

**FORMULASI DAN KARAKTERISASI Fisetin ETOSOM DENGAN
METODE *DINGIN* - *SONIKASI***



Oleh :

**Oktaviani Dewi Permata
20144305A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**FORMULASI DAN KARAKTERISASI Fisetin ETOSOM DENGAN
METODE DINGIN – SONIKASI**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat
Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh :

**Oktaviani Dewi Permata
220144305A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul :

**FORMULASI DAN KARAKTERISASI ETOSOM Fisetin
DENGAN METODE DINGIN-SONIKASI**

Oleh:
Oktaviani Dewi Permata
20144305A

Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal 25 Mei 2018

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt

Surakarta, 25 Mei 2018

Pembimbing utama

Muhammad Dzakwan, M.Si., Apt

Pembimbing pendamping

Nur Aini Dewi P, M.Sc., Apt

Penguji :

1. Dra. Suhartinah, M.Sc., Apt
2. Ilham Kuncahyo, M.Sc., Apt
3. Dr. Supriyadi, M.Si
4. Muhammad Dzakwan M.Sc., Apt

HALAMAN PERSEMBAHAN

“Man Jadda Wajada”

“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum kecuali kaum itu sendiri yang mengubah apa yang ada pada diri mereka”

(QS. Ar-Ra’d:11)

“Dan perumpamaan-perumpamaan ini kami buat untuk manusia dan tiada yang memahaminya kecuali orang-orang yang berilmu”

(QS. Al-Ankabuut:43)

“Dan tidaklah sama orang yang buta dengan orang yang melihat”

(QS. Faathir:19)

Kupersembahkan karya ini untuk :

1. Allah SWT dengan rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu dan bapak tercinta yang selalu memberikan semangat dan doa selama ini, dan selalu memberikan semuanya yang dibutuhkan penulis dalam penyusunan karya ini. Semoga Allah selalu memberikan kesehatan kepada beliau.
3. Kakak-kakakku yang selalu memberikan motivasi dan selalu mengingatkan terus dalam hal beribadah.
4. Untuk teman-temanku dikos bu Endang yang selalu memberikan semangat dan menemani begadang selama penyusunan karya ini.
5. Untuk teman-teman kuliah (Mentari, Siti Imro’atul M, Rine Larasati, Risna Permata S, Amaliah Citra Khotimah, Mamardika Putri, Dian Novita V) yang sudah terjalin dari PPSPP terimakasih untuk waktunya dan pembelajarannya.
6. Teman-teman FST-OA seangkatan yang luar biasa yang selalu berbagi ilmu dan berbagi canda tawa nya.

7. Untuk bapak Muhammad Dzakwan, M.Si.,Apt selaku pembimbing utama saya yang selalu memberikan ilmunya selama penyusunan karya ini.
8. Untuk ibu Nur Aini Dewi P, M.Sc.,Apt selaku pembimbing pendamping yang sudah sabar membimbing dan terimakasih ilmunya selama penyusunan karya ini.
9. Untuk seseorang yang masih dalam misteri yang dijanjikan Allah yang siapapun itu.
10. Agama, almamater, bangsa, dan negara Indonesiaku.

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah penulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, Mei 2018



Oktaviani Dewi Permata

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warohmatullahi Wabarokatuh

Alhamdulillah segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan nikmatNya dan karuniaNya niat-niat baik hamba-Nya dapat terlaksana, serta tak lupa semoga shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW kepada keluarganya, sahabatnya, dan pengikutnya yang senantiasa berdiri diatas sunnahnya, serta kepada seluruh umatnya hingga akhir zaman yang menjadikan sebagai uswatun husanah, suri tauladan yang baik sehingga memotivasi penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Formulasi dan Karakterisasi Fisetin Etosom dengan Metode Dingin-Sonikasi”.

Skripsi ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm) pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Dalam penyusunanya skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan, bimbingan, dorongan, serta doa dari berbagai pihak.

Oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan MBA, selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta
2. Prof. Dr. RA Oetari, SU, MM, M.Sc., Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
3. Muhammad Dzakwan, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing utama
4. Nur Aini Dewi P, M.Sc., Apt selaku dosen pendamping
5. Dwi Ningsih, S.Si., M.Farm., Apt selaku dosen pembimbing akademik
6. Seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
7. Keluarga peneliti (Bapak Tugiman, Ibu Sukinem, dan kedua kakak ku (Apriana Dian Permata & Septian Isna Dewa Permata)
8. Teman-teman FST-OA angkatan 2014 yang selalu berbagi ilmu selama ini
9. Untuk teman-teman kuliah (Mentari, Siti Imroa'atul M, Rine Larasati, Risna Permata S, Amaliah Citra Khotimah, Mamardika Putri, Dian Novita V)
10. Untuk teman-teman kos bu Endang (semoga silaturahmi masih bisa terjalin)
11. UPT-Lab dan Perpustakaan Univesitas Setia Budi Surakarta

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang lebih baik pada mereka semua dan semoga Allah SWT selalu memberikan kesehatan dan dilancarkan semua urusannya.

Penulis menyadari bahwa hasil penelitian ini jauh dari sempurna, namun penulis berharap hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pihak lain yang berkepentingan.

Wassalamualaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh.

Surakarta, Mei 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
PERNYATAAN.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Kegunaan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Fisetin	5
B. Liposom.....	6
1. Lipid film hidration (hidrasi lapis tipis)	8
2. Metode yang digambarkan oleh Handjani-Vila	9
3. <i>Reverse Phase Evaporation</i> (Penguapan fase balik).....	9
4. Metode Alternatif	9
5. <i>Ether Injection</i> (Injeksi Eter).....	9
6. <i>Hand shaking</i> (Pengocokan)	10
7. Sonikasi	10
C. Etosom.....	10
1. Efek etanol.....	11
2. Efek etosom.....	11
D. Komponen etosom.....	12
1. Fosfolipid.....	13
2. Etanol.....	14

E.	Metode pembuatan etosom.....	14
1.	Metode panas.....	14
2.	Metode dingin.....	14
	<i>Sonikasi</i>	15
F.	<i>Freeze drying</i>	16
G.	Verifikasi metode	18
1.	Linieritas.....	18
2.	<i>Limit of Detection (LOD)</i> dan <i>Limit of Quantitation (LOQ)</i> ...	19
H.	Analisis dan Karakterisasi Etosom.....	19
1.	PSA (Particle Size Analyzer)	19
2.	Zeta potensial	20
3.	SEM (<i>Scanning Electron Microscopy</i>).....	22
4.	Efisiensi Penjerapan	22
I.	Landasan Teori	23
	<i>Sonikasi</i>	24
J.	Hipotesis	25
BAB III METODOLOGI PENELITIAN		26
A.	Populasi dan Sampel.....	26
1.	Populasi	26
2.	Sampel	26
B.	Variabel Penelitian	26
1.	Identifikasi variabel utama	26
2.	Klasifikasi variabel utama	26
3.	Definisi operasional variabel utama	27
C.	Bahan dan Alat	28
1.	Bahan.....	28
2.	Alat	28
D.	Jalannya Penelitian	28
1.	Percobaan pendahuluan	28
2.	Pembuatan fisetin etosom.....	28
2.1	Metode Dingin	28
2.2	Metode Panas	29
3.	Karakterisasi fisetin etosom	29
3.1	Penetapan distribusi ukuran partikel dan potensial zeta.	29
3.2	Pengujian morfologi etosom.	29
4.	Efisiensi penjerapan.	29
4.1	Pembuatan Larutan Induk	30
4.2	Penetapan Panjang Gelombang Maksimum	30
4.3	Penetapan <i>Operating Time</i>	30
4.4	Pembuatan Larutan Seri Kurva Kalibrasi	30
5.	Verifikasi Metode Analisis.....	30
5.1	Linearitas.....	30
5.2	Penentuan LOD dan LOQ.....	30
E.	Analisis Hasil.....	31

F. Skematis Jalannya Penelitian	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	33
A. Percobaan Pendahuluan.....	33
B. Pembuatan etosom fisetin.....	33
1. Penetapan ukuran partikel dan zeta potensial.....	34
C. Stabilitas Etosom Fisetin Dalam Penyimpanan.....	35
1. Pengamatan secara visual.....	35
D. Penetapan ukuran partikel dan zeta potensial setelah penyimpanan.....	36
E. Penetapan Efisiensi Penjerapan.....	37
1. Penentuan kurva kalibrasi	37
1.1 Penentuan panjang gelombang maksimum.....	37
1.2 Penentuan <i>operating time</i>	37
1.3 Kurva kalibrasi.....	37
F. Verifikasi metode analisis	39
1. Linearitas.....	39
2. Penentuan Limit of detection (LOD) dan Limit of Quantitation (LOQ).....	40
G. Pengujian morfologi etosom fisetin.....	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	43
A. Kesimpulan.....	43
B. Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur fisetin.....	5
Gambar 2. Struktur Liposom	7
Gambar 3. Struktur etosom	11
Gambar 4. Struktur fosfatidilkolin	13
Gambar 5. Skema ilustrasi partikel bermuatan negatif pada media air.....	21
Gambar 6. Skema jalannya penelitian.....	32
Gambar 7. Kurva kalibrasi	38
Gambar 8. Hasil morfologi etosom jarak pandang 1 mm	41
Gambar 9. Hasil morfologi etosom jarak pandang 1 mm	42

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Komposisi formula etosom fisetin	28
Tabel 2. Hasil penetapan ukuran partikel dan zeta potensial	34
Tabel 3. Stabilitas etosom fisetin pada suhu kamar	36
Tabel 4. Ukuran partikel setelah penyimpanan.....	37
Tabel 5. Efisiensi penjerapan dan jumlah obat yang terjerap	38
Tabel 6. Parameter verifikasi metode analisis kurva kalibrasi fisetin.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Seritfkat analisis fisetin	51
Lampiran 2. Sertifikat analisis lipoid.....	52
Lampiran 3. Penetapan ukuran partikel dan zeta potensial sebelum penyimpanan.....	54
Lampiran 4. Uji stabilitas selama 4 minggu	55
Lampiran 5. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	57
Lampiran 6. Penentuan Operating Time	58
Lampiran 7. Verifikasi metode	59
Lampiran 8. Perhitungan efisiensi penjerapan	62
Lampiran 9. Hasil scanning Electron Microscopy (SEM)	64
Lampiran 10. Gambar Alat	66
Lampiran 11. Gambar bahan.....	68

INTISARI

PERMATA, OD. 2018. FORMULASI DAN KARAKTERISASI Fisetin ETOSOM DENGAN METODE DINGIN-SONIKASI

Fisetin merupakan senyawa flavonoid golongan flavonol yang berkhasiat sebagai antioksidan. Fisetin termasuk dalam BCS kelas II dimana memiliki kelarutan yang rendah yaitu 10% dan permeabilitas yang tinggi, dengan kelarutan dalam air yang kecil (0,002 mg/ml). Kelarutan rendah menyebabkan fisetin perlu dikembangkan bentuk sediaan topikal yaitu etosom untuk meningkatkan penetrasi obat kedalam kulit. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh variasi konsentrasi etanol terhadap mutu fisetin etosom dari segi ukuran partikel, efisiensi penyerapan serta stabilitas fisetin etosom.

Fisetin etosom dibuat dengan menggunakan metode dingin-sonikasi, metode dingin yaitu metode pemanasan dengan menggunakan suhu 30⁰C selanjutnya disusut ukurannya dengan sonikasi. Penelitian ini menggunakan fisetin 10 mg, fosfatidilkolin 75 mg serta etanol pada masing-masing formula 25%,30%,35%,40%. Etosom yang dihasilkan dilakukan karakterisasi meliputi ukuran partikel, morfologi, efisiensi penyerapan dan stabilitas.

Fisetin dapat dibuat dengan sistem pembawa etosom dengan berbagai variasi konsentrasi etanol. Semakin tinggi konsentrasi etanol semakin kecil ukuran partikel, efisiensi penyerapan besar serta stabilitas terjamin. Ukuran partikel masing-masing formula yaitu 271, 235, 402, 196 nm. Efisiensi penyerapan terbesar pada formula 2 dan 4 dengan masing-masing 93,460% dan 93,250%. Uji stabilitas hanya formula 4 yang tidak mengalami pengendapan.

Kata kunci: fisetin, etosom, metode dingin-sonikasi, fosfatidilkolin

ABSTRACT

PERMATA, OD. 2018. FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF Fisetin ETOSOME USING SONICATION-COOLING METHOD

Fisetin is flavonoid compound belonging to flavonol category useful as antioxidant agent. Fisetin belongs to the 2nd-grade BCS with low solubility of 10%, high permeability, and small water-solubility (0.002 mg/ml). Low solubility requires fisetin to be developed in the form of topical preparation, etosome, to improve drug penetration into skin. This research aimed to find out the effect of ethanol's varying concentrations on fisetin etosome's quality viewed from particle size, absorption efficiency and stability.

Fisetin etosome was prepared using sonication-cool method. Cool method is a heating method at 30⁰C to be shrunk later using sonication. This research employed fisetin 10 mg, phosphatidilcholine 75 mg, and ethanol in individual formulas of 25%, 30%, 35%, 40%. Etosome produced was characterized for its particle size, morphology, absorption efficiency and stability.

Fisetin could be prepared using etosome carrier system in varying ethanol concentrations. The higher the ethanol concentration, the smaller was the particle size, the larger was the absorption efficiency and the more guaranteed was the stability. Particle sizes of all formulas were 271, 235, 402, and 196 nm, respectively. The largest absorption efficiency occurred in formula 2 and 4, 93.460% and 93.250%, respectively. Stability test showed that only formula 4 did not indicate precipitation.

Keywords: fisetin, etosome, sonication-cool method, phosphatidilcholine.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Fisetin merupakan senyawa flavonoid golongan flavonol yang mengandung antioksidan yang secara luas dapat diperoleh dalam buah-buahan. Fisetin dapat diperoleh dalam buah-buahan seperti stroberi (160,0 µg/g), apel (26,9 µg/g), kesemek (10,5 µg/g), anggur (3,9 µg/g), kiwi (2,0 µg/g), dan persik (0,6 µg/g). Senyawa fisetin terdapat pada sayuran seperti akar teratai (5,8 µg/g), bawang (4,8µg/g), tomat (0,1 µg/g), dan mentimun (0,1 µg/g) (Arai *et al.* 2000). 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, salah satunya adalah fisetin (3,3',4',7-tetrahidroksiflavonol). Fisetin memiliki berbagai aktivitas yaitu sebagai antioksidan alami, antiinflamasi, antialergi, antikanker, kardioprotektif (Prozhazcova *et al.* 2011).

Senyawa antioksidan banyak dikembangkan, baik antioksidan alami maupun antioksidan sintetik. Antioksidan alami umumnya berupa senyawa-senyawa fenolik yang terdapat dalam berbagai tanaman (Khalil *et al.* 2007). Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan. Senyawa antioksidan mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi yaitu dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan merupakan senyawa yang apabila dalam konsentrasi rendah berada bersama substrat yang dapat teroksidasi, dapat menunda atau menghambat oksidasi senyawa tersebut (Sunardi 2007).

Bioavaibilitas sediaan oral senyawa flavonoid sangat rendah disebabkan karena rendahnya kelarutan dalam air dan absorpsi yang terbatas (Odeh *et al.* 2011). Fisetin memiliki bioavaibilitas yang sangat rendah yaitu sekitar 10-44%, hal ini karena kelarutan dalam air yang kecil (0,002 mg/ml) dan absorpsi yang

rendah sehingga pemberian fisetin dalam bentuk sediaan oral dan dermal menjadi terbatas (Hong *et al.* 2014).

Kelarutan obat yang rendah menjadi penyebab terbatasnya pengembangan zat aktif farmasi yang poten. Obat-obat yang sukar larut menyebabkan laju disolusi yang rendah dalam cairan pencernaan, absorpsi terbatas dan berpengaruh terhadap rendahnya ketersediaan hayati, terutama untuk golongan obat-obat *Biopharmaceuticals Classification System* (BCS) kelas II, dimana BCS kelas II memiliki kelarutan yang rendah dan permeabilitas yang tinggi (Junyapresart *et al.* 2015). Obat dengan profil disolusi rendah dapat menyebabkan iritasi pada saluran cerna (Gao *et al.* 2013).

