

## BAB 6

## PEMBAHASAN

## 6.1 Pembahasan

Ekstrak daun jeruk purut yang digunakan sebagai zat aktif etosom memiliki aktivitas antioksidan (Feng, *et al*, 2009). Ekstraksi dilakukan dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:5 dan dilakukan remaserasi sebanyak dua kali, kemudian dilakukan pengeringan etanol 96% dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 80 rpm (Depkes RI, 2000).

Metode maserasi dipilih untuk melindungi senyawa aktif yang dipengaruhi oleh suhu, namun kekurangannya metode ini memerlukan pelarut etanol 96% lebih banyak. Pelarut etanol 96% dipilih karena memiliki sifat polaritas yang tinggi yang dapat menarik senyawa dengan sifat polar, semi polar dan non-polar pada ekstrak daun jeruk purut yang memiliki aktivitas antioksidan yaitu flavonoid, terpen, alkaloid dan fenol. Remaserasi dilakukan untuk mendapatkan senyawa aktif daun jeruk purut lebih sempurna. Filtrat yang didapat disaring pelarutnya dengan *rotary evaporator* kemudian menjadi ekstrak kental (Depkes RI, 2000).

Hasil ekstraksi dengan metode maserasi pada daun jeruk purut didapat dari total serbuk simplisia 165,0 gram dengan rendemen 9,85%. Rendemen yg didapat menurut Munawaroh, 2010, sebesar 13,39%. Hasil rendemen yang berbeda disebabkan perbedaan perbandingan pelarut etanol pada saat proses maserasi.

Uji organoleptik yang dilakukan selama penyimpanan memiliki hasil yang tidak jauh berbeda. Hasil organoleptik warna pada etosom kuning kehijauan.

Warna kuning berasal dari fosfatidilkolin yang digunakan yaitu soya lesitin. Warna hijau pada etosom ekstrak daun jeruk purut disebabkan pigmen klorofil pada daun jeruk purut yang terlarut dengan pelarut etanol (Munawaroh dan Astuti, 2010). Bau pada etosom khas aromatis karena adanya senyawa minyak atsiri yang mengandung terpen. Menurut Feng, 2009, Ekstrak daun jeruk purut yang memberikan efek antioksidan tertinggi adalah kandungan flavonoid dan sitronelal pada senyawa terpen yang terdapat pada daun jeruk purut.

Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C.) berdasarkan hasil skrining fitokimia, positif mengandung senyawa fenol, terpen, alkaloid dan flavonoid. Pada senyawa fenol, peran utama aktivitas antioksidan terdapat pada struktur rantai samping cincin aromatisnya. Aktivitas peredaman radikal bebas senyawa fenol dipengaruhi jumlah dan posisi atom hidrogen ( $H^+$ ). Senyawa fenol berpotensi sebagai antioksidan dengan menyumbangkan atom hidrogen, maka dapat menghasilkan reaksi netralisasi radikal bebas atau menghentikan reaksi radikal berantai yang terjadi (Ghidouche, *et al*, 2007).

Potensi antioksidan yang dimiliki flavonoid berasal dari kemampuan mendonorkan elektron ke senyawa radikal bebas. Mekanisme tersebut membuat flavonoid memiliki efek menekan kerusakan jaringan oleh radikal bebas (Shahidi, *et al*, 1997). Senyawa alkaloid, terutama indol, memiliki kemampuan untuk menghentikan reaksi rantai radikal bebas secara efisien. Senyawa radikal turunan dari senyawa amina ini memiliki tahap terminasi yang lebih lama. Beberapa senyawa alkaloid lain yang bersifat antioksidan adalah quinolon (Chung dan Woo, 2001). Kandungan terbanyak pada daun jeruk purut selain flavonoid adalah senyawa monoterpen. Menurut Luo dan Tan, 2011, terpenoid mampu meredam radikal bebas. Terpenoid memiliki ikatan rangkap terkonjugasi



sehingga dapat mentransfer hidrogen (Capelli dan Cysewski, 2007). Senyawa monoterpen paling banyak yang dimiliki daun jeruk purut adalah  $\beta$ -sitronelal (Luo dan Tan, 2011).

Etosom disimpan pada suhu  $25,0^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  dan RH  $60,0\% \pm 5,0\%$ , ukurannya mengalami ketidakstabilan pada hari ke-0, ke-15, dan ke-30. Pembentukan vesikel pada etosom terjadi pada saat fosfolipid terhidrasi dalam medium berair. Lapisan lipid (lipofil) ganda akan melekuik dengan sendirinya, membentuk gelembung yang tertutup dan fase air (hidrofil) akan terperangkap di bagian tengahnya. Hidrasi akan membuat vesikel membesar semaksimal mungkin sehingga mengoptimalkan penjeratan obat (Sharma dan Srivastava, 2010).

