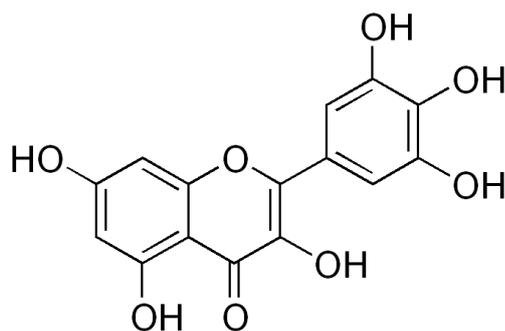


BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Myricetin



Gambar 1. Struktur kimia myricetin

Myricetin adalah flavonoid alami dengan gugus hidroksil pada posisi 3, 5, 7, 3', 4', 5' dan memiliki berat molekul 318,2351 g/mol. Myricetin memiliki struktur yang mirip dengan fisetin, luteolin, dan quercetin (Ross 2002). Myricetin secara luas terkandung dalam sayuran yaitu bayam (1660,9 mg kg⁻¹), kembang kol (1586,9 mg kg⁻¹), wortel (525,3 mg kg⁻¹), lobak (457,0 mg kg⁻¹), kacang polong (146,2 mg kg⁻¹), myricetin juga terkandung dalam buah-buahan yaitu strawberry (3382,9 mg kg⁻¹), plum (564,1 mg kg⁻¹), apel (308,9 mg kg⁻¹), serta terkandung dalam tanaman obat yaitu daun *M. oleifera* (5804,4 mg kg⁻¹), *Aloe vera* (1283,52 mg kg⁻¹), buah *F. religiosa* (694,0 mg kg⁻¹), kulit kayu *A. nilotica* (188,9 mg kg⁻¹), dan akar *M. oleifera* (170,2 mg kg⁻¹) (Sultana & Anwar 2008). Flavonol merupakan senyawa golongan flavonoid yang memiliki potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Substituen hidroksil dan metoksil dapat terikat pada cincin benzena dan heterosiklik flavonol, menghasilkan beragam jenis flavonol. Myricetin memiliki berbagai aktivitas yaitu sebagai antioksidan alami, antiinflamasi, antialergi, dan antikanker (Gaber *et al.* 2017).

Myricetin memiliki kelarutan yang rendah dalam air, tetapi mudah larut dalam pelarut organik seperti dioxane, acetone, methylene chloride, atau ethyl acetate (Comoglio *et al* 1995). Myricetin memiliki kelarutan yang rendah yaitu 0,002 mg/ml serta bioavaibilitas sistemik 10-44%. Myricetin bersifat tidak stabil

terhadap panas (*termolabil*) (Dang *et al.* 2014 & Yao *et al.* 2013). Myricetin memiliki khasiat sebagai antioksidan. Energi disosiasi gugus hidroksil (OH) dan momen dipol menunjukkan bahwa myricetin memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dengan mengikat radikal seperti hidroksil (OH), azide (N₃), dan peroxy (ROO). Myricetin mengikat antara kepala polar dan ekor hidrofobik dari fosfolipid pada permukaan fosfatidilkolin liposom (Khan *et al.* 2013).

B. Antioksidan

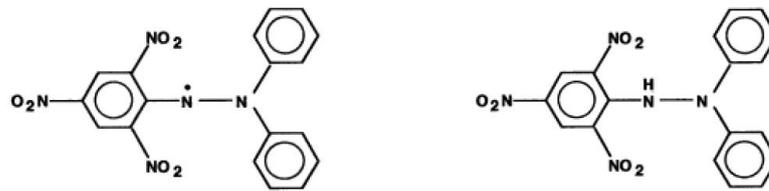
Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan. Senyawa antioksidan mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi yaitu dengan mencegah terbentuknya radikal (Adawiah *et al.* 2015). Antioksidan merupakan senyawa yang apabila dalam konsentrasi rendah berada bersama substrat yang dapat teroksidasi, dapat menunda atau menghambat oksidasi senyawa tersebut (Sunardi 2007).

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 2002).

Metode yang dilakukan untuk pengujian aktivitas antioksidan salah satunya adalah metode DPPH, yaitu dengan menggunakan radikal bebas 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH). Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan

banyak reagen. Hasil pengukuran dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasarkan jenis radikal yang dihambat (Juniarti *et al.* 2009). Pada metode lain selain DPPH membutuhkan reagen kimia yang cukup banyak, waktu analisis yang lama, biaya yang mahal dan tidak selalu dapat diaplikasikan pada semua sampel (Badarinath *et al.* 2010). Prinsip dari metode uji aktivitas antioksidan ini adalah pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif yaitu dengan melakukan pengukuran penangkapan radikal DPPH oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga dengan demikian akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*). Nilai IC_{50} merupakan parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH. 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.

Spektrofotometer UV-Vis merupakan gabungan antara spektrofotometer UV dan *Visible*. Menggunakan dua buah sumber cahaya berbeda, sumber cahaya di daerah ultraviolet (200 – 350 nm) UV dan sumber cahaya tampak (*visible*) (350 – 800 nm). Kelebihan metode ini adalah dapat digunakan untuk sampel berwarna maupun sampel tidak berwarna. Hal ini sesuai dengan kebutuhan dalam pengujian aktivitas antioksidan, dimana senyawa atau DPPH berperan sebagai radikal bebas dalam metanol berwarna ungu tua terdeteksi pada panjang gelombang sinar tampak 517 nm akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga DPPH akan berubah menjadi 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin yang bersifat non-radikal. Peningkatan jumlah 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin akan ditandai dengan berubahnya warna ungu tua menjadi warna merah muda atau kuning pucat dan dapat diamati perubahan warna menggunakan spektrofotometer UV-Vis karena alat ini didasarkan pada penggunaan sinar UV dan ultraviolet sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Molyneux 2004).



1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (*free radical*) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (*non radical*)

Gambar 2. Struktur kimia DPPH

Koefisien y pada persamaan $Y=a+bx$ adalah sebagai nilai IC_{50} , sedangkan koefisien x adalah konsentrasi dari ekstrak yang akan dicari nilainya, dimana nilai dari x yang didapat merupakan besarnya konsentrasi yang diperlukan untuk dapat meredam 50% aktivitas radikal DPPH. Nilai r 0,996 dan 0,99 yang mendekati +1 (bernilai positif) menggambarkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak maka semakin besar aktivitas antioksidannya. IC_{50} merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50% atau IC_{50} dapat dikatakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm ($IC_{50} < 50$ ppm), kuat (50 ppm $< IC_{50} < 100$ ppm), sedang (100 ppm $< IC_{50} < 150$ ppm), lemah (150 ppm $< IC_{50} < 200$ ppm), dan sangat lemah ($IC_{50} > 200$ ppm). Suatu zat mempunyai sifat antioksidan bila nilai IC_{50} yang diperoleh berkisar antara 200-1000 $\mu\text{g/mL}$ (Molyneux 2004).

