

BAB 2

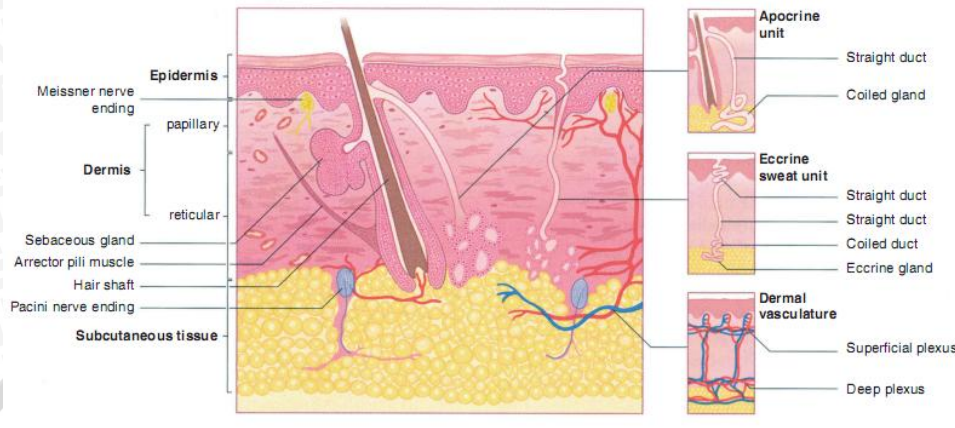
TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Struktur Kulit

Kulit manusia merupakan pelindung utama tubuh. Melalui *innate immunity* kulit berfungsi sebagai barier fisik dari invasi mikroba yang patogen. *Innate immune respon* merupakan respon imun yang tidak spesifik pada suatu patogen tertentu. Pada *innate immune responses* tergantung pada kelompok protein dan sel fagosit mengenali patogen, yang secara cepat teraktivasi untuk memfagosit patogen (Alberts *et al*, 2002).

Struktur kulit tersusun atas dua lapisan besar yaitu epidermis dan dermis. Epidermis merupakan lapisan luar yang terdiri dari epitel skuamosa bertingkat. Sel-sel yang menyusunnya secara berkesinambungan dibentuk oleh lapisan germinal dalam epitel silindris. Lapisan luar mengandung keratin, protein bertanduk (Gibson, 2002). Sedangkan dermis merupakan lapisan yang terdiri dari kolagen jaringan fibrosa dan elastin. Lapisan superfisial menonjol ke dalam epidermis berupa sejumlah kecil papila kecil. Lapisan yang lebih dalam terletak pada jaringan subkutan dan fasia. Lapisan ini mengandung pembuluh darah, pembuluh limfe dan saraf (Gibson, 2002).

Epidermis menjadi barier kimia dan fisik dari lingkungan sedangkan dermis berada pada lapisan dalam yang mendukung struktur dari kulit (Murphy, 1997).



Gambar 2.1. Struktur Kulit (James, 2006)

Lapisan epitel skuamosa pada epidermis tersusun atas dua tipe sel yaitu keratinosit dan sel dendritik. Didalam epidermis juga terdapat sel lain seperti melanosit, sel langerhans, sel markel, namun sel keratinosit merupakan penyusun terbanyak. Umumnya epidermis dibagi menjadi empat lapisan berdasarkan morfologi dari keratinosit dan letak keratinosit berdiferensiasi menjadi sel tanduk, lapisan tersebut yaitu stratum germinativum, stratum spinosum, stratum granulosum dan stratum korneum. Lapisan basal dari epidermis terus mengalami siklus proliferasi untuk memperbaiki epidermis yang terluar (Maghrabya, 2008).

Stratum korneum merupakan suatu barrier internal untuk mencegah hilangnya kandungan air dan iritan dari luar (Maghrabya, 2008). Sel penyusun epidermis secara terus-menerus memperbaiki startum korneum, melindungi dari paparan sinar UV yang dapat merusak kulit, mengatur suhu tubuh, berpartisipasi dalam transduksi sensor, dan mencegah kerusakan dari adanya friksi (visscher, 2009). Epidermis memiliki mekanisme berlebihan yang secara cepat dapat

menginisiasi perbaikan jaringan ketika kulit mengalami cedera. Keasaman stratum korneum dibutuhkan untuk aksi dari enzim termasuk dalam pembentukan dan integritas dari stratum korneum, seperti metabolisme lipid bilayer, sintesis keramid, kohesi sel, struktur bilayer dan lain-lain. Selain itu pH asam dapat berperan dalam menghambat kolonisasi dari patogen (visscher, 2009).

Pada stratum korneum terdapat protein penghubung yang disebut desmosom, desmosom menghubungkan antar sel. Sel yang sudah matur akan bergerak ke atas menuju ke lapisan kulit yang lebih luar, ketika sel telah mencapai lapisan paling luar, stratum korneum yang selnya disebut korneosit tidak bertahan lama. Korneosit tidak memiliki inti dengan korneosit berbentuk datar, hexagonal yang diisi oleh keratin dan air yang dikelilingi oleh protein penutup dan lipid. Bentuk dan struktur sel yang sedemikian menghasilkan barrier fisik secara alami dan mampu menahan air sehingga dapat menjaga kelembaban kulit (Marino, 2001).

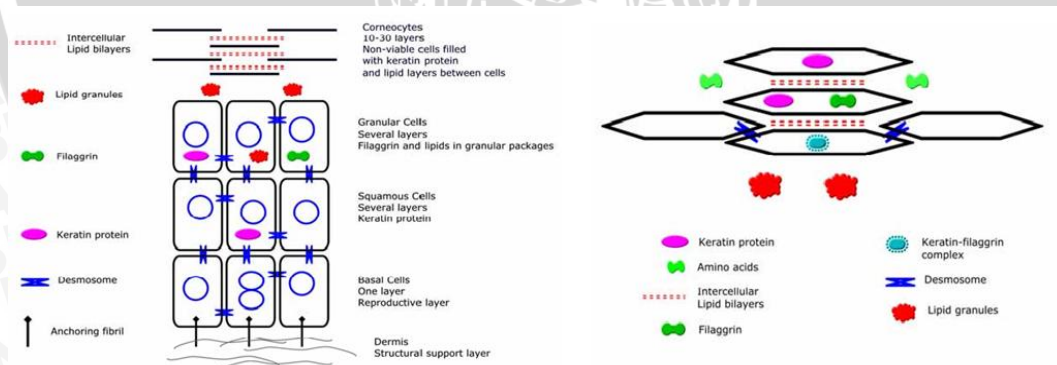


Figure 1. Structure of the Epidermis: Physical Skin Barrier

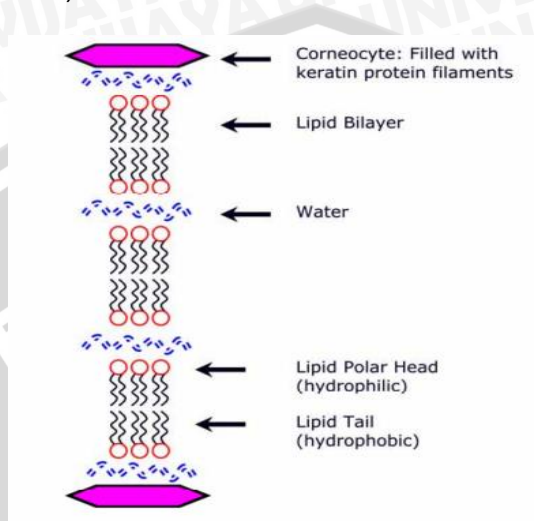
Figure 2. Physical Skin Barrier: Corneocyte Layer

Gambar 2.2 Struktur Epidermis dan Korneosit (Marino, 2001)

Lipid interseluler merupakan faktor penting dalam menjelaskan barrier alami kulit bekerja untuk menjaga kelembaban dan kelembutan kulit. Lipid ini tersusun atas lipid bilayer yang mengelilingi korneosit pada stratum korneum dan mempertahankan kandungan air ke dalam susunan ini. Korneosit berbentuk



datar, kira-kira berdiameter 30 μm dengan tebal mencapai 0.3 μm . Korneosit mengandung keratin fibril dengan diameter 8 μm dalam matrix yang tidak berbentuk (Robert, 2006).



Gambar 2.3 Struktur Membran Sel (Marino, 2001)

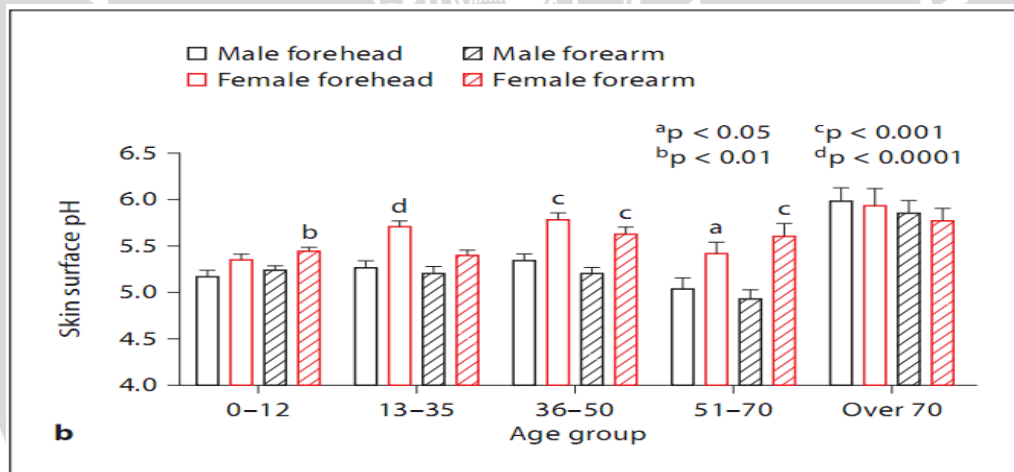
Lipid ini berasal dari degradasi sel pada lapisan granuler, struktur lipid yang khusus disebut lamelar granul yang dilepaskan kedalam ruang ekstra sel. Selain itu juga berasal dari sel pembentuk sel membran. Lipid yang dikeluarkan meliputi kolesterol, asam lemak bebas dan spingolipid. Ceramid merupakan tipe spingolipid yang berasal dari lamelar granul merupakan penyusun lipid utama pada membran sel sehingga menyebabkan membran sel tersebut memiliki sifat cenderung lipofil (Marino, 2001). Oleh karena itu obat-obatan yang memiliki mekanisme obat menembus kulit melalui difusi pasif sangat bergantung pada karakteristik obat tersebut terhadap kelarutannya dalam minyak dan air.

