



UNIVERSITAS INDONESIA

**EVALUASI DAN UJI PENETRASI FORMULASI LIPOSOM
YANG MENGANDUNG EKSTRAK *Centella asiatica* (L.) Urban
MENGUNAKAN METODE HIDRASI LAPIS TIPIS**

SKRIPSI

**DIAN RAHMA BAKTI
0806321146**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**EVALUASI DAN UJI PENETRASI FORMULASI LIPOSOM
YANG MENGANDUNG EKSTRAK *Centella asiatica* (L.) Urban
MENGUNAKAN METODE HIDRASI LAPIS TIPIS**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana
farmasi**

**DIAN RAHMA BAKTI
0806321146**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 6 Juli 2012



Dian Rahma Bakti

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Dian Rahma Bakti
NPM : 0806321146
Tanda Tangan : 
Tanggal : 6 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Dian Rahma Bakti
NPM : 0806321146
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Evaluasi dan Uji Penetrasi Formulasi Liposom yang
Mengandung Ekstrak *Centella asiatica* (L.) Urban
Menggunakan Metode Hidrasi Lapis Tipis

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Mahdi Jufri, M.Si. (.....)
Penguji I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt. (.....)
Penguji II : Dr. Iskandarsyah, M.S., Apt. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 6 Juli 2012

"Bacalah dengan (menyebut) nama Tuhan-mu yang menciptakan. Dia mengajarkan manusia apa yang tidak diketahuinya."

(QS. Al-'Alaq : 1 dan 5)

*Skripsi ini dipersembahkan untuk ayah dan mama.
Yang selalu mengajarkan bahwa sebaik-baiknya manusia
adalah yang bermanfaat bagi sesamanya...*

*Skripsi ini dipersembahkan untuk kemajuan ilmu pengetahuan
Bangsa Indonesia...*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas berkah rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak sejak masa perkuliahan hingga masa penyusunan skripsi, sulit untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan terima kasih dan rasa hormat kepada:

1. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S. selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini;
2. Dr. Mahdi Jufri, M.Si. sebagai dosen pembimbing penulis yang telah menyediakan banyak waktu, tenaga, dan pikiran untuk membantu, berdiskusi, memberikan solusi, dan mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
3. Ibu Yuni Anggraeni, mahasiswa S2 Herbal Farmasi UI yang juga sebagai dosen farmasi di FKIK UIN Syarif Hidayatullah Jakarta, atas bantuan pemberian standar bahan asiatikosid secara cuma-cuma.
4. drg. Laifa dan dr. Ayu sebagai kepala laboratorium serta Mba Lilis sebagai laboran laboratorium kultur jaringan FKIK UIN Syarif Hidayatullah Jakarta, atas izin pemakaian alat ultrasentrifugasi. Bapak Wahyu sebagai dosen Kimia UGM dan Bapak Azwar sebagai dosen Fisika UI atas bantuan pemeriksaan sampel penelitian;
5. Prof. Dr. Maksun Radji, M.Biomed., Apt. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan banyak perhatian, saran, dan bantuan selama ini;
6. Seluruh dosen Departemen Farmasi FMIPA UI atas segala keikhlasan berbagi ilmu pengetahuannya dan didikannya selama ini. Terutama Dr. Abdul Mun'im yang telah banyak membantu memberikan solusi selama penelitian ini;

7. Laboran-laboran Farmasi UI yang telah banyak membantu penulis dalam pengadaan bahan maupun alat untuk penelitian ini, Mba Devfa, Pak Surya, Pak Imih, Mba Ulfa, dan Mba Lia.
8. Dra.Nurliati dan Abu Bakar sebagai kedua orang tua, Sharah Bakti, Ridho Bakti, dan seluruh keluarga tercinta, terkhusus ibu almh. Nurjasni yang selalu memberikan suntikan semangat, dorongan untuk terus menggapai cita-cita tanpa kenal lelah, segala kasih dan sayangnya memberikan bantuan baik moril maupun materil selama ini;
9. Muhammad Irfan Hasan untuk segala doa dan dukungan, yang mengajarkan tidak mengenal kata putus asa demi masa depan yang cerah.
10. Sahabat-sahabat tercinta Neti Triwinanti, Nisa Yulianti Suprahman, Nurlisa, Seruni Puspa, Aisyah Noor Astari, Cantika Sari, Febryo, teman-teman KBI farmasetika, dan rekan-rekan farmasi 2008 lainnya, atas segala kebersamaan, persaudaraan, suka duka, dan untuk Wenny Silvia sebagai rekan kerja penulis yang telah banyak membantu selama masa penelitian hingga penyusunan skripsi ini, serta Berwi Fazri Pamudi sebagai kakak angkat di farmasi yang telah banyak membantu dalam hal akademis;
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungan dan bantuannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini berjalan.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis dengan senang hati menerima segala kritik dan saran demi perbaikan di masa yang akan datang. Penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dian Rahma Bakti
NPM : 0806321146
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Evaluasi dan Uji Penetrasi Formulasi Liposom yang Mengandung Ekstrak *Centella asiatica* (L.) Urban Menggunakan Metode Hidrasi Lapis Tipis.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia / memformatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis / pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal: 6 Juli
Yang menyatakan



(Dian Rahma Bakti)

ABSTRAK

Nama : Dian Rahma Bakti
Program Studi : Farmasi
Judul : Evaluasi dan Uji Penetrasi Formulasi Liposom yang Mengandung Ekstrak *Centella asiatica* (L.) Urban Menggunakan Metode Hidrasi Lapis Tipis

Pemanfaatan herbal di Indonesia telah lama dilakukan baik untuk penyembuhan penyakit, salah satunya pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) sebagai penyembuh luka dan mencegah terbentuknya keloid dengan zat aktif asiatikosid yang diaplikasikan secara topikal. Oleh karena asiatikosid memiliki berat molekul yang besar, kelarutan dalam air dan lipid yang buruk, sehingga susah untuk berpenetrasi melewati kulit, untuk itu dibuat dalam sistem pembawa liposom. Penelitian ini bertujuan untuk membuat liposom dengan menganalisis pengaruh penambahan konsentrasi fosfatidilkolin terhadap stabilitas liposom dan mengetahui daya penetrasinya. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode hidrasi lapis tipis, analisis kuantitatif kadar penjerapan asiatikosid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri dan uji penetrasi secara *in vitro* dengan sel difusi Franz. Ada empat formula yang digunakan sesuai dengan perbandingan fosfatidilkolin dan kolesterol, di mana konsentrasi kolesterol tetap, hanya fosfatidilkolin yang mengalami penambahan. Hasil menunjukkan adanya peningkatan efisiensi penjerapan terhadap zat aktif asiatikosid; memperkecil distribusi ukuran partikel melalui pengukuran *Particle Size Analyzer* (PSA), *Transmission Electron Microscope* (TEM); dan peningkatan jumlah kumulatif, fluks, serta persentase jumlah asiatikosid yang terpenetrasi berdasarkan uji penetrasi *in vitro* selama 8 jam.

Kata kunci : Asiatikosid, *Centella asiatica* (L.) Urban, efisiensi penjerapan, fosfatidilkolin, keloid, liposom, pegagan, sistem penghantaran obat.

xv+104 halaman; 54 gambar; 10 tabel; 15 lampiran

Daftar Pustaka : 65 (1976-2012)

ABSTRACT

Name : Dian Rahma Bakti
Program Study : Pharmacy
Title : Evaluation and Penetration Test from Liposome Formulation
which Contain *Centella asiatica* (L.) Urban's Extract Using
Thin Layer Hidration Method

The use of herbs in Indonesia has been carried out long time ago for healing the disease, one of which gotu kola (*Centella asiatica* (L.) Urban) as wound healing and prevent the formation of keloids with asiaticoside active substance applied topically. However, asiaticoside has a large molecular weight, poor solubility in water and lipid, so difficult to penetrate through the skin. Therefore, it needs such a carrier system called liposome, which is the major constituent of lipid components, namely phosphatidylcholine and cholesterol. The aims of this study is to analyze the effect of addition on phosphatidylcholine concentration for the stability of liposomes and its penetration. This study is using a thin layer hidration method to make liposom, entrapment levels of asiaticoside analyzed quantitatively by Thin Layer Chromatography (TLC) densitometry and *in vitro* penetration test with Franz diffusion cell. There are four formulas were used in accordance with the ratio of phosphatidylcholine and cholesterol, where cholesterol concentration was constant. The results showed there was increase in efficiency of entrapment the active substance and reduce the particle size distribution. The results also showed there was increase in the cumulative number penetration, flux, and the percentage amount of asiaticoside that penetrated based on Franz diffusion cell test for 8 hours.

Key Words : Asiaticoside, *Centella asiatica* (L.) Urban, drug delivery system, entrapment efficiency, gotu kola, keloid, liposome, phosphatidylcholine.

xv+104 pages ; 54 pictures; 10 tables; 15 appendices

Bibliography : 65 (1976-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah dan Ruang Lingkup	3
1.3 Jenis Penelitian dan Metode yang Digunakan	3
1.4 Hipotesis	3
1.5 Tujuan Penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Pegagan (<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban)	4
2.1.1 Klasifikasi	4
2.1.2 Nama Daerah dan Nama Asing	4
2.1.3 Morfologi	5
2.1.4 Ekologi dan Penyebaran	5
2.1.5 Kandungan Kimia	6
2.1.6 Penggunaan dan Aktivitas Farmakologi	7
2.2 Liposom	8
2.2.1 Definisi Liposom	8
2.2.2 Klasifikasi Liposom	10
2.2.3 Bahan Dasar Pembentuk Liposom	12
2.2.4 Pembuatan Liposom	13
2.2.5 Mekanisme Pembentukan Liposom	17
2.2.6 Stabilitas Liposom	18
2.2.7 Evaluasi Liposom	19
2.3 Fosfatidilkolin	22
2.4 Kolesterol	23
2.5 Uji Penetrasi Secara <i>in vitro</i> Menggunakan Sel Difusi Franz	24
2.6 Analisis Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Menggunakan KLT Densitometer (<i>TLC Scanncer</i>)	26

3. METODE PENELITIAN	29
3.1 Lokasi Penelitian	29
3.2 Bahan	29
3.2.1 Bahan Uji	29
3.2.2 Hewan Uji	29
3.2.3 Bahan Kimia dan Preaksi	29
3.3 Peralatan	30
3.4 Cara Kerja	30
3.4.1 Persiapan Ekstrak Kasar Pegagan	30
3.4.2 Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 7,4	32
3.4.3 Identifikasi dan Penetapan Kadar Asiatikosid dengan KLT Densitometri	32
3.4.4 Pembuatan Liposom dengan Metode Hidrasi Lapis Tipis	34
3.4.5 Pengecilan dan Penyeragaman Ukuran Partikel Liposom	36
3.4.6 Pemurnian Liposom	36
3.4.7 Penentuan Efisiensi Penjerapan Ekstrak Pegagan dalam Liposom	36
3.4.8 Evaluasi Liposom yang Mengandung Ekstrak Pegagan	37
3.4.9 Uji Penetrasi Liposom Ekstrak Pegagan secara <i>in vitro</i> dengan Metode Sel Difusi Franz	38
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1 Pemurnian Asiatikosid dari Ekstrak Kental Pegagan	40
4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Penetapan Kadar Asiatikosid secara KLT Densitometri	41
4.3 Pembuatan Liposom	43
4.4 Pengecilan Ukuran Partikel dan Pemurnian Liposom	46
4.5 Evaluasi Liposom	48
4.5.1 Morfologi	48
4.5.2 Distribusi Ukuran Partikel	51
4.5.3 Persen Efisiensi Penjerapan Obat oleh Liposom	54
4.5.4 Uji Penetrasi secara <i>in vitro</i> Melalui Sel Difusi Franz	55
5. KESIMPULAN DAN SARAN	61
5.1 Kesimpulan	61
5.2 Saran	61
DAFTAR ACUAN	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	5
Gambar 2.2.	Struktur kimia kandungan senyawa aktif <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	6
Gambar 2.3.	Struktur Liposom	9
Gambar 2.4.	Tipe-tipe Liposom	11
Gambar 2.5.	Metode Hidrasi Lapis Tipis	15
Gambar 2.6.	Mekanisme pecahnya liposom oleh ultrasonikasi	16
Gambar 2.7.	Pembentukan liposom berdasarkan teori <i>budding off</i>	18
Gambar 2.8.	Struktur kimia α -fosfatidilkolin	22
Gambar 2.9.	Struktur kimia kolesterol	23
Gambar 2.10.	Skema alat sel difusi Franz	24
Gambar 4.1.	Morfologi liposom formula 4 berbentuk bulat sferis dilihat dari mikroskop konvokal dengan perbesaran maksimum 4000x	48
Gambar 4.2.	Morfologi liposom formula 4 hasil pengukuran dengan TEM (perbesaran 80000x)	49
Gambar 4.3.	Morfologi liposom formula 4 hasil pengukuran dengan TEM (perbesaran 120000x)	50
Gambar 4.4.	Grafik rata-rata distribusi ukuran partikel liposom hasil pengukuran dengan PSA	51
Gambar 4.5.	Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 1 hasil pengukuran PSA	52
Gambar 4.6.	Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 2 hasil pengukuran PSA	52
Gambar 4.7.	Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 3 hasil pengukuran PSA	53
Gambar 4.8.	Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 4 hasil pengukuran PSA	53
Gambar 4.9.	Diagram persentase efisiensi penjerapan asiatikosid dalam liposom	54
Gambar 4.10.	Jumlah kumulatif asiatikosid yang terpenetrasi per satuan luas membrane dari liposom formula 1	57
Gambar 4.11.	Jumlah kumulatif asiatikosid yang terpenetrasi per satuan luas membrane dari liposom formula 2	58
Gambar 4.12.	Jumlah kumulatif asiatikosid yang terpenetrasi per satuan luas membrane dari liposom formula 3	58
Gambar 4.13.	Jumlah kumulatif asiatikosid yang terpenetrasi per satuan luas membrane dari liposom formula 4	59
Gambar 4.14.	Fluks asiatikosid dari liposom formula 1, 2, 3, dan 4	59
Gambar 4.15.	Tanaman Pegagan dengan nama latin <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban yang diambil dari BALITTRO Bogor	68
Gambar 4.16.	Ekstrak kental <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban dari maserasi dengan pelarut etanol 70%	68