C. Liposom

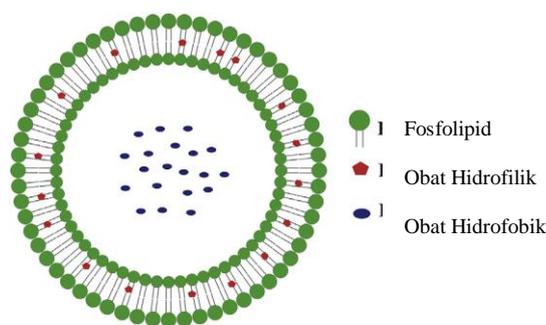
Liposom adalah suatu vesikel yang dibuat dari fosfolipid dan kolesterol. Liposom telah dilaporkan dapat digunakan sebagai pembawa dari zat aktif dalam pengobatan. Liposom memiliki ukuran yang beragam, mulai dari nanometer hingga mikrometer yang umumnya dalam rentang 25 nm-2,5 μm (Aqil *et al.* 2013).

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. Lemak polar ketika berinteraksi dengan air, maka lipid polar berkumpul dan membentuk partikel koloid (Ajazuddin 2010).

Liposom merupakan sediaan farmasi yang dikembangkan dalam dunia farmasi karena liposom sebagai NDDS (*Nano Drug Delivery System*) 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 (Ramadon & Mun'im 2016). Liposom adalah partikel berbentuk vesikel yang dindingnya tersusun atas molekul lipid dengan konstituen utamanya adalah fosfolipid lapis ganda yang membungkus kompartemen cairan di dalamnya (Hamada *et al.* 2002; Jufri 2004). Liposom dibuat dari bahan alami berupa turunan fosfolipid yang dicampur dengan rantai lemak (misalnya fosfatidilkolin) dengan cara didispersikan. Liposom yang terbuat dari bahan alami menghasilkan membran yang menyerupai lipid membran sel dan bersifat biokompatibel atau biodegradasi, nontoksik, dan tidak memicu respon imun (Sjahbanar 2000).

Liposom dalam penggunaannya memiliki berbagai keuntungan yaitu dapat meningkatkan kelarutan, biokompatibilitas yang tinggi, mudah dalam proses pembuatan, memiliki sifat yang fleksibel sehingga dapat digunakan sebagai pembawa bahan obat yang bersifat hidrofilik, amfifilik, atau lipofilik. Modulasi yang sederhana dari karakteristik farmakokinetiknya hanya dengan mengganti komposisi bilayer, dapat digunakan untuk sistem penghantaran tertarget (Verma 2013). Liposom banyak dikembangkan sebagai sediaan topikal karena sediaan liposom memiliki penetrasi yang baik di kulit (Maghraby *et al.* 2001).



Gambar 3. Struktur liposom (Li *et al.* 2014)

Komponen penyusun liposom adalah fosfolipid dan kolesterol. Jenis fosfolipid yang biasanya digunakan dalam pembentukan liposom antara lain dari golongan lipid bermuatan negatif, fosfolipid asam seperti Dipalmitoil Fosfatidilgliserol (DPPG), Dipalmitoil Fosfatidilkolin (DPPC), golongan lipid bermuatan netral seperti fosfatidiletanolamin (Mayes 2003). Kolesterol dalam liposom berfungsi untuk meningkatkan stabilitas, menurunkan porositas, mencegah agregasi dan fusi dari liposom.

1. Macam-macam liposom

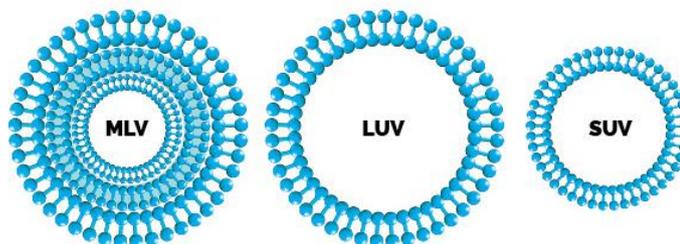
1.1 Multi Lamellar Vesicle (MLV). Liposom multi lamelar dapat dikatakan sebagai bentuk awal liposom, MLV merupakan liposom multi kompartemen dengan ukuran vesikel 100 nm-1000 nm dan setiap vesikel terdiri dari lima atau lebih lamela konsentris. Liposom MLV sangat cocok untuk proses enkapsulasi karena enkapsulasi obat lipofilik cukup besar, stabil dalam penyimpanan jangka panjang, cepat dibersihkan oleh *retikuloendotelial system* (RES) dan dibuat dengan metode *thin film hydration* (Purwaningsih 2002).

1.2 Large Unilamellar Vesicle (LUV). LUV memiliki ukuran 500-1000 nm. Vesikel ini dapat dibuat dengan metode injeksi eter dan fusiliposom jenis SUV dengan diinduksi kalsium. LUV memiliki bentuk single bilayer, rasio air dibanding lipid tinggi, bermanfaat untuk obat-obat hidrofil, cepat dibersihkan dari retikuloendotelial, dibuat dengan active loading, injeksi eter, dialisis detergen, dan *reverse phase evaporation* (New RRC 1990).

1.3 Intermediate-Sized Unilamellar Vesicle (IUV). IUV berukuran 100-200 nm, dapat bertahan lebih lama dalam sirkulasi darah dan stabilitasnya baik sehingga sangat bermanfaat dalam penghantaran obat (New RRC 1990).

1.4 Small Unilamellar Vesicle (SUV). SUV memiliki variasi ukuran terkecil. Ukuran SUV didasarkan pada kekuatan ionisasi medium cair dan komposisi lemak pada membran, ukuran vesikel ± 15 nm untuk liposom yang berasal dari lesitin pada *normal saline* dan ± 25 nm untuk liposom DPC. SUV memiliki bentuk single bilayer, ukuran homogen, secara termodinamik kurang stabil, mudah beragregasi dan bergabung pada muatan yang rendah atau netral, rasio air dibanding lipid kecil, *long circulating*, dibuat dengan mereduksi ukuran MLV dan LUV menggunakan

sonikator, gas *extruder*, *active loading* atau *solvent injection techniques* (New RRC 1990).