Setiap manusia memiliki ketebalan lapisan kulit yang berbeda-beda, berikut merupakan ketebalan lapisan kulit pada masing-masing bagian tubuh (Verma, 2003) :

Tabel 2.1 Ketebalan Lapisan Kulit (Verma, 2003).

	Stratum corneum ^a (µm)	Cellular epidermis ^a (µm)	Total epidermis ^a (µm)
Forearm dorsal	18.3 (4.9)	56.6 (11.5)	74.9 (12.7)
Shoulder	11.0 (2.2)	70.3 (13.6)	81.3 (13.5)
Buttock	14.9 (3.4)	81.5 (15.7)	96.5 (16.1)
All body sites	14.8 (4.8)	68.9 (17.0)	83.7 (16.6)

Untuk pH kulit normal secara keseluruhan berkisar antara 4.5-7, berikut merupakan variasi pH pada berbagai bagian kulit serta pada pria maupun wanita seperti tabel dibawah ini (Man, 2009) :



Gambar 2.4
Grafik Perbedaan pH Kulit pada Bagian Tubuh yang Dipengaruhi Oleh Jenis Kelamin serta Usia (Man, 2009).

2.2 Inflamasi pada Kulit

Kulit merupakan penghubung utama antara tubuh dengan lingkungan. Dimana lingkungan merupakan salah satu penyebab gangguan kulit, karena mengandung berbagai macam senyawa kimia dan mikroba, suhu dan radiasi elektromagnetik serta trauma mekanik. Yang paling banyak menyebabkan kerusakan pada kulit yaitu adanya invasi dari mikroorganisme patogen, oleh

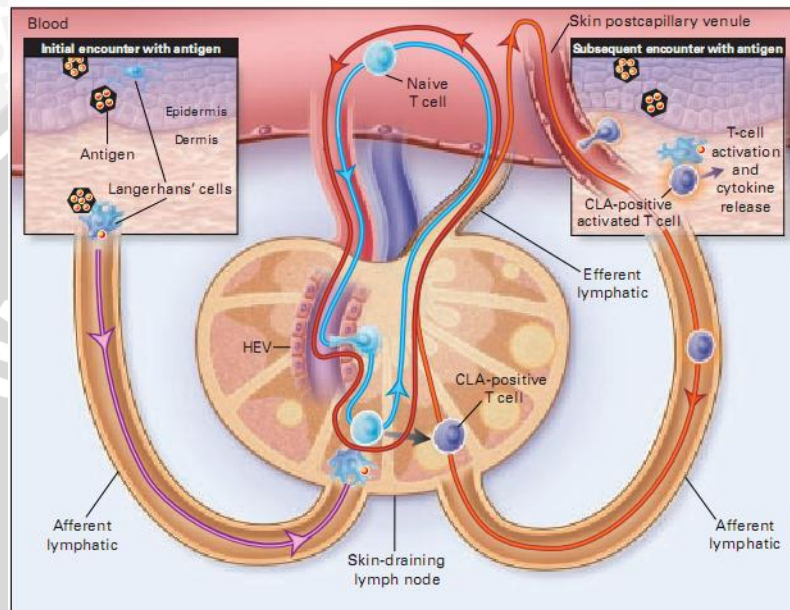
karena itu tubuh membutuhkan perlindungan dari dalam tubuh, salah satunya dari mekanisme pertahanan tubuh (*immune system*) (Robert, 1999).

Inflamasi merupakan mekanisme pertahanan ketika terdapat stimulus adanya kerusakan jaringan. Tujuannya adalah untuk memperbaiki kerusakan atau setidaknya untuk membatasi kerusakan tersebut agar tidak menyebar, dan untuk menghilangkan penyebabnya seperti benda asing atau bakteri. Inflamasi akut akan mengekspresikan reaksi lokal yang berhubungan dengan gejalanya yaitu merah, bengkak, nyeri, dan panas. Terdapat beberapa jalur inflamasi seperti jalur eikosanoid dan melalui jalur *cutaneous lymphocyte antigen* (CLA) (Robert, 1999).

Pada jalur eikosanoid, ketika tubuh terjadi kontak dengan antigen, sel B akan terstimulasi untuk memproduksi IgE yang akan terikat pada reseptor Fc di sel mast. Ikatan antara antigen dan antibodi merupakan pesan sekunder pada sel mast (cGMP, fosfat inositol, Ca^{2+}) yang akan menyebabkan degranulasi secara cepat pada sel mast. Ca^{2+} akan mengaktifasi fosfolipase A2 yang memecah asam arakidonat dari fosfolipid pada sel membran. Ini merupakan awal bagi mediator inflamasi, seperti prostaglandin (PGE2 dan lain-lain) dan leukotrien (Silbernagl, 2000).

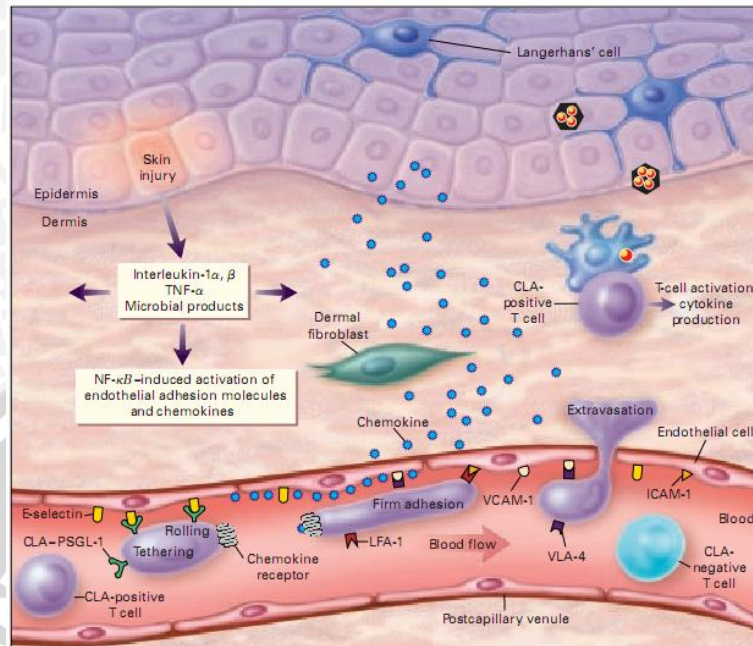
Sedangkan untuk jalur CLA yaitu, memori sel T akan mengingat secara anatomi letak dimana pertama kali terpapar oleh antigen. Memori sel T diidentifikasi melalui marker yang disebut *cutaneous lymphocyte antigen* (CLA). CLA dihasilkan dari nodus limfa yang ada pada kulit dan akan tertarik ke daerah kulit yang akan mengalami inflamasi. Inflamasi dapat terjadi baik pada epidermis, dermis maupun pada subkutan. CLA-positif sel T juga memperantarai banyak

penyakit kulit termasuk dermatitis kontak alergi, psoriasis, dermatitis atopik, alopecia dan lain-lain. Dengan adanya CLA maka akan mengaktivasi sel T dan melepaskan sitokin untuk menuju ke daerah yang terdapat kerusakan (Robert, 1999).



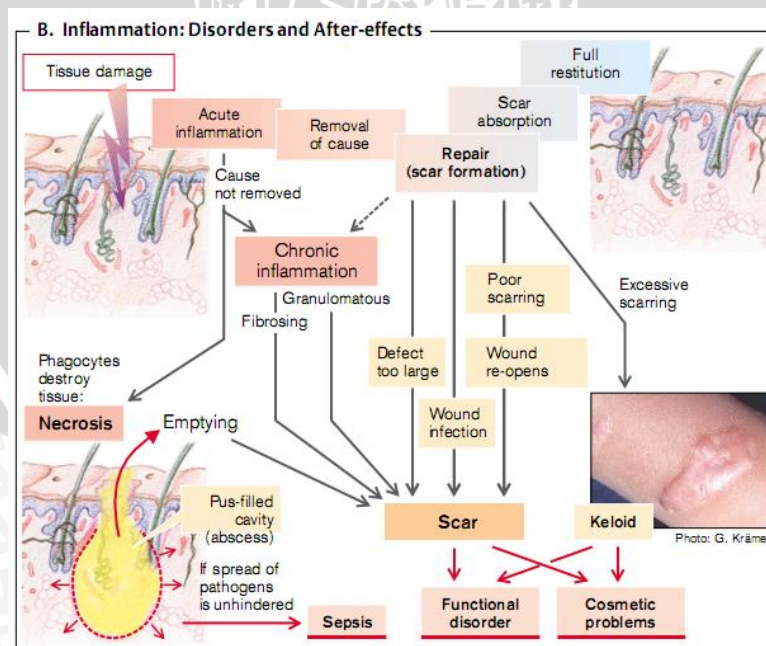
Gambar 2.5. Pergerakan Sel T yang Sebelumnya Tidak Teraktivasi dan CLA-positif, *Skin-Homing Memory T Cells* (Robert, 1999).