Penelitian yang sudah banyak dikembangkan untuk meningkatkan kelarutan fisetin antara lain, dibuat liposom fisetin yang telah dilakukan oleh (Nathalie Mignet 2012), liposomal enkapsulasi fisetin sebagai antitumor oleh (Johanne Seguin 2013), pengembangan bentuk sediaan untuk zat aktif fisetin juga pernah dilakukan oleh (Uday H Thorat 2014) sebagai antitumor. Metode yang telah dilakukan untuk meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas fisetin seperti kokristal (Sowa *et al.* 2014), liposom (Mignet *et al.* 2012), nanokelat (Bothiraja *et al.* 2014), nanoemulsi (Ragelle *et al.* 2012) dan kompleks inklusi β -siklodektrin (Guzzo *et al.* 2006). Metode tersebut belum mampu meningkatkan kelarutan fisetin secara signifikan karena terbatasnya pemahaman tentang sifat fisika kimia dan sifat biologi fisetin (Yao *et al.* 2013).

Obat yang diberikan secara oral akan dimetabolisme oleh enzim di dinding usus atau di hati pada lintasan pertamanya melalui organ-organ tersebut (metabolisme atau eliminasi lintas pertama). Eliminasi lintas pertama obat dapat dihindari dengan cara pemberian topikal, sublingual, rektal, transdermal, inhalasi dan injeksi (Ansel 1989). Obat dengan pemberian topikal memiliki kesulitan yaitu pada daya penetrasi melalui kulit. Metode yang digunakan dalam meningkatkan penetrasi ke dalam kulit dan gelembung (*vesicles*) seperti liposom, nioson, transferosom, dan etosom (Cristina *et al.* 2010).

Etosom adalah suatu sistem pembawa obat berupa vesikel yang lembut dan elastik dengan komponen utama berupa fosfolipid, alkohol (etanol atau

isopropil alkohol) dengan konsentrasi yang cukup tinggi (20-45%) dan air. Etosom merupakan sistem pembawa obat yang sangat menguntungkan karena kemampuannya untuk berpenetrasi melalui kulit tinggi. Sifat fisikokimia dari etosom dapat dijadikan sebagai pembawa untuk menghantarkan senyawa aktif lebih baik melalui kulit secara jumlah maupun kedalaman ketika dibandingkan dengan liposom konvensional. Etosom merupakan sistem penghantar obat yang bersifat hidrofilik, lipofilik ataupun amfifilik. Kelebihan etosom dibandingkan dengan sistem pembawa obat lain yaitu etosom memiliki daya penetrasi yang tinggi. Etosom memiliki kekurangan dapat menyebabkan iritasi dan kulit kering jika menggunakan etanol dengan konsentrasi yang terlalu tinggi (Rakesh & Anoop 2012).

Metode dalam pembuatan etosom ada dua yaitu, Metode Panas dan Metode Dingin. Metode tersebut memiliki perbedaan dari suhu yang digunakan selama proses pembuatan etosom. Metode panas menggunakan suhu 40⁰C, sedangkan metode dingin menggunakan suhu 30⁰C. Metode dingin lebih banyak digunakan karena penggunaan suhu yang tidak terlalu tinggi sehingga dapat menghindari penguapan etanol. Ukuran gelembung dari pembuatan etosom dapat disusut sesuai keinginan dengan penggunaan sonikasi (Akiladevi *et al.* 2010).

Sonikasi adalah 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).

Karakterisasi etosom fisetin meliputi, ukuran partikel, zeta potensial, morfologi etosom, efisiensi penjerapan. Penelitian ini dikembangkan sistem pembawa etosom fisetin dengan metode sonikasi dengan menggunakan berbagai variasi konsentrasi etanol untuk mengetahui pengaruhnya terhadap mutu fisik etosom.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka perumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah fisetin dapat dibuat sediaan etosom dengan menggunakan metode dingin-sonikasi?
2. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi etanol terhadap mutu fisetin etosom?
3. Bagaimanakah karakterisasi fisetin etosom?
4. Apakah fisetin etosom stabil selama proses penyimpanan?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui sediaan fisetin etosom dapat dibuat dengan menggunakan metode dingin-sonikasi.
2. Mengetahui pengaruh variasi konsentrasi etanol terhadap mutu fisetin etosom.
3. Mengetahui karakterisasi fisetin setelah dibuat sediaan etosom.
4. Mengetahui stabilitas fisetin etosom selama proses penyimpanan.

D. Kegunaan Penelitian

1. Bagi peneliti

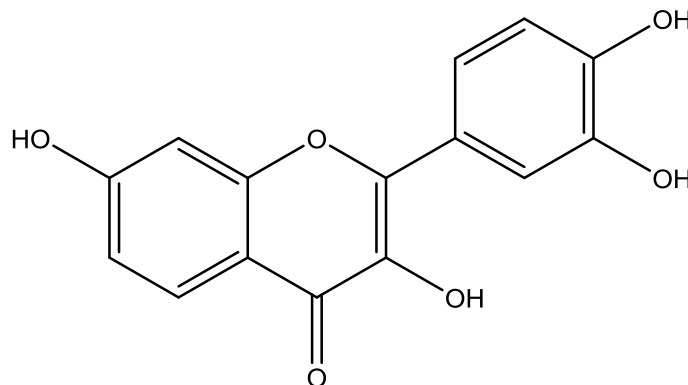
Hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan oleh pihak peneliti dan lainnya yang berminat di bidang penelitian yang sama sebagai dasar untuk melakukan penelitian lanjutan tentang fisetin etosom dengan aktivitas lainnya.

2. Bagi masyarakat

Hasil penelitian dapat dimanfaatkan oleh masyarakat dan industri dalam pengembangan obat, serta dapat digunakan sebagai pilihan alternative dalam pengobatan untuk mendapatkan efek terapi yang cepat.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Fisetin



Gambar 1. Struktur fisetin

Fisetin-tetrahydroxyflavone (3,3',4',7) adalah senyawa flavonoid yang memiliki khasiat sebagai penangkal radikal bebas atau antioksidan (Sengupta *et al.* 2005). Senyawa fisetin banyak ditemukan dalam buah-buahan, kacang-kacangan, anggur dan sayuran seperti bawang, mentimun, apel, kesemek dan stroberi pada konsentrasi 2-160 mg / g dengan perkiraan asupan harian rata-rata 0,4 mg. Fisetin memiliki berbagai aktifitas farmakologi seperti sebagai antioksidan dan antiradikal bebas, anti karsinogenik, anti inflamasi, anti sklerosis dan anti thrombosis (Adhami 2012). Fisetin juga bertindak sebagai inhibitor *kinase cyclin dependent* dan dapat menginduksi penangkapan siklus sel kanker. (Chen *et al.* 2010).

Fisetin memiliki kelarutan yang rendah dalam air, tetapi mudah larut dalam etanol, metanol, aseton dan DMF (dimetilformamida) . Fisetin merupakan obat dalam golongan BCS kelas II dimana fisetin memiliki permeabilitas tinggi sedangkan memiliki kelarutan rendah, dengan kelarutan 0,002 mg/ml serta absorpsi dan bioavaibilitas yang sangat rendah sekitar 10%. Fisetin bersifat tidak stabil terhadap panas (*termolabil*) (Dang *et al.* 2014 & Yao *et al.* 2013).

Fisetin memiliki khasiat sebagai antioksidan. Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan. Senyawa ini mampu

menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga dapat didefinisikan sebagai 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).

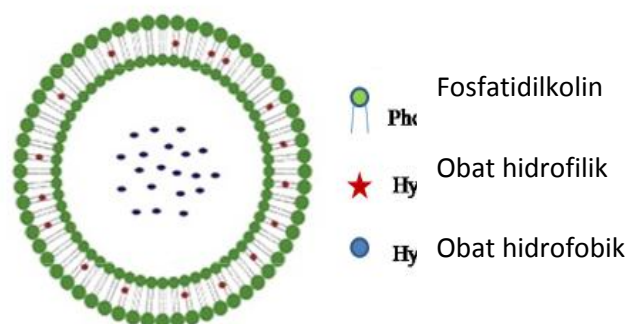
B. Liposom

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 F *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 pada obat, khususnya dengan menghantarkan obat pada sisi aksi dan mengatur kadar obat pada konsentrasi terapeutik dalam jangka waktu yang diperpanjang. Liposom adalah partikel berbentuk vesikel yang dindingnya tersusun atas molekul lipid dengan konstituen utamanya adalah fosfolipid lapis ganda yang membungkus kompartemen cairan didalamnya (Hamada *et al.* 2002; Jufri 2004). Liposom dibuat dari bahan alami yang berupa turunan alami 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/biodegradasi, nontoksik, tidak memicu respon imun (Sjahbanar 2000).

Liposom dalam penggunaannya memiliki berbagai keuntungan yaitu dapat meningkatkan kelarutan, biokompatibilitas yang tinggi, mudah dalam pembuatannya, sifatnya 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, 1999).



Gambar 2. Struktur Liposom (Rudra 2017)

Komponen penyusun liposom adalah fosfolipid dan kolesterol. Jenis fosfolipid yang biasanya digunakan dalam pembentukan liposom antara lain

adalah dari golongan lipid bermuatan negatif, fosfolipid asam seperti dipalmitoil fosfalidilgliserol (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.

Pembuatan liposom dapat dilakukan dengan cara konvensional maupun metode novel yang hingga saat ini masih dikembangkan. Metode-metode tersebut membutuhkan waktu yang lama dalam pembuatan. Metode tersebut membutuhkan pelarut organik yang bila meninggalkan residu dapat bersifat toksik (Mozafari *et al.* 2005). Metode pemanasan (metode Mozafari) merupakan salah satu metode novel yang dikembangkan dalam pembuatan liposom tanpa pelarut organik. Metode pemanasan dapat digunakan untuk membuat liposom yang mengandung enzim, vaksin, atau senyawa lain yang peka terhadap pelarut organik (Colas *et al.* 2007).

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).

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 :

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 biasa meliputi pengeringan campuran bahan tambahan dari vesikel yaitu surfaktan dan kolesterol yang dilarutkan dalam pelarut organik (dieter ether, kloroform atau metanol) di dalam labu alas bulat. Larutan yang terbentuk dalam labu alas bulat dirotavapor agar lipid terdeposit dari pelarut organik dalam bentuk lapis tipis pada permukaan dinding labu. Sejumlah larutan dapat ditambahkan dan lipid akan terhidrasi pada

temperatur diatas temperatur transisi lipidnya. Vesikel multilamellar yang dihasilkan dapat diproses lebih lanjut melalui sonifikasi, ekstrusi atau penanganan lain untuk mengoptimalkan penjerapan obat (Blazek 2001; Verma 2010; Tarekegn 2010; Arora 2007)

2. Metode yang digambarkan oleh Handjani-Vila

Sejumlah yang sama lipid (campuran lipid) dan larutan air dari senyawa aktif dicampur dan digoyang untuk mendapatkan fase lamellar yang homogen. Campuran yang dihasilkan, dihomogenkan pada temperatur yang terkontrol dengan diputar atau ultrasentrifugasi (Blazek 2001; Verma 2010; Tarekegn 2010; Arora 2007)

3. *Reverse Phase Evaporation* (Penguapan fase balik)

Lipid-lipid dilarutkan dalam kloroform dan $\frac{1}{4}$ volume *Phosphat Buffer Saline* (PBS). Campuran disonifikasi dan diuapkan dibawah tekanan. Lipid yang terbentuk kemudian dihidrasi. Penguapan dilanjutkan hingga hidrasi sempurna (Blazek 2001; Verma 2010; Tarekegn 2010; Arora 2007)

4. Metode Alternatif

Ukuran dan jumlah bilayer dari vesikel yang terdiri dari polioksietilen alkil eter dan kolesterol dapat diubah pada cara alternatif ini. Temperatur diatas 60°C menghasilkan SUV hingga LMV ($> 1\mu\text{m}$). 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 (Blazek 2001; Verma 2010; Tarekegn 2010; Arora 2007).

5. *Ether Injection* (Injeksi Eter)

Surfaktan dan kolesterol dilarutkan kedalam pelarut dietil eter dan diinjeksikan pelan-pelan dengan menggunakan jarum suntik kedalam fase air. Surfaktan-kolesterol serta air akan bergabung membentuk *Large Unilamellar Vesikel* (LUV) selama penguapan eter. Metode ini memiliki kelemahan adalah sejumlah kecil eter sering tertinggal dalam suspensi vesikel dan sangat sulit untuk dikeluarkan (Blazek 2001; Verma 2010; Tarekegn 2010; Arora 2007)

6. *Hand shaking* (Pengocokan)

Surfaktan, kolesterol dilarutkan dalam dietil eter pada labu alas bulat, dan pelarut organik dikeluarkan pada temperatur kamar dibawah 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) (Blazek 2001; Verma 2010; Tarekegn 2010; Arora 2007)

7. Sonikasi

Suatu fase air ditambahkan ke dalam campuran surfaktan-kolesterol pada gelas vial. Campuran surfaktan-kolesterol disonifikasi selama beberapa waktu tertentu sehingga dihasilkan vesikel kecil, uniform dan unilamellar. Vesikel niosom yang dihasilkan ini umumnya ukurannya sangat besar dibandingkan liposom, diameternya tidak lebih kecil daripada 100 nm (Blazek 2001; Verma 2010; Tarekegn 2010; Arora 2007)

C. Etosom

Etosom adalah suatu sistem pembawa berupa vesikel yang lembut dan elastik dengan komponen utama adalah fosfolipid, alkohol (etanol atau isopropil alkohol) dengan konsentrasi yang cukup tinggi (20-45%) dan air. Etosom dikembangkan pertama kali oleh Touitou dan rekannya pada tahun 1997. Etosom merupakan pembawa yang sangat menarik karena kemampuannya untuk berpenetrasi melalui kulit karena deformabilitasnya tinggi. Sifat fisikokimia dari etosom dapat dijadikan sebagai pembawa untuk menghantarkan senyawa aktif lebih baik melalui kulit secara jumlah maupun kedalaman ketika dibandingkan dengan liposom konvensional. Etosom dapat digunakan untuk menghantarkan obat yang bersifat hidrofilik, lipofilik ataupun amfifilik (Rakesh & Anoop 2012).

Ukuran vesikel etosom bervariasi, mulai dari ukuran mikrometer (μm) hingga sepuluh nanometer (nm). Etosom lebih cepat berpenetrasi ke dalam lapisan kulit dan meningkatkan nilai fluks sediaan transdermal secara signifikan serta dapat mengatasi efek samping obat berupa iritasi saluran cerna terutama jika diberikan secara oral (Pratima & Tiwari 2012).

Mekanisme penghantaran obat oleh etosom maupun liposom dapat dianggap berasal dari interaksi etosom dengan lapisan lipid pada kulit. Suatu mekanisme interaksi yang mungkin terjadi ada dua fase yaitu :

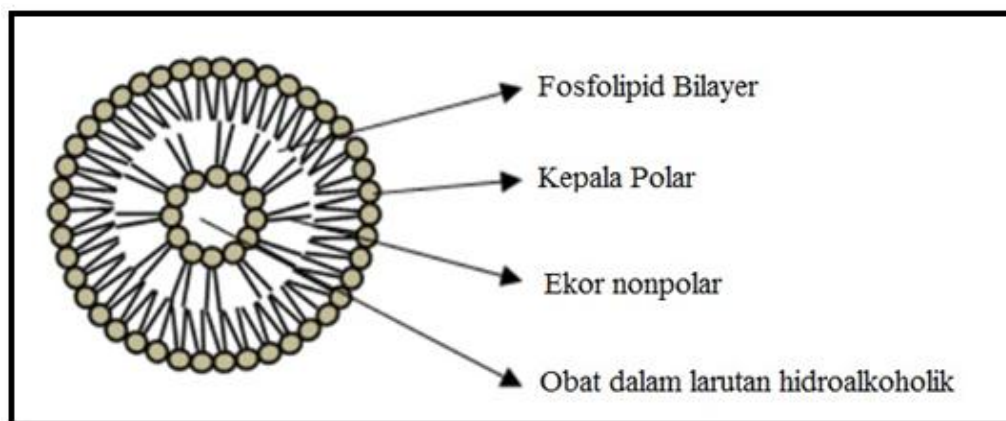
1. Efek etanol

Etanol membantu penetrasi di kulit dengan cara menembus ke dalam lipid interseluler dan meningkatkan fluiditas dari membran sel lipid serta menyusutkan lapisan lipid multilayer pada membran sel.