Gambar 4. Macam-macam struktur liposom

2. Metode pembuatan liposom

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

2.1 Lipid film hydration (hidrasi lapis tipis). Metode pembuatan liposom dengan cara hidrasi lapis tipis dapat dibuat dengan cara yang sederhana dengan peralatan laboratorium yang meliputi pengeringan campuran bahan tambahan dari vesikel yaitu surfaktan dan kolesterol dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Larutan yang terbentuk dalam labu alas bulat dievaporasi hingga lipid terdeposit dari pelarut organik dalam bentuk lapis tipis pada permukaan dinding labu. Sejumlah larutan dapat ditambahkan dan lipid akan terhidrasi pada temperatur di atas temperatur transisi lipidnya. Vesikel multilamellar yang dihasilkan dapat diproses lebih lanjut melalui sonifikasi, ekstrusi atau penanganan lain untuk mengoptimalkan penjerapan obat (Babazadeh *et al.* 2018).

2.2 Reverse phase evaporation (penguapan fase balik). Kolesterol dan surfaktan dilarutkan dalam kloroform dan $\frac{1}{4}$ volume *Phosphat Buffer Saline* (PBS). Kemudian ditambah fase air yang mengandung obat ke dalam campuran, dua fase yang dihasilkan disonikasi pada suhu 4-5°C. Fase organik diuapkan pada suhu 40°C di bawah tekanan rendah. Lipid yang terbentuk kemudian dihidrasi. Penguapan dilanjutkan hingga hidrasi sempurna, kemudian dilarutkan dalam campuran eter dan kloroform (Akbarzadeh *et al.* 2013; Arora 2007; Tarekegn 2010; Verma 2010).

2.3 Metode alternatif. Ukuran dan jumlah bilayer dari vesikel yang terdiri dari polioksietilen alkil eter dan kolesterol dapat diubah pada cara alternatif ini. Temperatur di atas 60°C menghasilkan SUV hingga LMV (> 1µm). Pengocokan dengan kecepatan tinggi pada temperatur kamar menghasilkan efek yang berlawanan dengan perubahan bentuk vesikel multilamellar menjadi bentuk vesikel unilamellar. Perubahan dari vesikel multilamellar menjadi unilamellar pada temperatur lebih tinggi merupakan karakteristik dari surfaktan polioksietilen alkil eter (Arora 2007).

2.4 Ether injection (injeksi eter). Surfaktan dan kolesterol dilarutkan ke dalam pelarut dietil eter atau campuran eter-metanol dan diinjeksikan pelan-pelan dengan menggunakan jarum suntik ke dalam fase air pada suhu 55°C hingga 65°C (Akbarzadeh *et al.* 2013). Surfaktan-kolesterol dan air akan bergabung membentuk *Large Unilamellar Vesikel* (LUV) selama penguapan eter. Metode ini memiliki kelemahan yaitu sejumlah kecil eter sering tertinggal dalam suspensi vesikel dan sangat sulit untuk dikeluarkan (Arora 2007; Tarekegn 2010; Verma 2010)

2.5 Hand shaking (pengocokan). Surfaktan, kolesterol dilarutkan dalam dietil eter pada labu alas bulat, dan pelarut organik dikeluarkan pada temperatur kamar di bawah tekanan. Surfaktan kering dihidrasi dengan fase air pada suhu 50-60°C dengan kecepatan perputaran yang lambat. Surfaktan, kolesterol dan air akan bergabung membentuk *Large Multilamellar Vesikel* (LMV) (Arora 2007; Tarekegn 2010; Verma 2010).

2.6 Sonikasi. Ukuran partikel merupakan parameter sifat fisik yang perlu diperhatikan dalam pembuatan liposom. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk memperkecil ukuran partikel adalah dengan sonikasi (Akbarzadeh *et al.* 2013). Ukuran diameter liposom yang dihasilkan dengan cara sonikasi dipengaruhi oleh suhu, lama, dan durasi proses sonikasi (Dua *et al.* 2012). Suatu fase air ditambahkan ke dalam campuran surfaktan-kolesterol pada gelas vial. Campuran surfaktan-kolesterol disonikasi selama beberapa waktu tertentu sehingga dihasilkan vesikel kecil, uniform dan unilamellar. Vesikel niosom yang dihasilkan ini umumnya memiliki ukuran yang sangat besar dibandingkan liposom, diameternya tidak lebih kecil daripada 100 nm (Akbarzadeh *et al.* 2013; Arora 2007; Tarekegn

2010; Verma 2010). Kelebihan sonikasi yaitu dapat membentuk ukuran partikel yang lebih kecil dan homogen sehingga ukuran nanopartikel lebih stabil serta mengurangi penggumpalan. Gelombang kejut pada metode sonikasi dapat memisahkan penggumpalan partikel (*agglomeration*) sehingga terdapat banyak rongga pemisah antar partikel. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan bahwa ukuran kristal nanopartikel magnetik yang dihasilkan berada dalam orde nanometer (nm). Penambahan metode sonikasi dapat membentuk nanopartikel dengan ukuran yang lebih kecil dibandingkan disintesis tanpa metode sonikasi. Morfologi permukaan nanopartikel magnetik yang dihasilkan lebih homogen dan terdapat rongga pemisah antar partikel (Delmifiana & Astuti 2013).

D. Fitosom

Fitosom merupakan suatu teknologi yang telah dikembangkan dalam formulasi obat dan produk nutrasetika 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 (Gupta *et al.* 2010).

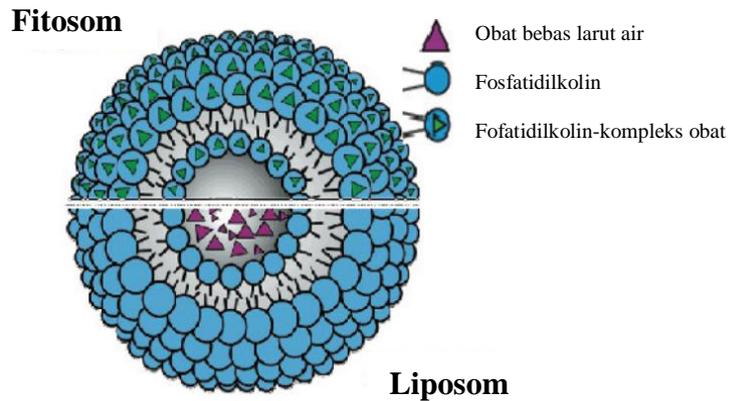
Pengembangan sistem fito-fosfolipid kompleks atau dikenal dengan fitosom dimulai pada tahun 1989 yang dikembangkan oleh Indena di Milan, Italia melalui suatu reaksi kimia antara ekstrak fenolik dengan fosfolipid yang mengandung fosfatidilkolin. Setelah melalui pengujian, diketahui bahwa terjadi peningkatan bioavailabilitas senyawa fenol tersebut bila diformulasikan dalam bentuk fitosom dibandingkan dengan pemberian ekstrak secara langsung. Mulai dari masa tersebut hingga saat ini, penelitian mengenai penggunaan fitosom sebagai pembawa senyawa aktif dari bahan alam yang bersifat hidrofilik sangat banyak dikembangkan (Manglani *et al.* 2012).