Gambar 4.17. Ekstrak serbuk kering <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban yang telah dipartisi dengan pelarut n-heksan dan diklormetan	69
Gambar 4.18. Alat <i>Rotary Evaporator Vacuum</i> Hahn Shin	69
Gambar 4.19. Hasil pembuatan suspensi liposom	70
Gambar 4.20. Alat KLT Densitometri (<i>TLC Scanner Camag</i>)	70
Gambar 4.21. Alat ultrasonikasi Branson	71
Gambar 4.22. Alat mikroskop konvokal (<i>Convocal Laser Scanning Biological Microscope</i>).....	71
Gambar 4.23. Alat <i>Particle Size Analyzer</i> Malvern Zetasizer Ver. 6.20	72
Gambar 4.24. Alat <i>Transmission Electron Microscope</i> Jeol Jem 1400	72
Gambar 4.25. Hasil <i>Particle Size Analyzer</i> (PSA) liposom formula 1 setelah disonikasi selama 20 menit	73
Gambar 4.26. Hasil <i>Particle Size Analyzer</i> (PSA) liposom formula 2 setelah disonikasi selama 20 menit	74
Gambar 4.27. Hasil <i>Particle Size Analyzer</i> (PSA) liposom formula 3 setelah disonikasi selama 20 menit	75
Gambar 4.28. Hasil <i>Particle Size Analyzer</i> (PSA) liposom formula 4 setelah disonikasi selama 20 menit	76
Gambar 4.29. Seperangkat alat ultrasentrifugasi	77
Gambar 4.30. Hasil ultrasentrifugasi liposom dengan kecepatan 30.000 rpm selama 30 menit	78
Gambar 4.31. Lempeng yang telah melalui proses KLT sesaat sebelum akan <i>discan</i> dengan densitometri	78
Gambar 4.32. Sel difusi Franz	79
Gambar 4.33. Kurva kalibrasi asiatikosid dalam dapar fosfat pH 7,4	80
Gambar 4.34. Tampilan 3D kurva kromatogram penetapan kadar asiatikosid	80
Gambar 4.35. Kurva kalibrasi efisiensi penjerapan asiatikosid	81
Gambar 4.36. Tampilan 3D kurva kromatogram efisiensi penjerapan asiatikosid	81
Gambar 4.37. Kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz formula 1	82
Gambar 4.38. Tampilan 3D kurva kromatogram uji penetrasi sel difusi Franz Formula 1	82
Gambar 4.39. Kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz formula 2	83
Gambar 4.40. Tampilan 3D kurva kromatogram uji penetrasi sel difusi Franz Formula 2	83
Gambar 4.41. Kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz formula 3	84
Gambar 4.42. Tampilan 3D kurva kromatogram uji penetrasi sel difusi Franz Formula 3	84
Gambar 4.43. Kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz formula 4	85
Gambar 4.44. Tampilan 3D kurva kromatogram uji penetrasi sel difusi Franz Formula 4	85

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Formulasi liposom ekstrak pegagan	35
Tabel 4.1.	Kosentrasi dan area kurva kalibrasi penetapan kadar asiaticosid dalam larutan dapar pH 7,4 pada $\lambda = 506$ nm dengan berat standar 50,4 mg	86
Tabel 4.2.	Kosentrasi dan area kurva kalibrasi efisiensi penyerapan asiaticosid pada $\lambda = 506$ nm dengan berat standar 50,4 mg	86
Tabel 4.3.	Kosentrasi dan area kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz liposom formula 1 pada $\lambda = 506$ nm	86
Tabel 4.4.	Kosentrasi dan area kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz liposom formula 2 pada $\lambda = 506$ nm	87
Tabel 4.5.	Kosentrasi dan area kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz liposom formula 3 pada $\lambda = 506$ nm	87
Tabel 4.6.	Kosentrasi dan area kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz liposom formula 4 pada $\lambda = 506$ nm	88
Tabel 4.7.	Hasil uji penetrasi asiaticosid dalam larutan dapar fosfat pH7,4 dari liposom formula 1,2,3, dan 4 selama 8 jam	88
Tabel 4.8.	Hasil perhitungan fluks asiaticosid tiap waktu pengambilan dari liposom formula 1, 2, 3, dan 4 berdasarkan uji penetrasi selama 8 jam	89
Tabel 4.9.	Hasil jumlah kumulatif asiaticosid yang terpenetrasi, persentase jumlah asiaticosid yang terpenetrasi dan fluks asiaticosid dari liposom formula 1, 2, 3, dan 4 berdasarkan uji penetrasi selama 8 jam	89

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema pembuatan ekstrak serbuk kering pegagan	90
Lampiran 2.	Skema pembuatan liposom menggunakan metode hidrasi lapis tipis	91
Lampiran 3.	Contoh perhitungan penetapan kadar asiaticosid dalam ekstrak serbuk kering pegagan	92
Lampiran 4.	Contoh perhitungan efisiensi penyerapan asiaticosid dalam liposom formula 1	93
Lampiran 5.	Contoh perhitungan jumlah asiaticosid yang terpenetrasi dari liposom formula 1 pada menit ke-10	94
Lampiran 6.	Contoh perhitungan jumlah asiaticosid yang terpenetrasi dari liposom formula 1 pada menit ke-30	95
Lampiran 7.	Contoh perhitungan fluks asiaticosid dari liposom formula 1	96
Lampiran 8.	Contoh perhitungan persentase jumlah kumulatif asiaticosid yang terpenetrasi dari liposom formula 2	97
Lampiran 9.	Sertifikat hasil identifikasi atau determinasi tumbuhan pegagan	98
Lampiran 10.	Sertifikat analisis pengujian kadar rendemen dan kadar asiaticosid dalam serbuk simplisia <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	99
Lampiran 11.	Sertifikat analisis pengujian kadar air dan abu dalam ekstrak kental <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	100
Lampiran 12.	Sertifikat analisis standar asiaticosid	101
Lampiran 13.	Sertifikat analisis fosfatidilkolin	102
Lampiran 14.	Sertifikat analisis kolesterol	103
Lampiran 15.	Sertifikat analisis tikus putih	104

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Liposom dipandang sebagai sistem pembawa yang efisien dan spesifik serta dapat menghantarkan obat langsung ke sel target (Benita, 1996). Sebagai sistem pembawa obat, liposom dapat melindungi obat selama perjalanan ke target organ sehingga tidak merusak organ lain yang sehat, dapat menekan dosis obat, mengurangi efek samping, mengubah farmakokinetik obat sehingga dapat memberikan indeks terapi yang lebih baik (Kurkani, *et al.*, 1997). Dalam liposom, obat terjerap di dalam lipid *bilayer* sehingga obat terlindung dari pengaruh lingkungan luar (Voight, 1994). Penjerapan obat dalam liposom terjadi tanpa menyebabkan modifikasi kimia pada bahan obat, baik bagi obat larut air yang terjerap dalam kompartemen fase air ataupun obat yang terjerap pada lipid *bilayer* untuk obat larut lemak, sehingga pada saat dibebaskan di tempat sasaran, obat berada dalam bentuk yang sama seperti pada saat obat tersebut terjerap karena terlindung dalam vesikel liposom.

Di Indonesia masyarakat sudah sejak lama memanfaatkan obat herbal yang berasal dari tumbuhan untuk meningkatkan kesehatan (promotif), memulihkan kesehatan (rehabilitatif), pencegahan penyakit (preventif) dan penyembuhan (kuratif) yang dimanfaatkan secara turun temurun (Departemen Kesehatan RI, 1989). Salah satunya adalah tanaman pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang telah banyak dimanfaatkan sebagai tanaman obat sejak dahulu kala, termasuk Indonesia (Kwon, 2011).

Salah satu kandungan zat aktif obat herbal yang berasal dari pegagan adalah asiatikosid. Bersamaan dengan madekassosid memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka (Bonte, *et al.*, 1994). Hal ini memberikan prospek yang menjanjikan untuk pemanfaatan tanaman ini sebagai agen penyembuh luka dan mencegah terbentuknya keloid dalam sediaan topikal. Asiatikosid memiliki berat molekul yang besar, kelarutan dalam air dan lipid yang

buruk, sehingga susah untuk berpenetrasi melewati kulit dan mempengaruhi preparasi untuk sediaan farmasetika dan kosmetik (Chen, *et al.*, 2006).

Pada dasarnya untuk mendapatkan efek yang optimal dari sediaan topikal, diharapkan zat berkhasiat yang ada dapat terpenetrasi melalui lapisan kulit teratas agar dapat dirasakan efek farmakologinya. Penghalang utama dari kulit terletak pada *stratum corneum*. Salah satu kemungkinan untuk meningkatkan permeasi kulit terhadap obat adalah dengan menggunakan sistem vesikuler (Honeywell-Nguyen, *et al.*, 2002). Untuk itulah dibuat sediaan partikulat dalam sistem pembawa berupa liposom.

Pada penelitian ini dilakukan pembuatan liposom ekstrak pegagan melalui metode hidrasi lapis tipis. Metode ini sesuai untuk ekstrak pegagan, karena paling praktis serta mudah dilakukan. Komposisi fase lipid yang besar akan memungkinkan jerapan zat aktif menjadi lebih efektif. Untuk itulah, dilakukan perbandingan formulasi konsentrasi lipid dengan penambahan fosfatidilkolin terhadap kolesterol untuk mengetahui hasil penyerapan yang paling maksimal pada liposom.

Fosfatidilkolin yang digunakan berasal dari kuning telur karena pada penelitian sebelumnya dalam formulasi liposom, fosfolipid dari telur menunjukkan hasil yang bagus dalam menginduksi kenaikan kandungan air pada kulit dan interaksi yang paling kuat dengan *stratum corneum*, sehingga sangat cocok untuk sediaan topikal (Betz, *et al.*, 2005). Ekstrak pegagan yang digunakan adalah ekstrak dari pelarut etanol karena berdasarkan penelitian Hamid, *et al.* (2002), etanol dan air adalah pelarut yang paling cocok untuk *Centella asiatica* (L.) Urban. Setelah liposom terbentuk, selanjutnya dilakukan karakterisasi dan evaluasi meliputi bentuk morfologi vesikel, distribusi ukuran partikel, persentase obat yang terjerap dalam liposom, dan uji penetrasi secara *in vitro* melalui sel difusi Franz.

Penelitian daya penetrasi dan pelepasan obat melalui kulit secara *in vitro* merupakan cara termudah dan hemat dalam mengkarakterisasi absorpsi dan penetrasi obat melalui kulit. Hal tersebut diperlukan untuk pengembangan formula sediaan topikal agar diperoleh formula yang terbaik (Witt, 2003).

1.2 Perumusan Masalah dan Ruang Lingkup

Masalah yang diangkat dalam penelitian adalah apakah dengan penambahan fosfatidilkolin terhadap kolesterol pada perbandingan formulasi konsentrasi lipid dapat meningkatkan penyerapan ekstrak pegagan di dalam liposom, memperkecil distribusi ukuran partikel, dan meningkatkan penetrasi ekstrak pegagan ke kulit secara topikal dengan pembawa liposom. Ruang lingkup penelitian ini adalah Fitokimia-Farmasetika Eksperimental.

1.3 Jenis Penelitian dan Metode yang Digunakan

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode pembentukan liposom secara hidrasi lapis tipis, analisis kuantitatif kadar penyerapan asiaticosid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri dan uji penetrasi secara *in vitro* dengan sel difusi Franz.

1.4 Hipotesis

Semakin tinggi konsentrasi fosfatidilkolin yang digunakan akan semakin meningkatkan penyerapan, memperkecil distribusi ukuran partikel, dan meningkatkan penetrasi ekstrak pegagan melalui sistem pembawa berupa liposom.

1.5 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh penambahan konsentrasi fosfatidilkolin terhadap evaluasi liposom yang mengandung asiaticosid dari ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dan mengetahui daya penetrasinya melalui metode uji penetrasi sel difusi Franz secara *in vitro*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Centella asiatica mempunyai sinonim *Hydrocotyle asiatica* L. atau yang lebih sering dikenal di Indonesia dengan pegagan merupakan tanaman herba tahunan yang hidup di tempat tropis, penggunaannya sering digunakan sebagai lalap terutama oleh masyarakat Jawa Barat dan resep tradisional secara turun temurun. Adapun taksonomi dari tanaman ini adalah:

2.1.1 Klasifikasi (Lasmadiwati, 2003)

Klasifikasi tumbuhan pegagan adalah sebagai berikut.

Kerajaan : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Bangsa : Umbellales
Suku : Umbelliferae
Marga : *Centella*
Jenis : *Centella asiatica* (L.) Urban



[sumber: Cicatrix, 2012, telah diolah kembali]

Gambar 2.1. *Centella asiatica* (L.) Urban

2.1.2 Nama Daerah dan Nama Asing

Nama umum dagang *Centella asiatica* (L.) Urban adalah pegagan, daun kaki kuda, dan antanan (Lasmadiwati, 2003). Di Indonesia, pegagan juga mempunyai nama yang berbeda, antara lain (Departemen Kesehatan RI, 1977):

Sumatera: Pegaga (Aceh), daun kaki kuda, daun penggaga, penggaga, rumput kaki kuda, pegagan, kaki kuda (Melayu), pegago, pugago (Minangkabau), *Jawa*: Cowet gompeng, antanan, antanan bener, antanan gede (Sunda), gagan-gagan, gangganan, kerok batok, panegowang, rendeng, calingan rambat, pacul gowang (Jawa), gan gagan (Madura), *Nusa Tenggara*: Berbele (Sasak), paiduh, penggaga

(Bali), kelai lere (Sewo), *Maluku*: Sarowati (Halmahera), kolotidi manora (Ternate), *Sulawesi*: Pagaga, wisu-wisu (Makassar), cipubalawo (Bugis), hisu-hisu (Salayar), *Irian*: Dogauke, gogauke, sandanan.