Interleukin-1 (IL-1) dan tumor necrosis factor alpha (TNF-alfa), yang telah diketahui sebagai sitokin primer yang berperan dalam proses inflamasi dan imunitas. Epidermis merupakan tempat penyimpanan IL-1 alfa, IL-1b, dan TNF-alfa. Setelah berikatan dengan reseptor, sitokin ini akan mengaktivasi beberapa jalur signaling sel (*cellular signaling pathway*), termasuk jalur *nuclear factor-kB* (NF-kB) (Silbernagl, 2000).



Gambar 2.6 Ekstrvasasi CLA-Positif Kedalam Kulit yang Mengalami Inflamasi (Robert, 1999).

Adanya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh proses inflamasi menimbulkan beberapa penyakit kulit serti dermatitis, psoriasis, skar, ulser dan kerusakan jaringan.



Gambar 2.7 Inflamasi : Gangguan dan Efek Setelannya (Silbernagl, 2000)

2.3 Desain Obat Rute Topikal

Kulit bertindak sebagai barrier fisik dan biologi, kulit juga bertindak sebagai regulator transport. Kulit secara terus menerus mengatur keluar masuk molekul air pada tubuh. Dan juga membiarkan masuk (influx) berbagai macam molekul kecil yang cukup lipofil dengan log P kurang dari 5 dan memiliki berat molekul kurang dari 500 Dalton (Raut, 2014). Jika senyawa tidak memenuhi kriteria yang telah disebutkan, maka diperlukan modifikasi melalui berbagai macam bentuk pengendalian seperti meningkatkan liposifilisitas dan menurunkan ukuran partikel agar senyawa yang diinginkan dapat berpenetrasi ke dalam kulit dengan mudah. Selain itu absorpsi obat melalui kulit meningkat jika obat dalam bentuk larutan karena memiliki koefisien partisi yang cenderung tinggi dan bukan merupakan elektrolit. Berikut merupakan faktor yang mempengaruhi penetrasi obat ke dalam kulit (Barrett, 1969):

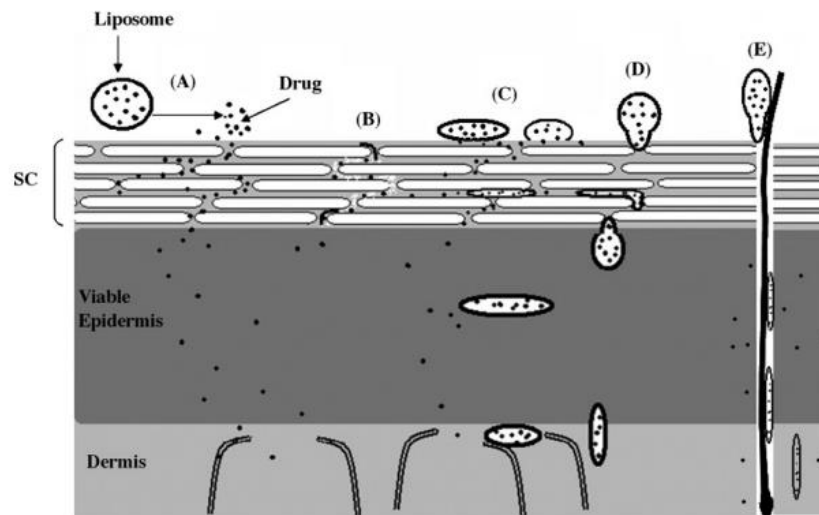
1. Jenis kulit yang berbeda-beda
2. Usia dan letak kulit
3. Suhu kulit dan sirkulasi ke perifer
4. Kondisi kulit (normal, sakit, mengelupas)
5. Waktu kontak, luas pengaplikasian, dan frekuensi penggunaan
6. Tingkat hidrasi kulit
7. Perlakuan sebelum pengaplikasian pada kulit
8. Karakteristik senyawa yang berpenetrasi ke kulit
9. Pembawa
10. Hubungan antara pembawa dan senyawa obat

Selain itu Karakteristik fisika kimia obat yang berpenetrasi menjadi salah satu faktor yang paling penting yang berkontribusi dalam penetrasinya. Kelarutan, ukuran molekul, ukuran partikel, bentuk kristalnya, kemampuannya untuk menguap dan kepolaran yang mempengaruhi kecepatan penetrasi (Barrett, 1969).

2.4 Mekanisme Obat Menembus Kulit

Mekanisme obat menembus membran sel dibagi menjadi dua yaitu transport aktif dan transport pasif yang berupa difusi dan difusi terfasilitasi. Jika obat memiliki berat molekul rendah dan bersifat lipofil, sel membran lipid bukan merupakan barrier untuk berdifusi dan absorpsi. Difusi pasif merupakan dimana molekul secara spontan berdifusi dari bagian konsentrasi tinggi menuju ke konsentrasi rendah. Sedangkan untuk molekul yang berukuran besar serta bersifat hidrofil menggunakan transport aktif untuk menembus membran (Shargel, 2004).

Rute transepidermal dapat didefinisikan sebagai rute dimana suatu komponen menembus stratum korneum. Permasalahan utama yang berhubungan dengan sistem penghantaran obat secara topikal adalah kemampuan suatu senyawa menembus barrier biologis tubuh yang mayoritas tersusun oleh komponen lipid. Lipofilisitas yang cukup dibutuhkan pada mekanisme obat dalam menembus stratum korneum, sedangkan untuk senyawa yang tidak cukup lipofil maka akan sulit untuk menembus stratum korneum (Csizmazia, 2011). Terdapat beberapa mengenai mekanisme suatu vesikel dalam menghantarkan obat dan berpenetrasi kedalam lapisan kulit. beberapa diantaranya yaitu melalui transeuler, paraseluler, adsorpsi, dan transappedegeal (Maghrabya, 2008).

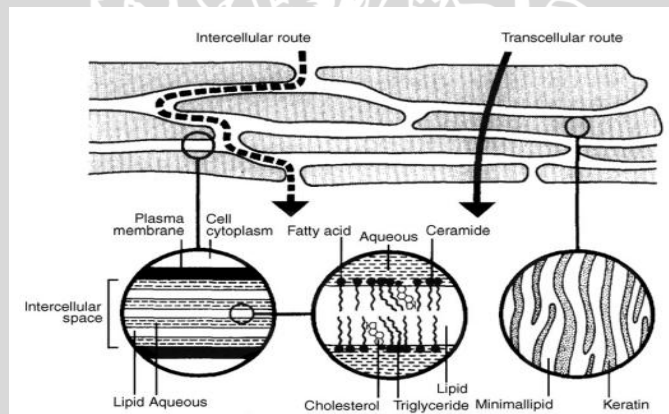


Gambar 2.8 Mekanisme Penetrasi liposom yang mungkin sebagai *skin drug delivery system* (Magrabhya, 2008).

(A) mekanisme obat bebas secara umum. Berdasarkan proses ini, obat berpermeasi pada kulit secara independen setelah keluar dari vesikel (Ganesan *et al.*, 1984). (B) merupakan mekanisme liposom berpenetrasi secara transeluler. Kato *et al.* (1987) berpendapat bahwa lesitin dapat meningkatkan penghantaran obat secara transdermal dengan menurunkan permeabilitas barrier kulit. perubahan ultrastruktur pada interseluler lipid terlihat setelah penggunaan vesikel yang menunjukkan peningkatan efek. Sehingga disimpulkan bahwa nano-agregat yang mengandung kepala hidrofilik (fosfat) dapat berinteraksi dengan stratum korneum manusia secara invitro (Hofland *et al.*, 1995). (C) merupakan vesikel yang mengalami adsorpsi dan atau mengalami fusi dengan stratum korneum. berdasarkan mekanisme ini vesikel kemungkinan diadsorpsi ke permukaan stratum korneum, kemudian mentransfer obat secara langsung dari vesikel ke dalam kulit, atau vesikel mengalami fusi dan bercampur dengan matriks lipid stratum korneum, meningkatkan partisi obat kedalam kulit. selain itu

komponen utama dari liposom yaitu fosfolipid meningkatkan kemudahan marix lipid pada kulit untuk dilalui oleh molekul lipofilik. (D) menggambarkan vesikel liposom masuk menembus kulit melalui paraseluler. konsep ini sulit untuk diterapkan, vesikel lipid yang berukuran besar dapat berpenetrasi pada sejumlah stratum korneum yang memiliki struktur rapat dan berhimpitan. (E) merupakan mekanisme dimana liposom masuk melalui transappendegeal (Maghrabya, 2008).

Rute yang paling banyak digunakan dalam mekanisme penetrasi obat kedalam kulit khususnya stratum korneum yaitu melalui transeuler dan paraseluler (Maghraby, 2008).



Gambar 2.9
Mekanisme Obat Menembus Stratum Korneum (Maghraby, 2008).