Apabila dibandingkan dengan formulasi herbal secara konvensional, terdapat beberapa keunggulan 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. Di samping itu, fitosom juga memiliki efisiensi penyerapan yang cukup baik dan kompleks yang terbentuk relatif stabil karena proses pembentukan kompleks berlangsung melalui reaksi kimia (Gupta *et al.* 2010).

Fitosom dibuat melalui reaksi yang melibatkan fosfolipid, baik sintesis maupun yang berasal dari alam, dengan ekstrak tanaman yang telah distandarisasi dengan konsentrasi yang bervariasi, berkisar antara 0,5 hingga 2 (Thurapati *et al.* 2011). Reaksi tersebut melibatkan pelarut-pelarut aprotik seperti aseton, dioksan, *methylenechloride*, *hexane* dan *ethylacetate*, 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 (Ramadon & Mun'im 2016).

Fitosom dapat dibedakan dengan liposom melalui mekanisme penyerapan senyawa obat, dimana penyerapan molekul obat pada fitosom yaitu bagian lipofilik berinteraksi dengan bagian polar fosfolipid (gugus fosfat dan amonium) melalui ikatan hidrogen. Sementara pada liposom, molekul obat yang hidrofilik akan terjerap pada bagian inti (*cavity*) yaitu ruang yang terbentuk di antara membran fosfolipid tanpa adanya interaksi molekuler antara lipid dengan komponen hidrofilik (Karatas & Turhan 2015). Berdasarkan penelitian 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 (Ramadon & Mun'im 2016).

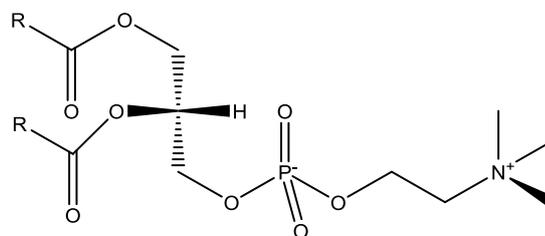


Gambar 5. Perbandingan struktur fitosom dan liposom (Karatas & Turhan 2015)

Fitosom merupakan pembawa yang noninvasif dan dapat menghantarkan obat ke bagian dalam kulit hingga ke sirkulasi sistemik. 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 fosfolipid dari golongan lesitin kedelai, otak atau kulit sapi dan babi, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserin dengan gugus asil yang sama atau berbeda yang sebagian besar berasal dari asam palmitat, stearat, oleat dan asam linoleat. Flavonoid tidak larut dalam kloroform, etil eter atau benzena, tetapi flavonoid bisa menjadi sangat larut setelah dirubah menjadi kompleks fitosom. Perubahan sifat kimia dan fisika ini disebabkan oleh pembentukan kompleks yang stabil (Sharma & Sikarwar 2005).

E. Monografi Bahan

1. Fosfolipid



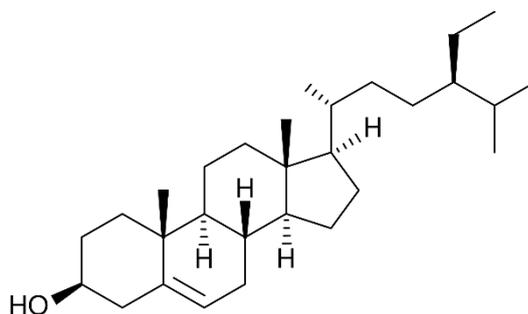
Gambar 6. Struktur kimia fosfatidilkolin

Fosfolipid merupakan bahan pembentuk vesikel dari sistem fitosom. Fosfolipid yang dapat digunakan untuk membuat fitosom cukup beragam, misalnya fosfolipid dari golongan lesitin kedelai, otak atau kulit sapi dan babi, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserin dengan gugus asil yang sama atau berbeda yang sebagian besar berasal dari asam palmitat, stearat, oleat dan asam linoleat (Sharma & Sikarwar 2005).

Phospholipon 90 G adalah fosfatidilkolin yang dimurnikan dari lesitin kedelai, berbentuk padat, warna kekuningan dengan nilai pH 5-7 pada suhu 20°C. Fosfatidilkolin larut dalam etanol 96% (Husni & Puspitaningrum 2017). Fosfatidilkolin adalah senyawa bifungsional, bagian fosfatidil bersifat lipofilik dan bagian kolin bersifat hidrofilik. Fosfatidilkolin terdiri dari kepala kolin dari molekul fosfatidilkolin yang mengikat komponen-komponen herbal, 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 (Manglani *et al.* 2012).

Struktur molekul fosfolipid mencakup kepala yang larut dalam air dan dua ekor yang dapat larut dalam lemak. Fosfatidilkolin digunakan dengan kadar 0,5-10 %, fosfolipid bertindak sebagai pengemulsi yang efektif dengan menggabungkan aksi pengemulsi fosfolipid dengan senyawa aktif dan terbentuk liposom serta memberikan bioavailabilitas yang ditingkatkan untuk obat terlarut lipid (Nandure *et al.* 2013; Kidd 2009). Nanofitosom dibuat dengan mencampurkan fitokonstituen dengan fosfatidilkolin pada perbandingan tertentu (1:1 hingga 1:3), sehingga akan menghasilkan suatu kompleks yang ikatannya lebih kuat karena 1 molekul fitokonstituen akan diikat oleh 1 molekul fosfatidilkolin (Husni & Puspitaningrum 2017).

2. Kolesterol

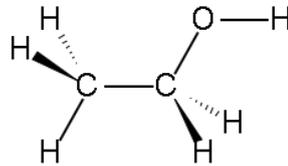


Gambar 7. Struktur kimia kolesterol

Kolesterol memiliki rumus empiris $C_{27}H_{46}OH$ dan berat molekul 386,67 gram/mol serta memiliki titik lebur 147-150°C. Kolesterol digunakan dengan 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. Kolesterol dapat berubah warna menjadi kuning pada paparan cahaya dan udara yang berkepanjangan. Senyawa ini berwarna putih atau kekuningan (samar), hampir tidak berbau, berbentuk mutiara, jarum bubuk atau butiran. Kolesterol larut dalam minyak nabati, aseton, larut 1:4,5 dalam kloroform, larut 1:3,6 suhu 80°C dalam etanol 95% dan praktis tidak larut dalam air. Senyawa ini stabil dan harus disimpan dalam wadah tertutup, terlindung dari cahaya (Rowe *et al.* 2006). Kolesterol dalam liposom berfungsi untuk meningkatkan stabilitas, menurunkan porositas, mencegah agregasi dan fusi dari liposom.