2. Efek etosom

Peningkatan fluiditas dari membran sel lipid yang disebabkan oleh etanol pada etosom dapat meningkatkan penyerapan air (permeabilitas) pada kulit. Etosom akan diserap dengan mudah melalui lapisan multilayer yang menyusut dan menyatu, dan melepaskan obat ke dalam lapisan kulit yang terdalam (hipodermik/ subkutan) (Akiladevi *et al.* 2010).

Struktur dari etosom mirip dengan liposom, yaitu merupakan suatu vesikel *lipid bilayer* yang memiliki suatu celah di bagian intinya seperti terlihat pada gambar3.



Gambar 3. Struktur etosom

Etosom memiliki perbedaan dengan liposom yaitu pada komponen penyusunnya digunakan etanol dengan konsentrasi yang tinggi. Etosom juga dapat memiliki ukuran yang lebih kecil dan efisiensi penyerapan yang lebih besar bila dibandingkan dengan liposom konvensional sehingga dapat memperbaiki stabilitas dari vesikel yang dihasilkan. Etosom dapat dijadikan sebagai suatu

sediaan lepas lambat. Etosom memiliki ukuran bervariasi dari 10 nm hingga 1000 nm, bergantung pada metode pembuatan, komposisi dan teknik penggunaan alat seperti sonikator (Rakesh & Anoop 2012).

Etosom merupakan pembawa yang noninvasif dan dapat menghantarkan obat ke bagian dalam kulit atau hingga sirkulasi sistemik. Sifat deformabilitas yang tinggi diperoleh karena komponen penyusunnya adalah fosfolipid dan etanol. Fosfolipid merupakan bahan pembentuk vesikel dari sistem etosom. Fosfolipid yang dapat digunakan untuk membuat etosom cukup beragam, misalnya fosfatidilkolin (PC), PC terhidrogenasi ataupun fosfatidiletanolamin (PE) dengan rentang konsentrasi 0,5-10%. Fosfolipid dapat berasal dari telur, kacang kedelai, semi sintetik atau sintetik (Nandure *et al.* 2013).

Etosom bila dibandingkan dengan vesikel pembawa lainnya memiliki beberapa keunggulan : etosom dapat meningkatkan penetrasi dari suatu obat melalui kulit untuk tujuan dermal ataupun transdermal, dapat membawa molekul obat dengan sifat fisikokimia yang beragam, mulai dari senyawa yang hidrofilik, lipofilik ataupun amfifilik, komponen penyusunnya aman dan telah disetujui untuk digunakan pada sediaan farmasi dan kosmetik, dalam pengembangannya tidak ada risiko seperti profil toksikologi dari setiap komponen penyusun etosom. Umumnya etosom diberikan dalam bentuk sediaan semisolid (gel atau krim) sehingga meningkatkan kepatuhan pasien, dalam pemberiannya merupakan sistem noninvasif, pembuatan skala besar cukup mudah karena tidak memerlukan teknik pembuatan yang rumit (Rakesh & Anoop 2012).

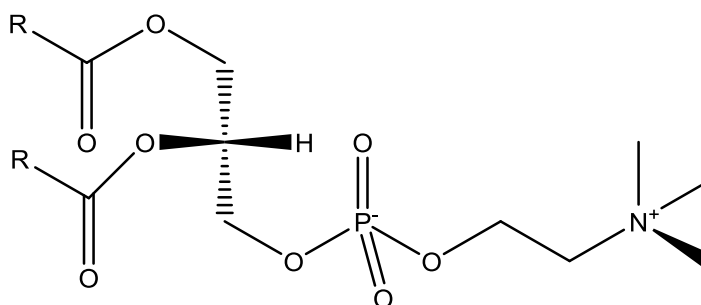
D. Komponen etosom

Etosom utamanya terdiri dari fosfatidilkolin, hidroalkohol dengan konsentrasi yang tinggi, dan air. Fosfatidilkolin yang digunakan dapat berupa fosfatidilkolin kedelai, fosfatidilkolin terhidrogenase, fosfatidilkolin dari telur, dipalmitat fosfatidilkolin, sedangkan alkohol dapat digunakan etanol, isopropil alkohol, propilen glikol dan transkutol (Cristina *et al.* 2010).

1. Fosfolipid

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

Fosfatidilkolin adalah senyawa bifungsional, bagian fosfatidil menjadi lipofilik dan bagian kolin bersifat hidrofilik. Fosfatidilkolin terdiri dari, kepala kolin dari molekul fosfatidilkolin mengikat senyawa ini sementara bagian fosfatidil terlarut lipid yang terdiri dari tubuh dan ekor yang kemudian menyelubungi bahan terikat *choline*. *Phytoconstituents* menghasilkan kompleks molekul lipid yang kompatibel dengan fosfolipid, yang juga disebut sebagai kompleks *phyto-phospholipid*. Molekul dilabuhkan melalui ikatan kimia ke kepala kolin polar dari fosfolipid, seperti yang dapat ditunjukkan dengan teknik spektroskopi spesifik (Bombardelli 1991).



Gambar 4. Struktur fosfatidilkolin

Struktur molekul fosfolipid mencakup kepala yang larut dalam air dan dua ekor yang dapat larut dalam lemak. Fosfatidilkolin memiliki kelarutan ganda, fosfolipid bertindak sebagai pengemulsi yang efektif dengan menggabungkan aksi pengemulsi fosfolipid dengan senyawa aktif dan terbentuk liposom serta memberikan bioavailabilitas yang secara dramatis ditingkatkan untuk obat terlarut lipid yang dijelaskan oleh penyerapan yang lebih cepat dan lebih baik pada saluran usus (Bombardelli *et al.* 1989).

2. Etanol

Konsentrasi utama dari etosom adalah alkohol (umumnya etanol) dalam konsentrasi tinggi yaitu 20-45%. Konsentrasi etanol yang tinggi di dalam formula memberikan karakteristik elastik, fleksibel dan stabilitas terhadap vesikel yang terbentuk. Etanol juga bisa menjadi peningkat daya penetrasi dari obat yang dibawa karena etanol dapat mengganggu struktur *lipid bilayer* pada kulit yang akan meningkatkan permeabilitas membran dan mengubah kemampuan melarutkan bahan dari *lipid bilayer* pada stratum korneum (Barry 2001). Alkohol yang digunakan dalam pembuatan etosom tidak hanya etanol melainkan dapat digunakan turunan glikol seperti propilen glikol. Propilen glikol digunakan dimaksudkan untuk meningkatkan penetrasi pada kulit (Nandure *et al.* 2013).

Etanol dengan kadar yang tinggi memiliki kekurangan yaitu dapat menyebabkan kulit kering, iritasi atau bahkan bisa menyebabkan kerusakan pada kulit, sehingga penggunaan etanol untuk sediaan etosom hanya di batasi dengan konsentrasi 20-45%.

E. Metode pembuatan etosom

Etosom dapat dibuat dengan menggunakan dua metode yang sangat sederhana yaitu metode panas dan metode dingin.

1. Metode panas

Metode panas, fosfolipid didispersikan dalam air yang dipanaskan hingga suhu 40⁰C menggunakan tangas air hingga terbentuk larutan koloid. Pada bejana terpisah etanol dan propilen glikol dicampur dan dipanaskan hingga 40⁰C. Pada saat campuran mencapai suhu 40⁰C, ditambahkan fase organik ke dalam air. Obat dilarutkan dalam etanol kemudian dituang pada bagian hidrofilik/ hidrofobik. Ukuran gelembung dari pembuatan etosom dapat disusut sesuai keinginan dengan menggunakan metode sonikasi (Akiladevi *et al.* 2010).

2. Metode dingin

Metode dingin paling umum digunakan dalam pembuatan etosom. Metode ini dilakukan dengan cara melarutkan fosfolipid, obat dan bahan lipid lainnya dengan menggunakan etanol dalam bejana tertutup pada suhu kamar, diaduk

dengan kuat menggunakan mixer. Propilen glikol atau poliol lainnya ditambahkan selama proses pengadukan. Campuran ini dipanaskan pada suhu 30°C menggunakan tangas air. Air yang dipanaskan hingga 30°C dalam bejana terpisah, ditambahkan ke dalam campuran kemudian diaduk selama 5 menit dalam bejana tertutup. Ukuran gelembung dari pembuatan etosom dapat disusut sesuai keinginan dengan penggunaan sonikasi (Akiladevi *et al.* 2010).

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).

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).

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).

Efek kimia pada ultrasonikasi ini 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 kavitasi 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).

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).

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 kavitas 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).

F. *Freeze drying*

Metode *freeze drying* (liofilisasi) merupakan metode yang sesuai untuk bahan sampel yang sensitif terhadap panas dan baik sekali digunakan dalam pengembangan farmasi. *Freeze drying* adalah salah satu metode pengeringan yang

mempunyai keunggulan dalam mempertahankan mutu hasil pengeringan, khususnya untuk produk-produk yang sensitif terhadap panas. Cara pengeringan ini semua bahan pada awalnya dibekukan, kemudian diperlakukan dengan suatu proses pemanasan ringan dalam suatu lemari hampa udara. Kristal-kristal es ini yang terbentuk. Selama tahap pembekuan, menyublim jika dipanaskan pada tekanan hampa yaitu, berubah secara langsung dari es menjadi uap air tanpa melewati fase cair. *Freeze drying* akan menghasilkan produk yang bersifat porous (mudah dilalui air) dengan perubahan yang sangat kecil terhadap ukuran dan bentuk bahan aslinya. *Freeze drying* menggunakan panas rendah, maka kerusakan karena panas juga kecil dibandingkan dengan cara-cara pengeringan lainnya. Produk yang bersifat porous dapat direhidrasi dengan cepat didalam air dingin (Gaman dan Sherrington 1981). *Freeze drying* memiliki prinsip lebih menitikberatkan pada proses penghilangan kandungan air dalam suatu bahan atau produk yang telah membeku tanpa melalui tahapan fase cair terlebih dahulu (Hariyadi 2013).

Proses *freeze drying* dengan alat *freeze dryer* ini berlangsung selama 18-24 jam, karena proses yang panjang inilah yang membuat produk-produk bahan alam ini menjadi lebih stabil dibandingkan dengan metode pengeringan yang lain seperti pengeringan semprot atau yang dikenal dengan *spray drying*. *Freeze drying* ini dapat meninggalkan kadar air sampai 1%, sehingga produk bahan alam yang dikeringkan menjadi stabil dan sangat memenuhi syarat untuk pembuatan sediaan farmasi dari bahan alam yang kadar airnya harus kurang dari 10% (Muchtadi & Sugiono 1992).

Freeze drying memiliki kelebihan pada hasil pengeringan yang dilakukan dapat mempertahankan stabilitas bahan dan tidak menyebabkan keriput pada permukaan bahan yang dikeringkan, dapat mempertahankan stabilitas produk tidak menyebabkan perubahan warna pada produk, dan mudah untuk melakukan penyegaran kembali setelah dikeringkan. Metode *freeze drying* ini akan menambah nilai jual yang cukup tinggi dibandingkan dengan produk sama yang dilakukan tanpa menggunakan pengeringan *freeze drying*. Pada proses

pengeringan freeze drying ini tahapan utamanya adalah pembekuan dan pengeringan (sublimasi) (Hariyadi 2013).

Proses pengeringan *freeze drying* ini memiliki ciri khas atau karakteristik berupa produk yang dihasilkan ringan, mudah disimpan ditempat non-refrigerator, dan sangat tahan terhadap lingkungan yang dapat menyebabkan tumbuhnya jamur, kapang dan sejenisnya. *Freeze drying* yang dilakukan pada saat suhu rendah ini juga menghasilkan produk yang lebih tahan lama dengan kualitas yang sama berupa warna dan tekstur khas dari produk (Hariyadi 2013).

Freeze drying menurut Muchtadi (1992), bahan yang dikeringkan terlebih dahulu dibekukan kemudian dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan tekanan rendah sehingga kandungan air yang banyak menjadi es akan langsung menjadi uap, yang dikenal dengan istilah sublimasi. Pengeringan menggunakan alat *freeze dryer* lebih baik dibandingkan dengan oven karena kadar airnya lebih rendah. Pengeringan menggunakan alat *freeze dryer* lebih aman terhadap resiko terjadinya degradasi senyawa dalam ekstrak. *Freeze drying* menggunakan suhu rendah.

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 memperoleh 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 (Tetrsari 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 (Anonim 1994).

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

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

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

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

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

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).

H. Analisis dan Karakterisasi Etosom

1. PSA (Particle Size Analyzer)

Metode yang paling umum digunakan untuk analisa gambar (mikrografi), meliputi metode mikroskopi dan metode holografi. Alat yang sering digunakan biasanya SEM, TEM dan AFM. Metode yang dikembangkan berkembangnya

ilmu pengetahuan yang lebih mengarah ke era nanoteknologi, para peneliti mulai menggunakan *Laser Diffraction* (LAS). Metode ini dinilai lebih akurat untuk analisis bila dibandingkan dengan metode analisis gambar maupun metode ayakan (*sieve analyses*), terutama untuk sample-sampel dalam orde nanometer maupun submikron. Contoh alat yang menggunakan metode LAS adalah *Particle Size Analyzer* (PSA). Alat ini menggunakan prinsip *Dynamic Light Scattering* (DLS). Metode ini juga dikenal sebagai *Quasi-Elastic Light Scattering* (QELS). Alat ini berbasis *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS). Metode LAS bisa dibagi dalam dua metode :

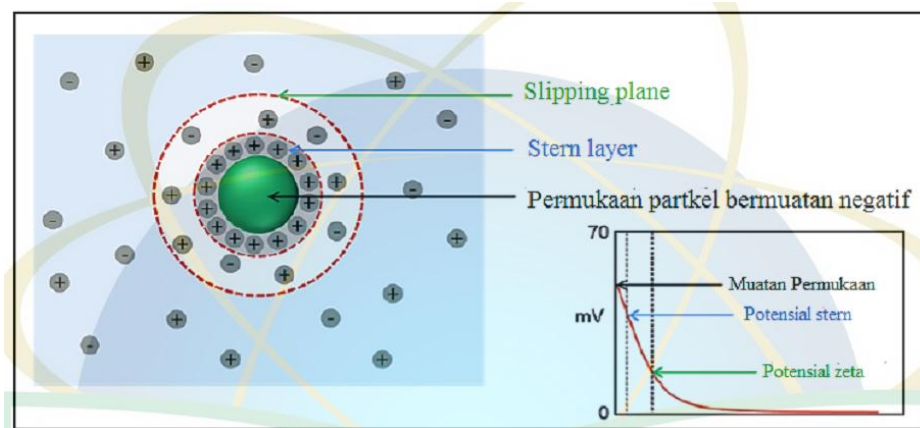
- a. Metode basah : metode ini menggunakan media pendispersi untuk mendispersikan material uji.
- b. Metode kering : metode ini memanfaatkan udara atau aliran udara untuk melarutkan partikel dan membawanya ke *sensing zone*. Metode ini baik digunakan untuk ukuran yang kasar, dimana hubungan antarpartikel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

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

2. Zeta potensial

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



Gambar 5. 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. 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).

Perlekatan antara nanopartikel dengan membran sel juga terpengaruh oleh muatan permukaan partikel. Nanopartikel dengan muatan permukaan tinggi sangat terikat pada membran sel dan menunjukkan serapan seluler tinggi, di mana interaksi elektrostatik antara membran anionik dan nanopartikel kationik memfasilitasi penyerapan tersebut. Adsorpsi nanopartikel pada membran sel, penyerapan terjadi melalui beberapa mekanisme yang mungkin seperti pinositosis, endositosis dan fagositosis. Senyawa kationik juga dapat memiliki efek positif pada permeasi kulit, dimana komponen penyusun jaringan kulit seperti fosfatidilkolin dan karbohidrat yang ditemukan di sel mamalia 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 fosfatidil serin, 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).

3. SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

SEM adalah 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 relative luas memungkinkan pengamatan mudah fokus pada daerah spesimen untuk dilihat pada perbesaran rendah (Stevens 2001).

SEM berbeda dengan TEM memiliki perbedaan pada suatu 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 dengan menggunakan SEM, terbatas pemakaiannya, tetapi memberikan informasi yang bermanfaat mengenai topologi permukaan dengan resolusi sekitar 100 Å (Stevens 2001).

