

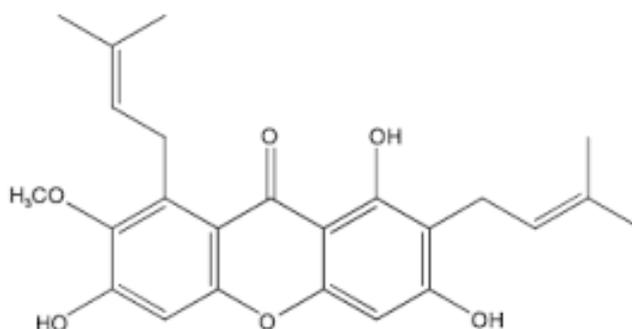
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Alfa Mangostin

Alfa mangostin secara alami adalah senyawa xanton, yang merupakan metabolit sekunder utama kulit buah manggis (Martinez *et al.* 2011). Xanton memiliki struktur kimia yang unik terdiri dari sistem aromatik trisiklik (C6-C3-C6). Senyawa xanton yang terdapat dalam kulit buah manggis ini merupakan senyawa fenolik yang tergolong dalam kelas polifenol. Senyawa xanton lain yang terdapat dalam manggis yaitu β -mangostin, gartanin, mangostinon dan isomangostin (Orozco & Failla 2013).

Alfa mangostin ditemukan pada tahun 1855. Memiliki rumus molekul $C_{24}H_{26}O_6$ dengan berat molekul sebesar 410,466 g/mol. Alfa mangostin memiliki nama IUPAC 1,3,6-Trihidroxy-7methoxy-2,8bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-9H-xanthen-9-one (Malathi *et al.* 2000). Senyawa alfa mangostin berwarna kekuningan, memiliki berbagai manfaat seperti antiinflamasi, anti tumor, kardioprotektor, antidiabetes, antijamur, antiparasit, antioksidan, dan antiobesitas (Ibrahim *et al.* 2014). Alfa mangostin sebagai antioksidan, bekerja dengan menonaktifkan radikal bebas berupa *singlet oxygen*, anion superoksida dan anion peroksinitrit (Martinez *et al.* 2011).



Gambar 1. Struktur Kimia Alfa Mangostin (Malathi *et al.* 2000)

Alfa mangostin memiliki kelarutan dalam air yang rendah serta bioavailabilitas oral yang rendah, menyebabkan masalah bagi pengembangan sediaan farmasi. Alfa mangostin larut dalam etanol, eter, aseton, kloroform dan etil asetat. Bioavailabilitas oral alfa mangostin (dosis 20 mg/kg) dilarutkan dalam larutan berair yang mengandung etanol 2% dan Tween 80 2%, diperkirakan hanya sekitar 0,4% (Li *et al.* 2011).

1. Penelitian Mengenai Alfa Mangostin

1.1 Enkapsulasi. Xanton dalam pengembangannya sering mengalami proses pengeringan dengan panas tinggi, hal itu menyebabkan komponen terdegradasi. Contohnya, kandungan beberapa xanton dalam kulit buah manggis karena proses pengeringan, metode atau kondisi yang memerlukan pemanasan dapat menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan dari bioaktif.

Untuk meningkatkan stabilitas komponen selama proses dan penyimpanan maka terdapat alternatif yaitu enkapsulasi bioaktif dengan metode *spray drying*. Teknik ini efektif untuk menjerap dan melindungi komponen bioaktif. Enkapsulasi biasanya menggunakan biopolimer yang dapat membantu meningkatkan stabilitas produk dengan membentuk fase yang mengelilingi senyawa target. Penambahan protein dan siklodekstrin dapat menurunkan mobilitas molekul senyawa dengan berat molekul rendah, dengan demikian dapat meningkatkan stabilitas enkapsulasi xanton (Silalai *et al.* 2016).

1.2 Liposom. Sistem liposom telah banyak dikembangkan sebagai sistem pembawa obat karena berupa vesikel membran yang mampu mengemas obat untuk berbagai aplikasi target. Penelitian secara *in vivo* yaitu penentuan distribusi alfa mangostin dalam otak dan plasma dibuat sistem penghantaran liposom. Hasil menunjukkan terjadi peningkatan bioavailabilitas liposom-alfa mangostin dalam plasma (Chen *et al.* 2015)

1.3 Dispersi Padat. Beberapa penelitian menunjukkan *solid dispersi* atau dispersi padat meningkatkan kelarutan dan ketersediaan hayati obat yang kurang larut dalam air salah satunya alfa mangostin. Alfa mangostin digabungkan dengan polimer *polyvinylpyrrolidone* (PVP), yang berupa polimer yang larut air.

Terjadi peningkatan kelarutan dalam air, dikaitkan dengan pembentukan kompleks antara alfa mangostin dan PVP menjadi nanomisel. Ukuran partikel yang kecil meningkatkan stabilitas fisik serta permeabilitas. Dispersi padat alfa mangostin juga meningkatkan khasiat bahan obat sebagai antitumor karena memberikan penargetan berdasarkan permeabilitas (Aisha *et al.* 2012).