Kolesterol merupakan steroid yang menyebabkan perubahan fluiditas dan permeabilitas dari bilayer fitosom. Kolesterol merupakan metabolit steroid lilin yang dicampurkan dengan surfaktan nonionik untuk memberikan kekuatan dan keteraturan pada fitosom. Kolesterol merupakan molekul ampifilik, dimana gugus OH-nya akan mengarah pada fase air, dan rantai alifatiknya akan mengarah pada rantai hidrokarbon dari surfaktan. Kekuatan yang terjadi pada fitosom disebabkan karena adanya kerangka steroid yang kaku dan berinteraksi dengan molekul surfaktan sehingga membatasi pergerakan karbon dari rantai hidrokarbon surfaktan. Kolesterol juga dapat mencegah terjadinya kebocoran pada molekul surfaktan yang telah menyerap zat aktif (Du *et al.* 2015).

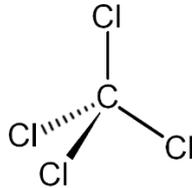
3. Etanol



Gambar 8. Struktur kimia etanol

Etanol adalah alkohol yang biasa digunakan sebagai pelarut berbagai bahan kimia yang ditujukan untuk konsumsi dan kebutuhan industri. Rumus kimia dari etanol adalah C_2H_5OH dan dikenal dengan nama lain etil alkohol, alkohol murni atau alkohol absolut. Etanol berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar dan sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari (Makeshwar *et al.* 2013). Etanol larut dalam air, aseton, benzena, kloroform, dietil eter, piridina dan toluena (Rowe *et al.* 2006).

4. Kloroform



Gambar 9. Struktur kimia kloroform

Kloroform dikenal sebagai triklorometana, metana triklorida, trikloroform, metil triklorida dan formil triklorida. Kloroform memiliki rumus molekul $CHCl_3$ dan berat molekul 119,4 g/mol. Kloroform adalah suatu pelarut berupa cairan jernih, tidak berwarna, mudah mengalir dan menguap, mempunyai sifat khas, bau eter, mendidih pada suhu kurang lebih $61^\circ C$ dan dipengaruhi oleh cahaya. Kloroform sedikit larut dalam air, mudah larut dalam karbon disulfida dan dapat bercampur dengan alkohol, eter, benzena, heksana, karbon tetraklorida dan minyak yang mudah menguap. Kloroform stabil di bawah suhu dan tekanan normal dalam wadah tertutup. Kloroform dapat digunakan sebagai pelarut untuk lemak, resin dan merupakan penyari alkaloid yang baik (Wilson dan Gisvold 1982; Rowe *et al.* 2006).

5. Phosphat Buffer Saline (PBS)

PBS adalah larutan isotonis yang digunakan dalam penelitian biologis. Larutan ini mengandung natrium klorida, natrium fosfat, kalium klorida, dan kalium fosfat. PBS sering digunakan karena isotonis dengan cairan tubuh manusia dan tidak bersifat toksik. PBS memiliki pH berkisar 7,3-7,5 dan osmolaritasnya berkisar 280-315 Mosm/kg (Medicago 2010). Dalam pembuatan nanofitosom larutan PBS ditambahkan ke dalam lapisan tipis kompleks fosfolipid dan fitokonstituen, yang berfungsi untuk menghidrasi kembali lapisan tipis pada labu alas bulat.

F. Metode pembuatan fitosom

Fitosom dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis dan sonikasi.

1. Hidrasi lapis tipis

Metode pembuatan fitosom dengan cara hidrasi lapis tipis dengan melakukan evaporasi campuran bahan tambahan dari vesikel yaitu fosfatidilkolin dilarutkan dalam etanol 96% dan kolesterol dilarutkan dalam kloroform di dalam labu alas bulat. Larutan yang terbentuk dalam labu alas bulat dievaporasi agar lipid terdeposit dari pelarut organik dalam bentuk lapis tipis pada permukaan dinding labu. Sejumlah larutan dapar fosfat ditambahkan dan lipid akan terhidrasi pada temperatur di atas temperatur transisi lipidnya. Vesikel multilamellar yang dihasilkan diproses lebih lanjut melalui sonikasi untuk mengoptimalkan penyerapan obat (Babazadeh *et al.* 2018).

2. Sonikasi

Sonikasi merupakan aplikasi dari penggunaan energi suara dengan frekuensi melebihi batas pendengaran manusia yaitu di atas 20 KHz untuk mengaduk partikel dalam suatu sampel dengan tujuan yang bermacam-macam (Tipler 1998). Sonikasi dapat digunakan untuk mempercepat pelarutan suatu materi dengan memecah reaksi intermolekuler, sehingga terbentuk partikel berukuran nano. Prosesnya dengan cara menggunakan gelombang ultrasonik dengan rentang frekuensi 20 KHz-10 MHz yang ditembakkan ke dalam medium cair untuk

menghasilkan gelembung kavitas yang dapat membuat partikel memiliki diameter dalam skala nano (Suslick dan Price 1999). 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 & Lorimer 2002).

Penggunaan sonikasi berdasarkan rentangnya yang luas ini dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama adalah suara beramplitudo rendah (frekuensi lebih tinggi). Gelombang beramplitudo rendah ini secara umum digunakan untuk analisis pengukuran kecepatan dan koefisien penyerapan gelombang pada rentang 2 hingga 10 MHz. Bagian kedua adalah gelombang berenergi tinggi dan terletak pada frekuensi 20 hingga 100 KHz. Gelombang ini dapat digunakan untuk pembersihan, pembentukan plastik, dan modifikasi bahan-bahan organik maupun anorganik (Mason & Lorimer 2002). Kelebihan sonikasi yaitu dapat membentuk ukuran partikel yang lebih kecil dan homogen sehingga ukuran nanopartikel lebih stabil serta mengurangi penggumpalan. Gelombang kejut pada metode sonikasi dapat memisahkan penggumpalan partikel (*agglomeration*) sehingga terdapat banyak rongga pemisah antar partikel (Delmifiana & Astuti 2013).