4. Efisiensi Penjerapan

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

- a. **Dialysis.** Dispersi cairan etosom didialisis dalam tabung dialysis dengan menggunakan buffer fosfat atau normal saline atau larutan glukosa.

- b. **Gel Filtration.** Obat yang tidak terjerap dihilangkan dari etosom menggunakan filtrasi gel melalui kolom sephadex-G-50 dan dielusi dengan buffer garam fosfat atau normal salin.
- c. **Sentrifugasi.** Etosom disentrifugasi dan supernatan dipisahkan. Pellet yang diperoleh dicuci kemudian disuspensikan kembali untuk mendapatkan etosom yang bebas dari obat terjerap. Efisiensi penjerapan vesikel ditentukan dengan memisahkan obat bebas dari vesikel penjerap obat dengan menggunakan teknik ultrasentrifugasi. Etosom disentrifugasi selama 50 menit pada 50.000 rpm dan suhu 4⁰ 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 fisein yang terdapat dalam formula dan FD adalah jumlah senyawa fisetin yang terdeteksi pada supernatan (tidak terjerap).

I. Landasan Teori

Fisetin adalah flavonoid tanaman bioaktif penting besar sebagai obat terapi untuk berbagai radikal bebas yang dimediasi serta penyakit lainnya (Sengupta *et al.* 2005). Fisetin juga dilaporkan menurun risiko kardiovaskular oleh ameliorating hati steatosis dan dengan menurunkan sirkulasi konsentrasi glukosa. Fisetin digunakan sebagai senyawa aktif obat yang siap digunakan, masih sangat sedikit karena masalah kelarutan dan laju disolusi senyawa ini di dalam air. Fisetin praktis tidak larut dalam air, tetapi mudah larut dalam etanol, metanol, aseton dan DMF. Fisetin bersifat tidak stabil terhadap pemanasan. Fisetin termasuk dalam BCS kelas II dimana fisetin memiliki kelarutan yang rendah dan permeabilitasnya yang tinggi, dengan data kelarutan sekitar 0,002 mg/ml serta data bioavalabilitas 10-44% (Odeh *et al.* 2011) .

Etosom merupakan pembawa yang noninvasif dan dapat menghantarkan obat ke bagian dalam kulit atau hingga sirkulasi sistemik. Sifat deformabilitas yang tinggi diperoleh karena komponen penyusunnya adalah fosfolipid, etanol serta kolesterol. Fosfolipid merupakan bahan pembentuk vesikel dari sistem etosom. Fosfolipid yang dapat digunakan untuk membuat etosom cukup beragam, misalnya fosfatidilkolin (PC), PC terhidrogenasi ataupun fosfatidiletanolamin (PE) dengan rentang konsentrasi 0,5-10%. Fosfolipid dapat berasal dari telur, kacang kedelai, semi sintetik atau sintetik. Etanol merupakan komponen etosom yang memiliki kemampuan dapat meningkatkan penetrasi kedalam kulit pada sistem pembawa etosom (Nandure *et al.* 2013).

Metode dalam pembuatan etosom ada dua yaitu, metode panas dan dingin. Perbedaan dari kedua metode tersebut hanya pada suhu yang digunakan selama proses pembuatan etosom. Metode panas menggunakan suhu 40⁰C, sedangkan metode dingin menggunakan suhu 30⁰C. Metode dingin sering digunakan karena penggunaan suhu yang tidak terlalu tinggi sehingga menghindari penguapan pelarut. Ukuran gelembung dari pembuatan etosom dapat disusut sesuai keinginan dengan penggunaan sonikasi (Akiladevi *et al.* 2010).

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 50-1000 nm dan stabil pada periode waktu tertentu (Muller *et al.* 2000). Potensial zeta diukur dengan menggunakan zetasizer. Potensial zeta mempunyai aplikasi praktis dalam stabilitas sistem yang mengandung partikel-partikel terdispersi, karena potensial ini mengatur derajat tolak-menolak antara partikel-partikel terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan (Sinko 2012). Besarnya potensi zeta dapat memprediksi stabilitas koloid. Nanopartikel dengan nilai Potensial Zeta lebih

besar dari +25 mV atau kurang dari -25 mV biasanya memiliki derajat stabilitas tinggi. Dispersi dengan nilai potensial zeta rendah akan menghasilkan agregat karena atraksi *Van Der Waals* antar-partikel (Ronson 2012).

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

J. Hipotesis

1. Fisetin etosom dapat dibuat dengan menggunakan metode dingin-sonikasi.
2. Variasi konsentrasi etanol memiliki pengaruh terhadap ukuran partikel dan efisiensi penjerapan fisetin etosom.
3. Profil karakterisasi fisetin seperti ukuran partikel, efisiensi penjerapan, serta morfologi dapat diketahui setelah dibuat sediaan etosom.
4. Fisetin etosom dapat stabil selama proses penyimpanan.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan unit atau individu dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi sampel yang digunakan adalah mikrokristal fisetin (Sigma Aldrich, USA). Ukuran kisaran mikron yang telah terjamin kemurniaannya, yang dibuat dengan komponen lipid fosfatidilkolin.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari populasi yang ingin diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan ciri-ciri dan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah mikrokristal fisetin murni yang dibuat etosom fisetin dengan komponen lipid fosfatidilkolin dan etanol dengan berbagai variasi konsentrasi tertentu.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung. Variabel utama dalam penelitian ini adalah formula dari etosom fisetin yang dibuat dengan fosfatidilkolin dan etanol dengan berbagai variasi konsentrasi.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah karakteristik, stabilitas dan mutu fisik dari etosom fisetin (ukuran partikel).

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah metode pembuatan etosom fisetin (alat dan lama sonikasi).

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan dalam berbagai variabel, antara lain variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas yaitu variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung yaitu konsentrasi etanol yang digunakan dalam pembuatan fisetin etosom.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian ini yaitu karakterisasi etosom fisetin yaitu ukuran partikel, zeta potensial, analisis morfologi dan efisiensi penjerapan.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat yaitu proses pembuatan etosom fisetin dengan metode dingin-sonikasi

3. Definisi operasional variabel utama

Zat aktif fisetin dengan proposi fosfatidilkolin dan etanol. Menentukan ukuran partikel pada etosom fisetin yaitu kurang dari 1000 nm. Ukuran partikel merupakan uji untuk mengetahui ukuran partikel dari etosom fisetin yang dibuat. Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas dari etosom fisetin. Pengukuran ukuran partikel dilakukan dengan alat PSA.

Zeta potensial merupakan prediktor yang baik dari fenomena glasi karena potensial zeta mengatur derajat tolak-menolak antara partikel-partikel yang terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan. Potensial zeta merupakan uji untuk mengetahui dan mengkarakterisasi sifat muatan permukaan partikel yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Potensial zeta mencerminkan potensi muatan dari partikel dan dipengaruhi oleh komposisi dari partikel dan medium tempat nanopartikel terdispersi. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Zeta Analyzer*.

Analisis morfologi merupakan analisis yang digunakan untuk membandingkan bentuk dan morfologi fisetin standar dengan etosom yang mengandung fisetin. Analisis morfologi dilakukan dengan menggunakan SEM.

Efisiensi penjerapan merupakan analisis yang digunakan untuk mengetahui zat aktif yang terjerap dalam sistem pembawa etosom dengan cara melakukan sentrifugasi etosom kemudian pellet di ukur dengan alat spektrofotometer UV-Vis dan dihitung sebagai obat yang tidak terjerap.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fisetin (Shaanxi Dideu Medichem Co. Ltd, Cina), etanol (*Merk*), fosfatidilkolin (*Sigma Aldrich*), aquadest (*Merk*).

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat untuk memperkecil ukuran partikel *homogenizer sonicator* (QSonica, newtown, U.S.A), alat uji ukuran partikel dan zeta potensial *particle size analyzer* (Malvern), *magnetic stirrer* (Thermo Scientific, China), *sentrifuge* (SPLC Series, Gemmy 8 Hole, Taiwan), pH meter (Eutech Instruments, Ecoscan hand-held series, Singapura), *Scanning Electron Microscopy* (JEOL, JSM-6360 LA), Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10s, Thermo scientific), timbangan analitik (Ohaus), alat-alat gelas alat (Pyrex, Jepang) dan non gelas yang terdapat di laboratorium.

D. Jalannya Penelitian

1. Percobaan pendahuluan

Percobaan pendahuluan dilakukan untuk menentukan kondisi percobaan terbaik dan komposisi bahan yang sesuai untuk menghasilkan sediaan etosom fisetin yang stabil dan homogen dengan menggunakan metode sonikasi (Suryani 2014 & Atmaram 2014).

Tabel 1. Komposisi formula etosom fisetin

Komposisi	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
Fisetin (mg)	10	10	10	10
Fosfatidilkolin (mg)	75	75	75	75
Etanol	25%	30%	35%	40%
Air ad	10	10	10	10

2. Pembuatan fisetin etosom

2.1 Metode Dingin. Dalam metode ini sebanyak 75 mg fosfatidilkolin dilarutkan dengan etanol sebagai campuran 1, fisetin 10 mg dilarutkan dengan etanol sebagai campuran 2. Campuran fosfatidilkolin dan campuran fisetin digabungkan menjadi satu kemudian di tambah dengan etanol sampai tanda batas dalam bejana tertutup pada suhu kamar, diaduk dengan kuat menggunakan mixer.

Selanjutnya, campuran ini dipanaskan pada suhu 30⁰C menggunakan tangas air. Kemudian memanaskan air hingga suhu 30⁰C dalam bejana terpisah, ditambahkan ke dalam campuran ad 10 ml. Diaduk selama 5 menit dalam bejana tertutup. Ukuran gelembung dari pembuatan etosom dapat disusut sesuai keinginan dengan penggunaan sonikasi *bath* (Akiladevi *et al.* 2010).

2.2 Metode Panas. Dalam metode ini sebanyak 75 mg fosfatidilkolin dilarutkan dengan etanol sebagai campuran 1, fisetin 10 mg dilarutkan dengan etanol sebagai campuran 2. Campuran fosfatidilkolin dan campuran fisetin digabungkan menjadi satu kemudian di tambah dengan etanol sampai tanda batas dalam bejana tertutup pada suhu kamar, diaduk dengan kuat menggunakan mixer. Selanjutnya, campuran ini dipanaskan pada suhu 40⁰C menggunakan tangas air. Kemudian memanaskan air hingga suhu 40⁰C dalam bejana terpisah, ditambahkan ke dalam campuran ad 10 ml. Diaduk selama 5 menit dalam bejana tertutup. Ukuran gelembung dari pembuatan etosom dapat disusut sesuai keinginan dengan penggunaan sonikasi *bath* (Akiladevi *et al.* 2010).

3. Karakterisasi fisetin etosom

3.1 Penetapan distribusi ukuran partikel dan potensial zeta. Untuk mengetahui ukuran sediaan nanopartikel dilakukan pengukuran ukuran dan distribusi nanopartikel menggunakan alat PSA. Untuk mengetahui nilai potensial zeta diukur menggunakan *zeta potensial analyzer*.

3.2 Pengujian morfologi etosom. Penentuan bentuk partikel etosom dilakukan menggunakan mikroskop Nikon E50iPol, dipindai menggunakan Nikon DS-Fil dan ditampilkan dengan digital *sight* DS-U2. Dilakukan pencitraan morfologi SEM dengan cara sampel diberi lapisan menggunakan arus pada posisi 6-7,5 mA, tegangan 1,2 kV selama 4 menit.

4. Efisiensi penjerapan.

Etosom disentrifugasi dan supernatan dipisahkan. Pellet yang diperoleh dicuci kemudian disuspensikan kembali untuk mendapatkan etosom yang bebas dari obat terjerap. Etosom disentrifugasi selama 50 menit pada 50.000 rpm 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).

4.1 Pembuatan Larutan Induk. Pembuatan larutan induk fisetin dengan konsentrasi 100 ppm dibuat dengan cara menimbang sejumlah 10 mg serbuk fisetin murni, dilarutkan dalam 10 ml etanol 96%, di masukan dalam labu takar 100 ml, dan ditambahkan *dapar phosphate* Ph 6,5 sampai tanda batas (El-Gawad *et al.* 2014).

4.2 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum. Larutan induk fisetin dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan dengan nilai serapan yang paling tinggi (El-Gawad *et al.* 2014).

4.3 Penetapan *Operating Time*. Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui kestabilan suatu senyawa. Pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk fisetin pada panjang gelombang maksimum fisetin, dibaca mulai dari menit ke 0 sampai menit didapatkan nilai serapan yang stabil.

4.4 Pembuatan Larutan Seri Kurva Kalibrasi. Seri konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm, kemudian masing-masing diencerkan sampai tanda batas dengan larutan dapar. Seri larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum fisetin, dibuat kurva regresi linear antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi fisetin sehingga diperoleh persamaan *regresi linear* yang selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar fisetin dalam uji efisiensi penjerapan (El-Gawad *et al.* 2014).

5. Verifikasi Metode Analisis

5.1 Linearitas. Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan induk fisetin dalam pelarut etanol 96% dan dapar fosfat Ph 6,5 yaitu 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm pada gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat persamaan garis regresi linear dan ditentukan koefisien korelasi (nilai r). Hasil ini selanjutnya digunakan untuk menentukan linearitas.

5.2 Penentuan LOD dan LOQ. Batas deteksi dan batas kuantifikasi penetapan kadar obat fisetin ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

dengan membuat lima seri konsentrasi dibawah konsentrasi terkecil uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai b (*slope*) pada persamaan regresi linier $y=a+bx$, sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x). Batas deteksi dan kuantifikasi dapat ditentukan dengan persamaan :

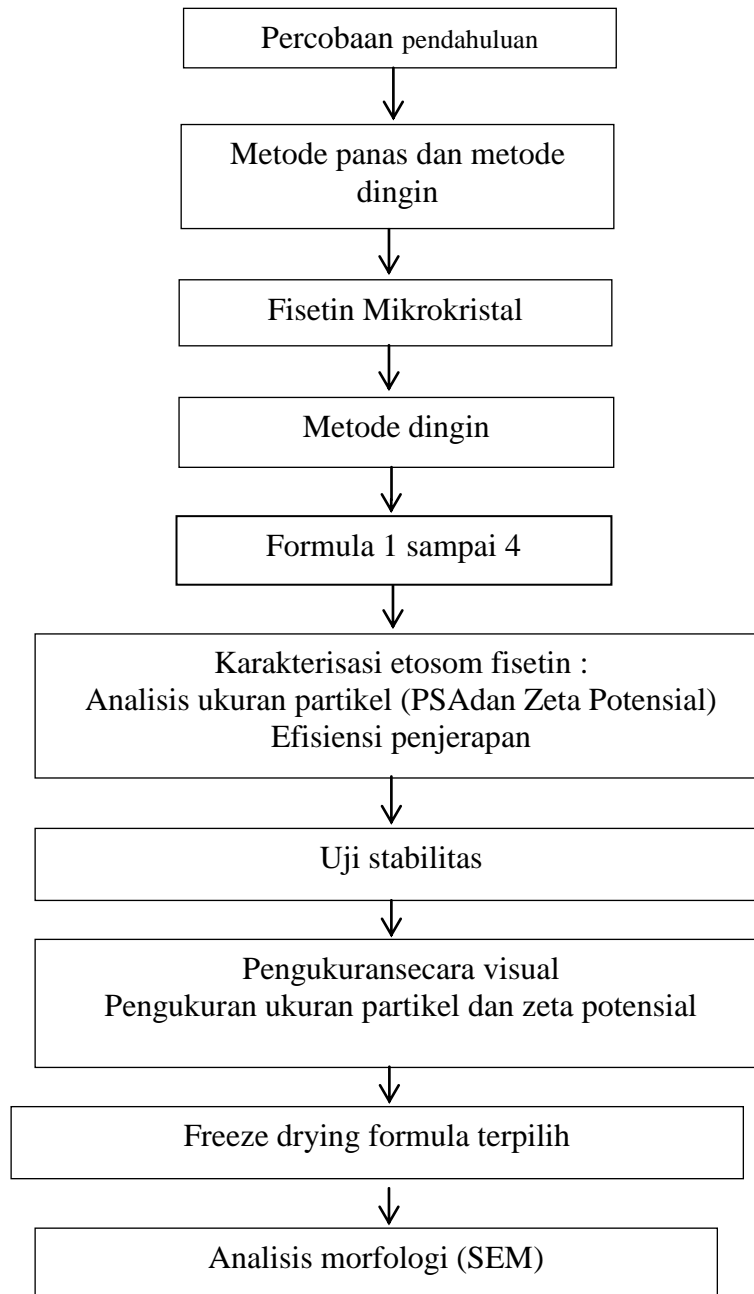
$$LOQ = \frac{10 Sy/x}{b} \dots\dots\dots 1$$

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

E. Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan untuk mengetahui suatu data terhadap terjadinya kesalahan dalam penelitian, penyimpangan dari aturan baku yang sudah ditentukan. Analisis hasil suatu pengujian yang mengacu pada parameter dapat dilakukan dengan cara, data yang diperoleh dari penelitian dilakukan analisis dan dilihat kesesuaian dengan persyaratan baku yang telah menjadi ketentuan dari sediaan etosom fisetin, misalnya pengacuan data hasil pengujian dengan referensi secara teori yang ada, dengan demikian hasil penelitian dengan referensi teori tersebut dibandingkan satu sama lainnya. Pengacuan terhadap referensi teori dilakukan untuk menghindari adanya kesalahan dalam penelitian.