B. Radikal Bebas

1. Pengertian Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan atom atau gugus yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Radikal bebas dapat dijumpai pada lingkungan seperti asap rokok, polusi udara, obat, bahkan makanan dalam kemasan. Suatu atom molekul akan tetap stabil bila elektronnya berpasangan. Untuk mencapai kondisi stabil, radikal bebas menyerang bagian tubuh seperti sel. Hal ini akan menyebabkan kerusakan sel dan kinerjanya serta berlanjut pada kerusakan jaringan dan akhirnya mempengaruhi proses metabolisme tubuh (Winarsi 2007). Radikal bebas bersifat reaktif, dan untuk mendapatkan kestabilannya molekul yang bersifat reaktif tersebut mencari pasangan elektronnya sehingga disebut juga *Reactive Oxygen Species* (ROS). Mekanisme dapat dengan donasi, meski umumnya dengan mengambil dari sel tubuh lain (Baumann 2002). Terdapat 2 jenis ROS, yakni molekul oksigen dengan elektron yang tidak mempunyai pasangan dan molekul oksigen tunggal (Masaki 2010). Senyawa radikal terbentuk melalui serangkaian reaksi yakni pembentukan awal (inisiasi), perambatan atau terbentuknya radikal baru (propagasi), dan tahap terakhir yakni pemusnahan atau pengubahan senyawa radikal menjadi non radikal (terminasi) (Rohmatussolihat 2009).

Radikal matahari dapat menginduksi pembentukan berbagai radikal bebas, terutama *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada kulit seperti *singlet oxygen* dan *anion superoxide*, yang memicu kerusakan biologi pada jaringan terpapar melalui reaksi oksidatif yang dikatalisis oleh besi. Radikal bebas ini berperan penting dalam aktivasi *tyrosinase* pada kulit manusia dan oleh karena itu dapat meningkatkan biosintesis melanin melalui induksi proliferasi malnosit. Selain itu, radikal bebas juga dapat menyebabkan kerusakan DNA. Sehingga untuk menghambat ROS zat

antioksidan dapat mengurangi hiperpigmentasi dan juga digunakan sebagai bahan pencerah kulit, tanpa mengesampingkan pentingnya penggunaan pelindung kulit terhadap paparan sinar matahari (Lukitaningsih 2014).

2. Sumber Radikal Bebas

Menurut Rohmatussolihat (2009), sumber radikal bebas yakni endogen dan eksogen. Radikal bebas endogen terbentuk melalui auto oksidasi, oksidasi enzimatis, fagositosis, tranfer elektron di mitokondria, dan oksidasi ion-ion logam transisi. Sedangkan radikal bebas eksogen berasal dari luar sistem tubuh atau lingkungan, misalnya sinar ultra violet, polusi udara, asap rokok, makanan dan minuman.

C. Antioksidan

1. Pengertian antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat memberikan satu atau lebih elektron (elektron donor) kepada radikal bebas. Proses ini dapat menghambat reaksi radikal bebas. Senyawa antioksidan memiliki berat molekul yang kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal (Winarsi 2007).

2. Klasifikasi Antioksidan

Jenis antioksidan berdasarkan sumbernya dibedakan menjadi antioksidan alami dan sintesis. Antioksidan alami adalah antioksidan hasil ekstraksi bahan alam. Sedangkan antioksidan sintetik berasal dari hasil sintesa reaksi kimia (Winarsi 2007). *Butil Hidroksi Anisol* (BHA), *Butil Hidroksi Toluene* (BHT), *Tersier Butil Hidroksi Quinon* (TBHQ), propil galat dan tokoferol merupakan antioksidan sintetik yang sudah sangat banyak penggunaannya (Buck 1991).

Antioksidan alami banyak terdapat dalam tanaman pada seluruh bagian tanaman seperti akar, daun, bunga, biji, batang, dsb. Senyawa-senyawa yang umum terkandung dalam antioksidan alami adalah fenol, polifenol, dan yang paling umum adalah flavonoid (flavonol, isoflavon, flavon, katekin, dan flavonon), turunan asam sinamat, tokoferol dan asam organik polifungsi.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dapat diklasifikasi menjadi 3 jenis, yakni :

2.1 Antioksidan Primer. Antioksidan jenis ini disebut juga antioksidan enzimatis. Antioksidan primer meliputi *enzim superoxide dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase*. Enzim-enzim ini menghambat pembentukan radikal bebas dengan memutus reaksi berantai (polimerisasi), dan mengubah menjadi produk yang lebih stabil. Antioksidan ini disebut juga *chain breaking antioxidant*.

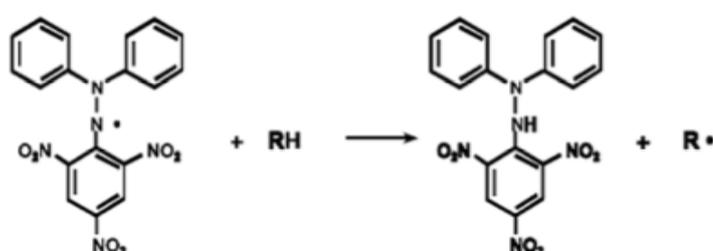
2.2 Antioksidan Sekunder. Antioksidan sekunder disebut juga sebagai antioksidan eksogen atau non enzimatis. Mekanisme kerja sistem antioksidan non enzimatis yaitu dengan cara memotong reaksi berantai dan radikal bebas. Akibatnya radikal bebas tidak bereaksi dengan komponen seluler. Contoh antioksidan sekunder yaitu vitamin E, vitamin C, flavonoid, bilirubin, dan albumin (Winarsi 2007).