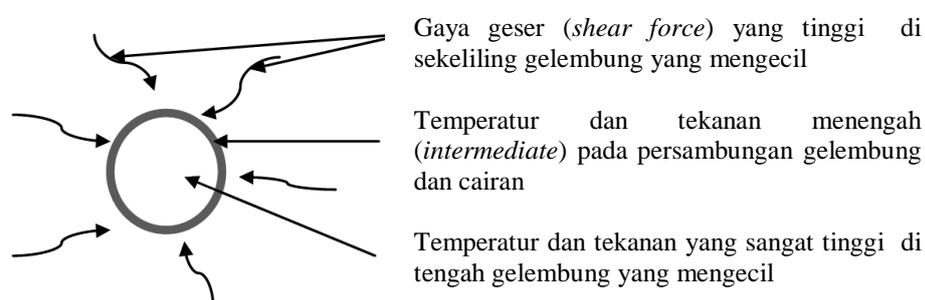
Ultrasonikasi dengan intensitas tinggi dapat menginduksi secara fisik dan kimia. Efek fisik dari ultrasonikasi intensitas tinggi salah satunya adalah emulsifikasi. Beberapa aplikasi ultrasonikasi ini adalah dispersi bahan pengisi dalam polimer dasar, emulsifikasi partikel anorganik pada polimer dasar, serta pembentukan dan pemotongan plastik (Suslick & Price 1999).

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). Kavitasasi ultrasonik menghasilkan daya patah yang akan memecah dinding sel secara mekanis dan meningkatkan transfer material (Liu *et al.* 2010).

Efek kimia pada ultrasonikasi menyebabkan molekul-molekul berinteraksi sehingga terjadi perubahan kimia. Interaksi tersebut disebabkan panjang gelombang ultrasonik lebih tinggi dibandingkan panjang gelombang molekul-molekul. Interaksi gelombang ultrasonik dengan molekul-molekul terjadi melalui media cairan. Gelombang yang dihasilkan oleh tenaga listrik diteruskan oleh media cair ke medan yang dituju melalui fenomena kavitasasi akustik yang menyebabkan kenaikan suhu dan tekanan lokal dalam cairan. Ultrasonikasi pada cairan memiliki berbagai parameter seperti frekuensi, tekanan, suhu, viskositas, dan konsentrasi suatu sampel (Wardiyati *et al.* 2004). Selama proses kavitasasi akan terjadi *bubble collapse* (ketidakstabilan gelembung), yaitu pecahnya gelembung kecil akibat suara. Akibatnya akan terjadi peristiwa hotspot yang melibatkan energi yang sangat tinggi. Hotspot adalah pemanasan lokal yang sangat intens yaitu sekitar 5000 K dengan tekanan sekitar 1000 atm, laju pemanasan dan pendinginannya bisa sangat cepat yaitu 10^{10} K/s (Suslick dan Price 1999).

Pemberian gelombang ultrasonik pada suatu larutan menyebabkan molekul-molekul yang terkandung di dalam larutan berosilasi terhadap posisi rata-ratanya. Larutan akan mengalami regangan dan rapatan. Ketika energi yang diberikan oleh gelombang ultrasonik ini cukup besar, regangan gelombang bisa memecah ikatan antar molekul larutan, dan molekul larutan yang terpecah ikatannya ini akan memerangkap gas-gas yang terlarut di dalam larutan ketika timbul rapatan kembali. Akibatnya timbul bola-bola berongga atau gelembung-gelembung yang berisi gas yang terperangkap, yang dikenal dengan efek kavitasasi. Gelembung-gelembung ini bisa memiliki diameter yang membesar hingga ukuran maksimumnya, kemudian berkonstraksi, mengecil sehingga berkurang volumenya, bahkan beberapa hingga menghilang seluruhnya.



Gambar 10. Ilustrasi temperatur, tekanan, dan gaya geser yang timbul ketika gelembung mengecil (*Collapse*) (Mason & Lorimer 2002)

Beberapa keunggulan pada penggunaan teknologi ultrasonik dalam aplikasinya pada berbagai macam pati dan polisakarida: proses ultrasonik tidak membutuhkan penambahan bahan kimia dan bahan tambahan lain, prosesnya cepat dan mudah (prosesnya tidak memerlukan biaya tinggi), prosesnya tidak mengakibatkan perubahan yang signifikan pada struktur kimia, partikel, dan senyawa-senyawa bahan yang digunakan. Hal-hal yang mempengaruhi kemampuan ultrasonik untuk menimbulkan efek kavitasi yang diaplikasikan pada produk pangan antara lain karakteristik ultrasonik seperti frekuensi, intensitas, amplitudo, daya, karakteristik produk (seperti viskositas, tegangan permukaan) dan kondisi sekitar seperti suhu dan tekanan (Williams 1983). Penggunaan gelombang ultrasonik sangat efektif dalam pembentukan materi berukuran nano. Dalam proses kavitasi terbentuk gelembung yang berasal dari salah satu fasa yang didispersikan dalam fasa yang lain. Pada proses sonikasi terjadi siklus perendaman gelombang dimana terjadi penurunan energi mekanik terhadap waktu dan resonansi. Hal inilah yang menyebabkan nanopartikel dapat terpisah satu sama lain sehingga didapatkan nanosfer dengan ukuran kecil (Nakahira *et al.* 2007).

G. 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. Untuk memperolehnya maka perlu dilakukan validasi. Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan

percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Tertasari 2003). Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi 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 (Harmita 2004).

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 (Harmita 2004).

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. LOQ merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. LOD dan LOQ dapat dihitung dengan statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan rumus:

$$LOQ = \frac{10 S_{y/x}}{b} \dots\dots\dots 1$$

$$LOD = \frac{3,3 S_{y/x}}{b} \dots\dots\dots 2$$

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; ICH Q2A 2005).

3. Akurasi

Uji akurasi bertujuan untuk menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung pada sebaran galat sistematis di dalam seluruh tahap analisis. Uji akurasi dilakukan dengan metode adisi secara duplo yaitu dengan menimbang sampel dengan bobot yang sama sebanyak dua kali kemudian pada salah satu sampel ditambahkan larutan baku. Suatu metode dikatakan mempunyai akurasi yang baik apabila memiliki nilai perolehan kembali 80%-120% (Harmita 2004).

4. Presisi

Uji presisi alat dilakukan dengan mengaspirasikan larutan standar dengan konsentrasi tertentu pada alat spektrofotometri serapan atom sebanyak lima kali aspirasi. Tujuan dari uji ini adalah membuktikan ketelitian suatu alat berdasarkan tingkat keakuratan individual hasil analisis yang ditunjukkan dari hasil *Standart Deviation* (SD), *Relatif Standary Deviation* (RSD), dan ketelitian alat. Kriteria ketelitian diberikan apabila metode memberikan hasil simpangan baku relative atau koefisien variasi kurang dari 2% (Harmita 2004).

H. Analisis dan Karakterisasi Fitosom

1. Morfologi nanofitosom

Metode yang paling umum digunakan untuk analisa gambar (mikrografi), meliputi metode mikroskopi dan metode holografi. *Transmission Electron Microscopy* (TEM), *Scanning Electron Microscopy* (SEM), dan *Atomic Force Microscopy* (AFM) dapat digunakan untuk menganalisa morfologi fitosom (Babazadeh *et al.* 2017).