F. Skematis Jalannya Penelitian



Gambar 6. Skema jalannya penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Percobaan Pendahuluan

Pembuatan etosom fisetin dilakukan dengan menggunakan metode dingin-sonikasi sehingga didapatkan sediaan etosom yang homogen dengan ukuran partikel yang masih dalam ukuran nanometer yaitu 10-1000 nm. Pada awal penelitian dilakukan percobaan pendahuluan yang bertujuan untuk mengetahui kondisi percobaan dan metode terbaik yang dapat menghasilkan etosom yang stabil dan homogen. Percobaan pendahuluan ini, metode percobaan yang perlu diperhatikan adalah pemilihan metode pembuatan etosom yaitu antara metode panas dan metode dingin serta kondisi percobaan pendahuluan waktu penggunaan sonikator *bath*. Etosom dibuat dengan cara metode dingin menggunakan *magnetic stirrer* dan kemudian diperkecil ukuran partikel dengan menggunakan sonikasi *bath* selama 1 jam untuk mendapatkan ukuran etosom yang masuk dalam *range* nano dan didapatkan etosom yang stabil dan homogen.

Percobaan pendahuluan dilakukan antara metode panas dan metode dingin, metode yang terpilih adalah metode dingin karena pada metode ini menggunakan suhu yang tidak terlalu besar sehingga mengurangi penguapan etanol sehingga konsentrasi etanol tetap terjaga. Percobaan pendahuluan juga dilakukan pada waktu penggunaan sonikasi, penggunaan sonikasi *bath* memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan sonikasi *probe*. Perbedaan antara sonikasi *bath* dan *probe* terletak pada posisi sampel, untuk sonikasi *bath* sampel perlu ditempatkan pada wadah sedangkan untuk sonikasi *probe* sampel langsung bereaksi dengan alat. Sampel yang berbeda posisi akan berpengaruh pada lamanya sonikasi dan ukuran partikel yang dihasilkan. Ukuran partikel yang diinginkan semakin kecil maka penggunaan sonikator *bath* membutuhkan waktu yang lama.

B. Pembuatan etosom fisetin

Etosom fisetin telah berhasil dibuat dengan metode dingin-sonikasi. Metode ini dilakukan dengan cara fisetin dilarutkan dalam pelarut etanol pada

bejana tertutup, fosfatidilkolin dilarutkan dengan etanol pada bejana tertutup, campuran fisetin dan fosfatidilkolin dicampur dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Campuran dipanaskan dengan suhu 30°C menggunakan *magnetic stirrer* dan ditambah air dengan suhu 30°C. Campuran diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 5 menit. Campuran tersebut akan membentuk etosom setelah dilakukan pengadukan.

Etosom yang sudah jadi kemudian dilakukan sonikasi dengan menggunakan sonikasi *bath* selama 1 jam yang berfungsi untuk memperkecil ukuran partikel agar masuk dalam ukuran nano yaitu 10 hingga 1000 nm. Penggunaan sonikasi *bath* menjadi pilihan karena sampel yang dianalisis memiliki volume yang kecil. Penggunaan suhu yang tidak terlalu tinggi pada alat sonikasi *bath* dimaksudkan agar zat aktif dalam hal ini fisetin tidak rusak karena fisetin memiliki sifat yang tidak stabil terhadap panas.

C. Karakterisasi etosom fisetin

1. Penetapan ukuran partikel dan zeta potensial

Ukuran partikel sangat penting dalam sistem nanopartikel. Ukuran partikel etosom fisetin diukur dengan menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*).

Tabel 2. Hasil penetapan ukuran partikel dan zeta potensial

Formula	Rata-rata ±SD	Indeks polidispersitas ± SD	Zeta potensial ±SD
1	271,867 ± 10,258	0,533 ± 0,065	-6,810 ± 0,197
2	235,067 ± 10,777	0,459 ± 0,023	-5,940 ± 0,073
3	402,800 ± 3,906	0,341 ± 0,026	-1,367 ± 0,366
4	196,733 ± 0,368	0,221 ± 0,005	-1,392 ± 0,5373

Ukuran partikel yang diinginkan bergantung dengan lamanya penggunaan sonikator *bath* dan konsentrasi etanol. Waktu sonikator yang lama akan membuat ukuran partikel semakin kecil, dan konsentrasi etanol yang semakin tinggi membuat nilai efisiensi penjerapan etosom semakin tinggi karena etanol pada konsentrasi yang tinggi memiliki daya mengikat zat aktif tinggi.

Hasil pengukuran partikel etosom fisetin terlihat pada semua formula 1 hingga formula 4 menunjukkan pada ukuran nanopartikel yaitu 10-1000 nm. Penggunaan konsentrasi etanol tertinggi pada etosom menghasilkan ukuran partikel

yang lebih kecil dibandingkan formula dengan konsentrasi etanol yang lebih rendah. Pada formula 4 dengan konsentrasi etanol tertinggi memiliki ukuran partikel yang lebih kecil dibandingkan dengan formula yang lain yaitu pada nilai 100 nm. Keseragaman ukuran partikel dapat diketahui dengan indeks polidispersitas. Nilai indeks polidispersitas terbaik yaitu pada angka dibawah 0,5 atau sekecil mungkin untuk menjamin homogenitas sediaan. Semakin nilai indeks polidispersitas semakin kecil maka stabilitas etosom semakin terjamin. Pada tabel terlihat nilai indeks polidispersitas yang dihasilkan mendekati 0, yaitu pada formula 4 dengan nilai indeks polidispersitas 0,2. Nilai indeks polidispersitas yang semakin kecil maka dikatakan sediaan memiliki ukuran yang homogen dengan partikel lainnya, hal ini menunjukkan bahwa etosom fisetin homogen.

Potensial zeta adalah ukuran umum dari besarnya muatan elektrostatik 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. Nilai zeta potensial yang menunjukkan muatan antar partikel, terlihat pada tabel bahwa partikel etosom fisetin memiliki muatan (-) sehingga terjadi tolak-menolak antar partikel sehingga tidak cepat terjadi aglomerasi menjadi partikel yang lebih besar. Formula terbaik dari keempat formula itu dapat dilihat pada formula 4 yaitu dengan ukuran partikel 100 an nm dengan indeks polidispersitas yang paling kecil 0,2 sehingga formula 4 bisa dikatakan homogen dan untuk menjamin stabilitas.

C. Stabilitas Etosom Fisetin Dalam Penyimpanan

1. Pengamatan secara visual

Pengujian stabilitas dilakukan dengan cara menyimpan semua formula etosom pada suhu kamar selama 4 minggu. Tujuan dari penggunaan suhu kamar adalah penyimpanan yang cocok dan terbaik untuk fisetin adalah pada suhu kamar karena sifat dari fisetinnya yang tidak tahan terhadap panas. Penyimpanan pada suhu kamar dilakukan untuk menjamin kestabilan etosom jika disimpan pada suhu kamar.

Tabel 3. Stabilitas etosom fisetin pada suhu kamar

Formula	Minggu ke 1	Minggu ke 2	Minggu ke 3	Minggu ke 4
1	-	+	+	+
2	-	+	+	+
3	-	+	+	+
4	-	-	-	-

Ket. Formula 1(etanol 25%), formula 2 (etanol 30%), formula 3 (etanol 35%), formula 4 (etanol 40%). Negatif (-) tidak ada endapan, positif (+) ada endapan.

Etosom fisetin untuk semua formula disimpan pada suhu kamar selama 4 minggu. Pada minggu ke-1 etosom fisetin yang disimpan dalam suhu kamar tidak timbul endapan untuk semua formula sedangkan pada minggu ke-2 sampai ke-4 terbentuk endapan untuk formula 1 hingga formula 3 dalam jumlah sedikit dan konstan. Hal ini karena kenaikan suhu akan meningkatkan energi kinetis dari partikel-partikel, sehingga memudahkan penggabungan antar partikel (beraglomerasi), suhu penyimpanan tidak sesuai menyebabkan rusaknya gerak brown. Endapan pada etosom fisetin bersifat reversible sehingga dapat dengan mudah terdispersi kembali dengan dilakukan penggojogan.

Gerak brown adalah gerak tidak beraturan atau gerak acak atau gerak zig-zag partikel koloid. Hal ini terjadi karena adanya benturan tidak teratur dari partikel koloid dengan medium pendispersi. Gerak brown ini akan membuat partikel koloid terhindar dari pengendapan karena terus menerus bergerak (Wanibesak 2011). Endapan yang terjadi bersifat reversible karena dapat terdispersi kembali setelah dilakukan pengocokan. Formula 4 tidak terbentuk endapan hingga minggu ke 4.

D. Penetapan ukuran partikel dan zeta potensial setelah penyimpanan

Uji stabilitas setelah penyimpanan dilakukan pada suhu kamar selama 4 minggu. Tujuan penggunaan suhu kamar adalah sifat dari fisetin yang tidak tahan terhadap pemanasan sehingga uji stabilitas dilakukan pada suhu kamar agar terjamin stabilitas fisetin etosom. Uji stabilitas meliputi ukuran partikel, indeks polidispersitas dan zeta potensial. Uji stabilitas dilakukan pada formula terpilih yaitu pada formula yang memiliki ukuran partikel terkecil diantara semua formula, jernih, dan memiliki nilai indeks polidispersitas yang terbaik.

Tabel 4. Ukuran partikel setelah penyimpanan

Formula	Ukuran partikel (nm)	Indeks polidispersitas	Zeta potensial (mV)
4	506,94	0,37	-1,467

Uji stabilitas dilakukan pada formula 4 dengan ukuran partikel 506,94 nm dan indeks polidispersitas sebesar 0,37 dengan nilai zeta potensial -1,467 mV. Formula 4 dari tabel diatas dikatakan stabil dengan ukuran partikel yang masih dalam ukuran nanometer dengan nilai indeks polidispersitas rendah.

E. Penetapan Efisiensi Penjerapan

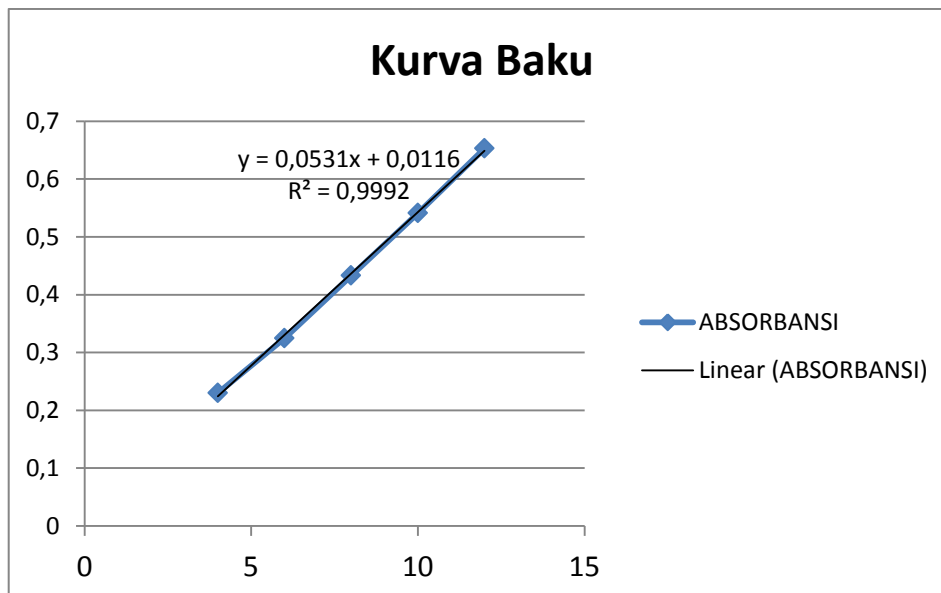
1. Penentuan kurva kalibrasi

1.1 Penentuan panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara 10 mg serbuk fisetin dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 10 ml dalam labu takar, selanjutnya ditambahkan dengan dapar fosfat ph 6,5 sampai tanda batas, selanjutnya larutan baku diuji dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm sampai didapatkan absorbansi yang stabil dan konstan. Serapan fisetin terbesar didapatkan pada panjang gelombang 361 nm dengan nilai serapan, sehingga bisa dikatakan panjang gelombang fisein pada 361 nm.

1.2 Penentuan *operating time*. Penentuan *operating time* bertujuan untuk melihat kestabilan reaksi suatu senyawa yang dianalisis. Larutan yang stabil ditunjukkan dengan serapan yang tidak berubah pada waktu tertentu, pengujian dilakukan dengan membaca larutan induk fisetin pada gelombang maksimum fisetin, dibaca mula dari menit 0 sampai menit 30 didapatkan nilai serapan yang stabil yaitu 6-8 menit pada medium dapar fosfat ph 6,5 dengan besar serapan secara berturut-turut.

1.3 Kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi fisetin dengan medium dapar fosfat ph 6,5 dan etanol dilakukan dengan kosentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dengan 3 kali pembacaan. Seri kosentrasi larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum fisetin kemudian dibuat kurva regresi linier antara kosentrasi (ppm) dan

absorbansi fisetin sehingga diperoleh persamaan *regresi linier*. Terlihat pada gambar.8



Gambar 7. Kurva kalibrasi

Dimana didapatkan nilai $a = 0,0116$, nilai $b = 0,0531$, nilai $r = 0,9992$. Didapatkan persamaan $y = 0,0531x + 0,0116$. Hasil persamaan regresi linier dengan pelarut dapar fosfat ph 6,5 yang diperoleh yaitu $y = 0,0531x + 0,0116$ dengan koefisien korelasi 0,9992. Dari data didapatkan nilai r sebesar 0,9992 maka data dinyatakan bagus karena nilai r mendekati 1 sehingga data dapat dipakai untuk analisis.

Tabel 5. Efisiensi penjerapan dan jumlah obat yang terjerap

Formula	Absorbansi	Efisiensi penjerapan	Jumlah yang terjerap (mg)
1	0,630	88,360%	8,836
2	0,354	93,460%	9,346
3	0,536	90,130%	9,013
4	0,370	93,250%	9,325

Efisiensi penjerapan digunakan untuk mengetahui % obat yang terjerap dalam sistem pembawa etosom. Obat yang tidak terjerap dapat dihilangkan atau dipisahkan dengan berbagai teknik pemisahan salah satunya sentrifugasi. Etosom disentrifugasi dengan menggunakan alat sentrifugasi selama 50 menit pada

kecepatan 50.000 rpm dan suhu kamar dengan tujuan untuk memisahkan obat yang tidak terjerap. Etosom disentrifugasi dan supernatan dipisahkan. Jumlah obat bebas (FDO) ditentukan pada supernatan. Supernatan hasil sentrifugasi ditetapkan kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Pham *et al.* 2012). Absorbansi pada spektrofotometer dimasukkan pada rumus.