Sedangkan di luar negeri dikenal dengan nama *Broken copper coin*, *button grass*, *small-leaved horsehoof grass*, *Indian pennywort*, *asya sutasi*, *brahmi*, *marsh penny*, *white rot*, *buabok*, *indische waternavel*, *paardevoet* (Belanda), *gotu kola* (India), *ji xue cao* (Cina) (Awang, 2009).

2.1.3 Morfologi (Departemen Kesehatan RI, 1977)

Terna atau herba tahunan, tanpa batang tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang melata, panjang 10 cm – 80 cm. Daun tunggal, tersusun dalam roset yang terdiri dari 2 sampai 10 daun, kadang-kadang agak berambut; tangkai daun panjang sampai 50 mm, helai daun berbentuk ginjal, lebar dan bundar dengan garis tengah 1 cm – 7 cm, pinggir daun beringgit sampai beringgit-bergerigi, terutama ke arah pangkal daun. Perbungaan berupa payung tunggal atau 3 sampai 5 bersama-sama keluar dari ketiak daun kelopak, gagang perbungaan 5 mm – 50 mm, lebih pendek dari tangkai daun. Bunga umumnya 3, yang di tengah duduk, yang di samping bergagang pendek; daun pelindung 2, panjang 3 mm – 4 mm, bentuk bundar telur; tajuk bewarna merah lembayung, panjang 1 mm – 1,5 mm, lebar sampai 0,75 mm. Buah pipih, lebar lebih kurang 7 mm dan tinggi lebih kurang 3 mm, berlekuk dua, jelas berusuk, berwarna kuning kecoklatan, berdinding agak tebal.

2.1.4 Ekologi dan Penyebaran (Departemen Kesehatan RI, 1977)

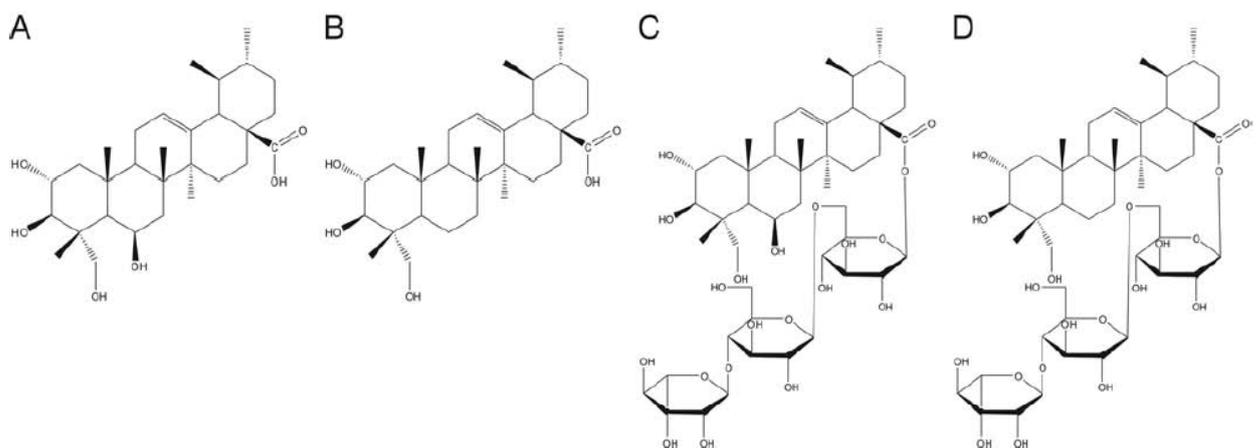
Tumbuh liar di seluruh Indonesia serta daerah-daerah beriklim tropik pada umumnya, dari dataran rendah hingga ketinggian 2.500 m di atas permukaan laut. Tumbuh di tempat yang terbuka atau sedikit ternaungi. Pada tanah yang lembab dan subur seperti di tegalan, padang rumput, tepi parit, di antara batu-batu, di tepi jalan, dan tembok.

2.1.5 Kandungan Kimia

Secara umum kandungan bahan aktif yang ditemukan dalam pegagan meliputi: triterpenoid saponin, minyak esensial, flavonoid, tannin, fitosterol, asam amino, dan gula atau glikosida (Leung, 1998).

Kandungan utama dari ekstrak pegagan adalah triterpenoid saponin, yaitu: asiaticosid, madekassosid, asam asiatic, dan asam madekassik (Gnanapragasam et al., 2004). Asiatikosid merupakan marker dalam penentuan standar bahan baku pada *Centella asiatica* (L.) Urban. Diantara senyawa aktif ini, asiaticosid dilaporkan dapat merubah ekspresi gen dan menginduksi sintesis kolagen tipe 1 pada fibroblast manusia. Madekassosid juga memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka dan mempunyai aktivitas anti rheumatoid (Bonte, et al., 1994) dan (Liu, et al., 2008).

Kandungan triterpenoid saponin dalam pegagan berkisar 1-8% (Kumar dan Gupta, 2003). Untuk formulasi dari pegagan yang terstandar, senyawa triterpenoid harus mengandung asiaticosid 40%, asam asiatic 29-30%, asam madekassik 29-30%, dan madekassosid 1-2% (American Botanical Council, 1997). Berikut ini adalah gambar dari kandungan kimia pegagan:



[sumber: James dan Dubery, 2011, telah diolah kembali]

Keterangan: A = Asam madekassik (BM 504,17), B = Asam asiatic (BM 488,70), C = Madekassosid (BM 975,1), D = Asiatikosid (BM 959,12).

Gambar 2.2. Struktur kimia kandungan senyawa aktif *Centella asiatica* (L.) Urban

Dalam triterpenoid saponin ini juga terkandung beberapa unsur lain seperti: centelloside, brahmosida, brahminosida, serta B, C, dan D centellasaonin yang saling bekerjasama dalam proses sintesis kolagen, akan tetapi unsur-unsur tersebut dalam jumlah yang sedikit (Bonte, *et al.*, 1994). Di samping itu, pegagan mengandung minyak esensial sebesar 0,1% dari seluruh kandungan bahan aktif di dalamnya. Minyak esensial ini terbagi menjadi 2 jenis yang meliputi: monoterpen dan sesquiterpen (Kumar dan Gupta, 2003). Monoterpen dan sesquiterpen banyak terdapat pada jaringan parenkim daun pegagan. Minyak esensial ini memberikan wangi yang khas pada tumbuhan pegagan.

2.1.6 Penggunaan dan Aktivitas Farmakologi

Centella asiatica (L.) Urban telah secara luas digunakan sebagai agen farmakologi. Penggunaan herba ini diantara lain adalah untuk mengobati luka, mencegah terbentuknya keloid, dan bekas luka (Chen, *et al.*, 2006). Aktivitas farmakologi ini disebabkan oleh kandungan triterpenoid saponin di dalamnya termasuk asiatikosid, asam asiatik, dan asam madekassik. Secara *in vivo*, setiap komponen akan menstimulasi pembentukan jaringan kolagen pada manusia (Bonte, *et al.*, 1994).

Hal ini dibuktikan pada penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Bonte dan kawan-kawan pada tahun 1994, disebutkan asiatikosid memfasilitasi proses penyembuhan luka melalui mekanisme peningkatan *tensile strength*, sintesis kolagen, angiogenesis dan ephitalisasi yang diperlihatkan pada hewan percobaan.

Baru-baru ini juga dilakukan penelitian terhadap beberapa studi yang menyebutkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* mempunyai aktivitas antioksidan, anti proliferaatif efek melawan sel-sel tumor, dan meningkatkan alterasi dinding vena pada penyakit hipertensi vena kronik, serta melindungi endothelium vena (Gnanapragasam, *et al.*, 2004).

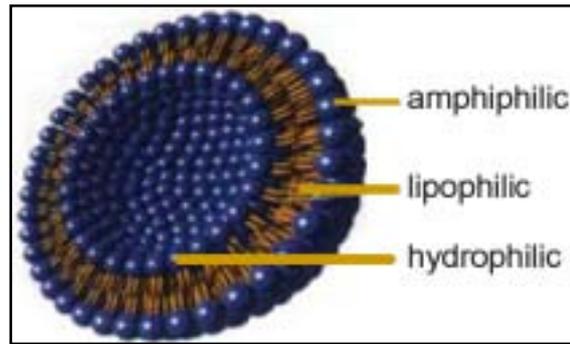
2.2 Liposom

2.2.1 Definisi Liposom

Liposom adalah vesikel fosfolipid yang mengandung kompartemen *aqueous* di dalamnya dikelilingi oleh satu atau lebih membran *bilayer* (Brandl, Bachmann, dan Drechsler, 1993). Liposom merupakan mikropartikel yang memiliki rentang ukuran bervariasi dari 15 sampai 3500 nm, terdiri dari dua lapis fosfolipid yang mengenkapsulasi fase air. Definisi lainnya juga dijelaskan liposom adalah mikrokapsul buatan berbentuk bola yang terbentuk dari fosfolipid yang dapat mengenkapsulasi zat aktif di dalam strukturnya (Boyland, 1994).

Liposom bisa dibentuk dari berbagai macam jenis fosfolipid. Fosfolipid yang paling banyak digunakan secara luas adalah fosfatidilkolin. Membran luar liposom bersifat semipermeabel dan permeabilitasnya bisa diatur dari jenis tipe lipid yang digunakan dalam pembuatan liposom. Liposom yang tinggi permeabilitasnya dibuat dengan menggunakan jenis lipid tak jenuh yang akan menghasilkan lebih banyak membran cairan. Liposom yang rendah permeabilitasnya dibuat dengan mencampurkan fosfolipid dan kolesterol. Kolesterol dikenal sebagai bahan untuk memadatkan pengemasan dari fosfolipid, dengan cara mengurangi permeabilitas dan meningkatkan stabilitas dari fosfolipid *bilayer*. Liposom yang bermuatan negatif dapat dibuat dengan cara menggunakan fosfatidilserin atau fosfatidilgliserol, sedangkan liposom bermuatan positif dengan menggunakan stearylamin. (Ganesan, Weiner, dan Flynn, 1984)

Fosfolipid merupakan konstituen membran sel yang berperan sebagai *barrier* selektif dan sebagai tempat protein membran. Fosfolipid adalah molekul ampifilik yang berasal dari kelas gliserofosfolipid yang memiliki ekor hidrofobik (asam lemak) dan kepala hidrofilik (contoh : kolin, serin, dan inositol). Ketika fosfolipid didispersikan dalam air, ekor hidrofobik akan bergabung atau teragregasi dengan molekul air (kepala hidrofilik). Kemudian, lapisan akan terbentuk dimana ekor asam lemak mengarah ke dalam membran dan kepala polar mengarah keluar (Boyland, 1994).



[sumber: GEA Process Engineering, 2012, telah diolah kembali]

Gambar 2.3. Struktur Liposom

Liposom memiliki banyak kelebihan dalam sistem penghantaran obat. Ketika diberikan secara parenteral, baik secara intravena, subkutan, maupun intramuskular, liposom dapat melindungi obat dari proses degradasi dan mengendalikan pelepasan obat yang terjerap di dalamnya. Dengan demikian liposom dapat mengurangi efek samping obat dengan mengendalikan pelepasan obat bebas yang tersedia dalam aliran darah.

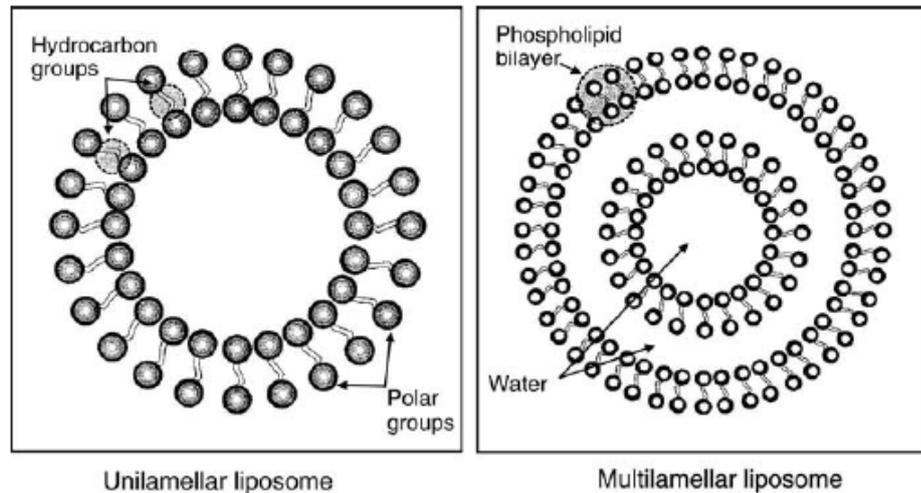
Kelebihan karakteristik farmasetik dan farmakologi dari liposom adalah (Barenholz dan Crommelin, 1994):

1. Liposom memiliki bagian lipofilik dan hidrofilik dalam satu sistem sehingga dapat digunakan sebagai pembawa obat-obat ataupun molekul-molekul hidrofobik, amfipatik, dan hidrofilik.
2. Liposom telah terkarakterisasi dengan baik, secara fisik dan kimia.
3. Kondisi liposom secara biologis ditentukan oleh komposisi dan sifat fisiknya.
4. Liposom bersifat biokompatibel kemampuan biodegradabelnya, toksisitas rendah, dan timbulnya reaksi imunogenisitasnya rendah.
5. Liposom dapat digunakan sebagai pembawa obat yang pelepasannya terkontrol di dalam cairan tubuh dan di dalam sel.
6. Penggunaan liposom dapat mengurangi resiko terpaparnya jaringan yang sensitif oleh obat-obat toksik.
7. Liposom dapat diberikan melalui beberapa rute pemberian.