1.1 TEM. TEM digunakan untuk melihat morfologi mikrostruktur, identifikasi defek, analisis antarmuka, struktur kristal, tatanan atom pada kristal, serta analisis elemen skala nanometer. TEM mampu menghasilkan resolusi hingga 0,1 nm atau 1 angstrom yang sama dengan perbesaran satu juta kali. Mikrostruktur dari nanovesikel dapat dianalisis menggunakan TEM dengan metode pewarnaan negatif. Sampel nanoliposom diencerkan 10 kali dengan aquadest deionisasi untuk mengurangi konsentrasi vesikel. Dengan volume yang sama dari sampel yang telah diencerkan, ditambah larutan amonium molibdat (2%) dan dibiarkan selama 3 menit pada suhu kamar. Larutan diambil satu tetes kemudian ditempatkan pada grid tembaga berlapis *Formvar-carbon* (mesh 200, diameter HF36 3 mm) selama 5 menit. Kelebihan cairan dapat diambil dengan menggunakan kertas saring. Setelah grid dikeringkan pada suhu kamar selama 5 menit, mikrograf dibuat dengan menggunakan Philips CM20 *Transmission Electron Microscope* beroperasi pada 200 kV. Mikrograf direkam menggunakan kamera Olympus TEM CCD (Colas *et al.* 2007). Sampel yang disiapkan sangat tipis sehingga elektron dapat menembusnya kemudian hasil dari tembusan elektron tersebut diolah menjadi gambar (Karlik 2001). Prinsip kerja dari TEM yaitu sinar elektron mengiluminasi spesimen dan menghasilkan sebuah gambar di atas layar fosfor. Gambar dilihat sebagai sebuah proyeksi dari spesimen.

1.2 SEM. Analisis untuk menggambarkan sampel dengan perbesaran hingga puluhan ribu kali. SEM dapat melihat ukuran partikel yang tersebar pada sampel. SEM bekerja dengan memanfaatkan elektron sebagai sumber cahaya untuk menembak sampel. Sampel yang ditembak akan menghasilkan penggambaran dengan ukuran hingga ribuan kali lebih besar. SEM memiliki keuntungan yaitu perbesaran yang relatif luas sehingga pengamatan menjadi lebih fokus pada daerah spesimen ketika dilihat pada perbesaran yang rendah. Berkas elektron yang sangat halus di-*scan* menyilangi permukaan sampel dalam sinkronisasi berkas tersebut dalam tabung sinar katoda. Elektron-elektron yang terhambur digunakan untuk memproduksi sinyal yang memodulasi berkas dalam tabung sinar katoda, yang memproduksi suatu citra dengan kedalaman medan yang besar dan penampakan yang hampir tiga dimensi. Penelitian morfologi permukaan partikel dengan

menggunakan SEM pemakaiannya terbatas, tetapi memberikan informasi yang bermanfaat mengenai topologi permukaan dengan resolusi sekitar 100 Å (Stevens 2001).

1.3 AFM. Keuntungan utama dari teknik ini yaitu dapat beroperasi dengan resolusi tinggi di udara atau dalam cairan secara *real-time* dan pada skala nanometer. Liposom dapat mengubah bentuk partikel dalam larutan air selama 10-15 menit dari deposisi ketika liposom masih terhidrasi dalam air. Interaksi antara sampel dan substrat terjadi gerakan terus menerus dari ujung, sehingga dapat menginduksi deformasi terutama pada komposisi vesikel. AFM mampu mengidentifikasi morfologi dari sifat permukaan (Ruozi *et al.* 2011).

2. PSA (Particle Size Analyzer)

Metode yang dikembangkan seiring berkembangnya ilmu pengetahuan yang lebih mengarah ke era nanoteknologi, para peneliti mulai menggunakan *Laser Diffraction*. 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. Prinsip dari *Laser Diffraction* yaitu ketika partikel-partikel melewati berkas sinar laser dan cahaya dihamburkan oleh partikel-partikel tersebut dikumpulkan melebihi rentang sudut yang berhadapan langsung. Distribusi dari intensitas yang dihamburkan akan dianalisis oleh komputer sebagai hasil distribusi ukuran partikel. Contoh alat yang menggunakan metode *Laser Diffraction* 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 *Laser Diffraction* dibagi dalam dua metode:

2.1 Metode basah. Metode ini menggunakan media pendispersi untuk mendispersikan material uji.

2.2 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).

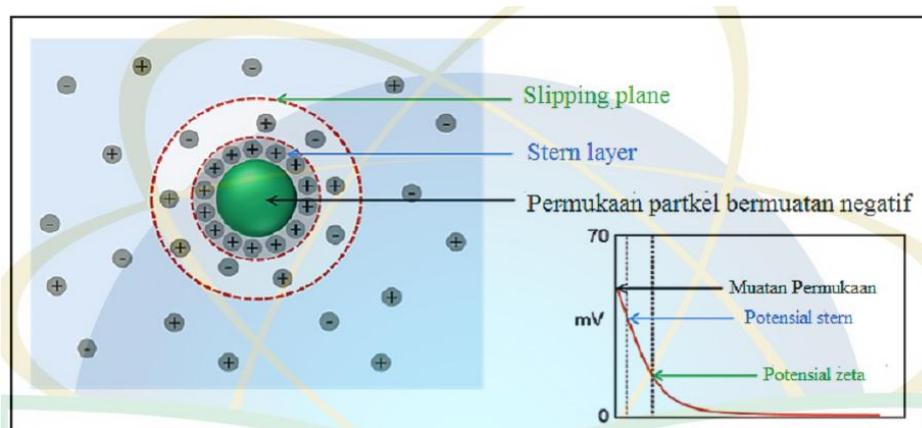
Pengukuran partikel dengan menggunakan PSA biasanya menggunakan metode basah. Metode ini dinilai lebih akurat jika dibandingkan dengan metode kering ataupun pengukuran partikel dengan metode ayakan dan analisis gambar. Sampel-sampel dalam orde nanometer dan submicron yang biasanya memiliki kecenderungan aglomerasi yang tinggi lebih tepat menggunakan metode basah. Hal ini disebabkan karena 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).

3. Zeta potensial

Potensial zeta adalah ukuran umum dari besarnya muatan elektrostatis partikel dalam dispersi, dan sangat sesuai dalam studi stabilitas suspensi nanopartikel. 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 (Jonassen 2014).

Zeta potensial dari sebuah nanopartikel biasanya digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan yang berkaitan dengan interaksi elektrostatis 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 dengan kemurnian tinggi (Ronson 2012).