Dari semua formula didapatkan rata-rata nilai efisiensi penjerapan obat sekitar 80-90% dengan jumlah obat yang terjerap sekitar 8-9 mg dengan total setiap formula 10 mg. Dari kelima formula terlihat formula 2 dan 4 yang memiliki efisiensi terbesar dibandingkan formula yang lain. Formula 2 dengan efisiensi penjerapan 93,46% setara dengan 9,346 mg dari total 10 mg, sedangkan formula 4 memiliki efisiensi penjerapan sebesar 93,25% setara dengan 9,325 mg dari total 10 mg. Dari keempat formula yang memiliki efisiensi penjerapan terkecil yaitu pada formula 1 sebesar 88,36% setara dengan 8,36 mg dari total 10 mg. Hal ini dikarenakan penggunaan konsentrasi etanol terendah pada formula 1. Semakin rendah konsentrasi etanol maka efisiensi penjerapan obat semakin kecil dikarenakan obat akan susah, sebaliknya efisiensi penjerapan besar pada konsentrasi etanol yang besar karena kekuatan etanol dalam mengikat obat semakin besar. Faktor lain yaitu pada kelarutan fisetin, fisetin larut dengan etanol konsentrasi tinggi. Semakin tinggi efisiensi penjerapan maka efek yang ditimbulkan dan kadar obat yang didapatkan semakin tinggi. Dari hasil diatas terdapat penyimpangan data pada formula 2 dan 3 dikarenakan tidak tepat pada saat pengaturan waktu pencampuran.

F. Verifikasi metode analisis

1. Linieritas

Linieritas adalah kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Koefisien korelasi adalah parameter yang paling umum digunakan untuk mengetahui linieritas suatu metode. Nilai koefisien relasi merupakan indikator kualitas dari parameter linieritas yang menggambarkan respon analitik (luas area) terhadap konsentrasi yang diukur (Anonim 1994). Hasil validasi metode

analisis menunjukkan bahwa serapan lebih dari 99% dipengaruhi oleh konsentrasi fisetin, ditunjukkan dari nilai koefisien determinasi (r^2) 0,9992. Nilai koefisien relasi yang dipersyaratkan oleh Association of Official Analytical Chemists (AOAC) adalah $> 0,99$, menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proporsional antara respon analitik dengan konsentrasi yang diukur.

2. Penentuan Limit of detection (LOD) dan Limit of Quantitation (LOQ)

Batas deteksi LOD didefinisikan sebagai konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi namun tidak perlu secara kuantitatif, sedangkan definisi LOQ dikatakan sebagai konsentrasi terkecil analit yang dapat diukur secara kuantitatif. Statistik perhitungan LOD dan LOQ diperoleh melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. LOD dan LOQ menunjukkan kesensitifan dari suatu metode, semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin sensitif metode yang digunakan (Harvey 2000)

Penentuan LOD dihitung berdasarkan standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (slope) kurva baku pada level yang mendekati LOD sesuai dengan rumus, standar deviasi dapat ditentukan berdasarkan intersep y pada garis regresi linier (Gandjar & Rohman 2012)

Penentuan LOD dan LOQ. Hasil verifikasi metode analisis ditunjukkan pada Tabel 7.

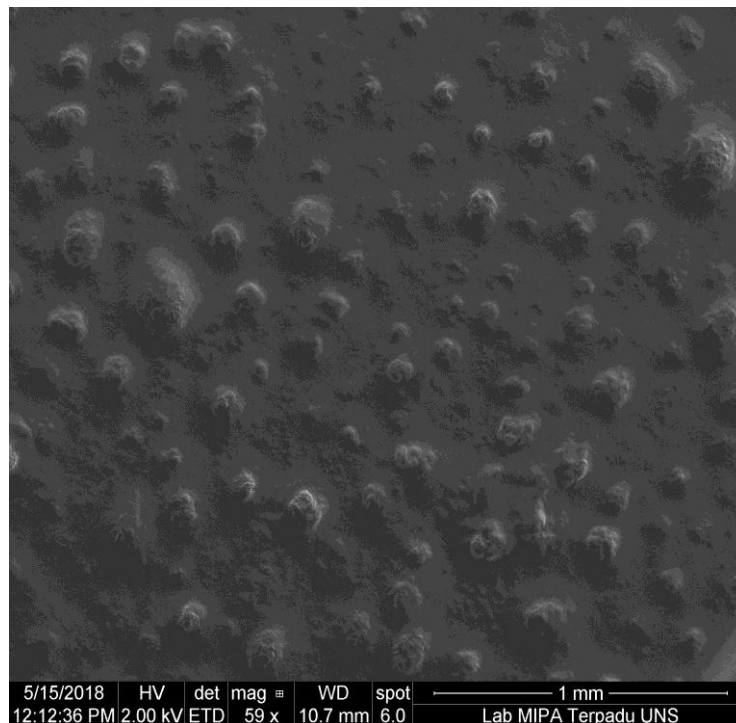
Tabel 6. Parameter verifikasi metode analisis kurva kalibrasi fisetin

Parameter	Hasil
R	0,9992
Batas deteksi (LOD)	0,0297
Batas kuantifikasi (LOQ)	0,0666

Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dilakukan dengan metode perhitungan yaitu berdasarkan standar deviasi respon dan kemiringan (slope) kurva baku. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blanko pada standar deviasi residual garis regresi linier atau standar deviasi intersep-y pada garis regresi. Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi (Gandjar & Rohman 2012). Kosentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi adalah 0,0297.

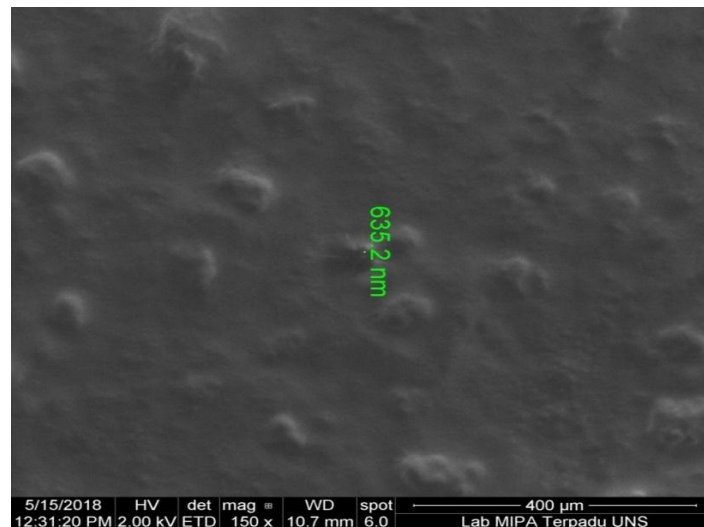
G. Pengujian morfologi etosom fisetin

Pengujian morfologi etosom fisetin dilakukan dengan cara sampel etosom sebelumnya dilakukan teknik *freeze drying* hingga terbentuk serbuk berwarna kuning. Pengujian morfologi dilakukan pada formula etosom terpilih yaitu pada formula 4. Penentuan bentuk partikel etosom fisetin dilakukan menggunakan mikroskop optik. Pengujian morfologi SEM dengan cara sampel ditempelkan pada alat. pengujian SEM menggunakan arus pada posisi 6-7,5 Ma, tegangan 2 kV, dengan perbesaran 1 mm hingga 400 μ m. Terlihat pada gambar.7



Gambar 8. Hasil morfologi etosom jarak pandang 1 mm

Hasil morfologi Fisetin Etosom diatas dilihat pada kondisi pandang 1 mm, menggunakan tegangan 2,00 kV dengan perbesaran 59 kali terlihat bentuk partikel etosom. Bentuk partikel etosom memiliki beragam ukuran dan berbentuk tidak beraturan.



Gambar 9. Hasil morfologi etosom jarak pandang 1 mm

Hasil morfologi Fisetin Etosom diatas dilihat pada kondisi pandang 400 μm , menggunakan tegangan 2,00 kV dengan perbesaran 150 kali terlihat bentuk partikel etosom. Bentuk partikel etosom memiliki beragam ukuran dan berbentuk tidak beraturan.

Mikroskop optik menunjukkan filament panjang atau struktur tubular tidak beraturan. Ketidakberaturan ukuran partikel dibuktikan adanya beberapa struktur bergulung merupakan bagian dalam struktur tubular yang memanjang dengan ukuran partikel 635,2 nm yang mana ukuran tersebut masih memenuhi range persyaratan ukuran nanokristal.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diperoleh kesimpulan bahwa :

Pertama, fisetin dapat dibuat etosom dengan menggunakan metode dingin-sonikasi.

Kedua, semakin tinggi konsentrasi etanol maka ukuran partikel semakin kecil dan efisiensi penjerapan obat pada sistem pembawa etosom semakin tinggi yaitu pada formula 4 dengan konsentrasi etanol tertinggi 40% memiliki ukuran partikel paling kecil yaitu 196 nm, efisiensi penjerapan tertinggi pada formula 4 dengan konsentrasi etanol 40% efisiensi penjerapan 93,25% setara dengan 9,325 mg dari total 10 mg.

Ketiga, karakterisasi etosom dilihat dari ukuran partikel semua formula memiliki ukuran nano antara 10-1000 nanometer, dengan efisiensi penjerapan tertinggi 93,25%, dan memiliki bentuk morfologi partikel yang tidak sferis untuk semua formula.

Keempat, fisetin etosom stabil selama penyimpanan pada konsentrasi etanol tertinggi.

B. Saran

Penelitian ini masih banyak kekurangan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai :

Pertama, perlu dilakukan pembuatan etosom dengan metode lainnya yang lebih bisa memberikan ukuran dibawah 100 nm.

Kedua, perlu dilakukan pembuatan etosom dengan menggunakan sonikasi probe dengan frekuensi yang diatur untuk mendapatkan waktu yang lebih singkat dibandingkan sonikator bath.

Ketiga, pengembangan formula fisetin etosom jika ditambah dengan stabilizer serta dilakukan uji aktivitas antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdou, Hamed M. (1989). Dissolution, Bioavailability, and Bioequivalence. *Pennsylvania: Mack Pulishing Company.*
- Adhami VM.Syed D. Khan N. Mukhtar H. Dietary flavonoid fisetin: a novel dual inhibitor of PI3K/Akt and Mtor for prostate cancer management. *Biochem Pharmacol.*2012;84:1277-1281.
- Ajazuddin, Saraf S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia.* 2010.81(7):680–9.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., 2013. Liposome : classification , preparation , and applications. *Nanoscalereslett*, 8, 1–9.
- Anonim. 1994. *Review Guidance: Validation of Chromatographich Methods.* Center for Drug Evaluation and Reearch, Rocckville. Hlm 12-28.
- Anonym. 1994. *Review Guidance: Validation og Chromatographich Methods.* Center for Drug Evaluation and Research, Rocckville. Hlm 12-28.
- Ansel, H.C., 1989, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, diterjemahkan oleh Farida Ibrahim, Asmanizar, Iis Aisyah, Edisi keempat, 255-271, 607-608, 700, Jakarta, UI Press.
- Aqil F, Munagala R, Jeyabalan J, Vadhanam M V. Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. *Cancer Lett.* 2013.334:133–41.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. 2000. Dietary mitakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr.* 130(9):2243-2251.
- Arora, Rajnish and Jain,C.P.(2007) Advances in Niosome as a Drug carrier, *Asian Journal of Pharmaceutics* 1(1) April-June.
- Blazek-Welsh, A.I dan D.G. Rhodes. (2001), Maltodextrin-based Proniosome, *AAP Pharmaceutical Sciences.*
- Chen WS. Lee YJ. Yu YC. Hsaio CH. Yen JH. Yu SH. Tsai YJ. Chiu SJ. Enhancement of p53-mutant human colorectal cancer cells radiosensitivity by flavonoid fisetin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010; 77 :1527–1535.

- Colas, J.C., Shi, W., Rao, V.S.N.M., Omri, A., Mozafari, M.R., Singh, H., 2007. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38, 841–847.
- Deny, F., dkk, 2006, Penggunaan Vitamin E dan Vitamin C Topikal dalam Bidang Kosmetik, *Majalah Kedokteran Andalas*, No. 2 Vol. 30: 40.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta.
- Dinu, Cristina. 2010. *Elastic Vesicles as Drugs Carriers Through The Skin*.
- Dua, J.S., Rana, A.C., Bhandari, A.K., 2012. Liposome : Methods of Preparation and Applications. *Int J Pharm*, 3, 14–20.
- El- Soud , N.H.A., Khalil, M.Y., Hussein, J.S., Oraby, F.S.H., & Farrag, A.R.H., 2007, Antidiabetic Effects of Fenugreek Alkaloid Extract in Streptozotocin Induced Hyperglycemic Rats, *Journal of Applied Sciences Research*, 3 (10) : 1073-1083. *Formula Ethosom*. Makassar. UIN Alauddin. Farmacia Vol.58, 2.
- Gaman P. M. dan K. B. Sherrington. 1981. *Ilmu pangan : pengantar ilmu pangan nutrisi dan mikrobiologi*. UGM-Press, Yogyakarta.
- Gandjar IG, Rohman A. 2012. Analisis Obat secara Kromatografi dan Spektroskopi. Yogyakarta: *Pustaka pelajar*. Hlm 466-497.
- Gopalan Sriram Prasath, Sorimuthu Pillai Subramanian. 2011. Modulatory effects of fisetin, a bioflavonoid, on hyperglycemia by attenuating the keyenzymes of carbohydrate metabolism in hepatic and renal tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 668 (2011) 492-496.
- Hamada A, Kawaguchi T, Nakano M. Clinical Pharrmakokinetics of Cytarabine Formulations. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41 (10): 705-71.
- Hariyadi P. 2013. Freeze drying technology for better quality & flavor of dried product. *Jurnal Foodreview indonesa*. Vol. 8(2): 52-56.
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 1:117:135.
- Harvey D. 2000. Modern Analytic Chemistry . *McGraw-Hill*, USA. Hlm 579.
- Honary, S.; & Zahir, F. 2013. Effect of Zeta Potensial on the Proerties of Nano Drug Delivery System – A Review(part 1). *Trop. J. of Pharmaceutical Research* April 12 (2): 255-264.

- Hong, C., Dang ,Y., Lin,G.,Yao, Y.,Li, G.,Ji, G., Shen ,H.,Xie, Y., (2014) : Effects of Stabilizing Agents on The Development of Myricetin Nanosuspension and its Characterization: *An in Vitro and in Vivo Evaluation, International Journal of Pharmaceutics*,**477**.251–260.
- Jonassen, H. 2014. Polysaccharide Based Nanoparticle for Drug Delivery Application. *Thesis School of Pharmacy, Faculty of Maternatics and Natural Science, University of Oslo.*
- Jufri M. Arah dan Perkembangan Liposom: drugs delivery systems. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2004; I(2): 59-68.
- Junyaprasert, V. B.,Morakul, B., (2015) : Nanocrystals for Enhancement of Oral Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs, *Asiaan Journal of Pharmaceutical Science*, **10**. 10-23.
- Khalil, M.Y., Moustafa, A.A., & Naguib, N.Y., 2007, Growth, Phenolic Compound, and Antioxidant Activity of Some Medical Plants Grown under Organic Farming Condition, *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(4): 451-457.
- Lalatendu Panigrahi, Snigdha P dan Saroj K.G. 2004. Design and Characterization of Mucoadhesive Buccal Patches of Salbutamol Sulphate. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. Vol 61 No. 5 Hal : 351 - 360.
- Leekumjorn, Sukit (2004). Synthesis and Characterization of Potensial Drug Delivery Systems using Nonionic Surfactant “Niosom”.
- Lei Gao., Liu,G., Ma, J., Wang, X., Zhou,L., Li,X., dan Wang, F., (2013) : Application of Drug Nanocrystal Technologies on Oral Drug Delivery of Poorly Soluble Drugs, *Pharm Res*, **30**, 307-324.
- Lipinski, C., (2002) : Poor Aqueous Solubility –An Industry Wide Problem in Drug Discovery, *Am. Pharm.Rev*, **5**, 82-85.
- Maghraby, G.M.M.E., Williams, A.C., dan Barry, B.W., 1999. Skin Delivery of Oestradiol from Deformable and Traditiona Liposomes: Mechanistic Studies. *J Pharm Pharmacol*, 51: 1123–1134.
- Maghraby, G.M.M.E., Williams, A.C., dan Barry, B.W., 2001. Skin delivery of 5-fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in-vitro. *J Pharm Pharmacol*, 53: 1069–1077.
- Mason TJ, Lorimer JP. 2002. *Applied Sonochemistry : The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*. Verlag: Wiley-VCH.