2.3 Antioksidan Tersier. Antioksidan tersier contohnya adalah enzim *DNA repair* dan *metionin sulfoksida reduktase* yang berperan dalam perbaikan biomolekular yang dirusak oleh radikal bebas. Kerusakan DNA yang terinduksi senyawa radikal bebas dicirikan oleh rusaknya *single atau double strand*, baik gugus basa maupun non basa. Perbaikan kerusakan basa dalam DNA yang diinduksi senyawa oksigen reaktif terjadi melalui perbaikan jalur eksisi basa. Pada umumnya eksisi basa terjadi dengan cara memusnahkan basa yang rusak yang dilakukan oleh DNA glikosilase (Winarsi 2007).

D. Metode Uji Antioksidan dengan DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*)

DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*) merupakan senyawa radikal bebas yang bersifat stabil dan beraktivitas dengan cara mendelokalikasi elektron bebas pada suatu molekul, sehingga molekul tersebut tidak reaktif sebagaimana radikal bebas yang lain. Proses delokalikasi ini ditunjukkan dengan adanya warna ungu (violet) pekat yang dapat dikarakterisasi pada pita absorbansi dalam pelarut etanol atau metanol pada panjang gelombang 517 nm (Molyneux 2004). Senyawa antioksidan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom

hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning (Widyastuti 2010). Saat elektron berpasangan oleh adanya antioksidan, maka absorbansinya menurun secara stoikiometri sesuai jumlah elektron yang berpasangan. Perubahan absorbansi akibat reaksi tersebut digunakan untuk menguji kemampuan suatu senyawa sebagai penangkal radikal bebas (antioksidan) (Dehpour *et al.*2009). Mekanisme reaksi DPPH dengan antioksidan dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 1. Reaksi penangkapan hidrogen senyawa antioksidan oleh DPPH (Widyastuti 2010)

Metode DPPH memberikan hasil akurat, efisien, cepat dalam menentukan profil antioksidan ekstrak tanaman, tidak memerlukan banyak reagen, dan mudah dalam preparasi sampelnya. Metode ini juga tidak memerlukan substrat, karena radikal bebas sudah tersedia secara langsung (Nur 2013). Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah IC_{50} (*Inhibition Concentration 50%*). IC_{50} merupakan konsentrasi larutan sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50% (Molyneux 2004).

E. Novel Drug Delivery System (NDDS)

Diperkirakan 40% atau lebih senyawa alam memiliki kelarutan yang rendah dalam air. Kelarutan dalam air yang rendah serta kurangnya kemampuan permeabilitas menembus *barier* absorpsi dapat mempengaruhi bioavailabilitas suatu senyawa bahan alam di dalam tubuh. Oleh karena itu sangat penting untuk melakukan pengembangan formula sehingga bioavailabilitas senyawa bahan alam dapat meningkat. Untuk mengatasi masalah tersebut dikembangkan *Novel Drug*

Delivery System (NDDS). NDDS merupakan suatu sistem penghantaran obat yang lebih modern dengan cara mengontrol pelepasan obat sehingga aktivitas farmakologis menjadi lebih baik (Farooq *et al.* 2013.)

Aplikasi NDDS pada produk herbal memiliki beberapa keuntungan untuk senyawa bahan alam, misalnya meningkatkan kelarutan, bioavailabilitas, meningkatkan aktivitas farmakologi, melindungi dari pH lambung, mengurangi toksisitas, meningkatkan stabilitas, dan mencegah degradasi fisik maupun kimia. Beberapa sistem pembawa yang termasuk NDDS, yaitu sistem pembawa berbasis dasar fosfolipid seperti (liposom, etosom, transferosom, fitosom), sistem pembawa berbasis dasar lemak seperti mikro/nanoemulsi dan *solid lipid nanoparticle* (SLN), sistem pembawa berbasis surfaktan seperti misel, dan sistem pembawa berbasis polimer, seperti nanopartikel kitosan atau dendrimer (Ting *et al.* 2014).

F. Fitosom

Liposom artifisial ditemukan oleh Alec D. Bangham pada tahun 1961. Sejak saat itu, penggunaannya meluas dalam berbagai bidang (Lautenshlager 2003). Salah satunya digunakan sebagai pembawa untuk banyak molekul dalam industri kosmetik, farmasi, industri makanan dan pertanian. Liposom merupakan partikel bulat atau sferis, yang mengenkapsulasi fraksi pelarut sehingga pelarut tersebut mampu berdifusi ke bagian dalam. Liposom mengenkapsulasi senyawa yang tidak stabil misalnya antimikroba, antioksidan, dan elemen bioaktif, dapat melindungi fungsi serta sebagai sistem penghantaran obat. Liposom dapat sebagai sistem penghantaran obat untuk senyawa hidrofilik dan hidrofobik, mencegah dekomposisi, dan membantu pelepasan obat ke target (Shehata *et al.* 2008).

