun teh hijau menunjukkan stabilitas fisikokimia yang baik melalui organoleptik, kadar air, dan studi sifat fisikokimia yang dilakukan selama 6 minggu pada berbagai suhu (Anwar & Farhana 2018), dan pembentukan fitosom dengan formula 2% silymarin-fosfolipid rasio kompleks dan molar 1:5 menunjukkan sifat fisik terbaik dan stabilitas yang baik setelah uji stabilitas *freeze thaw* (Maryana *et al.* 2016). Menurut Jain *et al.* (2010), dan Kidd *et al.* (2005), bahwa fitosom memiliki stabilitas yang lebih baik dari liposom. Hal ini karena fitosom terdiri dari ikatan kimia yang tidak terdapat pada liposom. Komposisi fitosom bersifat aman dan komponennya diterima untuk penggunaan dalam bidang farmasi.

Penelitian yang telah dilakukan oleh (Rasaie *et al.* 2014) menunjukkan hasil bahwa ukuran partikel nanofitosom meningkat hingga 6 kali lipat tanpa penambahan kolesterol kedalam formula, namun setelah penambahan kolesterol kedalam formulasi nanofitosom menghasilkan stabilitas ukuran partikel selama 21 hari. Pada penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa stabilitas fisik liposom

dapat ditingkatkan dengan penambahan kolesterol. Penambahan kolesterol dalam formula dapat meningkatkan stabilitas nanofitosom karena adanya interaksi antara kolesterol dan fosfatidilkolin yang menyebabkan struktur nano-fitosom menjadi lebih rigid.

L. Hipotesis

1. Nanofitosom askorbil palmitat dapat dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.
2. Variasi konsentrasi fosfatidilkolin yang lebih besar memiliki pengaruh terhadap ukuran partikel dan efisiensi penjerapan nanofitosom askorbil palmitat.
3. Profil karakterisasi askorbil palmitat seperti ukuran partikel, efisiensi penjerapan, serta morfologi dapat diketahui setelah dibuat nanofitosom.
4. Nanofitosom askorbil palmitat tidak stabil selama proses penyimpanan selama lebih dari 21 hari.