2.5 Pegagan

Taksonomi dari Pegagan (*Centella asiatica*) antara lain (Ross, 2005):

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Spermathophyta
- Subdivision : Angiospermae
- Class : Dicotyledonae

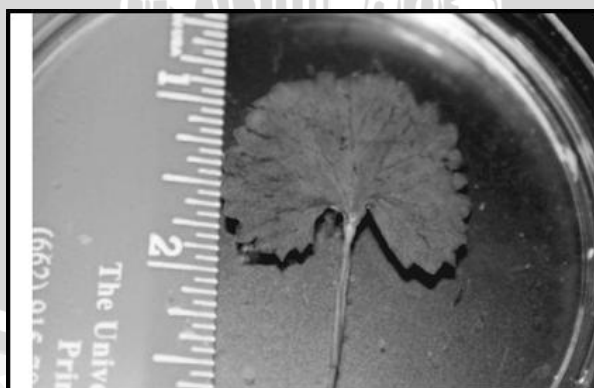


Gambar 2.10 Pegagan (Ross, 2005).

Ordo : Umbilales
Family : Umbiliferae
Genus : Centella
Species : *Centella asiatica* (L) Urban

2.5.1 Morfologi dan Habitat

Tanaman ini memiliki bentuk daun tunggal, bunga tunggal, batang basah dan berambut, memiliki keping biji sejumlah dua, serta memiliki akar tunggang. Daun tunggal, letak basalis atau rozet dengan 2-10 daun. Bentuk daun seperti ginjal (reniformis) yang berukuran 2-5 cm kali 3-7 cm, tangkai daun tegak dan sangat panjang, bagian dalam dari tangkai daun berlubang. Tepi daun bergerigi atau beringgit. Pangkal dari tangkai daun melekuk ke dalam dan melebar seperti pelepah. Tulang daun menjari (palmatus). Helai daun biasanya berwarna hijau, hijau muda dan kalau diremas berbau rangsang yang khas, jika dimakan rasanya seperti peterseli. Akar tunggang bercabang-cabang, akar serabut tumbuh dari buku-buku dari stolon (geragih) (Santa, 1992).



Gambar 2.11 Daun Pegagan (*Centella asiatica*) (Joshi, 2008).

Pada identifikasi dari Centellae Herba menunjukkan adanya fragmen pengenal yaitu seperti epidermis daun dengan stomata anisositik, mesofil, terdapat kalsium oksalat, rambut penutup berbentuk kerucut, sklerenkim berasal

dari mesokarp dan endokarp, pembuluh jala, pembuluh cincin, pembuluh spiral dan pembuluh noktah dari berkas pembuluh dan fragmen endosperm dengan hablur kalsium oksalat bentuk roset (Santa, 1992).

2.5.2 Persebaran dan Masa Panen

Di Indonesia, Pegagan banyak terdapat di beberapa tempat yaitu Cibodas, Cianjur, Banjarnegara, Cicurug, Bali, Bengkulu, Manoko, Ciwidey, Sumedang, Majalengka, Gunung Putri, Ungaran, Smukren, Boyolali, Karang anyar, Cilember, dan lain-lain (Nurjanah, 2008).

Masa panen pegagan biasanya dilakukan setelah tanaman berumur 3 – 4 bulan, Selang pemanenan dengan panen selanjutnya sekitar dua bulan. Hasil produksi total sekitar 15 - 25 ton/ha segar atau setara 1,5 - 2,5 ton/ha kering (Januwati dan Yusron, 2005).

2.5.3 Penggunaan Pegagan untuk Pengobatan

Pegagan sejak dulu telah banyak digunakan untuk berbagai macam pengobatan baik yang sudah didukung dengan uji secara klinis maupun preklinis. Berikut merupakan penggunaan pegagan dalam pengobatan (WHO, 1999) :

1. Penggunaan yang didukung oleh data klinis
Digunakan dalam pengobatan luka, luka bakar, ulser kulit yang ringan dan pencegahan keloid serta hipertropi skar. Ekstrak telah digunakan untuk mengobati luka bakar derajat dua dan tiga, selain itu secara topikal dapat mempercepat penyembuhan, khususnya pada kasus pasca pembedahan dan luka setelah trauma. Ektstrak diguankan secara oral untuk terapi luka pada lambung dan duodenal
2. Penggunaan yang sudah ada pada farmakope

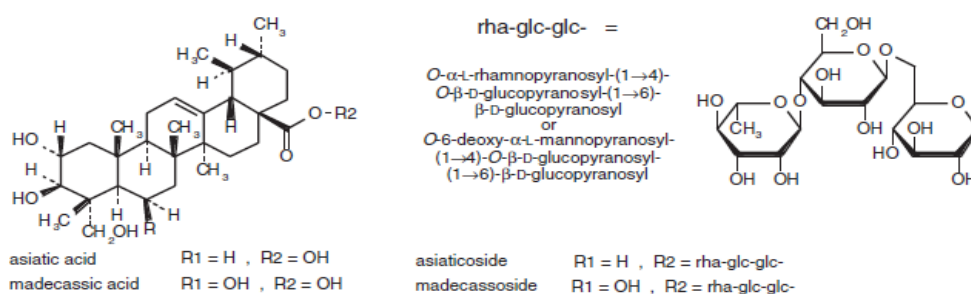
Herba Pegagan telah dilaporkan digunakan untuk pengobatan ulser pada kusta atau lepra dan gangguan vena. Studi menunjukkan bahwa ekstrak pegagan menyebabkan pemulihan pada sirosis hati melalui mekanisme antiinflamasi. Kemudian penelitian selanjutnya masih membutuhkan penelitian lanjutan mengenai aktifitas yang telah ditemukan tersebut.

3. Penggunaan oleh masyarakat namun belum ada data klinis yang mendukung

Digunakan untuk terapi albinis, anemia, asma, brinkitis, selulitis, kolera, konstipasi, dermatitis, diare, pusing, disentri, dismenorrhea, disuria, epilepsi, jaundis, hematemesis, hepatitis, hipertensi, sakit gigi, neuralgia, reumatik, antipiretik, analgesik serta antiinflamasi.

2.5.4 Kandungan Senyawa Fitokimia

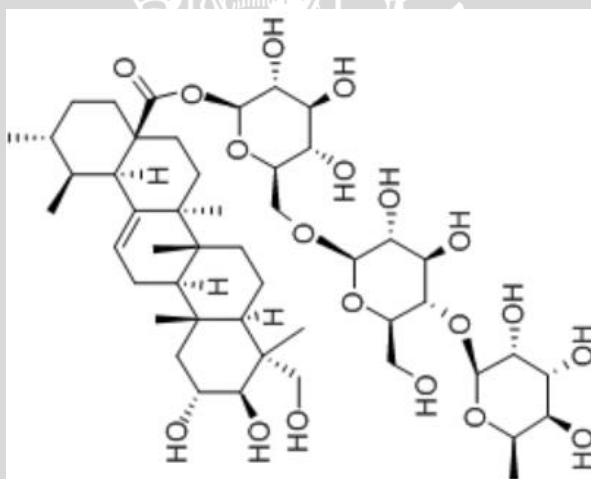
Pegagan mengandung asiatikosida, tankunisid, isotankunisid, madekasosid, brahmosid, asam madasiatik, hidrocotilin, mesoinositol, centellose, karotenoids, garam mineral (seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi), zat pahit vellarin, dan zat samak (Kristina dkk, 2009). Asiatikosida dapat menghambat enzim siklooksigenase 2 (COX-2) yang berperan dalam sintesa protaglandin (PGs), dapat menekan ekspresi tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α), interleukin 1 (IL-1) yang berperan dalam inflamasi (Günter dan Harald. 2007).



Gambar 2.12 Struktur Senyawa pada Ekstrak Pegagan (WHO, 1999)

2.5.4.1 Karakteristik asiatikosida

Asiatikosida merupakan komponen yang paling aktif dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Asiatikosida larut dalam alkohol 50%, gliserin, butilen glikol, polietilen glikol 600 dan air. Asiatikosida banyak digunakan dalam pengobatan luka dan telah banyak penelitian yang mendukungnya (Sikareepaisan, 2007). Asiatikosida memiliki rumus molekul $C_{48}H_{78}O_{19}$, dengan berat molekul 959.12 Dalton. Memiliki titik leleh sebesar 235-238 °C (Chemicalbook, 2007).

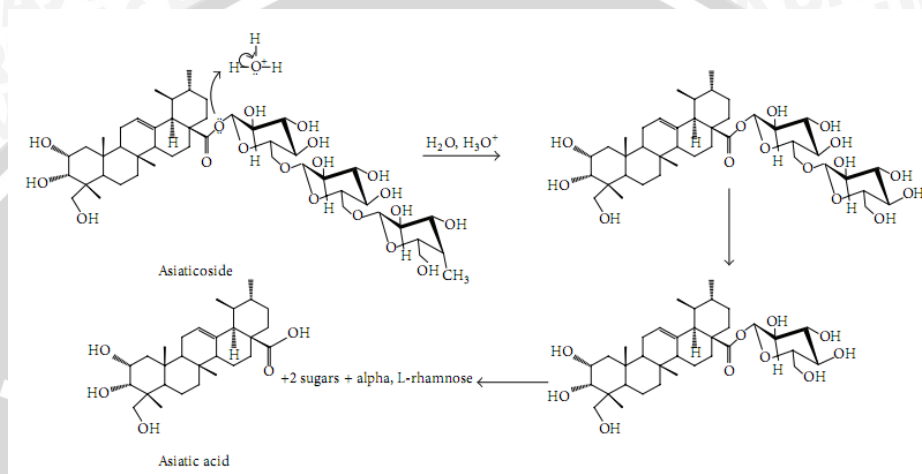


Gambar 2.13
Struktur Senyawa Asiatikosida pada Ekstrak Pegagan
(Chemicalbook, 2007)

Kadar asiatikosida akan menurun seiring dengan peningkatan suhu. Kadar total glikosida triterpenoid yang dihasilkan pada ekstrak yang tidak menggunakan proses pemanasan lebih besar 17,3% dibandingkan dengan kadar ekstrak pegagan dengan hasil pemanasan (Kormin, 2005). Selain kandungannya aktivitas pegagan sebagai antiinflamasi dan antioksidan menurun (kormin, 2005).

asam asiatic merupakan aglikon yang dibetuk dari asiaticosida, karena gugus gula dari asiaticosida mudah terbentuk dalam suasana asam (Borhan, 2013).