- Mayes AP. Lipid yang memiliki makna fisiologi. Dalam: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Biokimia harper*. Jakarta: EGC 2003; 151-154.
- Mozafari, M.R., 2005. Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments. *Trafford Publishing*, Victoria, B.C.
- Muchtadi T.R dan Sugiono. 1992. *Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Bogor : Institute Pertanian Bogor.
- Muller, R.H., Bohm, B.H.L., Grau,M.J.,(2002) : Nanosuspension – A Formulation Approach for Poorly Soluble and Poorly Bioavailable Drug, *in Handbook of Pharmaceutical Controlled Release*, Marcel Dekker, New York.345-357.
- Nandure HP, Puranik P, Giram P, Lone V. Ethosome: a novel drug carrier. *Int J Pharm Res Allied Sci*. 2013.2(3):18–30.
- Odeh, F., Al-Jaber, H and Khater, D., (2014) :Application of Nanotechnology in Drug Delivery, *InTech*, New York, 344-368.
- Ou, B., Huang, D.J., Woodill, M.H., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K.,2002, Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study, *J. Agric.Food Chem.*, 50, 3122-3128.
- Patel, Sanjay. 2007. *Ethosome: A Promising Tool For Transdermal Delivery Of Drugs*. India.
- Pirrung MC. 2007. *The Synthetic Organic Chemist's Companion*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Procházková, D.,Boušová, I.,Wilhelmová, N., (2011) : Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids, *Fitoterapia*, **82**.513–523.
- Rai U, Chandra D, Kumar S. Ethosomal gel: a novel tool for topical drug delivery. *Int J Univers Pharm Life Sci*. 2013.3:349–65.
- Raju, YP, Garbhapu, A, Prasanna, S, Rao, BS, Ramana, dan Murthy, KV. (2007). Studies on Enhancement of Dissolution Rate of Etoposide. *Indian Journal Pharmaceutical Sciences* 69, 269-273.
- Rakesh R, Anoop KR. Ethosomes for transdermal and topical drug delivery. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012.4(3):17–24.

- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S. (2006). Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biol Pharm Bull.* 29(9). 1790-1798.
- Rizal. 2012. Pengaruh Konsentrasi Etanol Terhadap Penjerapan Nifedipin Pada niosom.
- Sengupta B., Banerjee A., & Sengupta P.K. (2005) *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 80, 79-86.
- Sinko PJ. 2006. *Martin Farmasi Fisik dan Ilmu Farmasetika Edisi 5.* Jakarta: *Buku Kedokteran EGC.*
- Sjahbanar SZ, Setiadi E (ed). Stryer L. *Biokimia Vol 1.* Edisi 4. Jakarta: EGC 2000:264-77.
- Steven, Malcolm P. (2001). *Polymer Chemistry: An Introduction.* Oxford University Press. Diterjemahkan oleh Iis Sopyan. (2001). *Kimia Polimer.* Jakarta : PT Pradnya Paramita.
- Sunardi, K.I., 2007, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa blimbi, L*) terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazyl (DPPH), *Seminar Nasional Teknologi*, 1-9.
- Tarekegn, Alemayehu, dkk (2010). Niosom in targeted drug delivery: some recent advances, *IJPSR Vol 1(9)*: 1-8.
- Tertasari Hermeni. 2003. *Validasi Metode Analisis.* Pusat pengkajian Obat dan Makanan BPPOM.
- Tipler PA. 1998. *Fisika untuk Sains dan Teknik.* Prasetyo L & Adi RW, penerjemah. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: *Physics for Scientists and Engineers.*
- Toutou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M, Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Control. Release*, 2000; 65:403-418.
- Toutou, E., and Godin, B., 2000, Enhanced De-livery Into and Across The Skin by Ethosomal Carries, *Drug Development Research*, 50: 406- 415,
- Verma H, Prasad SB, Singh H. Herbal drug delivery system : a modern era prospective. *Int J Curr Pharm Rev Res.* 2013.4(3):88–101.
- Verma, Surender, S.K. Singh, Navneet S., P. Mathur, V. Valecha (2010). Nanoparticle vesicular system: A versatile tool for drug delivery. *J. Chem. Res.* Vol 2 (2): 496-509.

- Walters, Kenneth A, 2002, *Dermatological and Transdermal Formulation*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Wardiyati S. 2004. Pemanfaatan ultrasonik dalam bidang kimia. *Di dalam: Penguasaan IPTEK Bahan untuk Meningkatkan Kualitas Produk Nasional*. Prosiding Pertemuan Ilmiah IPTEK Bahan; Serpong, 7 Sep 2004. Serpong: *P3IB Batan*. Hlm 419-424.
- Yao, Y., Lin, G., Xie, Y., Ma, P., Li, G., Meng, Q., Wu, T., (2013) : Preformulation Studies of Myricetin: a Natural Antioxidant Flavonoid, *Pharmazie* **69**. 19-26 .

L

A

M

P

I

R

A


N

Lampiran 1. Serifikat analisis fisetin

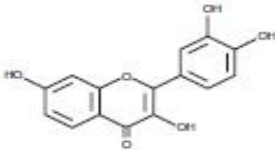
PRODUCT INFORMATION

Fisetin

Item No. 15246



CAS Registry No.: 528-48-3
Formal Name: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one
Synonyms: CI-75620, NSC 407010, NSC 656275
MF: C₁₅H₁₀O₆
FW: 286.2
Purity: ≥90%
UV/Vis: λ_{max}: 207, 250, 320, 364 nm
Supplied as: A crystalline solid
Storage: -20°C
Stability: As supplied, 2 years from the QC date provided on the Certificate of Analysis, when stored properly



Laboratory Procedures

Fisetin is supplied as a crystalline solid. A stock solution may be made by dissolving the fisetin in the solvent of choice. Fisetin is soluble in organic solvents such as ethanol, DMSO, and dimethyl formamide (DMF), which should be purged with an inert gas. The solubility of fisetin in ethanol is approximately 5 mg/ml and approximately 30 mg/ml in DMSO and DMF.

Fisetin is sparingly soluble in aqueous buffers. For maximum solubility in aqueous buffers, fisetin should first be dissolved in DMSO and then diluted with the aqueous buffer of choice. Fisetin has a solubility of approximately 0.5 mg/ml in a 1:1 solution of DMSO:PBS (pH 7.2) using this method. We do not recommend storing the aqueous solution for more than one day.

Description

Fisetin is a natural flavonol that is structurally and functionally related to kaempferol (Item No. 11852), myricetin (Item No. 10012600), and quercetin (Item No. 10005169). All are potent antioxidants and have anti-inflammatory actions with possible relevance to cancer.¹⁻³ Fisetin and other flavonols act as activators of sirtuin 1, inhibitors of the spleen tyrosine kinase SYK, and suppressors of CD36 gene expression.⁴⁻⁶

References

1. van Acker, F.A.A., Schouten, O., Haenen, G.R.M.M., et al. *FEBS Lett.* 473, 145-148 (2000).
2. Duthie, G. and Morrison, P. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 1-7 (2012).
3. Gupta, S.C., Kim, J.H., Prasad, S., et al. *Cancer Metastasis Rev.* 29(3), 405-434 (2010).
4. Szczepankiewicz, B.G. and Ng, P.Y. *Curr. Top. Med. Chem.* 8(17), 1533-1544 (2008).
5. Singh, R., Masuda, E.S., and Payan, D.G. *J. Med. Chem.* 55(8), 3614-3643 (2012).
6. Lian, T.-W., Wang, L., Lo, Y.-H., et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 601-609 (2008).

WARNING:
 THIS PRODUCT IS FOR RESEARCH ONLY - NOT FOR HUMAN OR VETERINARY DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE.

SAFETY DATA:
 This material should be considered hazardous until further information becomes available. Do not ingest, inhale, get in eyes, on skin, or on clothing. Wash thoroughly after handling. Before use, the user should refer to the [Cayman Safety Data Sheet](#), which has been sent via email to your institution.

WARRANTY AND LIMITATION OF REMEDY:
 Buyer agrees to purchase the material subject to Cayman's Terms and Conditions. Complete Terms and Conditions including Warranty and Limitation of Liability information can be found on our website.

Copyright Cayman Chemical Company, 03/22/2014

CAYMAN CHEMICAL
 1180 EAST ELLSWORTH RD
 ANN ARBOR, MI 48106 - USA
PHONE: (800) 364-9897
 (734) 971-3335
FAX: (734) 971-3640
 CUSTOM@CAYMANCHEM.COM
 WWW.CAYMANCHEM.COM

Lampiran 2. Sertifikat analisis lipid

REVIEWED
 By lia.aksari at 3:36 pm, Sep 08, 2016

Lipoid

AN2103202/3
- 1 -

ANALYTICAL DATA

LIPOID S 100 ✓ PT. Menjangan Sakti

Batch 579000-1160709-06 ✓

Phosphatidylcholine from Soybean

Recommended storage -20 +/- 5 °C
 Date of production 03/2016
 Retest date 02/2019 ✓

Parameter	Result	Specification		Unit	Method
		min	max		
Phosphatidylcholine (based on dry weight)	97,7	94,0		%	PC3
Identity (TLC)	complies	complies			ADC1
Lysophosphatidylcholine	0,7		3,0	%	ADC3
N-Acyl-phosphatidylethanolamine	I.t. 0,1		0,5	%	ADC3
Phosphatidylethanolamine	I.t. 0,1		0,1	%	ADC3
Phosphatidylinositol	I.t. 0,1		0,1	%	ADC3
Non-polar lipids	0,8		3,0	%	ADC5
Triglycerides	0,3		2,0	%	ADC5
Free fatty acids	I.t. 0,05		0,5	%	ADC5
DL- α -Tocopherol	0,20	0,15	0,25	%	TO
Phosphorus	3,8	3,7	4,0	%	TP
Iodine value	106	97	107		Ph.Eur.2.5.4A
Peroxide value	0		3		Ph.Eur.2.5.5A
Water	0,5		2,0	%	USP <921>1a
Ethanol	I.t. 0,2		0,2	%	ET

.../2

REVIEWED BY: *lia* 6/15

Lipoid GmbH - Frigenstraße 4 - D-87065 Ludwigshafen - Tel. 0821-5 38 19-0 Fax 0621-55 35 59

REVIEWED

By lia.aksari at 3:36 pm, Sep 08, 2016

Lipoid

ANALYTICAL DATA

AN2103202/3

- 2 -

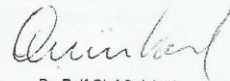
LIPOID S 100

PT. Menjangan Sakti

Batch 579000-1160709-06

Parameter	Result	Specification		Unit	Method
		min	max		
Heavy metals	l.t. 10		10	mg/kg	USP <231>II
Consistency	coarse agglomerates (waxy)		coarse agglomerates		visuell
Colour	light yellow - yellowish		light yellow - yellowish		visuell
Bacterial Endotoxins (Gel-clot method: limit test)	l.t. 0,7		6	EU/g	EU
Microbiological quality					
TAMC	l.t. 10		100	cfu/g	USP <61>
Yeasts	l.t. 10		10	cfu/g	USP <61>
Moulds	l.t. 10		10	cfu/g	USP <61>
E.coli	absent		absent	/10g	USP <62>
Salmonella	absent		absent	/10g	USP <62>
Pseudomonas aeruginosa	absent		absent	/10g	USP <62>
Staphylococcus aureus	absent		absent	/10g	USP <62>

Ludwigshafen, September 8, 2016


Dr. Ralf-Olaf Quinkert
Quality Control

Dr. Dirk Bruns
Head of Quality Control**REVIEWED BY :** 

Lampiran 3. Penetapan ukuran partikel dan zeta potensial sebelum penyimpanan

Formula	Ukuran partikel	Rata-rata ±SD	Indeks polidispersitas ± SD	Zeta potensial ±SD
1	282,7		0,496	-6,9
	262,3	271,867 ± 10,25881735	0,626 ± 0,065935996	-6,54 ± 0,197540432
	270,6		0,478	-7
2	248,3		0,431	-5,94
	221,9	235,067 ± 10,77785796	0,459 ± 0,023271346	-5,85 ± 0,073484692
	235		0,488	-6,03
3	397,5		0,377	-0,861
	404,1	402,8 ± 3,906404997	0,334 ± 0,026993826	-1,52 ± 0,366994096
	406,8		0,312	-1,72
4	196,3		0,215	-0,637
	197,2	196,733 ± 0,368178701	0,221 ± 0,005734884	-1,7 ± 0,537150713
	196,7		0,229	-1,84
5	337,8		0,274	-0,685
	342,4	339,2 ± 2,268626604	0,277 ± 0,017720045	-0,615 ± 0,571114894
	337,4		0,238	0,56

Lampiran 4. Uji stabilitas selama 4 minggu

UJI STABILITAS (4 minggu)

a. PEMBENTUKAN ENDAPAN

FORMULA	MINGGU KE 1	MINGGU KE 2	MINGGU KE 3	MINGGU KE 4
1 (ETANOL 20%)	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
2 (ETANOL 25%)	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
3 (ETANOL 30%)	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
4 (ETANOL 35%)	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan	Ada endapan
5 (ETANOL 40%)	Tidak ada endapan	Ada endapan	Ada endapan	Ada endapan

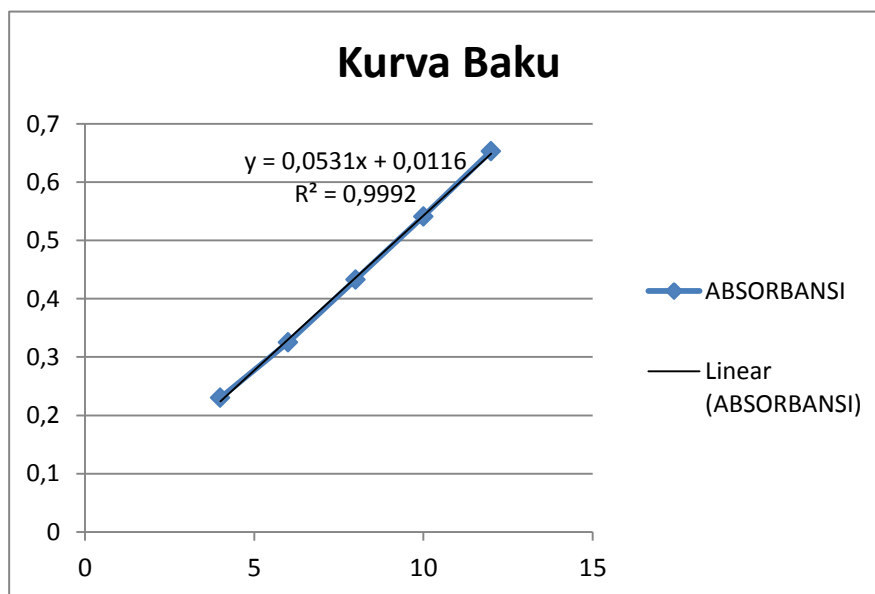
b. UKURAN PARTIKEL DAN ZETA POTENSIAL

Formula	Ukuran partikel (nm)	Indeks polidispersitas	Zeta potensial (mV)
4	506,94	0,37	-1,467

KURVA BAKU

Larutan stok 100 ppm → 10 mg fisetin + 10 ml etanol 96% + ad 100 ml dapar fosfat Ph 6,5