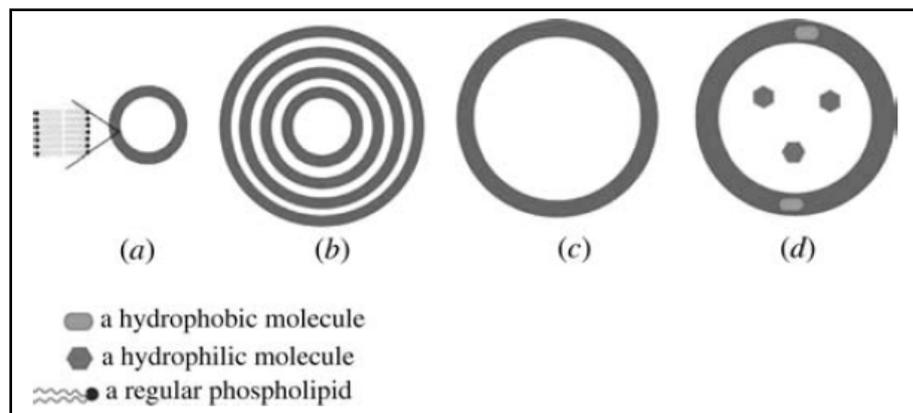
2.2.2 Klasifikasi Liposom

Umumnya liposom diklasifikasikan berdasarkan jumlah lapisan (lamellar), ukuran diameter, muatan, fungsi, dan bahan penyusun serta model penghantaran obatnya. Suspensi fosfatidilkolin murni di dalam air menghasilkan liposom yang memiliki lamelar dimana setiap lapis ganda dipisahkan oleh bagian fase air dari lapis ganda yang lainnya, tipe ini dikenal sebagai *multilamellar vesicle* (MLV). Apabila vesikel berukuran kecil terperangkap didalam vesikel berukuran besar maka tipe ini dikenal sebagai *multivesicular vesicle* (MVV). Liposom yang terdiri dari satu lamelar dikenal sebagai *unilamellar vesicle*, dimana pada rentang ukuran 20–100 nm disebut sebagai *small unilamellar vesicles* (SUV), pada rentang ukuran 100-1000 nm dikenal sebagai *large unilamellar vesicle* (LUV), dan pada ukuran >1000 nm dikenal sebagai *giant unilamellar vesicle*.

Liposom tipe LUV dapat dibedakan menjadi empat katagori berdasarkan fungsinya yaitu *conventional liposome*, *stealth liposome*, *cationic liposome*, dan *targeted liposome*. *Conventional liposome* merupakan liposom yang terdiri dari fosfolipid di mana fosfolipid tersebut menyalut zat aktif yang terdispersi dalam fase airnya. Liposom yang dilapisi oleh protein dan polimer seperti propilen glikol dan memiliki waktu paruh yang panjang (40 jam) dikenal sebagai *stealth liposome* (liposom sirkulasi panjang). Liposom yang memiliki muatan kationik pada permukaannya disebut sebagai *cationic liposome*. *Targeting liposome* adalah liposom yang memiliki kemampuan untuk berikatan dengan sel tertentu (Rosen, 2005).



[sumber: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third edition, 2007, telah diolah kembali]



[sumber: Drug Delivery Principle and Application, 2005, telah diolah kembali]

Keterangan: (a) Small Unilamellar Vesicle (b) Multilamellar Vesicles (c) Large Unilamellar Vesicle (d) Liposom yang menjerap obat larut air di kompartemen hidrofilik dan menjerap obat lipofilik di komponen fosfolipid bilayer

Gambar 2.4. Tipe-Tipe Liposom

Berdasarkan bahan penyusun dan model penghantaran obatnya, liposom diklasifikasikan dalam beberapa jenis yaitu (Biju, Talegaonkar, Mishra, dan Khar, 2006):

2.2.2.1. Liposom Sensitif pH

Liposom jenis ini terutama menggunakan fosfatidiletanolamin atau dioleilfosfatidiletanolamin, dikombinasi dengan kolesterol hemisuksinat atau asam oleat sebagai bahan penyusunnya. Liposom melebur dengan membran sel atau membran endosom, mengalami endositosis, dan akan melepaskan kandungan

zat aktifnya pada kondisi pH yang rendah di sitoplasma. Liposom jenis ini dapat digunakan sebagai pembawa obat yang bersifat basa lemah dan obat-obat makromolekular.

2.2.2.2 Imuno-liposom

Bahan penyusun liposom jenis ini sama seperti liposom konvensional atau liposom sirkulasi panjang, dengan ditempelkan sekuens antibodi atau sekuens lain yang sesuai. Liposom ini dapat digunakan sebagai mediasi reseptor endositosis, memiliki penargetan yang spesifik, dapat melepaskan kandungan terapetiknya di jaringan target yang selanjutnya akan berdifusi melewati membran plasma.

2.2.2.3 Liposom Magnetik

Liposom jenis ini tersusun dari fosfatidilkolin, kolesterol, sejumlah kecil senyawa aldehyd rantai lurus, dan partikel magnetik koloid besi oksida. Pada permukaannya, terdapat tempat pengikatan untuk molekul lain seperti antibodi.

2.2.2.4 Liposom Sensitif Suhu

Jenis fosfolipid yang digunakan sebagai bahan penyusun liposom jenis ini adalah dipalmitoil fosfatidilkolin. Pelapasan bahan terapetik dari liposom di seltarget berada pada kondisi suhu yang tinggi, dimana suhu tersebut merupakan suhu transisi dipalmitoil fosfatidilkolin tersebut.

2.2.3 Bahan Dasar Pembentuk Liposom

Berbagai macam lemak dapat digunakan sebagai bahan dasar liposom, karena lemak dibutuhkan dalam pembentukan lipid lapis ganda. Lipid penyusun liposom dapat berupa fosfolipid dan lipid golongan sterol seperti kolesterol. Berdasarkan bahan penyusunnya, fosfolipid sebagai bahan utama penyusun liposom diklasifikasikan menjadi empat kelompok, yaitu (Barenholz dan Crommelin, 1994):

2.2.3.1 Fosfolipid Alam

Fosfolipid alam didapat dari telur atau kedelai. Contoh dari fosfolipid alam adalah fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, sfingomielin (hanya

berasal dari telur), fosfatidilinositol (hanya berasal dari kedelai). Fosfolipid yang berasal dari telur (fosfolipid hewan) memiliki rantai asil jenuh pada posisi 1 dan rantai asil tidak jenuh pada posisi 2. Fosfolipid tumbuhan memiliki rantai asil tidak jenuh pada posisi 1 dan 2, dengan asam linoleat sebagai komponen asil utama.

2.2.3.2 Fosfolipid Alam Termodifikasi

Fosfolipid alam dimodifikasi sebagian secara kimia, dengan cara hidrogenasi, untuk menurunkan derajat ketidakjenuhan fosfolipid. Hal tersebut dapat meningkatkan resistensinya terhadap peroksidasi. Selain hidrogenasi, modifikasi juga dapat dilakukan pada bagian polar pada fosfolipid dengan menggunakan enzim fosfolipase. Contoh dari modifikasi tersebut adalah fosfatidilgliserol yang mengalami transfosfatidilasi menjadi fosfatidilgliserol fosfolipase D.

2.2.3.3 Fosfolipid Semisintetik

Fosfolipid semisintetik didapat dengan cara mengganti rantai alkil dari fosfolipid alam secara kimiawi.

2.2.3.4 Fosfolipid Sintetik

Fosfolipid sintetik diperoleh dengan cara reaksi-reaksi kimiawi.

2.2.4 Pembuatan Liposom

Secara umum, pembuatan liposom dilakukan dengan melarutkan lipid dengan pelarut yang sesuai, yaitu pelarut organik yang mudah menguap ataupun campuran pelarut (seperti kloroform, eter, etanol, atau kombinasinya), diikuti dengan penghilangan pelarut, hidrasi lipid dan reduksi ukuran partikel. Pelarut dihilangkan dengan menggunakan *rotary evaporator* yang kemudian akan membentuk lapisan tipis. Proses hidrasi lipid dilakukan dengan mencampurkan fase air ke lapisan tipis tersebut dengan menggunakan suhu di atas fase transisi dari fosfolipid dimana terjadi perubahan dari fase gel ke fase cairan. Reduksi ukuran partikel dapat dilakukan dengan metode sonikasi, ekstrusi, homogenisasi

atau homogenisasi tekanan tinggi. Selain reduksi ukuran partikel, juga dapat dilakukan reduksi jumlah lapisan yaitu dengan metode *freeze and thaw* (Biju, Talegaonkar, Mishra, dan Khar, 2006; Martin, 1990).

Proses pencampuran obat ke dalam bahan-bahan pembentuk liposom dan penyerapan obat bergantung pada lipofilisitas obat dan sifat-sifat fisikokimianya. Obat-obat yang bersifat lipofilik dilarutkan ke dalam fase lipid saat pembuatan liposom (solubilisasi fase lipid), sedangkan obat-obat hidrofilik dapat terenkapsulasi secara pasif pada saat liposom terbentuk, untuk pro-drug yang merupakan lipid derivatisasi dengan cara konjugasi pada rantai lipid, dan untuk molekul-molekul polianionik seperti asam nukleat dikompleksasi secara elektrostatik (Wu, Zhao, dan Lee, 2007).

Sifat dan penampilan liposom sangat tergantung dari komposisi dan metode pembuatannya. Metode pembuatan dan pemilihan bahan pembentuk liposom bergantung pada (Barenholz dan Crommelin, 1994):

- a. Sifat-sifat liposom yang ingin dibentuk, berdasarkan aspek farmakokinetik, rute pemberian, kecepatan disintegrasi, serta pertimbangan pembentuk liposom *long-circulating*.
- b. Karakteristik fisikokimia dari obat yang akan dijerap
- c. Waktu simpan liposom (*shelf life*)
- d. Aspek avabilitas, ekonomis, farmasetis, dan keamanan dari bahan pembuatan liposom.

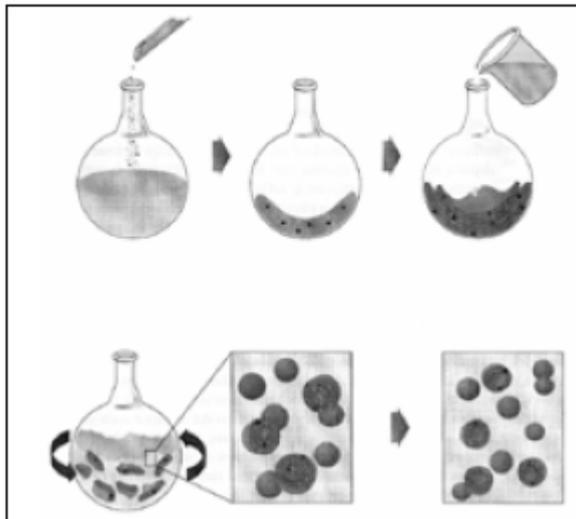
Berdasarkan proses penting pembuatan liposom, secara umum metode pembuatan liposom dibagi menjadi (Barenholz dan Crommelin, 1994):

2.2.4.1 Hidrasi

Proses hidrasi dapat dilakukan dengan tiga cara:

a. Hidrasi Lapis Tipis

Hidrasi lapis tipis dilakukan dengan proses pengocokan mekanis. Lipid dilarutkan dalam pelarut organik, kemudian pelarut diuapkan dengan alat *rotatory evaporator*, dan vesikel yang terbentuk akan terdeposit di dasar wadah. Produk yang dihasilkan berupa MLV (*Multilamellar Large Vesicles*) berukuran sekitar 10 μ m (Martin, 1990).



[sumber: Avanti Polar Lipids, 2012, telah diolah kembali]

Gambar 2.5. Metode hidrasi lapis tipis

b. Penggantian dengan Pelarut Organik

Ada dua macam pelarut organik yang dapat digunakan yaitu pelarut organik yang dapat bercampur air seperti etanol, metanol, dan isopropilalkohol; dan tidak bercampur air seperti eter. Produk yang dihasilkan adalah MLV, OLV (*Oligolamellar Vesicles*), dan UV (*Unilamellar Vesicles*).

Metode ini terbagi menjadi dua cara, yaitu :

- *Reverse-phase Evaporation* (Szoka dan Papadjopoulos, 1976)

Pada metode ini, beberapa fosfolipid baik murni maupun campuran dengan kolesterol dapat digunakan. Lipid terlebih dahulu dilarutkan dengan pelarut organik yang kemudian dialiri dengan gas nitrogen. Pelarut yang biasa digunakan adalah dietil eter dan isopropil eter. Campuran larutan lipid dengan fase air yang mengandung obat disonikasi sampai terdispersi menjadi satu fase. Campuran dua fase tersebut ditempatkan pada *rotary evaporator* dan pelarut organik dihilangkan sampai terbentuk gel.

- Metode Injeksi Pelarut (Riaz, 1996)

Metode injeksi pelarut terbagi menjadi dua, yaitu :

- Metode Injeksi Eter

Larutan lipid yang dilarutkan dengan menggunakan dietil eter atau campuran eter dan metanol diinjeksikan ke dalam fase air yang mengandung zat

aktif yang akan dienkapsulasi pada temperatur 55-65°C atau dibawah tekanan. Kekurangan metode ini adalah ukuran liposom yang dihasilkan heterogen yaitu sekitar 70 – 190 nm.

o Metode Injeksi Etanol

Larutan lipid yang dilarutkan dalam etanol diinjeksikan secara cepat kedalam fase air yang mengalami pengadukan. Dengan metode ini didapatkan liposom tipe MLV. Kekurangan dari metode ini adalah ukuran yang didapatkan terlalu heterogen yaitu sekitar 30 – 110 nm, liposom yang dihasilkan terlalu cair, dan sulitnya untuk menghilangkan etanol karena terbentuk azeotrop dengan air.