Berikut merupakan mekanisme hidrolisis asiaticosida dalam suasana asam (Borhan, 2013):



Gambar 2.14
Mekanisme Hidrolisis Asiaticosida (Borhan, 2013)

Struktur gula dihidrolisis secara bertahap, pada proses hidrolisis ini akan menghasilkan aglikon dan 2 molekul gula dan 1 ramnosa yang mana komponen ini merupakan bagian gula dari struktur asiaticosida (Borhan, 2013).

2.5.5 Posologi

Penggunaan secara oral ekstrak pegagan yang digunakan untuk pengobatan yaitu sebesar 0.33-0.68 gram/hari (WHO, 1999).

2.5.6 Standarisasi Ekstrak

Berikut merupakan standarisasi ekstrak pegagan (WHO, 1999):

1. Ekstrak yang digunakan tidak diperbolehkan mengandung *salmonella spp* pada Herba Pegagan. Batas maksimum yang dapat diterima adalah sebagai berikut :

- Metode ekstraksi secara dekokta tidak diperbolehkan mengandung bakteri aerob $\geq 10^7$ CFU/gram, jamur $\geq 10^3$ CFU/g, dan *Escherichia coli* tidak lebih dari 105 CFU/g atau ml
 - Sedangkan untuk preparasi ekstrak yang ditujukan untuk pemakaian secara oral tidak diperbolehkan mengandung bakteri aerob $\geq 10^5$ CFU/gram atau ml, jamur $\geq 10^4$ CFU/gram atau ml, dan enterobacteria khususnya gram negative $\geq 10^3$ CFU/gram atau ml, serta tidak boleh mengandung *escherichia coli*
2. kandungan total abu tidak boleh lebih dari 19%, bahan organik asing tidak boleh lebih dari 2%, maksimum residu dari aldrin dan dieldrin pada herba pegagan tidak boleh lebih dari 0.05mg/kg serta Kadar logam cadmium maksimum 0.3mg/kg

2.5.7 Identifikasi Senyawa

Identifikasi senyawa kimia tanaman atau skrining fitokimia dilakukan untuk memberikan gambaran tentang senyawa yang terkandung dalam ekstrak (Kristanti dkk, 2008)

2.5.7.1 Uji kualitatif

Uji kualitatif dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam ekstrak yang memiliki aktivitas farmakologi (Jagtap, 2009).

Pada Identifikasi dengan kromatogram, adanya terpenoid dapat ditunjukkan dengan adanya bercak berwarna ungu pada daerah visibel. Warna violet yang terdeteksi pada kromatogram setelah direaksikan dengan penampak bercak vanilin asam sulfat, hal ini diakibatkan oleh adanya reaksi Liebermann-Burchard. Pereaksi ini merupakan campuran antara asam asetat anhidrat dan

asam sulfat pekat. Menurut Wagner (1984) senyawa terpenoid dapat dideteksi dengan pereaksi vanilin asam sulfat dengan mekanisme abstraksi H^+ sehingga terbentuk senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Ikatan rangkap dua pada struktur kimia terpenoid memiliki spektrum serapan pada sinar ultraviolet dan sinar visibel, sehingga deteksi di daerah cahaya tampak terlihat berwarna violet (Wagner, 1984).

KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Berbeda dengan kromatografi kolom yang mana fase diamnya diisikan atau dikemas di dalamnya, pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium atau pelat plastik. Meskipun demikian, kromatografi planar ini dapat dikatakan sebagai bentuk terbuka dari kromatografi kolom (Gandjar, 2007).

Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*) atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Gandjar, 2007).

Kromatografi lapis tipis dalam pelaksanaannya lebih mudah dan lebih murah dibandingkan dengan kromatografi kolom. Demikian juga peralatan yang digunakan. Dalam kromatografi lapis tipis, peralatan yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan hampir semua laboratorium dapat melaksanakan setiap saat secara cepat (Gandjar, 2007).

2.5.7.2 Uji Kuantitatif

Untuk uji kuantitatif senyawa triterpen (asiatikosida) dari ekstrak pegagan dapat dilakukan dengan menggunakan metode *High Performance Liquid*

Chromatography (HPLC) yang dapat memisahkan dan mendeteksi senyawa tersebut dari senyawa yang lainnya (Tiwari, 2010). Herba Pegagan mengandung tidak kurang dari 2% glikosida ester triterpen (asiatikosida dan madekasosida) (WHO, 1999).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) merupakan suatu metode untuk pemisahan komponen yang tidak volatil, tidak stabil terhadap panas, serta komponen polar baik dalam campuran maupun tidak. Komponen dalam campuran dipisahkan melalui retensi yang selektif pada fase diam. Seperti analit yang mengalir melalui detektor yang dipilih, terdapat puncak (peak) pada chart. Area dibawah kurva menggambarkan konsentrasi analit pada larutan. Detektor yang paling umum digunakan adalah ultraviolet, indeks reaktif, mass spektrometri, fluoresen, elektrokimia, infra merah, fotokonduktif dan konduktansi (Inamdar, 1996).

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) merupakan satu-satunya teknik *High Performance Liquid Chromatography* dengan detektor *Mass Spectrometry*. *Mass Spectrometry* bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi mereka. Dua komponen utama dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion, dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menyeleksi ion. Sistem LC-MS/MS umumnya menggunakan beberapa jenis *ion source* dan *mass analyzer* yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa. Masing-masing *ion source* dan *mass analyzer* memiliki kelebihan dan kekurangan sehingga harus disesuaikan dengan jenis informasi yang dibutuhkan (Gandjar, 2007).

Berikut merupakan kelebihan dari teknologi LC-MS/MS meliputi (Vogeser, 2008):

- a. spesifisitas, hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan *Mass Spectrometry* sebagai detektor.
- b. Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis, penerapan LC-MS/MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.
- c. Fleksibilitas, pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat.
- d. Kaya informasi, sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan oleh seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.

2.6 Metode Ekstraksi

Prinsip dasar dari ekstraksi adalah bagaimana solven dapat mengambil suatu ekstrak dari simplisia. Ekstraksi adalah pengambilan suatu senyawa dari simplisia (bahan kasar), dengan prinsip disolusi (*leaching*). Senyawa fitokimia letaknya ada didalam sel, kerja dari solven adalah mengeluarkan senyawa fitokimia dari dalam sel (Handa, 2008).

Pada umumnya metode ekstraksi dibagi menjadi dua yaitu metode ekstraksi panas dan dingin. Hal ini didasarkan pada prosesnya yang menggunakan pemanasan maupun tidak. Yang merupakan metode ekstraksi dingin adalah

maserasi, digesti dan perkolasi. Sedangkan untuk metode ekstraksi panas yaitu infusa, dekokta, dan soxhlet (Handa, 2008).

Senyawa fitokimia yang tidak tahan panas kebanyakan menggunakan metode ekstraksi dingin agar senyawa fitokimia tidak menurun kadar serta efektifitasnya (Nurlaily, 2012). Metode ekstraksi yang paling banyak digunakan untuk ekstraksi pegagan adalah maserasi, infusa, refluks dan soxhlet (Kim, 2010). Dari ketiga metode tersebut hanya maserasi yang merupakan metode ekstraksi dingin dan paling banyak digunakan untuk ekstraksi pegagan, hal ini dikarenakan prosesnya yang tidak menggunakan pemanasan akan cenderung lebih berpotensi untuk tidak merusak senyawa fitokimia yang ada (Kim, 2010).

Proses dalam ekstraksi menggunakan metode maserasi dilakukan dengan cara perendaman. Serbuk simplisia ditempatkan dalam wadah yang tertutup kemudian ditambahkan pelarut dan biarkan pada suhu ruang pada selama waktu tertentu, dengan pengadukan sampai bahan yang terlarut tercampur merata. Campuran kemudian disaring, dan ampas dari penyaringan ditekan hingga didapatkan maserat. Kemudian dilakukan remaserasi untuk memaksimalkan pelarutan senyawa fitokimia yang ada pada serbuk simplisia terhadap pelarut (Handa, 2008).

2.7 Pelarut Ekstraksi

Ekstraksi tanaman dilakukan dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Untuk memilih pelarut yang akan dipakai dalam ekstraksi harus diketahui sifat kandungan kimia metabolit sekunder yang akan diekstraksi. Senyawa polar lebih mudah larut dalam pelarut polar dan senyawa non polar mudah larut dalam pelarut non polar (Mora, 2012).

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan pelarut, yaitu: polaritas, koefisien, densitas, tegangan antar permukaan, kemudahan pengambilan kembali pelarut (titik didih), keaktifan secara kimia (toksisitas) (Ramadhan,2010).

Berdasarkan Nurlaily *et al* membandingkan tiga macam pelarut yaitu etanol, metanol dan air terhadap kadar asiaticosida dan madekasosida. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar asiaticosida dan madekasosida banyak didapatkan dengan menggunakan pelarut etanol (Nurlaily, 2012).