Fitosom atau *Phyto-phospholipid kompleks* merupakan kompleks yang terbuat dari ikatan hidrogen antara fitokonstituen dengan fosfolipid yang mampu menunjang stabilitas fisik dan absorpsi fitokonstituen (Amit *et al.* 2013). Fitosom termasuk dalam sistem penghantaran obat golongan vesikuler. Sistem penghantaran obat vesikuler merupakan kumpulan konsentrasi lipid yang terstruktur menjadi lapisan ganda (bilayer) ketika blok molekul-molekul ampifilik tertentu bertemu dengan air (Jadhav *et al.* 2012). Sistem penghantaran fitosom dapat digunakan

untuk penghantaran sistemik dengan meminimalkan degradasi zat aktif. Fitosom juga dapat sebagai pembawa untuk sediaan transdermal karena dapat menunjang perjalanan obat menembus kulit (Chen *et al.* 2012).

Fitosom disebut juga herbosom termasuk dalam teknologi formulasi fitolipid baru yang dapat mengatasi permasalahan barrier tubuh namun tetap menjaga stabilitas serta secara signifikan meningkatkan efikasi dan bioavailabilitas senyawa turunan tumbuhan (Mzaumber *et al.* 2016). Sistem vesikuler fitosom tersusun oleh fosfatidilkolin (terutama dari kedelai) (Uchechi *et al.* 2014). Fosfatidilkolin mengatasi penyerapan yang buruk dari flavonoid sehingga dapat meningkatkan kelarutan dalam lipid sel. Fitosom terbentuk ketika fosfolipid bereaksi dengan ekstrak herbal dengan pelarut aprotik. Fosfatidilkolin merupakan komponen amfoterik, bagian fosfatidil bersifat lipofilik, sedangkan bagian kolin bersifat hidrofilik. Polifenol berikatan dengan bagian kolin pada fosfatidilkolin sedangkan bagian fosfatidil membentuk kompleks tubuh dan ekor serta menyelubungi inti struktur hidrofilik dari kolin. Molekul terikat dengan ikatan kimia pada kutub kepala kolin dari fosfolipid (Chivte *et al.* 2017)

Fitosom memiliki ukuran yang bervariasi, mulai dari 50 nm dan mencapai 500µm (Tripathy *et al.* 2013). Fitosom merupakan sistem penghantaran obat potensial untuk dapat berpenetrasi baik di kulit. Salah satu contohnya saponin dari ginseng terbukti mampu menembus ke dalam kulit setelah diformulasikan ke dalam fitosom, hal ini karena fitosom memiliki afinitas yang tinggi dengan lipid kulit serta kompleks *curcumin*–*fosfolipid* mampu meningkatkan permeabilitas pada uji di kulit tikus dibandingkan kurkumin (More *et al.* 2013).

1. Keuntungan dan kerugian dari fitosom

1.1 Keuntungan dari sistem penghantaran fitosom. Meningkatkan absorpsi fitokonstituen polar yang tidak larut pada lipid baik melalui rute oral maupun topikal, fitosom menunjukkan bioavailabilitas yang lebih baik serta manfaat terapeutik dari zat aktif lebih besar. Fitosom dapat menghantarkan beragam kelompok obat seperti peptida, molekul protein, dan ekstrak non lipofilik. Penyerapan konstituen aktif meningkat, menyebabkan kebutuhan dosis obat dapat berkurang (Dayan *et al.* 2002).

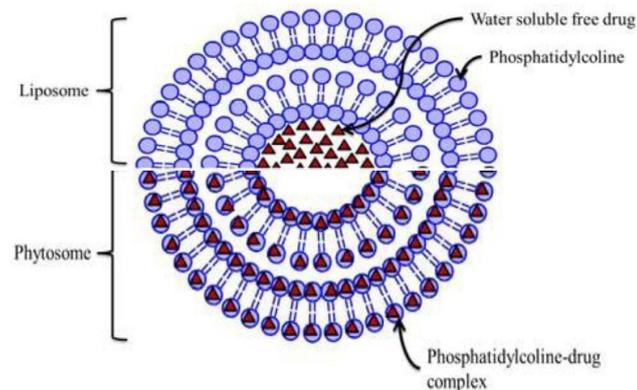
Fitosom terdiri dari fosfatidilkolin, selain digunakan sebagai pembawa juga bertindak sebagai hepatoprotektor sehingga memberikan efek sinergis ketika di kompleks dengan zat aktif hepatoprotektor. Berbeda dengan liposom, pada fitosom terbentuk ikatan kimia antara molekul fosfatidilkolin dan fitokonstituen sehingga menunjukkan stabilitas yang lebih baik. Komponen yang digunakan untuk pembuatan fitosom relatif aman dan memiliki resiko toksisitas rendah (Facino *et al.* 1994).