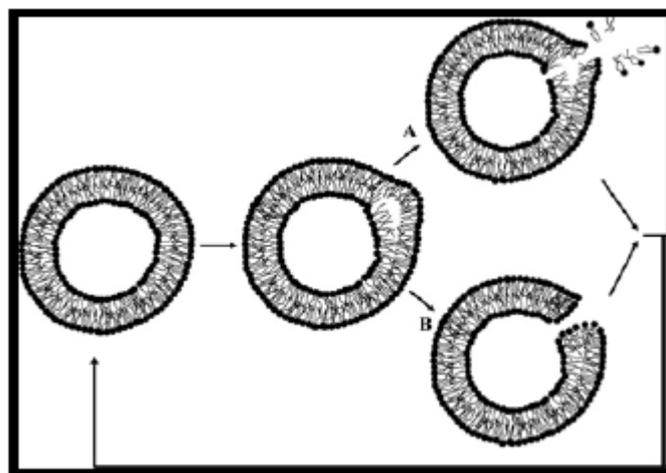
c. Pencampuran dengan Surfaktan

Proses pencampuran antara surfaktan dengan lipid menghasilkan misel, diikuti dengan penguapan pelarut, dan menghasilkan produk OLV, UV, dan SUV (*Small Unilamellar Vesicles*).

2.2.4.2 Dengan Pengaturan Ukuran

a. Ultrasonikasi

Ultrasonikasi menghasilkan *small unilamellar liposom*, dengan ukuran minimal 20 nm. Mekanisme pecahnya liposom oleh ultrasonikasi adalah terbentuknya gas-gas kecil sementara di dalam bagian hidrofobik dari *lipid bilayer*. Adanya gas-gas tersebut dapat memecah fragmen membran dari liposom dan membentuk agregat yang lebih kecil (Schroeder, Kost, dan Barenholz, 2009).



[sumber: Shroeder, Kost, dan Barenholz, 2009, telah diolah kembali]

Gambar 2.6. Mekanisme Pecahnya Liposom oleh ultrasonikasi.

b. Ekstrusi

Metode ekstrusi dapat terbagi menjadi ekstrusi bertekanan tinggi dan ekstrusi bertekanan rendah. Ekstrusi bertekanan tinggi menggunakan tekanan diatas 35 MPa, menghasilkan vesikel yang berukuran kecil dan sebagian besar *unilamellar*. Sedangkan, pada ekstrusi bertekanan rendah, tekanan yang digunakan hingga 14 MPa, dan ukuran dan distribusi ukuran yang dihasilkan bergantung pada pori membran yang digunakan. Jenis-jenis membran yang dapat digunakan adalah polikarbonat, keramik, dan *stainless steel*.

o Metode Ekstrusi Freeze-thaw

Liposom dibentuk menjadi lapisan tipis yang kemudian zat yang akan dienkapsulasi diaduk dengan vortex sampai semua lapisan tipis tersuspensi dan menghasilkan liposom tipe MLV yang dibekukan dengan menggunakan *dry ice* atau aseton, dicairkan dengan menggunakan air suhu hangat dandiaduk dengan vortex kembali. Hal tersebut diulangi sampai dua kali kemudian sampel diekstrusi tiga kali. Liposom yang dihasilkan adalah *large unilamellar vesicles by extrusion technique* (LUVET) dan kadar zat yang terjerap lebih besar. Protein dapat dienkapsulasi dengan menggunakan teknik ini (Sou, 2003).

o Metode Dehidrasi-rehidrasi

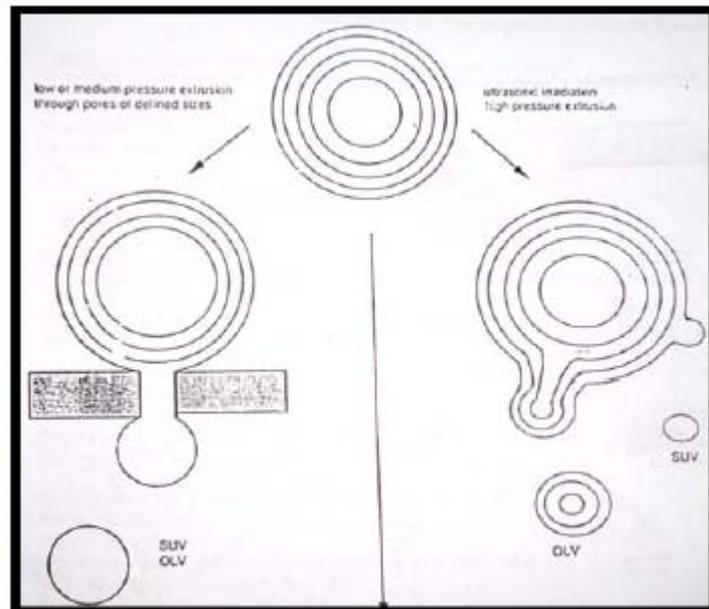
Metode ini dimulai dari liposom SUV (liposom tipe MLV dapat juga digunakan) dalam dapar fosfat dicampur dengan zat yang akan dijerap, kemudian dikeringkan dengan *freeze drying*. Pada dehidrasi didapatkan vesikel yang lebih terkonsentrasi dan dihasilkan liposom tipe *multilamellar*. Selama proses hidrasi terbentuk vesikel ukuran besar. Teknik menghasilkan ukuran liposom yang heterogen (Kirby dan Gregoriadis, 1984).

2.2.5 Mekanisme Pembentukan Liposom

Menurut Barenholz dan Crommelin (1994), pembentukan liposom dapat dijelaskan dengan dua teori yaitu teori pertunasan (*budding off*) dan teori fragmen fosfolipid lapis ganda.

2.2.5.1 Teori Pertunasan (*budding off*)

Teori ini menjelaskan bahwa liposom terbentuk dari hidrasi komponen fosfolipidnya dalam susunan lapisan yang teratur menyebabkan terbentuknya tunas dari lipid lapis ganda dan mengarah pada pembentukan ukuran yang tetap.



[Sumber: Barenholz dan Crommelin, 1994, telah diolah kembali]

Gambar 2.7. Pembentukan liposom berdasarkan teori *budding off*

2.2.5.2 Teori Fragmen Fosfolipid Lapis Ganda (*Bilayer Phospholipid Fragment/BPF*)

Pembentukan hidrasi fosfolipid lapis ganda disebabkan adanya ketidakstabilan termodinamik saat molekul hidrofobik terpapar fase air melebur dengan fragmen lain untuk membentuk vesikel lipid. Ketidakstabilan termodinamik pada tepi fragmen fosfolipid lapis ganda menyebabkan lengkungan dan saat fragmen lipid lapis ganda berdekatan akan terbentuk vesikel.

2.2.6 Stabilitas Liposom (Boyland, 1994)

Kestabilan liposom harus diperhatikan dalam pengembangan formula yang menggunakan liposom. Liposom dapat menjadi tidak stabil karena penguraian fisika dan kimia. Kehilangan kadar obat yang dienkapsulasi dan liposom yang teragregasi termasuk dalam ketidakstabilan fisika. Ketidakstabilan kimia

disebabkan reaksi peroksidasi pada fosfolipid dan sterol, serta reaksi hidrolisis yang terjadi pada fosfolipid. Dalam stabilitas kimianya, integritas kimia fosfolipid sebagai konstituen utama dapat dipengaruhi oleh reaksi hidrolisis dan peroksidasi.

Reaksi hidrolisis pada ikatan ester dapat menguraikan fosfatidilkolin menjadi 2-lisofosfatidilkolin dan asam lemak bebas. Suhu, rigiditas lapis ganda, dan pH adalah parameter yang mempengaruhi kinetika hidrolisis dari fosfatidilkolin.

Reaksi peroksidasi terjadi pada ikatan jenuh pada rantai asil fosfolipid yang diinduksi oleh autooksidasi atau fotooksidasi. Reaksi peroksidasi dapat dihindarkan dengan pemilihan lipid yang memiliki ikatan tidak jenuh, penyimpanan dalam keadaan vakum dengan menggunakan gas inert yang dialirkan ke liposom, penyimpanan dalam keadaan gelap untuk mencegah fotooksidasi, menghindari aktivasi dari logam berat dan zat pengkelat, dan penambahan antioksidan seperti α -tokoferol, butilhidroksitoluen, butilhidroksianisol, dan lain-lain.

Pada stabilitas fisika, liposom dapat teragregasi tergantung dari konstituen lapis ganda, ukuran partikel, kekuatan ionik, dan suhu. Pada umumnya dengan penambahan fosfatidilgliserol atau kolesterol hemisuksinat dapat menstabilkan liposom.

2.2.7 Evaluasi Liposom

Dilakukan karakterisasi dan evaluasi terhadap liposom tepat setelah proses tahapan pembuatan liposom selesai yang meliputi:

2.2.7.1 Morfologi (Bentuk Fisik)

Evaluasi morfologi meliputi evaluasi fisik terhadap liposom yang terbentuk, evaluasi yang dilakukan antara lain evaluasi terhadap ukuran dan tebal liposom yang terbentuk. Alat yang digunakan adalah mikroskop elektron yaitu *Scanning Electron Microscope* (SEM) ataupun *Transmission Electron Microscope* (TEM). Untuk dapat mengukur ukuran liposom yang mikroskopik diperlukan suatu instrumen berupa SEM, sedangkan untuk mengukur ketebalan

yang terbentuk, diperlukan suatu instrumen yang dapat menganalisa liposom secara tiga dimensi, oleh karena itu diperlukan alat berupa TEM.

a. SEM (*Scanning Electron Microscope*)

Terkadang liposom memiliki ukuran yang cukup besar untuk dilihat dengan menggunakan mikroskop biasa (diameter 1-10 μm). Namun karena keterbatasan ukuran yang dapat dilihat oleh mikroskop optik biasa, maka mikroskop elektron memiliki peran yang penting dalam menampilkan ukuran dan bentuk nanopartikel yang tidak dapat terlihat dengan mikroskop optik biasa. Tidak semua liposom dapat dilihat dengan menggunakan SEM secara langsung, liposom mungkin tidak cukup memiliki agen pengkontras, sehingga penambahan agen pengkontras dari luar perlu dilakukan. Agen pengkontras yang biasa ditambahkan biasanya emas. (Barenholz dan Crommelin, 1994).

b. TEM (*Transmission Electron Microscopy*)

Mirip dengan SEM, TEM merupakan suatu metode untuk mengevaluasi ukuran dan morfologi nanopartikel. Tomografi TEM memiliki resolusi yang lebih besar daripada SEM dan gambar yang dihasilkan dapat diperbesar lebih banyak daripada gambar yang dihasilkan oleh SEM. (Barenholz dan Crommelin, 1994).

2.2.7.2 Distribusi Ukuran Partikel

Distribusi ukuran partikel diukur dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* berupa *Laser Light Scattering* atau *Coulter Counter*. Mekanisme dalam metode *Laser Light Scattering* adalah difraksi cahaya, difusi cahaya, atau keduanya, bahkan ada juga yang menggunakan perhitungan dari terjadinya proses gerak Brown dari partikel. Metode ini lebih sederhana dan sangat efisien. Rentang ukuran partikel yang diukur cukup luas yaitu antara 10 nm – 1 mm. Sedangkan, pada metode *Coulter Counter*, mekanisme yang terjadi adalah adanya tahanan elektrik saat dispersi partikel melewati dua elektroda. Ketika kepadatan partikel dispersi cukup, setiap pulsa tegangan akan berinteraksi dengan setiap partikel sehingga distribusi ukuran partikel dapat diperkirakan (Williams dan Vaughn, 2007).

2.2.7.3 Daya Jerap Obat

Utuk mendapatkan efektivitas penjerapan dari liposom yang terbentuk, biasanya sebelumnya dilakukan proses pemisahan obat yang terjerap dan obat yang tidak terjerap di dalam liposom. Berikut ini menurut Gregoriadis (1984), ada tiga cara untuk pemisahan tersebut, yaitu dengan dialisis, ultrasentrifugasi, dan filtrasi gel.

a. Ultrasentrifugasi

Sentrifugasi di berbagai variasi kecepatan putaran per menit dapat secara efektif untuk pemurnian liposom dari molekul zat aktif yang tidak terikat di dalam medium suspensi. Dua atau lebih resuspensi dan sentrifugasi biasanya menghasilkan pemurnian yang komplit. Gaya sentrifugalnya mendorong liposom turun ke bawah terkait dengan ukuran partikelnya menjadi bentuk terflokulasi pada dispersinya.

Untuk liposom berukuran kecil hingga medium, perlu diperhatikan kondisi pendinginan yang diperlukan dan dibutuhkan kecepatan putaran yang relatif tinggi. Di sisi lain, untuk liposom ukuran medium hingga besar, kecepatan putaran relatif lebih rendah, yaitu 2000-4000 rpm. Metode ini tidak disarankan untuk liposom yang berukuran kecil, karena memerlukan kecepatan putaran yang tinggi, yang memerlukan energi dan biaya yang lebih mahal.

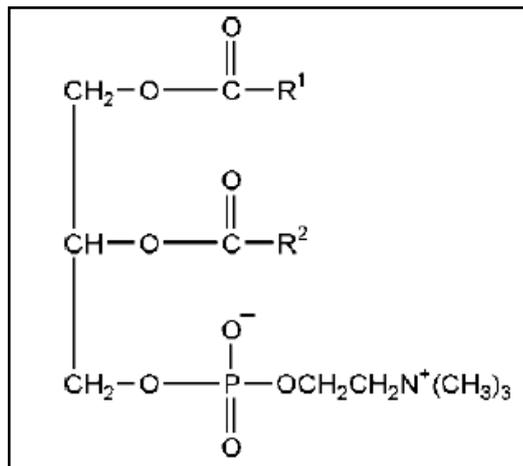
b. Dialisis

Dialisis merupakan cara yang paling sederhana dan paling banyak digunakan secara umum, kecuali untuk senyawa makromolekuler. Teknik ini tidak kompleks, tidak membutuhkan peralatan yang mahal dan bisa untuk skala besar. Meskipun prosesnya lambat, dibutuhkan waktu sekitar 10-24 jam dengan penggantian minimum sebanyak 3 kali dari medium eksternalnya, namun efektif untuk pemisahan obat yang tidak terjerap. Evaluasi daya jerap obat dilakukan dengan menghitung zat aktif yang terdialisis.

c. Filtrasi Gel

Teknik *gel permeation chromatographic* biasanya digunakan secara ekstensif untuk pemurnian liposom dan fraksinasi dispersi liposom heterogenus. Teknik ini efektif dikembangkan untuk skala laboratorium, namun teknik ini sulit dan relatif mahal.