Tabel 2.2 Hasil Ekstraksi dengan Pelarut Etnaol, Metanol, Air terhadap Kadar Asiatikosida dan Madekasoside (Nurlaily, 2012)

Compounds	Total Phenolic Content (g/100g)	Asiaticoside (mg/g)	Madecassoside (mg/g)
Ethanol Extract	177.6	42.86	18.66
Methanol Extract	155.2	36.37	15.87
Aqueous Extract	131.6	2.82	3.75

Pada penelitian lain menunjukkan bahwa untuk aktivitas ekstrak pegagan hasil maserasi dengan berbagai macam pelarut yaitu etil asetat, metanol, n-hexan, dan air menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi dalam penyembuhan luka diitunjukkan pada pelarut etil asetat, seperti pada tabel 2.3 (Somboonwong, 2012).

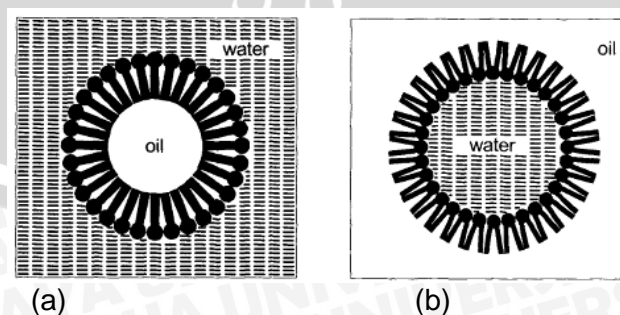
Table 2.3 Pengaruh Ekstrak Pegagan terhadap Kesembuhan Luka (Somboonwong, 2012)

Treatment group	Degree of wound healing (%)			
	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14
Untreated	9.51 ± 1.21	14.27 ± 2.10	20.21 ± 2.10	25.36 ± 1.81
NSS	12.80 ± 2.65	19.64 ± 2.34	25.90 ± 2.67	31.85 ± 2.66
Tween 20®	10.05 ± 1.50	20.57 ± 2.58	27.69 ± 2.39	38.07 ± 5.15
Hexane extract	11.12 ± 2.89	26.02 ± 4.02	37.78 ± 3.89*	53.87 ± 4.64*
Ethyl acetate extract	18.13 ± 2.29*	30.17 ± 1.81*	38.11 ± 2.30*	57.53 ± 5.68*
Methanol extract	11.71 ± 1.94	20.39 ± 2.07	28.94 ± 2.55	60.31 ± 5.70**
Aqueous extract	7.86 ± 1.45	19.98 ± 2.23	28.57 ± 3.35	59.82 ± 8.31**

Values are presented as mean ± S.E.M; n=8; *P < 0.05 and **P < 0.01 vs. Tween 20®.

2.8 Emulsi

Emulsi didalam Farmakope Indonesia IV didefinisikan sebagai sistem dua fasa, yang salah satu cairannya terdispersi dalam cairan lain dalam bentuk tetesan kecil (Depkes RI, 1995). Jika minyak yang merupakan fase terdispersi dan larutan air merupakan fase pembawa maka sistem ini disebut emulsi minyak dalam air. Sebaliknya jika air atau larutan yang merupakan fase terdispersi dan minyak atau bahan seperti minyak merupakan fase pembawa, sistem ini disebut emulsi air dalam minyak (Depkes RI, 1995).



Gambar 2.15 Tipe Emulsi
(a) Tipe Emulsi w/o (b) Tipe Emulsi o/w (Mollet, 2004)

Emulsi dapat terbentuk oleh input energi kinetik. Stabilitas emulsi terutama ditentukan oleh kekuatan dan pembentukan *interfacial* film. Agen pengemulsi yang ideal harus memiliki sifat stabil, inert, serta bebas dari toksik dan kemampuan mengiritasi (Lund, 1994). Stabilitas emulsi memiliki dua prinsip, yakni emulsi tidak mengalami perubahan baik ukuran partikel maupun ukuran distribusi tetesan fase terdispersi. Selanjutnya, emulsi harus memiliki distribusi yang homogen (Lund, 1994). Stabilitas emulsi sebagian besar ditentukan oleh adsorpsi surfaktan pada permukaan minyak-air, yang menjaga tetesan emulsi dari penggumpalan (*coalescing*) (Stein, 1995).

2.8.1 Sediaan Topikal

Produk obat secara topikal secara umum dibagi menjadi dua kategori, yaitu diaplikasikan untuk tujuan lokal dan tujuan lainnya digunakan untuk efek sistemik (Ueda, 2009). Efek lokal meliputi pada permukaan kulit, yang bekerja pada stratum korneum dan yang memodulasi fungsi epidermis dan atau dermis. Produk yang umum yang tergolong dalam penggunaan untuk tujuan lokal yaitu gel, krim, pasta, suspensi, lotion, aerosol, spray, dan larutan. Sedangkan untuk tujuan efek sistemik biasanya menggunakan *transdermal drug delivery system* atau *transdermal patch* (Ueda, 2009).

Sediaan topikal fitosom yang sudah ada berupa krim (*Sericoside* fitosom) dan gel (*Ginco biloba terpen* fitosom) (Singh, 2011). Sedangkan untuk sediaan lain yang paling umum digunakan pada formulasi phytosome adalah berupa emulsi dan tablet (Singh, 2011).

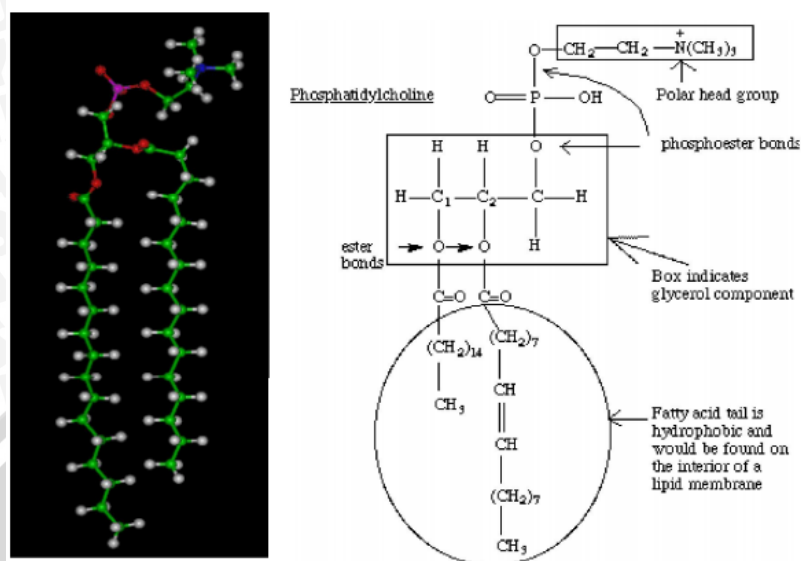
2.9 Fitosom

Fitosom adalah suatu teknologi terbaru dalam formulasi obat herbal yang saat ini dikembangkan untuk memperbaiki farmakokinetika bahan aktif obat

herbal. Fitosom merupakan pengembangan dari produk herbal konvensional dengan mengikat komponen ekstrak tanaman herbal dengan fosfatidilkolin sehingga dapat dihasilkan produk yang mempunyai tingkat absorpsi yang lebih baik daripada ekstrak herbal konvensional (Sharma and Roy, 2010).

Fitosom juga disebut dengan *phosfolipid delivery system* yang membentuk jembatan antara *konvensional delivery system* dan *novel delivery system*. Fitosom merupakan teknologi yang ditujukan untuk menggabungkan ekstrak tanaman atau fitokonstituen yang larut dalam air dengan fosfolipid untuk membentuk kompleks lipid yang kompatibel, yang dapat meningkatkan absorpsi dan bioavailabilitasnya (Amit, 2007).

Konstituen yang larut dengan air (flavonoid dan terpenoid) dari ekstrak memiliki afinitas untuk mengikat secara langsung dengan fosfatidilkolin. Fosfatidilkolin menjadi komponen yang bifungsional yang memiliki suatu bagian lipofilik berupa fosfatidil dan bagian hidrofilik berupa kolin yang membantu meningkatkan bioavailabilitas fitokonstituen yang larut dalam air. Bagian hidrofilik (kolin) berikatan dengan fitonstituen yang larut dengan air dan membentuk badan sementara fosfatidil yang larut dengan lipid membentuk bagian ekor dan menyelimuti kolin yang telah berikatan dengan konstituen. Sehingga dihasilkan kompleks lipid yang kompatibel yang disebut phytosome (Cathurvedi, 2011). Adanya proses pengeringan setelah dilakukan hidrasi akan menyebabkan fitosom membentuk flokulat atau gumpalan sehingga akan mengganggu kestabilan dari fitosom (Bansal, 2012).