1.2 Kerugian dari fitosom. Kerugian dari fitosom yaitu fitosom dapat menghilangkan fitokonstituen tertentu dalam sediaan dan mengurangi konsentrasi obat yang diinginkan karena cepat tereliminasi (Tripathy *et al.* 2013, Dayan *et al.* 2002, Facino *et al.* 1994).

2. Perbedaan fitosom dengan liposom

Liposom terbentuk dengan mencampur zat aktif larut air dengan fosfatidilkolin dalam rasio tertentu, namun tidak ada ikatan kimia, molekul fosfatidilkolin mengelilingi substansi yang larut dalam air. Kemungkinan pada substansi tersebut banyak molekul senyawa aktif. Dalam fitosom fosfatidilkolin dan komponen tanaman membentuk ikatan kompleks molekul dengan rasio 1:1 atau 2:1 melibatkan ikatan kimia (ikatan hidrogen). Perbedaan ini yang menyebabkan fitosom menghasilkan penyerapan yang baik dibandingkan liposom serta menunjukkan bioavailabilitas yang lebih baik (Saini *et al.* 2013).

Fitosom juga lebih unggul dari liposom dalam produk perawatan topikal. Fitosom dapat dibedakan dengan liposom melalui mekanisme penyerapan senyawa obat, di mana penyerapan molekul obat pada fitosom terjadi pada bagian polar, sementara pada liposom, molekul obat yang hidrofilik akan terjerap pada bagian inti (*cavity*) yang merupakan ruang yang terbentuk di antara membran fosfolipid. Beberapa penelitian mengemukakan bahwa fitosom merupakan alternatif yang lebih baik dibandingkan dengan liposom karena lebih permeabel terhadap membran dan stabilitas yang lebih baik. Oleh karena itu, penggunaan fitosom telah banyak dikembangkan hingga saat ini untuk meningkatkan efikasi bahan aktif terutama yang berasal dari tanaman, baik dalam formulasi sediaan obat maupun kosmetik (Tripathy *et al.* 2013)



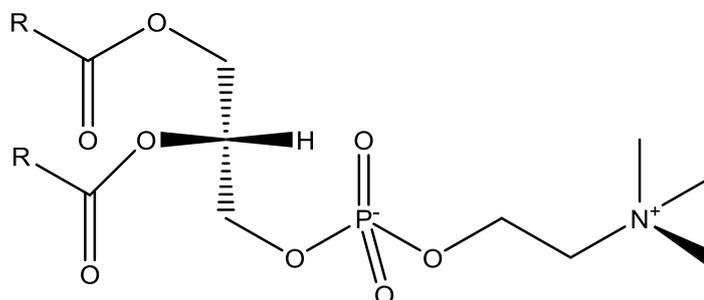
Gambar 3. Struktur perbedaan liposom dan fitosom (Saini *et al.* 2013)

G. Komponen fitosom

1. Fosfolipid

Fosfolipid merupakan bahan pembentuk vesikel dari sistem fitosom. Fosfolipid yang dapat digunakan untuk membuat fitosom cukup beragam, misalnya fosfatidilkolin (PC), PC terhidrogenasi ataupun fosfatidiletanolamin (PE) dengan rentang konsentrasi 0,5 – 10 % (Nandure *et al.* 2013).

Fosfatidilkolin adalah senyawa bifungsional. Bagian fosfatidil bersifat lipofilik dan bagian kolin bersifat hidrofilik. Bagian kepala kolin dari molekul fosfatidilkolin mengikat senyawa, sementara bagian fosfatidil yang terdiri dari tubuh dan ekor kemudian menyelubungi bahan terikat kolin. Molekul dihubungkan melalui ikatan kimia ke kepala kolin polar dari fosfolipid, seperti yang dapat ditunjukkan dengan teknik spektroskopi spesifik (Bomabrdelli 1991).



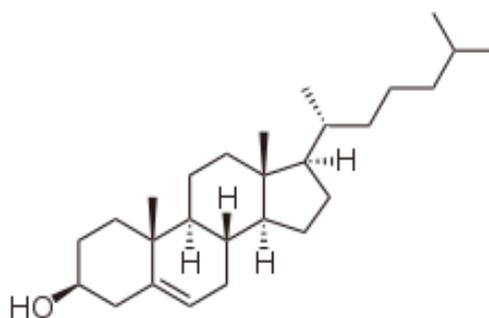
Gambar 4. Struktur fosfatidilkolin (Rajasekaran 2017)

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 fitosom serta memberikan bioavailabilitas yang meningkat untuk obat terlarut lipid, penyerapan yang lebih cepat dan lebih baik pada saluran usus (Bombardelli *et al.* 1989).

Fosfatidilkolin merupakan fosfolipid yang paling umum digunakan dalam pembuatan liposom dan fitosom, karena stabilitas dan kapasitasnya maka dapat bertindak melawan perubahan pH (Kulkarn *et al.* 2011). Fosfatidilkolin merupakan lipid yang paling penting dan umum ditemukan di membran alami, terhitung 50-90% penyusun dari membran sel (Carmona & Ribeiro 2003). Fosfatidilkolin mudah diperoleh dari berbagai sumber tetapi paling sering dari kuning telur atau kedelai melalui ekstraksi mekanis atau kimia menggunakan pelarut heksana. Fosfatidilkolin merupakan komponen utama lesitin yang dalam beberapa konteks istilahnya kadang-kadang digunakan sebagai sinonim. Namun, ekstrak lecithin terdiri dari campuran fosfatidilkolin dan senyawa lainnya (Adeyeye 2013).