KOSENTRASI (PPM)	PEMBACAA N 1	PEMBACAA N 2	PEMBACAA N 3	RATA-RATA
4	0,230	0,230	0,230	0,230
6	0,325	0,325	0,325	0,325
8	0,433	0,433	0,433	0,433
10	0,541	0,540	0,540	0,541
12	0,653	0,653	0,653	0,653



$$a = 0,0116$$

$$b = 0,0531$$

$$r = 0,9992$$

$$y = a + bx$$

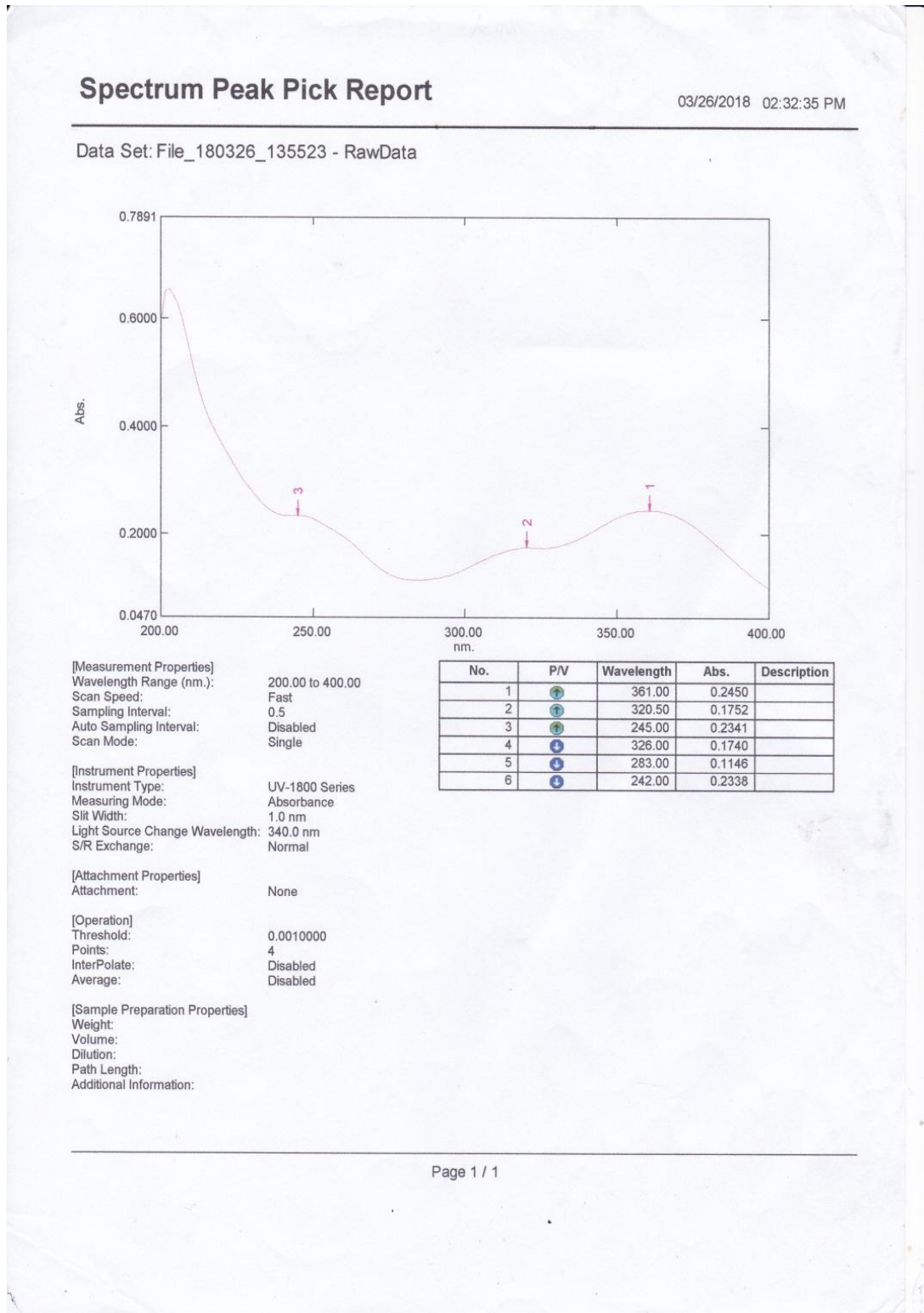
$$y =$$

$$0,0116 + 0,0$$

$$531x$$

Lampiran 5. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

LAMDA MAX → 361 nm, dengan nilai serapan maksimum yaitu 0,2450



Lampiran 6. Penentuan Operating Time

Operating Time □ 5-7 menit (300-420 detik) dengan nilai serapan berturut-turut 0,2410

Kinetics Data Print Report 03/26/2018 02:31:09 PM

Time (Second)	RawData ...
0.0000	0.2441
60.0000	0.2432
120.0000	0.2431
180.0000	0.2430
240.0000	0.2417
300.0000	0.2410
360.0000	0.2410
420.0000	0.2410
480.0000	0.2412
540.0000	0.2406
600.0000	0.2393
660.0000	0.2382
720.0000	0.2380
780.0000	0.2362
840.0000	0.2360
900.0000	0.2357
960.0000	0.2372
1020.0000	0.2348
1080.0000	0.2331
1140.0000	0.2305
1200.0000	0.2302
1260.0000	0.2327
1320.0000	0.2330
1380.0000	0.2311
1440.0000	0.2305
1500.0000	0.2311
1560.0000	0.2316
1620.0000	0.2307
1680.0000	0.2317
1740.0000	0.2288
1800.0000	0.2292

Page 1 / 1

Lampiran 7. Verifikasi metode

A. LOD DAN LOQ

KOSENTRA SI (PPM)	ABSORBANSI (y)	y'	y-y'	y-y' ²
4	0,230	0,2240	0,0060	0,000036
6	0,325	0,3302	-0,0052	0,000027
8	0,433	0,4364	-0,0034	0,000011
10	0,541	0,5426	-0,0016	0,000002
12	0,653	0,6488	0,0042	0,000017
Jumlah total ($\sum y-y'$)² = 0,000093				

Nilai y' diperoleh dari substitusi konsentrasi dalam persamaan $y = 0,0116 + 0,0531x$ dengan x adalah konsentrasi (ppm) dan y adalah serapan (y')

1. $y = 0,0116 + 0,0531x$
 $Y = 0,0116 + 0,0531 \times 4$
 $Y = 0,224$
2. $y = 0,0116 + 0,0531x$
 $Y = 0,0116 + 0,0531 \times 6$
 $Y = 0,3302$
3. $y = 0,0116 + 0,0531x$
 $Y = 0,0116 + 0,0531 \times 8$
 $Y = 0,4364$
4. $y = 0,0116 + 0,0531x$
 $Y = 0,0116 + 0,0531 \times 10$
 $Y = 0,5426$
5. $y = 0,0116 + 0,0531x$
 $Y = 0,0116 + 0,0531 \times 12$
 $Y = 0,6488$

- $S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum|y-y'|^2}{N-2}}$

$S_{x/y}$ = simpangan baku residual

N = jumlah data

$(\sum|y-y'|)^2 =$ jumlah kuadrat total residual

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{0,000093}{5-2}} = 0,0055$$

- $LOD = 3,3 \times \frac{S_x}{b}$

$$LOD = 3,3 \times \frac{0,0055}{0,0531}$$

$$LOD = 0,3418 \text{ ppm}$$

$$Y = 0,0116 + 0,0531x$$

$$Y = 0,0116 + 0,0531 (0,3418)$$

$$Y = 0,0116 + 0,0181$$

$$\text{Serapan LOD} = 0,0297$$

- $LOQ = 10 \times \frac{S_x}{b}$

$$10 \times \frac{0,0055}{0,0531}$$

$$1,0358 \text{ ppm}$$

$$Y = 0,0116 + 0,0531x$$

$$Y = 0,0116 + 0,0531 (1,0358)$$

$$Y = 0,0116 + 0,0550$$

$$\text{Serapan LOQ} = 0,0666$$

B. LINEARITAS

KOSENTRASI (PPM)	PEMBACAA N 1	PEMBACAA N 2	PEMBACAA N 3	RATA-RATA
4	0,230	0,230	0,230	0,230
6	0,325	0,325	0,325	0,325
8	0,433	0,433	0,433	0,433
10	0,541	0,540	0,540	0,541
12	0,653	0,653	0,653	0,653

$$a = 0,0116$$

$$b = 0,0531$$

$$r = 0,9992$$

$$y = a + bx$$

$$y = 0,0116 + 0,0531x$$

Hasil linearitas diperoleh $R=0,9992$, sehingga dapat disimpulkan bahwa data linear.

Lampiran 8. Perhitungan efisiensi penjerapan

EFISIENSI PENJERAPAN

FORMULA	PEMBACAAN 1	PEMBACAAN 2	PEMBACAAN 3	RATA	KOSENTRASI
1	0,629	0,630	0,630	0,630	74.697
2	0,354	0,354	0,353	0,354	72.196
3	0,535	0,536	0,536	0,536	75.152
4	0,370	0,370	0,369	0,370	74.695

$$a = 0,0116$$

$$b = 0,0531$$

$$r = 0,9992$$

$$y = a + bx$$

$$y = 0,0116 + 0,0531x$$

Efisiensi penjerapan (%EE)

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

TD → total jumlah fenolat yang terdapat pada formula

FD → total senyawa fenolat yang terdeteksi pada supernatant (tidak terjerap)

FORMULA 1 →

- $y = a + bx$
 $y = 0,0116 + 0,0531x$
 $0,630 = 0,0116 + 0,0531x$
 $x = 11,645 \text{ ppm}$
- jumlah fisetin tidak terjerap = $\frac{11,645 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mg} = 1,164 \text{ mg}$
- % efisiensi penjerapan = $\frac{TD - FD}{TD} \times 100\%$
 $= \frac{10 \text{ mg} - 1,164 \text{ mg}}{10 \text{ mg}} \times 100\% = 88,36\%$

FORMULA 2 →

- $y = a + bx$
 $y = 0,0116 + 0,0531x$
 $0,354 = 0,0116 + 0,0531x$

$$x = 6,448 \text{ ppm}$$

- jumlah fisetin tidak terjerap = $\frac{6,448 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mg} = 0,645 \text{ mg}$
- % efisiensi penjerapan = $\frac{TD-FD}{TD} \times 100\%$
 $= \frac{10 \text{ mg} - 0,654 \text{ mg}}{10 \text{ mg}} \times 100\% = 93,46\%$

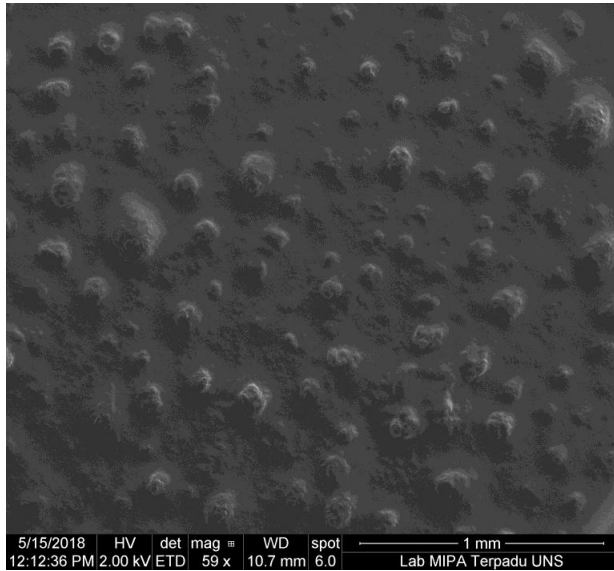
FORMULA 3 →

- $y = a+bx$
 $y = 0,0116 + 0,0531x$
 $0,536 = 0,0116 + 0,0531x$
 $x = 9,875 \text{ ppm}$
- jumlah fisetin tidak terjerap = $\frac{9,875 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mg} = 0,987 \text{ mg}$
- % efisiensi penjerapan = $\frac{TD-FD}{TD} \times 100\%$
 $= \frac{10 \text{ mg} - 0,987 \text{ mg}}{10 \text{ mg}} \times 100\% = 90,13\%$

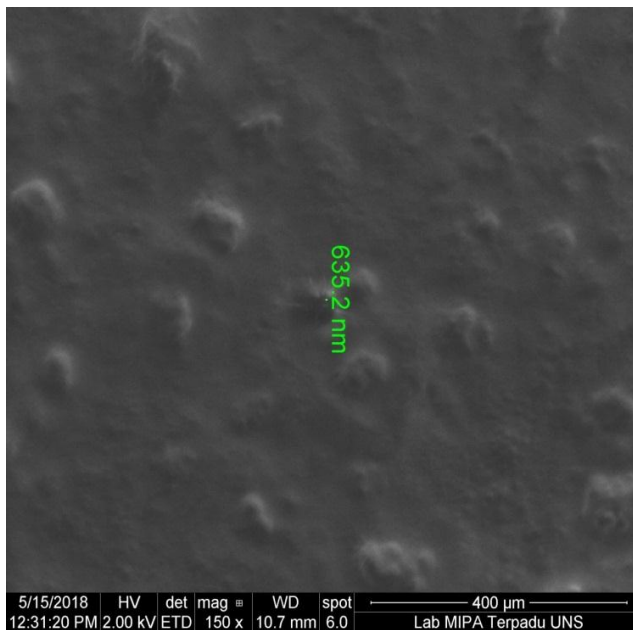
FORMULA 4 →

- $y = a+bx$
 $y = 0,0116 + 0,0531x$
 $0,370 = 0,0116 + 0,0531x$
 $x = 6,749 \text{ ppm}$
- jumlah fisetin tidak terjerap = $\frac{6,749 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mg} = 0,675 \text{ mg}$
- % efisiensi penjerapan = $\frac{TD-FD}{TD} \times 100\%$
 $= \frac{10 \text{ mg} - 0,675 \text{ mg}}{10 \text{ mg}} \times 100\% = 93,25\%$

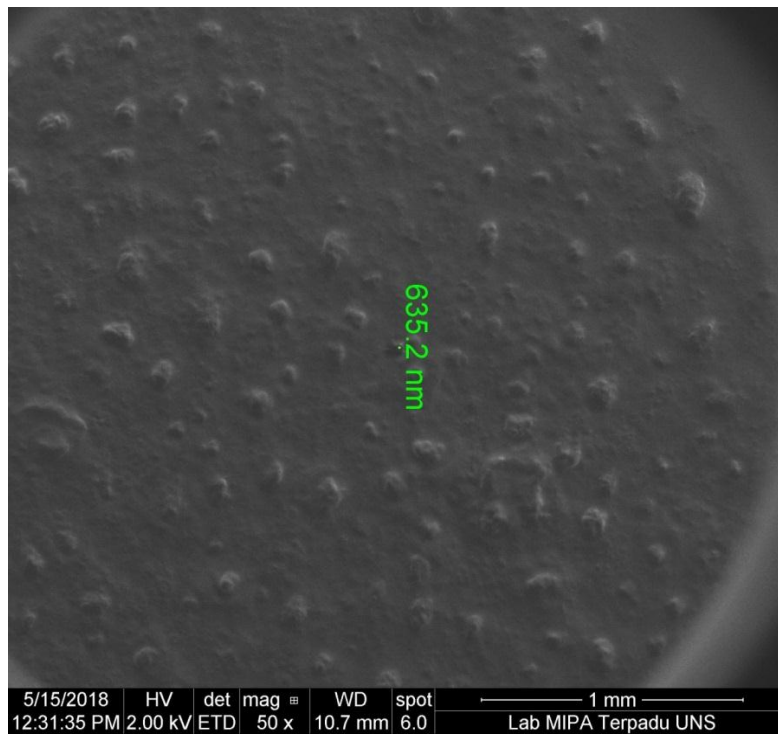
Lampiran 9. Hasil scanning Electron Microscopy (SEM)



Perbesaran 1 mm visual secara keseluruhan






Perbesaran 400μm dengan ukuran partikel 635,2 nm



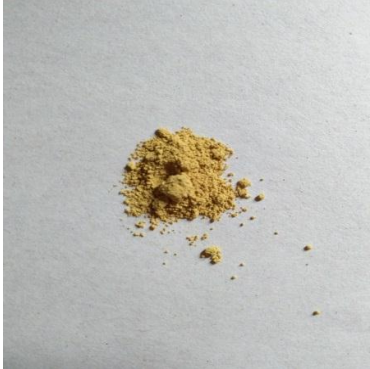
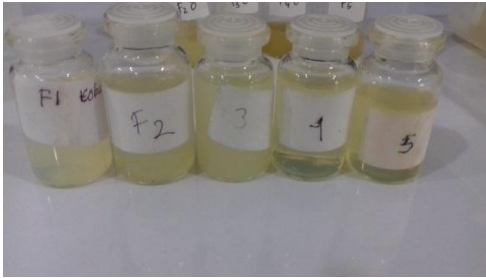


Perbesaran 1 mm dengan ukuran partikel 635,2 nm

Lampiran 10. Gambar Alat

ALAT	NAMA ALAT	KEGUNAAN
	Spektrofotometer UV-Vis	Membaca efisiensi penjerapan zat aktif
	Sonikator bath	Memperkecil ukuran partikel
	PSA (<i>Particle Size analyzer</i>)	Mengukur ukuran partikel sampel

ALAT	NAMA ALAT	KEGUNAAN
	Freeze dryer	Freeze drying sampel
	SEM (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)	Untuk melihat morfologi dari etosom

Lampiran 11. Gambar bahan

Bahan	Nama bahan	Kegunaan
	Fisetin	Sebagai zat aktif
	Fisetin etosom	Sampel
	Fisetin hasil <i>freeze drying</i>	Pengujian SEM
	Fosfatidilkolin	Sebagai penyusun etosom