Menurut Poland, *et al*, 2013, ukuran vesikel dengan ukuran mikro tidak dapat menembus dermis (Poland, 2013). Menurut Badenhorst, 2014, jika ukuran vesikel  $> 10 \mu\text{m}$  penetrasi sampai ke permukaan kulit,  $3-10 \mu\text{m}$  akan berkonsentrasi dalam folikel rambut dan ukuran vesikel  $< 3 \mu\text{m}$  akan dapat menembus stratum korneum. Berdasarkan hasil yang didapat hasil PSA, rata-rata ukuran vesikel masing-masing formula 1, formula 2, dan formula 3 sebesar  $17,086 \pm 28,491 \mu\text{m}$ ;  $52,872 \pm 42,553 \mu\text{m}$  dan  $27,489 \pm 38,634 \mu\text{m}$ . Hasil yang didapat, rerata ukuran vesikel akan penetrasi sampai stratum korneum dan ukuran vesikel tidak sesuai dengan spesifikasi yang diharapkan yaitu  $50-200 \text{ nm}$ . Ada beberapa faktor yang menyebabkan perbedaan ukuran vesikel, yaitu komposisi bahan, sonikasi dan kecepatan pengadukan.

Komposisi etosom yang memberikan pengaruh pada ukuran vesikel adalah fosfatidilkolin dan etanol. Konsentrasi fosfatidilkolin yang dapat digunakan pada etosom adalah rentang  $1,0-3,0\%$ , dalam penelitian ini menggunakan konsentrasi

1,5%; 2,5% dan 3,0% untuk formula 1, formula 2 dan formula 3. Menurut Dave, 2010, jika konsentrasi fosfatidilkolin terlalu rendah maka vesikel yang terbentuk hanya sedikit dan jika konsentrasi fosfatidilkolin terlalu tinggi maka vesikel terlalu lunak dan menyebabkan kebocoran pada vesikel sehingga menurunkan nilai efisiensi penjeratan.

Sonikasi yang dilakukan pada penelitian ini selama 45 menit dalam satu siklus, perlakuan ini lebih lama dibanding pustaka. Sonikasi dilakukan untuk memperkecil ukuran vasikel dengan memanfaatkan energi ultrasonik. Sonikasi bekerja dengan mengubah sinyal listrik menjadi getaran secara mekanis. Pada penelitian Yamaguchi *et, al* 2009, menyebutkan bahwa frekuensi dan lama waktu sonikasi mempengaruhi ukuran vesikel. Jika sampel terlalu lama mendapatkan getaran mekanis, dapat menyebabkan aglomerasi pada vesikel. Lama waktu sonikasi yang dilakukan pada penelitian ini selama 45 menit, sementara menurut Chandarn, 2012, sonikasi dilakukan selama 5 menit dengan 3 kali siklus dan setiap pergantian siklus diberi jeda 5 menit dan diperkuat oleh Yamaguchi, 2009, dengan paparan ultrasonik yang singkat lebih baik dibanding paparan ultrasonik yang lama. Menurut Gad, 2008, posisi sampel saat sonikasi mempengaruhi ukuran vesikel agar ultrasonik dapat terkonsentrasi pada sampel.

Frekuensi sonikasi yang dilakukan pada penelitian ini sebesar 39-41 khz, menurut Mahmood, 2014, frekuensi lain yang dapat digunakan sebesar 47 khz dan sejalan dengan Akib, 2014, yang menggunakan fekuensi sonikasi 56 khz. Namun, bukan berarti semakin meningkatnya frekuensi, semakin menurunkan ukuran vesikel, tetapi tergantung posisi sampel dengan ultrasonik.

Kecepatan pengadukan mempengaruhi ukuran vesikel yang diinginkan, pengadukan tidak boleh terlalu cepat dan tidak terlalu lambat. Jika terlalu cepat,



maka terjadi benturan antar vesikel sehingga menyebabkan ukuran yang lebih besar, pengadukan yang cepat juga menghasilkan busa yang terlalu banyak karena banyaknya udara yang terperangkap. Jika pengadukan lambat, maka bahan-bahan akan sulit homogen. Menurut Babaie, 2015, kecepatan pengadukan etosom dapat divariasikan dimulai 700-22.000 rpm.

Efisiensi penjeratan bahan aktif ekstrak daun jeruk purut dalam vesikel etosom dipengaruhi oleh komposisi fosfatidilkolin dan etanol. Fosfatidilkolin berperan penting dalam pembentukan vesikel yang akan menjerat obat. Penjeratan ekstrak pada etosom akan menurun dengan peningkatan konsentrasi etanol karena etanol dapat meningkatkan fluiditas pada kulit sehingga menjadi lebih permeabel. Semakin besar kandungan fosfatidilkolin maka penjerapan obat akan semakin besar karena peran dari fosfatidilkolin sebagai penjerap bahan aktif (Venkateswarlu, *et al*, 2011).