2. Kolesterol



Gambar 5. Struktur kimia kolesterol (Wagh 2010)

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

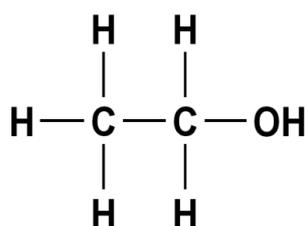
dalam minyak nabati, dan praktis tidak larut dalam air. Senyawa ini stabil dan harus disimpan dalam wadah tertutup, terlindung dari cahaya (Roer *et al.* 2009). Pengaruh kolesterol terhadap stabilitas fitosom adalah untuk mengempakkan barisan molekul fosfolipid pada lipid fitosom sehingga molekul protein tidak mudah berpenetrasi ke permukaan fitosom serta menyebabkan struktur nano-fitosom menjadi lebih rigid (Leekumjron 2004).

3. Kloroform

Kloroform dikenal sebagai triklorometana, metana triklororida, trikloroform, metil triklorida, dan formil triklorida. Kloroform memiliki rumus molekul CHCl_3 dan massa relatif 119,4 gram/mol. Kloroform jernih, tidak berwarna, cairan mudah menguap dengan bau khas eterik pada suhu ruang. Kloroform sedikit larut dalam air, mudah larut dalam disulfida dan dapat bercampur dengan alkohol, eter, benzen, karbon tetraklorida dan minyak yang mudah menguap. Kloroform stabil di bawah suhu dan tekanan normal dalam wadah tertutup (Akron 2002).

4. Etanol

Etanol memiliki struktur kimia $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, dengan massa relatif 46,07 gram/mol. Etanol digunakan untuk melarutkan banyak obat yang tidak larut dalam air dan terkait senyawa.



Gambar 6. Struktur etanol

H. Metode Pembuatan Fitosom

1. Metode

Terdapat metode persiapan untuk obat berbasis fosfolipid sebagai sistem pengiriman obat. Perbedaan metode tersebut biasanya didasarkan pada cara lipid

dikeringkan dari pelarut organik dan kemudian didispersikan kembali pada media berair.

1.1 Hidrasi lapis tipis. Metode hidrasi lapis tipis, metode yang paling sering digunakan karena lebih mudah. Pembentukan vesikel secara spontan terjadi ketika lapis tipis dihidrasi dengan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) pH 7,4 ditandai dengan terbentuknya suspensi. Hidrasi dilakukan untuk mengembangkan vesikel dan mengoptimalkan penyerapan obat. Hidrasi dilakukan dengan menggunakan fase air yang dapat melarutkan obat. Vesikel yang mengembang terjadi karena masuknya cairan ke dalamnya, sehingga dengan adanya obat terlarut pada fase air, diharapkan obat akan masuk ke dalam vesikel. Besar konsentrasi obat yang terjerap tergantung dari kemampuan obat untuk masuk pada bagian polar dan nonpolar molekul lipid yang membentuk vesikel dan kemampuannya berdifusi ke vesikel saat berlangsungnya hidrasi. Proses hidrasi mengakibatkan fosfolipid terdispersi pada buffer berair yang menghasilkan fitosom multilamellar dan fitosom (MLVs) yang heterogen dalam ukuran (diameter 1–5 μm). Namun, untuk memecahkan ukurannya yang heterogen maka memerlukan teknik baru, seperti sonikasi untuk membentuk vesikel unilamellar kecil sehingga menghasilkan ukuran yang lebih kecil dan vesikel yang lebih seragam (Picard *et al.* 1999).

1.2 Teknik Reverse-Phase Evaporation (REV). Dalam metode ini lapisan lipid juga dibuat dengan penguapan pelarut organik di bawah tekanan. Sistem ini kemudian dimurnikan dengan nitrogen dan lipid dilarutkan kembali dalam fase organik kedua, yang biasanya terdiri dari dietil eter atau isopropil eter. Setelah itu vesikula *oligolamellar* terbentuk ketika larutan buffer dimasukkan ke dalam campuran. Pelarut organik kemudian diuapkan dan sistem dijaga dengan pemberian nitrogen secara *kontinyu* (Baiti *et al.* 2014).

2. Sonikasi

Pendekatan energi tinggi memanfaatkan perangkat mekanik yang mampu menghasilkan energi yang dapat mengecilkan ukuran butiran partikel misalnya, homogenizer, tekanan tinggi, microfluidizer dan metode sonikasi (Gutierrez *et al.* 2008). Ukuran minimum butiran yang dapat diproduksi menggunakan pendekatan masing-masing tergantung pada beberapa faktor yang berbeda. Pengecilkan ukuran

partikel menggunakan pendekatan berenergi tinggi tergantung jenis dan kondisi homogenizer (misalnya intensitas energi, waktu dan suhu). Komposisi sampel (misalnya jenis dan konsentrasi minyak serta emulsifier) dan sifat fisikokimia fase komponen (McClements 2011). Sonikasi adalah prosedur dispersi spesifik sistem, yang melibatkan berbagai persamaan interaksi fisikokimia kompleks yang dapat menyebabkan kerusakan cluster atau lebih jauh aglomerasi, serta efek lainnya termasuk reaksi kimia. Ultrasonik merupakan vibrasi suara dengan frekuensi melebihi batas pendengaran manusia diatas 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 ultrasonik 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 tinggi dan terletak pada frekuensi 20 hingga 100 KHz (Mason & Lorimer 2002).