Gambar 2.16 Struktur Kimia Fosfolipid (Acharya, 2011)

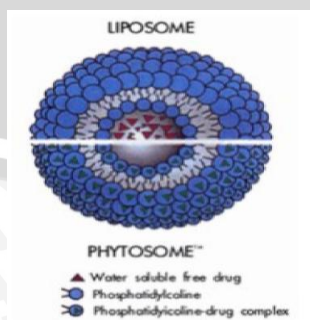
Berikut merupakan beberapa keuntungan dari teknologi fitosom (Gandhi, 2012) :

1. Fosfatidilkolin merupakan salah satu komponen fitosom yang memiliki fungsi ganda yang berperan sebagai karier
2. Komposisi fitosom aman dan komponennya telah disetujui untuk penggunaan farmasetik
3. Absorpsi dan bioavailabilitas dari fitokonstituen yang larut air meningkat. Hal ini dapat meningkatkan efek terapi
4. Proses pembuatan fitosom relatif sederhana
5. Fitosom memiliki kemampuan untuk menembus kulit dengan mudah sehingga meningkatkan efektifitasnya.
6. Fitokonstituen diselubungi oleh fosfolipid yang mencegahnya untuk dirusak oleh enzim pencernaan dan bakteri di saluran cerna pada penggunaan oral
7. Fosfatidilkolin menutrisi kulit disamping berfungsi sebagai karier karena fosfatidilkolin merupakan salah satu bagian dari membran sel.

2.10 Perbedaan Fitosom dan Liposom

Fitosom berbeda dengan liposom dari cara menyatukan obat yang larut air dalam membentuk kompleks. Liposom dibuat dengan mencampur substansi larut air dengan fosfatidilkolin dengan rasio yang pasti pada kondisi yang spesifik. Pada liposom, tidak terjadi pembentukan ikatan kimia, molekul fosfatidilkolin mengelilingi substansi larut air. Sebaliknya, pada proses pembuatan fitosom, jumlah fosfatidilkolin dan komponen tanaman membentuk kompleks molekul 1:1 atau 1:2 tergantung dari substansi yang akan dibuat kompleks dan proses ini melibatkan pembentukan ikatan kimia (sharma, 2010).

Perbedaan yang sangat fundamental adalah pada *liposom*, zat aktif larut pada bagian tengah rongga, tidak memungkinkan untuk terjadinya interaksi molekular antara lipid yang melindungi di luar dan substansi hidrofilik yang berada di dalam. Di sisi lain, kompleks fitosom dapat disamakan bagian integral dari membran lipid, dimana kemampuan polar dari bagian lipofilik berinteraksi melalui ikatan hidrogen dengan kepala polar fosfolipid, membentuk pola unik yang dikarakterisasi menggunakan spektroskopi. Perbedaan ini menyebabkan absorpsi fitosom lebih baik daripada *liposom* yang ditunjukkan dengan bioavailabilitas yang lebih baik (Sharma, 2010).



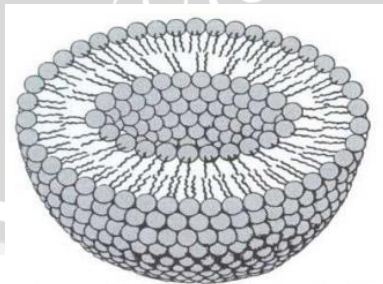
Gambar 2.17 Perbedaan Struktur antara Liposom dan Fitosom (Sharma, 2010).

2.11 Komposisi Fitosom

Komposisi formula fitosom terdiri dari bahan utama dan bahan tambahan. Bahan utama terdiri dari fitokonstituen sebagai zat aktif dan fosfolipid sebagai penyusun cangkang (*carrier*). Bahan tambahan terdiri dari penstabil pH untuk mengontrol pH, dan peningkat stabilitas cangkang untuk menjaga agar cangkang fitosom tetap terbentuk (Yadav, 2011). Meningkatkan stabilitas cangkang fitosom tidak hanya mempertahankan bentuk, ukuran namun juga mempertahankan kadar suatu senyawa yang ada didalamnya, sehingga ketika stabilitas cangkang dipertahankan selama penyimpanan diharapkan efektifitas dan efikasi terapi tetap terjaga (Yadav, 2011).

2.11.1 Fosfolipid

Fosfolipid merupakan komponen struktural utama membran biologis fosfolipid terdiri dari dua tipe yaitu fosfogliserid dan spingolipid. Fosfolipid yang paling umum digunakan adalah fosfatidilkolin, molekul dari fosfatidilkolin tidak larut dalam media cair molekul tersebut meluruskan dirinya seperti bentuk seperti lapisan planar bilayer untuk meminimalisir tindakan yang tidak menguntungkan antara ruah fase cair dengan hidrokarbon rantai lemak yang panjang (Anwekar, 2011).



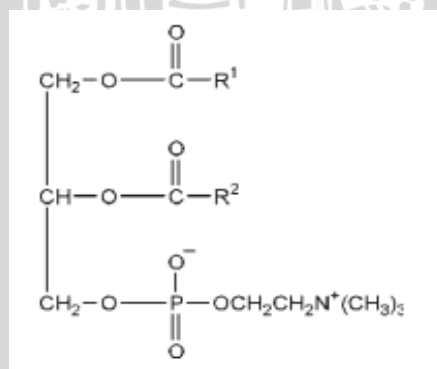
Gambar 2.18 Struktur Fitosom yang Berasal dari Fosfolipid (Anwekar, 2013).

Gliserol yang mengandung fosfolipid paling umum digunakan sebagai komponen formula liposom dan lebih dari 50% berat lipid pada membran biologis. Berikut merupakan beberapa fosfolipid (Anwekar, 2013):

1. Phosphatidyl choline (Lesitin) – PC
2. Phosphatidyl etanolamine (cephalin) – PE
3. Phosphatidyl serine (PS)
4. Phosphatidyl inositol (PI)
5. Phosphatidyl Glycerol (PG) Preformulasi

Lesitin banyak digunakan pada produk farmasetik seperti kosmetik. Kebanyakan lesitin digunakan pada produk farmasetik sebagai emulgator, penstabil emulsi, bahan pendispersi termasuk dalam penggunaan injeksi intravena maupun intramuscular, nutrisi parenteral dan produk topikal seperti krim dan salep (Rowe, 2009). Fosfolipid biasanya digunakan dengan perbandingan 1:1 terhadap fitokonstituennya.

Berikut merupakan karakteristik dari lesitin (Rowe, 2009) :



Gambar 2.19 Struktur Kimia Lesitin

Sinonim : E322 ; LSC 5050; LSC 6040; *mixed soybean phosphatides*; *ovolecithin*; Phosal 53 MCT; Phospholipon 100 H.

Komposisi : 21% fosfatidilkolin, 22% fosfatidiletanolamin, dan 19% fosfatidilinositol.

Kategori

Fungsional : emulgator, bahan pelarut, bahan penstabil emulsi

Pemerian : secara fisik lesitin berbentuk sangat bermacam-macam, berbentuk kental, semi liquid hingga serbuk, tergantung pada asam lemak bebas yang dikandungnya. Lesitin berwarna kuning terang hingga coklat dan tidak berbau, tergantung pada tingkat kemurniannya dan pemutihannya. Ketika terpapar dengan udara, oksidasi akan terjadi lebih cepat sehingga berwarna coklat gelap.

Sifat kimia,

fisika : lesitin memiliki densitas 0.97 gram/cm^3 untuk liquid, dengan nilai isoelektrik sebesar 3.5

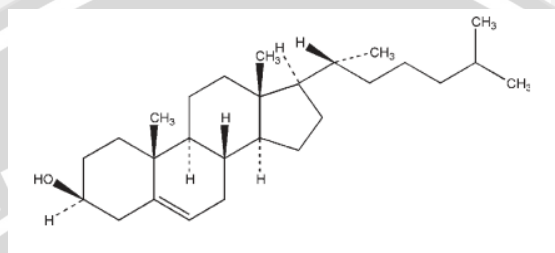
Kelarutan : lesitin larut dalam hidrokarbon alifatik dan aromatik, hidrokarbon terhalogenasi, mineral oil, dan asam lemak. Praktis tidak larut dalam minyak sayur dan hewan yang dingin, air, serta pelarut polar. Ketika dicampur dengan air akan membentuk emulsi.

Stabilitas : lesitin terdekomposisi pada pH yang ekstrim. Selain itu juga bersifat higroskopis dan dapat terdegradasi oleh mikroba. Ketika dipanaskan, lesitin akan teroksidasi dan terdekomposisi menjadi lebih gelap. Suhu yang dapat menyebabkan degradasi adalah $160\text{-}180 \text{ }^\circ\text{C}$ selama kurang lebih 24 jam. Semua lesitin harus disimpan dalam wadah tertutup rapat terhindar dari cahaya dan oksidasi.

Inkompatibilitas : inkompatibel dengan esterase yang dapat menyebabkan hidrolisis

2.11.2 Kolesterol

Pada fitosom kolesterol biasa digunakan sebagai bahan peningkat stabilitas cangkang, agar selama penyimpanan cangkang fitosom tidak mudah rusak. Berikut merupakan karakteristik dari lesitin (Rowe, 2009) :



Gambar 2.19 Struktur Kimia Kolesterol

Sinonim : kolesterin, kolesterolum.

Kategori

Fungsional : emulgator, pelembab

Pemerian : kolesterol berwarna putih atau agak kekuningan, hampir tidak berbau, berbentuk datar, jarum, serbuk atau granul. Jika terpapar pada udara dan cahaya yang terlalu lama maka akan berubah menjadi kuning hingga coklat

Sifat kimia,

fisika : titik leleh sebesar 147-150 °C, dengan konstanta dielektrik 5,41,

Kelarutan : larut dalam minyak sayur, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol 1: 29 pada suhu 40 °C.