Pada penelitian yang dilakukan, nilai efisiensi penjeratan formula 1, formula 2, dan formula 3 masing-masing sebesar 4,789%; 15,062%; 9,261%. Formula 1 memiliki persentase penjerapan paling rendah dibanding formula lain. Formula 2 memiliki persentase penjerapan yang paling tinggi karena mengandung fosfatidilkolin lebih besar dibanding formula 1, formula 3 memiliki persentase penjerapan lebih kecil dibanding formula 2 karena adanya pengaruh pembuatan etosom pada tahap sonikasi. Menurut Sugiyati, 2015, suhu mempengaruhi ukuran vesikel. Pengaruh suhu terhadap vesikel menunjukkan bahwa lesitin soya memiliki titik suhu transisi. Pada suhu yang lebih tinggi, dapat terjadi kerusakan susunan membran lipid (Liu, *et al*, 2011). Pada penelitian yang dilakukan, suhu saat sonikasi menggunakan suhu terendah pada alat sebesar 40°C, sementara suhu yang diperlukan untuk memekatkan fase lipid dalam air memerlukan suhu

ruangan agar terbentuk fase gel. Suhu pada saat dilakukan sonikasi, diantisipasi dengan memberi es pada wadah sonikator, namun suhu yang dilakukan tidak dimonitoring sehingga apabila suhu es sudah mulai naik, pembentukan vesikel selama proses sonikasi akan terganggu (Sugiyati, dkk, 2015).

Ukuran vesikel pada formula 1 paling kecil ( $17,086 \pm 28,491 \mu\text{m}$ ), diikuti dengan formula 3 ( $27,489 \pm 38,634 \mu\text{m}$ ) dan formula 2 ( $52,872 \pm 42,553 \mu\text{m}$ ). Konsentrasi fosfatidilkolin formula 1 sebesar 1,5%, formula 2 sebesar 2,5% dan formula 3 sebesar 3,0%. Menurut hasil, formula 2 memiliki ukuran lebih besar dibanding formula 3 karena konsentrasi fosfatidilkolin tidak berbeda secara signifikan, kecepatan pengadukan, suhu saat sonikasi dan durasi sonikasi. Potensi antioksidan formula 1 lebih tinggi dibanding formula 2 dan formula 3. Nilai pH ketiga formula selama penyimpanan sesuai dengan spesifikasi yang diharapkan yaitu antara 4.5-6.6. Untuk uji morfologi vesikel, sesuai dengan pustaka yaitu berbentuk *spheris* (Bhalaria, *et al*, 2009).

Berdasarkan hasil nilai IC 50 antioksidan antara vitamin C, ekstrak, dan sampel (etosom) memiliki perbedaan kemampuan meredam radikal yang bervariasi. Nilai IC 50 vitamin C sebesar  $4,793 \pm 0,047$ . Nilai IC 50 ekstrak daun jeruk purut sebesar  $25,907 \pm 0,187 \text{ ppm}$ .

Nilai IC 50 sampel etosom ekstrak daun jeruk purut formula 1 sebesar  $28,814 \pm 0,431 \text{ ppm}$ , formula 2 sebesar  $32,299 \pm 1,893 \text{ ppm}$  dan formula 3 sebesar  $30,234 \pm 0,531 \text{ ppm}$ . Menurut Ariyanto, 2006, aktivitas antioksidan dibagi menjadi beberapa tingkat, yaitu IC 50 < 50 ppm merupakan antioksidan sangat kuat, IC 50 50-100 ppm merupakan antioksidan kuat, IC 50 101-150 ppm merupakan antioksidan sedang, IC 50 > 150 ppm merupakan antioksidan lemah.

Dari tingkatan antioksidan tersebut, vitamin C, ekstrak dan sampel memiliki potensi aktivitas antioksidan sangat kuat.

## 6.2 Implikasi pada Bidang Farmasi

Pada penelitian ini, mengenalkan sistem pengantaran obat yang non-invasif (Pratima dan Shailee, 2012) yang memanfaatkan bahan aktif herbal yaitu daun jeruk purut dengan aktivitas antioksidan yang sangat kuat (Ariyanto, 2006) namun ukuran vesikel yang masih belum mencapai spesifikasi antara 50-200 nm. Aktivitas antioksidan yang sangat kuat ini berpotensi dalam mengurangi proses penuaan dini yang ditandai dengan kulit keriput, kering dan tidak elastis (Fisher, 2002). Etosom ekstrak daun jeruk purut masih dapat dikembangkan dalam sediaan setengah padat (gel atau krim) yang dapat meningkatkan kepatuhan pasien (Rakesh, 2014).

## 6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian yang dilakukan, tidak dilakukan uji permeasi sehingga tidak dapat diketahui tingkat penetrasi vesikel ke dalam kulit.