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 oleh 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 (Wardiyati *et al.* 2004). Ultrasonik pada cairan memiliki berbagai parameter seperti frekuensi, tekanan, suhu, viskositas dan konsentrasi suatu sampel (Wardiyanti *et al.* 2004).

I. Verifikasi Metode Analisis

Verifikasi merupakan suatu uji kinerja metode standar. Metode standar adalah metode yang dikembangkan dan ditetapkan oleh suatu organisasi atau badan standardisasi nasional suatu negara. Metode standar ini diterima secara luas,

misalnya : ISO, ASTM, BSN, SNI dan lain sebagainya. Verifikasi ini dilakukan terhadap suatu metode standar sebelum diterapkan di laboratorium. Verifikasi sebuah metode bertujuan untuk membuktikan bahwa laboratorium yang bersangkutan mampu melakukan pengujian dengan metode tersebut dengan hasil yang valid. Disamping itu juga bertujuan untuk membuktikan bahwa laboratorium memiliki data kinerja. Hal ini dikarenakan laboratorium yang berbeda memiliki kondisi dan kompetensi personil serta kemampuan peralatan yang berbeda. Sehingga kinerja antara satu laboratorium dengan laboratorium lainnya berbeda.

Parameter yang digunakan untuk verifikasi metode analisis antara lain:

1. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap analit sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah konsentrasi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima (Harmita 2004).

Penentuan uji linearitas dilakukan dengan larutan baku yang terdiri dari 5 konsentrasi yang naik dengan rentang 50-100% dari rentang komponen uji. Kemudian data diolah dengan regresi linier sehingga dapat diperoleh respon linier terhadap konsentrasi larutan baku dengan nilai koefisien korelasi yang diharapkan mendekati angka 1 untuk suatu metode analisis yang baik. Sebagai parameter adanya hubungan linier, digunakan koefisien korelasi pada analisis regresi linier $y=bx+ax$. Nilai a pada regresi linier menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita 2004).

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

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

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

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

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

Keterangan :

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

B : slope persamaan regresi linier kurva kalibrasi

3. Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi ditentukan salah satunya dengan metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi lalu campuran dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar sebenarnya. Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya (Harmita 2004).

Kriteria kecermatan sangat tergantung kepada konsentrasi analit dalam matriks sampel dan pada keseksamaan metode (RSD). Vander-wielen dkk, menyatakan bahwa selisih kadar pada berbagai penentuan (X) harus 5% atau kurang pada setiap konsentrasi analit. Harga rata-rata selisih secara statistik harus 1,5% atau kurang.

4. Presisi

Presisi atau keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan, yaitu jika metode dilakukan berulang kali oleh analisis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Hrmita 2004).

J. Analisis dan Karakterisasi Fitosom

1. Ukuran partikel

Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas nanopartikel (Singh *et al.* 2009). Partikel yang berukuran kecil memiliki luas permukaan yang lebih besar, dimana akan mengakibatkan pelepasan zat aktif yang lebih cepat. Partikel yang lebih besar memiliki inti yang lebih besar yang dapat mengurangi kecepatan obat untuk berdifusi keluar. Partikel yang berukuran kecil memiliki resiko yang lebih besar untuk terjadinya agregasi selama penyimpanan (Rafeeq *et al.* 2010).

Pengukuran partikel fitosom dilakukan dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Persyaratan parameter ini adalah partikel mempunyai ukuran 50 - 1000 nm dan stabil pada periode waktu tertentu. Metode yang digunakan dalam pengukuran partikel melibatkan suatu proses yang dikenal dengan *Dynamic Light Scattering* (DLS). *Dynamic Light Scattering* juga dikenal dengan PCS (*Proton Correlation Spectroscopy*) mengukur gerak Brown dan menghubungkan dengan ukuran partikel. Proses tersebut dilakukan dengan cara menyinari partikel dengan laser dan menganalisis intensitas fluktuasi cahaya yang tersebar. Partikel kecil ketika disinari sumber cahaya seperti laser, partikel tersebut akan menyebar ke segala arah (Rafeeq *et al.* 2010).

2. Zeta potensial

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. 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).

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).