Stabilitas : stabil dan harus disimpan pada wadah tertutup rapat

Inkompatibilitas : terjadi presipitasi dengan digitonin

2.12 Metode Pembuatan

Berikut merupakan beberapa metode yang dapat digunakan untuk pembuatan fitosom (Samad, 2007):

1. *Lipid Hydration Method (Hand Shake Vesicle)*

Metode ini banyak digunakan untuk pembuatan liposom. Metode ini termasuk dalam pengeringan larutan lipid sehingga membentuk lapisan tipis kemudian dilakukan hidrasi dengan larutan buffer atau larutan (aquades) dan dengan melakukan vortek untuk mendispersikan selama beberapa waktu. Metode ini sangat mudah dilakukan dan berbagai macam komponen dapat terenkapsulasi kedalam liposome, namun biasanya menghasilkan distribusi ukuran yang kurang homogen.

2. Reserves phase Evaporation Methode

Yang pertama dilakukan adalah emulsi air dalam minyak ditambahkan dengan pelarut organik kemudian sonikasi. Kemudian pelarut organik dihilangkan pada tekanan tertentu sehingga membentuk kental hingga gel.

3. Detergent Removal methodes

Metode pembuatan ini sedikit sulit dilakukan karena membutuhkan gel chromatography untuk menghilangkan sabun yang digunakan selama pembuatan.

2.13 Evaluasi Uji Fitosom

Identifikasi Sifat fisika kimia liposom harus dilakukan karena untuk memastikan kualitas dari produk yang dihasilkan. Oleh karena itu, evaluasi yang terperinci harus dilakukan. Karakterisasi sifat fisika kimia juga bermanfaat dalam evaluasi

produk ketika terjadi perubahan dalam proses pembuatan. Uji karakterisasi fisika kimia, yang dilakukan meliputi (FDA, 2002):

- Morfologi liposom termasuk penentuan jenis liposom (jika memungkinkan)
- Muatan liposom
- *Entrapment Efficiency*
- Ukuran partikel (rata-rata dan distribusinya)
- Suhu transisi
- Data spektroskopi (jika memungkinkan)
- Disolusi secara invitri
- Nilai osmotik
- Light scattering index
- Kadar obat

Berikut merupakan parameter yang sering ditentukan karena parameter tersebut merupakan parameter yang sangat berpengaruh pada Sifat fisika dan kimia liposom :

a. Ukuran partikel dan Morfologi

Respon imun oleh makrofag sangat penting diketahui karena merupakan salah satu cara pertahanan tubuh pada berbagai organ seperti kulit (Chono, 2006). Terdapat berbagai macam faktor yang dapat memberikan respon ambilan diantaranya adalah ukuran dan karakteristik kimia permukaan dari partikel tersebut (Lu, 2009). Ukuran partikel merupakan faktor penting yang mempengaruhi respon imun dari sel dendritik (Lu, 2009). Pengambilan oleh makrofag dan sel busa meningkat seiring dengan peningkatan ukuran partikel. Peningkatan diameter liposom lebih dari 200 nm dapat meningkatkan ambilan dari sel (Liu, 1992). Oleh karena itu

penentuan ukuran partikel sangat penting diketahui untuk dapat mengetahui potensi ambilan sel terhadap partikel tersebut. Selain itu morfologi fitosom juga sangat penting diketahui karena untuk memastikan terjadinya kompleks antara fosfolipid dengan fitokonstituen yang berbentuk sferik (Okhil, 2013).

b. Efisiensi Penjeratan (*Entrapment efficiency*)

Efisiensi penjeratan merupakan salah satu faktor kunci dalam menggambarkan stabilitas obat. Efisiensi penjeratan berhubungan dengan efek terapi obat pada sistem penghantaran seperti liposom. Efisiensi penjeratan menggambarkan seberapa banyak fitokonstituen yang ada didalam phytosome, selain itu efisiensi penjeratan juga menggambarkan seberapa kuat cangkang yang dibentuk oleh membran penyusunnya (Lin He *et al*, 2012).

c. Penetapan Kadar

Penetapan kadar dilakukan untuk mengetahui banyaknya kandungan fitokonstituen didalam phytosome. kadar sangat menentukan efek terapi yang diinginkan. Jika kadarnya tidak memenuhi spesifikasi yang diinginkan dapat terjadi dua kemungkinan yaitu tidak memberikan efek terapi karena under dose atau dapat menimbulkan toksisitas karena over dose (FDA, 2002).

d. Penentuan pH

Penyesuaian pH dalam aplikasinya sangat diperlukan, karena pH akan mempengaruhi efek iritasi pada kulit. selain itu pH dapat mempengaruhi ionisasi dari suatu senyawa maupun bahan penyusun fitosom sehingga dapat menyebabkan fitosom tidak stabil terutama pada cangkang fitosom.

untuk itu penentuan pH pada suatu senyawa maupun suatu sediaan sangat dibutuhkan (Donna, 1986).

2.14 Uji Stabilitas

2.14.1 Tujuan

Uji stabilitas dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang bagaimana kualitas dari suatu zat aktif atau produk farmasetik selama penyimpanan dalam suatu kondisi tertentu seperti temperatur, kelembaban dan cahaya (WHO, 2006).

2.14.2 Prinsip

Produk atau senyawa aktif yang disimpan dalam kondisi tertentu akan mempengaruhi kestabilannya. Faktor stabilitas yang dipengaruhi adalah sifat kimia dan fisiknya. Dari sifat fisika dan kimia yang dipengaruhi biasanya adalah kadar senyawa aktif yang ada didalam produk karena telah mengalami degradasi dan pH serta ukuran partikelnya (WHO, 2006). Begitu pula dengan phytosome untuk kestabilannya didapat dilihat dengan kadar senyawa yang dikandungnya, pH, serta ukurannya.

2.14.3 Kondisi Penyimpanan

Tabel 2.4 Kondisi Penyimpanan

Study	Storage conditions	Minimum time period covered by data at submission
Long term*	25°C ± 2°C/60% RH ± 5% RH or 30°C ± 2°C/65% RH ± 5% RH	12 months
Intermediate**	30°C ± 2°C/65% RH ± 5%RH	6 months
Accelerated	40°C ± 2°C/75% RH ± 5% RH	6 months

Jika uji stabilitas dilakukan pada kondisi 25°C ± 2°C/60 % RH ± 5% RH dan terdapat perubahan kadar, pH, serta sifat lainnya yang signifikan kapanpun selama 6 bulan pengujian pada kondisi penyimpanan uji stabilitas dipercepat,

maka penambahan uji pada kondisi intermediate harus dilakukan dan dievaluasi kembali kriteria yang berubah. pengujian pertama kali sebaiknya dilakukan minimal selama 6 bulan hingga 12 bulan pada kondisi intermediate (WHO, 2006).

Pada umumnya, senyawa aktif harus dievaluasi dibawah kondisi penyimpanan jika uji stabilitas terhadap suhu dan jika diterapkan pada sensitifitas terhadap kelembaban. Kondisi penyimpanan dan lama penelitian dipilih yang cukup untuk mengindikasikan selama penyimpanan sebenarnya dan jika diperlukan menggunakan *climatic chamber* (WHO, 2006).

2.14.4 Spesifikasi

Uji stabilitas harus termasuk dalam bahan lain yang menyertai senyawa aktif yang kemungkinan juga terjadi perubahan selama penyimpanan dan mempengaruhi kualitas, keamanan dan efikasi dari senyawa aktif. Uji harus meliputi fisika, kimia dan biologi (SADC, 2004).

2.14.5. Frekuensi Pengujian

Untuk uji dalam jangka waktu lama, frekuensi pengujian harus cukup menggambarkan profil stabilitas dari suatu zat aktif. Untuk senyawa aktif diuji ulang minimal 12 bulan dengan frekuensi pengujian tiap 3 bulan. Sedangkan pada kondisi penyimpanan dipercepat, minimal dilakukan 3 kali pada saat bulan ke-0, ke-3 dan ke-6 dan direkomendasikan pengujian selama 6 bulan. Jika pada pengujian dipercepat mengalami perubahan secara signifikan maka perlu dilakukan uji stabilitas pada sampel yang lebih banyak dan diambil sampel sebanyak 4 kali. Begitu pula pada uji stabilitas kondisi intermediate, dilakukan selama 6 bulan dengan pengambilan sampel minimal 3 kali (WHO, 2006).

2.14.6 Pernyataan atau Pelabelan

Pernyataan penyimpanan harus berdasarkan evaluasi stabilitas dari suatu senyawa aktif. Dimana dapat diterapkan, petunjuk spesifik harus ada, khususnya pada bahan yang tidak dapat disimpan pada kondisi beku. Kata-kata suhu ruang seharusnya dihindarkan.

Berikut merupakan pelabelan berdasarkan evaluasi stabilitas (SADC, 2004)(WHO, 2006):

Tabel 2.5 Pelabelan Berdasarkan Kondisi Uji Stabilitas

Testing condition where the stability of the pharmaceutical product has befishensi pejeratann shown	Recommended labelling statement
for countries in Climatic Zones I and II: 25°C/60% RH (long term) 40°C/75% RH (accelerated)	"Store below 30°C" *
for countries in Climatic Zones III and IVA: 30°C/65% RH (long term) 40°C/75% RH (accelerated)	"Store below 30°C"
for countries in Climatic Zones I and II: 25°C/60% RH (long term) 30°C/65% RH (intermediate)	"Store below 30°C"
for countries in Climatic Zone III and IVA: 30°C/65% RH (long term)	"Store and transport below 30°C"
for countries in Climatic Zones I and II: 25°C/60% RH (long term)	"Store below 25°C"
5°C ± 3°C	"Store and transport in a refrigerator (2°C to 8°C)" **
-20°C ± 5°C	"Store in a refeshensi pejeratanzer and transport frozen (-5°C to -20°C)" ***