2.3 Fosfatidilkolin (American Pharmaceutical Association, 1994)



[sumber: American Pharmaceutical Association, 1994, telah diolah kembali]

Gambar 2.8. Struktur kimia α -fosfatidilkolin (R_1 dan R_2 adalah asam-asam lemak)

Fosfatidilkolin memiliki nama trivial lesitin, merupakan fosfolipid yang paling banyak digunakan dalam pembuatan liposom. Fosfatidilkolin adalah suatu lipid yang mengandung gugus fosfat (fosfolipid). Fosfatidilkolin terdiri dari dua radikal asam lemak yang berikatan ester dengan gliserol serta satu molekul asam fosfat yang berikatan pada satu hidroksil dari gliserol dan pada satu molekul kolin. Larut dalam alifatik dan aromatik hidrokarbon, hidrokarbon terhalogenasi, minyak mineral, dan asam-asam lemak, tapi tidak larut dalam minyak nabati atau hewani, pelarut polar, dan air.

Komposisi dari fosfatidilkolin (yang juga mempengaruhi sifat fisiknya) sangat bervariasi tergantung dari sumbernya dan tingkat kemurniannya. Contohnya, fosfatidilkolin kuning telur mengandung 69% fosfatidilkolin dan 24% fosfatidiletanolamin, sementara fosfatidilkolin kedelai mengandung 21% fosfatidilkolin, 22% fosfatidiletanolamin, dan 19% fosfatidilinositol, bersamaan dengan komponen-komponen lainnya (Mitsui, 1993).

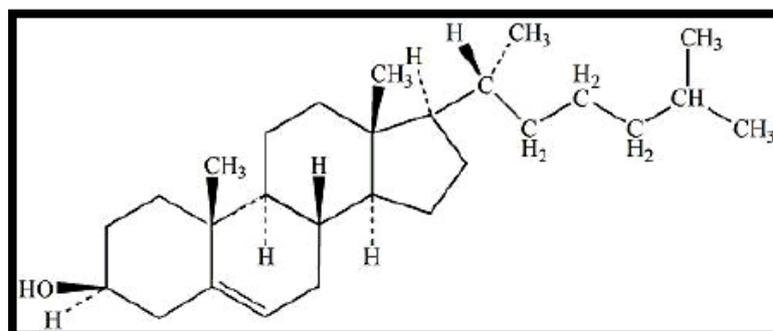
Dalam dunia farmasetika, fosfatidilkolin secara umum berfungsi sebagai *dispersing*, *emulsifying*, dan *stabilizing agents* yang diaplikasikan dalam sediaan injeksi intramuskular dan intravena, formulasi nutrisi parenteral, dan topikal seperti krim serta salep. Pada liposom, fosfatidilkolin termasuk ke dalam molekul

utama penyusun membran lipid *bilayer* yang digunakan untuk menjerap dari senyawa obat dan bersifat *biodegradable*, potensinya sebagai sistem penghantaran sudah dibuktikan melalui penelitian.

Fosfatidilkolin dan senyawa fosfolipid lainnya merupakan penyusun utama membran sel manusia, hewan, dan tumbuhan. Pada manusia dan hewan, fosfatidilkolin banyak ditemukan pada otak, jantung, hati, ginjal, paru-paru, dan darah, sedangkan pada tumbuhan, fosfatidilkolin terkonsentrasi pada bagian biji. Fosfatidilkolin memiliki berbagai bentuk fisik, dari kental, semi padat, hingga serbuk, tergantung konsistensi asam lemak bebas. Fosfatidilkolin juga beragam dalam warna, dari coklat hingga kuning ringan, tergantung apakah dibleaching atau tidak. Fosfatidilkolin pada umumnya tidak berbau, derivatnya dari sumber tumbuh-tumbuhan memiliki rasa seperti kacang, mirip dengan minyak kedelai (Windholz, 1976). Fosfatidilkolin dapat berubah menjadi coklat bila kena cahaya dan bersifat higroskopik, bila dicampur dengan air membentuk larutan koloid (Poedjiadi, 1994).

Fosfatidilkolin yang digunakan dalam penelitian ini adalah fosfatidilkolin yang berasal dari kuning telur yang didapat dengan cara ekstraksi *liquid egg yolks* menggunakan pelarut aseton atau dari *freeze-dried egg yolks* menggunakan etanol 95%.

2.4 Kolesterol (American Pharmaceutical Association, 1994)



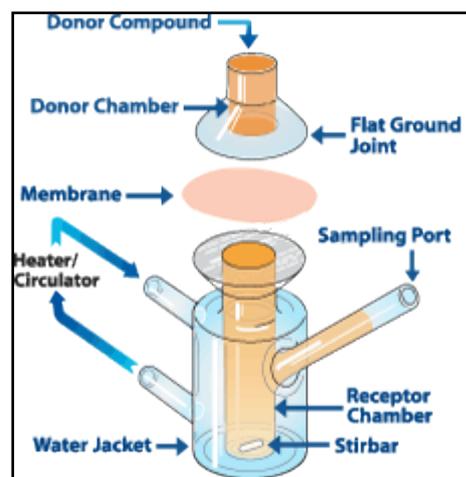
[sumber: American Pharmaceutical Association, 1994, telah diolah kembali]

Gambar 2.9. Struktur kimia kolesterol

Kolesterol adalah steroid alkohol yang tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik. Kolesterol terutama terdapat dalam membran sel, lipoprotein plasma, dan empedu, di mana senyawa ini dapat berasosiasi dengan lipid lain seperti fosfolipid dan asam empedu. Sinonim: 3beta-Hydroxy-5-cholestene, Cholest-5-en-3beta-ol, 3beta-Cholest-5-en-3-ol. Mempunyai berat molekul 386,66 dengan bentuk pemerian berupa kristal berwarna putih. Meleleh pada suhu 140⁰C. Kolesterol larut dalam aseton, kloroform, eter, dan benzen, tapi praktis tidak larut dalam air.

Keberadaan kolesterol dalam liposom akan meningkatkan stabilitas dengan menurunkan mobilitas molekul dan mengurangi permeabilitasnya, sehingga akan meningkatkan rigiditas dinding vesikel pada konsentrasi optimum. Penambahan kolesterol yang melewati batas optimum akan menyebabkan lapis tipis liposom yang terbentuk menjadi kaku, sehingga pengembangan saat hidrasi tidak maksimal. Apabila terlalu sedikit, maka dinding vesikel menjadi kurang kokoh. Banyak celah yang dapat dilalui air, sehingga memungkinkan vesikel beragregasi (Yunianto, 2007).

2.5 Uji Penetrasi Secara *in vitro* Menggunakan Sel Difusi Franz



[sumber: PermeGear, 2005, telah diolah kembali]

Gambar 2.10. Skema alat sel difusi Franz

Penelitian daya penetrasi dan pelepasan obat melalui kulit secara *in vitro* merupakan cara termudah dan hemat dalam mengarakterisasi absorpsi dan penetrasi obat melalui kulit. Selain itu, diperlukan saat pengembangan formulasi sediaan topikal untuk mengidentifikasi dan memilih formulasi yang baik. Formulasi yang baik akan memberikan pelepasan obat yang optimal dan deposisi obat menuju lapisan kulit yang diinginkan (stratum korneum, epidermis, atau dermis). Kegagalan dalam melaksanakan penelitian ini akan memberikan hasil yang toksik dan kegagalan pada uji klinis, bukan dikarenakan oleh aktivitas zat aktif namun karena karakteristik dari formulasi (Witt, 2003).

Langkah pertama pada pengantaran obat secara topikal adalah pelepasan obat dari pembawanya. Kecepatan pelepasan tergantung pada aktivitas termodinamik obat terkait formulasi dan hal ini dapat dipastikan dengan menggunakan suatu sistem sel difusi yang biasa digunakan pada penelitian daya penetrasi obat pada kulit secara *in vitro*. Kecepatan pelepasan obat yang kecil berhubungan dengan rendahnya bioavailabilitas dari formula yang digunakan. Umumnya, konsentrasi formula obat yang kecil dengan kelarutan obat yang besar akan menahan obat pada permukaan kulit dan memiliki kecepatan pelepasan obat yang kecil. Oleh karena itu, karakterisasi dari pelepasan obat dari suatu formulasi akan memberikan informasi berharga mengenai strategi dan pemilihan formula (Witt, 2003).

Studi penetrasi kulit secara *in vitro* berhubungan dengan mengukur kecepatan dan jumlah komponen yang menembus kulit dan jumlah komponen yang tertahan pada kulit. Salah satu cara untuk mengukur jumlah obat yang terpenetrasi melalui kulit yaitu dengan menggunakan sel difusi Franz. Sel difusi Franz terbagi atas dua komponen yaitu kompartemen donor dan kompartemen reseptor. Membran yang digunakan dapat berupa kulit manusia atau kulit hewan. Membran diletakkan di antara kedua kompartemen, dilengkapi dengan *o-ring* untuk menjaga letak membran. Kompartemen reseptor diisi dengan larutan penerima. Suhu pada sel dijaga dengan sirkulasi air menggunakan *water jacket* disekeliling kompartemen reseptor. Sediaan yang akan diuji diaplikasikan pada membran kulit. Pada interval waktu tertentu diambil beberapa ml cairan dari kompartemen reseptor dan jumlah obat yang terpenetrasi melalui kulit dapat

dianalisis dengan metode analisis yang sesuai. Setiap diambil sampel cairan dari kompartemen reseptor harus selalu digantikan dengan cairan yang sama sejumlah volume yang diambil (Anggraeni, 2007; Iswandana, 2009).

2.6 Analisis Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Menggunakan KLT Densitometer (*TLC Scanner*)

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi (pembagian), atau gabungannya. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Berbeda dengan kromatografi kolom yang mana fase diamnya diisikan atau dikemas di dalamnya, pada KLT, fase diamnya berupa lapisan tipis yang seragam pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik.

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode kromatografi paling sederhana yang secara luas digunakan sehingga sangat bermanfaat untuk analisis obat. Demikian juga peralatan yang digunakan juga lebih sederhana, waktu cukup singkat (15-60 menit), jumlah zat yang diperiksa cukup kecil (kira-kira 0,01 g senyawa murni dan 0,1 g simplisia) sehingga hampir semua laboratorium dapat melaksanakan setiap saat secara cepat. Bejana yang sesuai yang mengandung pelarut (eluen) dan plat (lempeng) yang telah dilapisi, dibutuhkan untuk pemisahan dan analisis secara kualitatif dan semikualitatif. Dengan melakukan optimasi terhadap teknik, material, dan penggunaan instrumen yang tersedia (contohnya densitometer), pemisahan secara efisien, akurat, dan analisis kuantitatif yang tepat dapat dicapai.

Dasar dari KLT adalah pengembangan sampel dengan eluen. Sedikit sampel ditotolkan di ujung fase diam untuk menunjukkan daerah penotolan, kemudian dikeringkan dan dimasukkan pada fase gerak, yang biasanya berupa campuran dua atau empat pelarut murni di dalam bejana. Jika lempeng dan fase gerak dipilih secara benar, pada saat fase gerak berelusi melalui fase diam, komponen-komponen dari campuran akan bergerak pada kecepatan yang berbeda. Hal ini disebut proses pengembangan pada kromatogram. Ketika fase gerak telah

berelusi dengan jarak yang sesuai, fase diam diambil dan fase geraknya dikeringkan dengan cepat dan bercak yang terbentuk dideteksi dengan cahaya atau dibawah sinar ultraviolet dengan atau tanpa aplikasi pereaksi warna yang cocok. Perbedaan jarak elusi dari tiap komponen terjadi karena perbedaan afinitasnya terhadap fase gerak dan fase diam.

Identifikasi senyawa pada KLT berdasarkan perbandingan nilai R_f antara sampel dengan standard. Nilai R_f umumnya tidak dihasilkan kembali dari laboratorium ke laboratorium atau bahkan pada proses yang berbeda di laboratorium yang sama, maka haruslah dipertimbangkan pedoman untuk jarak dan rangkaian perpindahan yang relatif. Faktor penyebab nilai R_f bervariasi mencakup ukuran dan tipe bejana, ukuran dan sifat lempeng, petunjuk dari aliran fase gerak, volume dan komposisi dari fase gerak, kondisi yang seimbang, kelembapan, dan persiapan metode pendahuluan (preparasi) KLT dari sampel. Hal inilah yang menjadi kekurangan dari KLT untuk analisis kuantitatif dibandingkan dengan metode kromatografi yang lain, seperti spektrofotometri dan KCKT.

Walaupun demikian, kelebihan yang dimiliki oleh KLT adalah sebagai berikut:

1. Lebih cepat dan lebih *reproducible* dari kromatografi kertas.
2. Untuk menyempurnakan pemisahan, lempeng dapat dibuat dengan campuran adsorben sebagai berikut :
 - a. Campuran homogen dari beberapa adsorben
 - b. Satu lempeng dilapisi dengan adsorben yang berbeda-beda
 - c. Satu lempeng dilapisi dengan campuran dua adsorben dengan konsentrasi bervariasi dari 0% ke 100% untuk adsorben yang satu dari ujung lempeng yang satu ke ujung lempeng yang lain dan sebaliknya.
3. Area dari bercak lebih kompak dan jenis *spray-reagents* lebih banyak termasuk yang bersifat korosif dapat digunakan bila adsorben bukan selulosa.
4. Identifikasi komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi atau pemadaman fluoresensi, radiasi UV
5. Dapat dilakukan elusi dengan mekanik (*ascending*) atau menurun (*descending*) atau dengan cara elusi 2 dimensi

6. Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang ditentukan merupakan noda yang tidak bergerak.