3. Efisiensi Penjerapan

Efisiensi penjerapan untuk mengetahui % obat yang terjerap dalam pembawa fitosom. Obat yang tidak terjerap dapat dihilangkan atau dipisahkan dengan berbagai teknik, salah satunya sentrifugasi. Fitosom disentrifugasi dan supernatan dipisahkan. Pellet yang diperoleh dicuci kemudian disuspensikan kembali untuk mendapatkan fitosom yang bebas dari obat terjerap. Efisiensi penjerap vesikel ditentukan dengan memisahkan obat bebas dari vesikel penjerap obat dengan menggunakan teknik ultrasentrifugasi. Fitosom disentrifugasi selama 50 menit pada 50.000 rpm dan suhu 4⁰ C dengan tujuan untuk memisahkan obat yang tidak terjerap. Jumlah obat bebas (FDO) 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 alfa mangostin yang terdapat dalam formula dan FD adalah jumlah senyawa alfa mangostin yang terdeteksi pada supernatan (tidak terjerap).

K. Landasan Teori

Alfa mangostin merupakan senyawa xanton yang terkandung dalam kulit buah manggis. Alfa mangostin memiliki khasiat salah satunya sebagai antioksidan, bekerja dengan menonaktifkan radikal bebas berupa *singlet oxygen*, anion superoksida dan anion peroksinitrit (Martinez *et al.* 2011). Xanton termasuk golongan senyawa fenolik yang memiliki kelarutan dalam air yang rendah. Kelarutan dalam air yang rendah serta kurangnya kemampuan permeabilitas menembus *barier* absorpsi dapat mempengaruhi bioavailabilitas suatu senyawa bahan alam di dalam tubuh. Bioavailabilitas oral alfa mangostin (dosis 20 mg/kg) dilarutkan dalam larutan berair yang mengandung etanol 2% dan Tween 80 2%, diperkirakan hanya sekitar 0,4% (Li *et al.* 2011). Oleh karena itu sangat penting untuk melakukan pengembangan formula sehingga bioavailabilitas senyawa bahan alam dapat meningkat.

Sistem penghantaran nanofitosom mampu meningkatkan aktivitas sehingga mempunyai peluang besar dalam pengembangannya seperti aktivitas antioksidan, hepatoprotektor, dan kandidat hepato suplemen (Karthivashan *et al.* 2016). Fitosom disebut juga herbosom termasuk dalam teknologi formulasi fitolipid baru yang dapat mengatasi permasalahan barier dalam tubuh namun tetap menjaga stabilitas serta secara signifikan, meningkatkan efikasi dan bioavailabilitas senyawa turunan tumbuhan (Mzaumber *et al.* 2016). Fitosom merupakan sistem penghantaran obat potensial untuk dapat berpenetrasi baik di kulit (More *et al.* 2013).

Sistem vesikuler fitosom tersusun oleh fosfatidilkolin (terutama dari kedelai) (Uchechi *et al.* 2014). Fosfatidilkolin mengatasi penyerapan yang buruk dari senyawa fenolik sehingga dapat meningkatkan kelarutan dalam lipid sel. Fosfatidilkolin adalah fosfolipid yang paling umum digunakan dalam pembuatan liposom dan fitosom, karena stabilitas dan kapasitas maka dapat bertindak melawan

perubahan pH (Kulkarni *et al.* 2011). Pengaruh kolesterol terhadap stabilitas pada lipid fitosom menyebabkan struktur nano-fitosom menjadi lebih *rigid*.

Metode hidrasi lapis tipis, metode yang paling sering digunakan karena lebih mudah. Pembentukan vesikel secara spontan terjadi ketika lapis tipis dihidrasi dengan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) pH 7,4 ditandai dengan terbentuknya suspensi. Hidrasi dilakukan untuk mengembangkan vesikel dan mengoptimalkan penyerapan obat. Hidrasi dilakukan dengan menggunakan fase air yang dapat melarutkan obat. Vesikel yang mengembang terjadi karena masuknya cairan ke dalamnya, sehingga dengan adanya obat terlarut pada fase air, diharapkan obat akan masuk ke dalam vesikel. Proses hidrasi mengakibatkan fosfolipid terdispersi pada buffer berair yang menghasilkan fitosom multilamellar yang heterogen maka memerlukan teknik baru untuk memperkecil ukuran misalnya, *homogenizer*, tekanan tinggi, *microfluidizer* dan metode sonikasi (Gutierrez *et al.* 2008).

Beberapa pengujian karakteristik yang dilakukan yaitu ukuran partikel menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Ukuran partikel dapat mempengaruhi muatan obat, pelepasan obat, dan stabilitas nanopartikel (Singh *et al.* 2009). Potensial zeta adalah ukuran umum dari besarnya muatan elektrostatis partikel dan sangat sesuai dalam studi stabilitas nanopartikel. Potensial zeta memiliki peran dalam stabilitas fisik, potensial zeta nanopartikel juga mempengaruhi efektivitasnya sebagai sistem penghantaran obat.

L. Hipotesis

1. Fitosom alfa mangostin dapat dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis-sonikasi.
2. Variasi konsentrasi fosfatidilkolin pada fitosom alfa mangostin yang lebih besar memiliki pengaruh terhadap ukuran partikel dan efisiensi penyerapan fitosom.
3. Profil karakterisasi fitosom alfa mangostin yaitu ukuran partikel, zeta potensial, efisiensi penyerapan, dapat diketahui setelah dibuat sediaan fitosom.
4. Fitosom alfa mangostin dapat stabil selama waktu penyimpanan.