Gambar 11. Skema ilustrasi partikel bermuatan negatif pada media air (Jonassen 2014)

Potensial zeta memiliki peran dalam stabilitas fisik, potensial zeta nanopartikel juga mempengaruhi efektivitasnya sebagai sistem penghantaran obat. Perlekatan antara nanopartikel dengan membran sel juga dipengaruhi oleh muatan di permukaan partikel. Nanopartikel dengan muatan permukaan yang tinggi menjadi sangat terikat pada membran sel dan menunjukkan serapan seluler yang tinggi, dimana interaksi elektrostatis antara membran anionik dan nanopartikel kationik memfasilitasi penyerapan tersebut. Senyawa kationik juga memiliki efek positif pada permeasi kulit, dimana komponen penyusun jaringan kulit seperti fosfatidilkolin dan karbohidrat yang ditemukan pada sel mamalia yang mengandung gugus bermuatan negatif (Honary & Zahir 2013).

Nanopartikel dengan muatan positif lebih cenderung diserap oleh sel tumor dan waktu retensi yang lebih lama dibandingkan dengan partikel bermuatan negatif atau netral karena fosfatidilserin, residu bermuatan negatif, ditranslokasikan ke permukaan sel kanker dan nanopartikel dengan muatan positif dapat ditranslokasikan oleh sel-sel tumor baik melalui endositosis, atau interaksi muatan dan penambatan ligan-reseptor (Honary & Zahir 2013).

4. Efisiensi penjerapan

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

4.1 Dialysis. Dispersi cairan fitosom didialisis dalam tabung dialysis dengan menggunakan buffer fosfat atau normal saline atau larutan glukosa.

4.2 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.

4.3 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 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 (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 myricetin yang terdapat dalam formula dan FD adalah jumlah myricetin yang terdeteksi pada supernatan (tidak terjerap).

5. Stabilitas nanofitosom

Karakterisasi ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas nanofitosom selama penyimpanan. Nanofitosom disimpan pada suhu kamar (27°C) selama 21 hari, kemudian dilakukan pengamatan terjadinya pemisahan fase, perubahan fisik dan kimia dari sediaan (Chandira *et al.* 2010).

I. Landasan Teori

Myricetin adalah flavonoid alami dengan gugus hidroksil pada posisi 3, 5, 7, 3', 4' dan 5'. Myricetin secara luas terkandung dalam sayuran, teh, buah-buahan dan tanaman obat. Flavonol merupakan senyawa golongan flavonoid yang memiliki potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Substituen hidroksil dan metoksil, dapat terikat pada cincin benzena dan heterosiklik flavonol, menghasilkan beragam jenis flavonol. Myricetin memiliki berbagai aktivitas yaitu sebagai antioksidan alami, antiinflamasi, antialergi, dan antikanker (Gaber *et al.*

2017). Myricetin memiliki bioavailabilitas sistemik yang sangat rendah yaitu 10-44%, hal ini karena kelarutan dalam air yang kecil (0,002 mg/ml) (Hong *et al.* 2014).

Fitosom merupakan struktur misel kompleks bahan alam-fosfolipid (Khan *et al.* 2013). Fitosom dapat terlarut dengan mudah di dalam pelarut organik, lemak dan air. Fitosom terdiri dari fosfolipid seperti *phosphatidylcholine*, *phosphatidylethanolamine* atau *phosphatidylserine* dengan komponen bioaktif dalam pelarut organik (dioxane, acetone, methylene chloride, atau ethyl acetate) dengan perbandingan tertentu (Comoglio *et al.* 1995). Perbandingan yang digunakan berkisar antara 0,5 hingga 2 (Kalita *et al.* 2013).

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa formulasi quercetin:fosfatidilkolin:kolesterol (1:2:0) menunjukkan ketidakstabilan setelah 7 hari karena ukuran partikelnya meningkat dari 80 nm menjadi 468 nm. Penambahan kolesterol pada formulasi quercetin:fosfatidilkolin:kolesterol (1:2:0,2) memiliki ukuran partikel yang lebih rendah (80 nm) dan efisiensi persen enkapsulasi lebih tinggi (98%). Penggabungan kolesterol meningkatkan stabilitas fisik nano *phytosome* selama lebih dari 21 hari. Data *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) menunjukkan bahwa penggabungan zat aktif dengan bilayer fosfolipid dapat mengurangi fase transisi suhu bilayer dalam struktur *nanophytosome* serta menghasilkan pelepasan obat dan bioavailabilitas yang lebih tinggi (Rasaie *et al.* 2014).

Metode dalam pembuatan fitosom pada penelitian sebelumnya meliputi pengendapan tanpa pelarut (Gupta 2011), pengendapan dan liofilisasi *co-solvent* anhidrat (Singh *et al.* 2012), hidrasi lapis tipis (Babazadeh *et al.* 2018) dan refluks (Patihul *et al.* 2017). Metode pembuatan nanofitosom myricetin menggunakan cara hidrasi lapis tipis, yaitu dibuat dengan mengevaporasi campuran bahan dari vesikel meliputi myricetin dan fosfatidilkolin dari lesitin kedelai (*Phospholipon 90 G*) dilarutkan dengan etanol 96%, serta kolesterol dilarutkan dengan kloroform di dalam labu alas bulat. Kompleks yang terbentuk dalam labu alas bulat dievaporasi pada suhu 45°C dengan kecepatan putaran 50 rpm hingga lipid terdeposit dari pelarutnya dalam bentuk lapis tipis pada permukaan dinding labu. Lapisan tipis

ditambahkan larutan dapar (*Phosphat Buffer Saline*) yang berfungsi untuk menghidrasi lipid pada temperatur di atas temperatur transisi lipidnya (Babazadeh *et al.* 2018).

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 & Lorimer 2002).

Pengukuran partikel dilakukan dengan *Particle Size Analyzer* (PSA). Persyaratan parameter ini adalah partikel mempunyai ukuran 10-1000 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 2011). Besarnya potensial zeta dapat memprediksi stabilitas koloid. Nanopartikel dengan nilai potensial zeta lebih besar dari ± 30 mV memiliki derajat stabilitas tinggi. Dispersi dengan nilai potensial zeta rendah akan menghasilkan agregat karena gaya *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. Sifat-sifat nanopartikel secara umum tidak sama dengan senyawa obat tersebut dalam ukuran partikel yang lebih besar (Rachmawati 2007).

J. Hipotesis

1. Myricetin fitosom dapat dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.
2. Variasi konsentrasi fosfatidilkolin yang lebih besar memiliki pengaruh terhadap karakterisasi myricetin seperti ukuran partikel, efisiensi penjerapan dan morfologi myricetin fitosom, profil karakterisasi myricetin serta stabilitasnya dapat diketahui setelah dibuat nanofitosom.
3. Myricetin fitosom stabil pada proses penyimpanan selama lebih dari 3 minggu.