Prinsip pemisahan yang optimal, yaitu ditentukan oleh pasangan fase diam dan fase gerak yang cocok untuk campuran yang akan dipisahkan. Apabila campuran yang akan dipisahkan adalah hidrokarbon jenuh, sebaiknya gunakan adsorben yang aktif dan pelarut yang agak polar. Karena hidrokarbon jenuh hampir tidak diadsorpsi sehingga merambat paling cepat. Hidrokarbon yang tidak jenuh diserap lebih kuat, makin banyak ikatan rangkap, penyerapan makin kuat, oleh karena itu pelarutnya juga dipilih yang lebih polar. Ukuran partikel dan kepadatan lapisan adsorben juga menentukan laju perambatan, yaitu makin halus partikel adsorben maka perambatan makin lambat. Ukuran partikel dapat berkisar antara 0,1-40 μm .

Dalam penggunaan pelarut (eluen) perlu diperhatikan:

1. Pelarut harus murni
2. Campuran pelarut hanya boleh digunakan maksimal 2-3 kali
3. Komposisi campuran pelarut dapat berubah karena penguapan atau penyerapan
4. Komponen campuran pelarut mungkin beraksi satu sama lain
5. Eter atau kloroform yang digunakan mengandung 0,5-1% etanol sebagai stabilisator.

Kekentalan menentukan laju perambatan pelarut, yaitu makin kental, perambatan makin lambat. Kekuatan eluasi akan semakin meningkat, bila kepolaran pelarut juga meningkat. (Harmita, 2006)

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian adalah di Laboratorium Penelitian Fitokimia, Laboratorium Farmasetika, Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kualitatif, dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia , serta Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Kesehatan dan Ilmu Kedokteran Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta selama kurang lebih 4 bulan dari bulan Februari sampai Mei 2012.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kasar yang didapat dari simplisia serbuk herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). Pegagan dipetik saat umur 8 bulan dari Badan Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO), Jl. Tentara Pelajar no.3, Bogor, Jawa Barat. Dideterminasi oleh Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jl. Raya Jakarta – Bogor Km.46, Cibinong.

3.2.2 Hewan Uji

Tikus putih betina galur *Sprague Dawley* berumur 8-9 minggu dengan bobot berkisar 150-200 gram (Institut Pertanian Bogor, Indonesia).

3.2.3 Bahan Kimia dan Pereaksi

Asiatikosid standard, fosfatidilkolin (Sigma Aldrich, USA), kolesterol (Sigma Aldrich, USA), etanol, kloroform, natrium hidroksida (Mallinckrodt), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), anisaldehida (Merck, Jerman), asam sulfat LP (Merck, Jerman), asam asetat (Merck, Jerman), *aquadest*, dan gas nitrogen.

3.3 Peralatan

Rotary evaporator (Hahn Shin), timbangan analitik (Adam AFA-210 LC), pH meter (Eutech), pengaduk magnetik, sel difusi Franz, lempeng KLT Silika gel GF₂₅₄ (Merck, Jerman), bejana KLT (CAMAG), pipet mikro (Eppendorf, Jerman; Socorex, Swiss), KLT densitometer (CAMAG TLC *Scanner* 3), komputer yang dilengkapi dengan program winCATS, lemari pendingin (Panasonic), penangas air (Memmert, Hongkong), oven (Memmert, Jerman), *vortex mixer* (Health H-VM-300), ultrasonikator (Branson 3200), *Scanning Electron Microscope* (LEO 420i), *Transmission Electron Microscope* (Jeol Jem 1400), *Confocal Laser Scanning Biological Microscope* (Fluoview FV1000, Olympus), *Particle Size Analyser* (Malvern Zetasizer Ver. 6.20), *glass beads*, kamera digital (Canon IXUS), selang, alat-alat gelas dan alat-alat bedah.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Persiapan Ekstrak Kasar Pegagan

Serbuk simplisia kering pegagan yang dikeringkan dengan metode pengeringan matahari langsung dari jam 08.00-11.00 dan sambil ditutup dengan kain hitam apabila panas terik dari jam 11.00-14.00 selama 3 hari, namun bila cuaca tidak mendukung digunakan pengeringan oven pada suhu 40-50 °C. Derajat kehalusan serbuk pegagan yaitu 40-50 mesh. Berat basah simplisia 3 kg didapatkan berat kering simplisia sebanyak 500 g, sehingga bisa dihitung susut pengeringan sebesar 83,33% (b/b). Kandungan air dalam simplisia sebesar 15%.

Ditimbang \pm 40 g serbuk pegagan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml. Ke dalam erlenmeyer ditambahkan etanol 70% sebanyak 400 ml. Dilakukan proses ekstraksi dengan metode maserasi selama 24 jam pada temperatur ruang. Hasil maserasi kemudian disaring dengan vakum dan residu pada kertas saring dicuci kembali dengan etanol 70% hingga diperoleh filtrat yang jernih. Pencucian dilakukan 4-5 kali. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan untuk menghilangkan pelarut menggunakan *rotary vaccum evaporator* hingga

diperoleh ekstrak kental. Proses maserasi diulang beberapa kali terhadap serbuk simplisia baru (Hamid *et al.*, 2002).

Setelah didapat ekstrak kental, dilakukan partisi atau pemurnian dengan tujuan menghilangkan (memisahkan) senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki. Untuk preparasi liposom sangat dianjurkan untuk menggunakan ekstrak yang relatif memiliki kemurnian yang tinggi.

Melalui corong pisah, ekstrak kental yang telah didispersikan dengan air hangat, dicampur dengan n-heksan sambil dikocok dan didiamkan selama 1 jam. Terbentuk selapis pemisahan, di mana n-heksan yang menarik senyawa-senyawa non polar berada di bagian atas corong pisah, dengan cara dekantasi, filtrat n-heksan dikeluarkan dari corong pisah. Proses yang sama terus dilakukan hingga tiga kali, sehingga menghasilkan perbedaan kejernihan warna antara filtrat pertama, kedua, dan ketiga.

Setelah senyawa-senyawa non polar dipartisi dari ekstrak kental pegangan tersebut, masih ada senyawa klorofil yang tersisa di sana. Untuk itu, dilakukan penarikan senyawa klorofil dengan menggunakan diklormetan. Proses partisi ini juga dilakukan dalam corong pisah. Ekstrak kental yang telah dicuci dengan n-heksan sebelumnya dicampur dengan diklormetan. Pada corong pisah, bagian yang terlarut di dalam diklormetan ada pada bagian bawah corong pisah, sedangkan yang larut air, yaitu senyawa asiatikosid itu sendiri ada di bagian atas corong pisah. Proses ini juga dilakukan sebanyak tiga kali dengan langkah yang sama seperti di atas.

Dari partisi tersebut dihasilkan filtrat lapisan air yang mengandung senyawa asiatikosid lebih murni. Melalui proses oven vakum selama 12 jam, dihasilkan ekstrak serbuk asiatikosid kering. Ekstrak serbuk kering ini disimpan di dalam vial terlindung dari cahaya matahari dan digunakan dalam formulasi liposom selanjutnya (Wu, *et al.*, 2009).

3.4.2 Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 7,4 (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979)

Larutan dapar fosfat dibuat dengan mencampurkan 50 ml kalium dihidrogen fosfat 0,2 M dengan 42,80 ml natrium hidroksida 0,2 N di dalam labu ukur 200,0 ml, kemudian dicukupkan volumenya sedikit demi sedikit dengan *aquadest* sambil diuji dengan pH meter agar sesuai menunjukkan pH 7,4 hingga 200 ml. Sebelumnya, kalium dihidrogen fosfat 0,2 M dibuat dengan menimbang 13,609 gram serbuk kalium dihidrogen fosfat, larutkan dengan *aquadest* di dalam labu ukur 500,0 ml, dan dicukupkan volumenya sedikit demi sedikit hingga batas labu ukur. Untuk pembuatan natrium hidroksida 0,2 N pelet natrium hidroksida ditimbang sebanyak 8,0 gram, kemudian dilarutkan dalam 1000 ml *aquadest*.

3.4.3 Identifikasi dan Penetapan Kadar Asiatikosid dengan KLT Densitometri (Departemen Kesehatan RI, 1977; Natural Remedies, 2001; James dan Dubery, 2006)

3.4.3.1 Penyiapan Larutan Standar Asiatikosid

Untuk mendapatkan persamaan garis linier dari kurva kalibrasi diperlukan rentang standar dengan konsentrasi 0,04-0,8 mM. Berat molekul asiatikosid diketahui sebesar 959,12. Larutan standar yang digunakan ada 7 titik, yaitu 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 140 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, dan 25 µg/ml. Untuk membuat larutan 1000 µg/ml, standar asiatikosid ditimbang seksama sebanyak 10 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml secara kuantitatif, ditambahkan pelarut dapar fosfat pH 7,4 hingga garis batas kemudian dikocok hingga larut. Dari larutan 1000 µg/ml dipipet 5,0 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambahkan dapar fosfat pH 7,4 dan dikocok hingga larut sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 500 µg/ml. Dari larutan 1000 µg/ml yang sama dipipet 7,0 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 ml, ditambahkan dapar fosfat pH 7,4 dan dikocok hingga larut sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 140 µg/ml. Dipipet sebanyak 5,0 ml dan 2,0 ml larutan 500 µg/ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml dan ditambahkan dapar fosfat pH 7,4 hingga garis batas lalu dikocok hingga larut sehingga diperoleh larutan 250 µg/ml dan 100 µg/ml. Dari larutan 100 µg/ml dipipet sebanyak 5,0 ml

lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambahkan dapar fosfat pH 7,4 hingga garis batas kemudian dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan 50 µg/ml. Terakhir, dari larutan 50 µg/ml dipipet sebanyak 5,0 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambahkan dapar fosfat pH 7,4 hingga garis batas kemudian dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan 25 µg/ml.

3.4.3.2 Penyiapan Larutan Sampel

Larutan sampel didapat dari ekstrak serbuk kering asiatikosid yang dilarutkan dalam larutan dapar, supernatan hasil ultrasentrifugasi suspensi liposom, dan hasil sampling pada uji penetrasi *in vitro* sel difusi Franz yang langsung dipipet dengan mikropipet sebanyak 5,0 µL.

3.4.3.3 Proses Pengembangan pada Lempeng KLT

Sebelum proses pengembangan dilakukan, bejana harus dijenuhkan terlebih dahulu dengan eluen yang digunakan, yaitu campuran antara metanol-air-kloroform-asam asetat glasial 60:32:12:8 (v/v) selama 4 jam. Lempeng KLT harus diaktifkan terlebih dahulu dengan dipanaskan dalam oven 100 °C selama 60 menit.

Larutan standar asiatikosid dengan konsentrasi berbeda dan larutan sampel (triplo) ditotolkan pada lempeng KLT Silika gel GF₂₅₄, masing-masing volume penotolan 5,0 µL. Penotolan dilakukan pada lempeng KLT ukuran 20 cm x 20 cm dengan jarak antar titik penotolan 1,0 cm dan jarak pengembangan yaitu hingga 6 cm. Setelah penotolan, dikeringkan dengan menggunakan *hair dryer*. Selanjutnya lempeng KLT tersebut dielusi atau dikembangkan di dalam bejana yang sudah jenuh dengan fase geraknya dalam keadaan vakum tertutup rapat dengan jarak pengembangan hingga 6 cm.

3.4.3.4 Pembuatan Pereaksi Penampak Bercak Anisaldehyd-Asam Sulfat LP (Touchstone dan Dobbins, 1983)

Lima ml asam sulfat pekat ditambahkan ke dalam larutan 0,5 ml anisaldehyd dan 10 ml asam asetat glasial dalam 85 ml metanol. Lalu dipanaskan

pada suhu 95⁰ C selama 10 menit hingga warnanya tampak. Dibuat segar sebelum digunakan.

3.4.3.5 Pembacaan Hasil dengan KLT Densitometri

Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan disemprot dengan pereaksi penampak bercak anisaldehyd-asam sulfat LP. Lempeng dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C selama 10 menit atau hingga bercak benar-benar tampak. Lempeng yang sudah tampak bercaknya kemudian segera dianalisis menggunakan *TLC Scanner* pada panjang gelombang optimum berdasarkan literatur, yaitu 506 nm.

3.4.3.6 Perhitungan Kadar Asiatikosid

Konsentrasi asiatikosid terukur dapat dihitung berdasarkan persamaan kurva kalibrasi yang telah diperoleh sesuai dengan persamaan berikut.

$$y = a + bx$$

Keterangan:

x = Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/ml}$)

y = Luas puncak (area) atau tinggi puncak

Setelah diperoleh konsentrasi terukur menggunakan persamaan kurva kalibrasi di atas, dihitung kadar asiatikosid dalam sampel menggunakan rumus di bawah ini.

$$\text{Kadar (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi terukur} \times 100}{\text{Konsentrasi total}}$$

Kadar yang diperoleh kemudian digunakan untuk perhitungan penyerapan suspensi liposom yang mengandung ekstrak pegagan dan kadar asiatikoasid yang terpenetrasi melalui kulit tikus.

3.4.4 Pembuatan Liposom dengan Metode Hidrasi Lapis Tipis

3.4.4.1 Pembuatan Lapisan Lipid Tipis

Fosfatidilkolin dan kolesterol ditimbang dengan seksama sesuai dengan yang tertera dalam formula pada **tabel 3.1.** dan dilarutkan dalam 20 ml kloroform

pada sebuah labu bulat. Larutan tersebut kemudian dievaporasi menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$, kecepatan 150 rpm, dan kondisi vakum untuk menguapkan kloroformnya hingga terbentuk lapisan tipis, selama 1 jam. Lapisan tipis yang telah terbentuk tersebut kemudian dialiri gas nitrogen, dan didiamkan selama 24 jam dalam lemari es untuk mencapai kondisi kesetimbangan dengan lingkungan dan menjamin penghilangan pelarut dengan sempurna. (Fang, *et al.*, 2005; Ramadhani, 20011; Yuniyanto, 2007)

Berikut ini adalah formulasi pembuatan liposom yang digunakan untuk menghasilkan 50 ml suspensi liposom:

Tabel 3.1. Formulasi liposom ekstrak pegagan

Bahan	Formula dengan perbandingan Fosfatidilkolin : kolesterol			
	F1 (2:1)	F2 (4:1)	F3 (7:1)	F4 (10:1)
Ekstrak pegagan (mg)	50	50	50	50
Fosfatidilkolin (mg)	140	280	490	700
Kolesterol (mg)	70	70	70	70

3.4.4.2 Hidrasi Lipid Lapis Tipis

Lapisan lipid tipis yang telah disimpan 24 jam, selanjutnya di dalam labu *evaporator* tersebut dihidrasi dengan 50 ml larutan dapar pH 7,4 yang sudah mengandung 50 mg ekstrak pegagan pada suhu 60°C sambil dikelupas dengan *glass beads* hingga terbentuk suspensi berwarna putih susu. Suspensi yang terbentuk kemudian di *vortex* selama 15 menit dan kembali disimpan di dalam vial selama 24 jam di dalam lemari pendingin pada suhu 4°C . (Tsai, *et al.*, 2011; Ramadhani, 2011)

3.4.5 Pengecilan dan Penyeragaman Ukuran Partikel Liposom

Pengaturan ukuran partikel liposom dilakukan dengan menggunakan metode ultrasonikasi. Suspensi liposom yang telah disimpan selama 24 jam kemudian dimasukkan ke dalam alat sonikator untuk memperkecil dan menseragamkan ukuran partikel liposom. Dilakukan dua macam perlakuan lamanya waktu sonikasi terhadap keempat formula liposom tersebut, yaitu selama 20 menit dan 120 menit dengan kondisi pada suhu 25⁰ C (Yang, *et al.*, 2009). Selanjutnya, dilihat perbedaan hasil yang diperoleh dari dua perlakuan tersebut.

3.4.6 Pemurnian Liposom

Untuk pemisahan obat yang terjerap di dalam vesikel dengan yang tidak terjerap, dilakukan pemurnian liposom dengan metode ultrasentrifugasi (Himac CP100WX, Hitachi) pada 30.000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4⁰ C (Kwon, *et al.*, 2011). Melalui proses ultrasentrifugasi ini akan terbentuk pemisahan antara supernatan dan presipitatnya. Liposom yang telah dimurnikan disimpan dalam vial dalam lemari pendingin.

3.4.7 Penentuan Efisiensi Penjerapan Ekstrak Pegagan dalam Liposom

Efisiensi penjerapan ekstrak pegagan diperoleh melalui analisis konsentrasi supernatan yang terbentuk, di mana konsentrasi asiatikosid terjerap liposom ada pada presipitat. Liposom yang telah diultrasonikasi dan dimurnikan dengan cara ultrasentrifugasi selama 30 menit, diambil supernatannya dengan mikropipet sebesar 5 µL, lalu dianalisis kadar asiatikosid yang tidak terikat di dalam liposom dengan menggunakan metode KLT densitometri.

Efisiensi penjerapan ekstrak pegagan oleh liposom dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\%EP = \frac{Ct - Cs}{Ct} \times 100\%$$

Konsentrasi ekstrak pegagan yang terjerap diperoleh dari hasil pengurangan konsentrasi ekstrak pegagan total (Ct) yang terdapat dalam formula dengan konsentrasi ekstrak pegagan pada supernatan (Cs). Daya jerap ekstrak pegagan oleh liposom diukur dengan membandingkan konsentrasi ekstrak pegagan yang terjerap

(Cterjerap) dengan konsentrasi ekstrak pegagan total (Ct). Setiap formulasi dilakukan penetapan kadarnya secara triplo (Touitou, *et al.*, 2000).

3.4.8 Evaluasi Liposom yang Mengandung Ekstrak Pegagan

3.4.8.1 Morfologi Bentuk Vesikel

Morfologi liposom dievaluasi dengan melihat bentuk fisik globul proliposom menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscope*), TEM (*Transmission Electron Microscope*), dan mikroskop konvokal. Untuk penggunaan SEM, sampel dikeringkan terlebih dahulu dengan *freeze dry*. Preparasi ini perlu dilakukan karena SEM tidak dapat menganalisa sampel yang mengandung air (Ramadhani, 2011). Untuk penggunaan mikroskop konvokal, prinsipnya dilakukan *laser scanning* pada preparat liposom di atas *object glass*. Untuk penggunaan TEM, preparasi pengukuran dilakukan dengan cara, 3 tetes sampel liposom ditambah 1 tetes ammonium asetat dan 1 tetes ammonium molybdat, lalu diaduk sampai homogen kemudian ditetaskan diatas *cooper grid* (tempat sampel), ditunggu kering selanjutnya dianalisis.

3.4.8.2 Distribusi Ukuran Partikel Liposom

Penetapan distribusi ukuran partikel dideterminasi menggunakan metode *light scattering* (pemendaran cahaya) dengan menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA) Zetasizer Ver. 6.20 pada temperature 25⁰C. Larutan dapar fosfat pH 7,4 dimasukkan ke ke dalam *fluid tank* sebagai *baseline*, kemudian sampel dimasukkan ke dalam *fluid tank* tetes demi tetes hingga konsentrasi yang mencukupi untuk dapat diukur, setelah itu akan terukur ukuran partikel globul-globul liposom. Sampel dipendar pada 35mW dan 632,8 nm menggunakan *He-Ne mono-wavelength* (Kwon, 2011). Alat ini juga menggunakan kecepatan gerak Brown untuk dapat menghitung ukuran partikel. Pengukuran distribusi ukuran partikel dilakukan baik untuk liposom yang diultrasonikasi selama 20 menit maupun selama 120 menit.

3.4.9 Uji Penetrasi Liposom Ekstrak Pegagan secara *in vitro* dengan Metode Sel Difusi Franz (Kwon, *et al.*, 2011; Crandal, 2005)

Tikus betina yang dihilangkan bulunya dengan alat cukur tipe *Sprague Dawley* yang berumur 8-9 minggu digunakan kulitnya sebagai membran untuk uji penetrasi liposom ekstrak pegagan secara *in vitro*. Pertama-tama tikus dibius dengan eter hingga mati kemudian bulu tikus dicukur dengan hati-hati. Setelah itu kulit tikus disayat pada bagian perut dengan ketebalan $0,6 \pm 0,1$ mm. Kemudian kulit tikus direndam dalam medium yang akan digunakan selama 30 menit setelah itu disimpan dalam suhu 4°C . Kulit dapat digunakan pada rentang waktu 24 jam. Uji penetrasi dilakukan menggunakan sel difusi Franz dengan luas area difusi 2.0117 cm^2 dan volume kompartemen reseptor 14 ml. Kompartemen reseptor diisi dengan larutan medium dapar fosfat pH 7,4 dan dijaga suhunya sekitar $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ serta diaduk dengan *stirrer* kecepatan 300 rpm. Kulit abdomen tikus kemudian diletakkan di antara kompartemen donor dengan kompartemen reseptor dengan posisi stratum korneum menghadap ke atas. Sampel sebanyak 1 gram diaplikasikan pada permukaan kulit. Kemudian pada menit ke-10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 diambil sampel sebanyak 0,5 ml dari kompartemen reseptor menggunakan *syringe* dan segera digantikan dengan larutan medium sejumlah volume yang sama. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam vial. Masing-masing sampel diukur konsentrasinya menggunakan KLT densitometer sesuai prosedur **3.4.3.1** hingga **3.4.3.6**. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali.

Jumlah kumulatif ekstrak pegagan yang terpenetrasi per luas area difusi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dihitung dengan rumus:

$$Q = \frac{\{C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C \cdot S\}}{A}$$

Keterangan:

Q = Jumlah kumulatif ekstrak pegagan yang terpenetrasi per luas area difusi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

C_n = Konsentrasi ekstrak pegagan ($\mu\text{g}/\text{ml}$) pada *sampling* menit ke-n

V = Volume sel difusi Franz (14,0 ml)

$\sum_{i=1}^{n-1} C$ = Jumlah konsentrasi ekstrak pegagan ($\mu\text{g}/\text{ml}$) pada *sampling* pertama (menit ke-10) hingga sebelum menit ke-n

S = Volume *sampling* (0,5 ml)

A = Luas area membrane (cm²)

Kemudian dilakukan perhitungan fluks obat berdasarkan hukum Fick I:

$$J = \frac{M}{Sxt}$$

J = Fluks (μg cm⁻² jam⁻¹)

M = Jumlah kumulatif asiaticosid yang melalui membran (μg)

S = Luas area difusi (cm²)

t = Waktu (jam)

Selanjutnya dibuat grafik jumlah kumulatif ekstrak pegagan yang terpenetrasi (μg) per luas area difusi (cm²) terhadap waktu (jam) dan grafik fluks (μg cm⁻² jam⁻¹) terhadap waktu (jam).

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pemurnian Asiatikosid dari Ekstrak Kental Pegagan

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pemurnian senyawa aktif asiatikosid dari ekstrak kental pegagan yang telah didapat sebelumnya dari hasil ekstraksi secara maserasi serbuk simplisa kering seberat 453,9 g selama 24 jam menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak kental yang diperoleh berwarna hijau pekat dapat diamati pada **Gambar 4.17.** yang mempunyai berat sebesar 114,9 g dan masih mengandung berbagai macam senyawa-senyawa lain selain dari zat aktif asiatikosid. Dengan menggunakan analisis KLT Densitometri, diketahui kadar asiatikosid yang terdapat dalam ekstrak kental adalah 4,29%. Sebanyak 15 g dari ekstrak kental diambil untuk dilakukan analisa kadar abu dan kadar air, hasil dapat dilihat pada lampiran.

Pada dasarnya, tahap ini lebih ke arah partisi daripada pemurnian karena untuk mendapatkan senyawa asiatikosid tunggal yang murni diperlukan langkah yang sulit dan jauh lebih panjang. Melalui proses partisi, senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin dipisahkan tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki, yaitu asiatikosid. Asiatikosid sendiri mempunyai sifat polar yang larut dalam air, untuk itu dilakukan pemisahan terhadap senyawa-senyawa non polar yang tidak diperlukan dengan menggunakan pelarut organik, yaitu n-heksan.

Melalui corong pisah, 100 g ekstrak kental yang telah didispersikan dengan 120 ml air hangat, dicampur dengan 150 ml n-heksan sambil dikocok dan didiamkan selama 1 jam. Terbentuk selapis pemisahan, di mana n-heksan yang menarik senyawa-senyawa non polar berada di bagian atas corong pisah, dengan cara dekantasi, filtrat n-heksan dikeluarkan dari corong pisah. Proses yang sama terus dilakukan hingga tiga kali, sehingga menghasilkan perbedaan kejernihan warna antara filtrat pertama, kedua, dan ketiga. Filtrat pertama berwarna hijau pekat, filtrat kedua berwarna hijau yang tidak terlalu pekat, dan filtrat ketiga berwarna hijau jernih.

Setelah senyawa-senyawa non polar dipartisi dari ekstrak kental pegagan tersebut, masih ada senyawa klorofil yang tersisa di sana. Untuk itu, dilakukan penarikan senyawa klorofil dengan menggunakan diklormetan. Proses partisi ini juga dilakukan di corong pisah. Ekstrak kental yang telah dicuci dengan n-heksan sebelumnya dicampur dengan 100 ml diklormetan. Pada corong pisah, bagian yang terlarut di dalam diklormetan ada pada bagian bawah corong pisah, sedangkan yang larut air, yaitu senyawa asiaticosid itu sendiri ada di bagian atas corong pisah. Proses ini juga dilakukan sebanyak tiga kali dengan langkah yang sama seperti di atas, hingga menghasilkan warna hijau pudar kekuningan pada filtrat ketiga diklormetan.

Dari partisi tersebut dihasilkan filtrat lapisan air yang mengandung senyawa asiaticosid lebih murni sebanyak 150 ml. Melalui proses oven vakum selama 12 jam, dihasilkan 687 mg ekstrak serbuk asiaticosid kering agak lengket berwarna hijau kekuningan seperti yang terlihat pada **Gambar 4.18**. Ekstrak serbuk kering ini disimpan di dalam vial terlindung dari cahaya matahari dan digunakan dalam formulasi liposom selanjutnya.

4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Penetapan Kadar Asiaticosid secara KLT Densitometri

Metode analisis kuantitatif yang dipilih adalah Kromatografi Lapis Tipis Densitometri. Awalnya, sempat ingin menggunakan Spektrofotometri, namun dikarenakan senyawa asiaticosid tidak mempunyai gugus kromofor dan untuk itu preparasinya harus menambahkan senyawa *coupler* agar terbentuk gugus kromofornya, akhirnya tidak jadi dilakukan dengan alasan proses yang rumit dan tidak efektif. Lebih baik lagi jika analisis kuantitatif ini menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), namun karena keterbatasan alat yang ada, akhirnya dipilihlah metode KLT Densitometri.

Selain itu, senyawa asiaticosid termasuk ke dalam golongan triterpenoid saponin, di mana berdasarkan penelitian sebelumnya untuk identifikasi dan analisis kuantitatif, metode yang paling banyak digunakan adalah KLT Densitometri. Ekstrak etanol *Centella asiatica* (L.) Urban dan standar yang

mengandung senyawa asiatikosid, madekassosid, asam asiatik, dan asam madekasik dapat dipisahkan melalui fase gerak yang digunakan pada KLT. Hal ini sudah terbukti berhasil memisahkan asam triterpenoid tersebut (asam asiatik, asam madekasik) dan senyawa dengan gugus glikosida (asiatikosid, madekassosid) dengan senyawa komponen lain dari ekstrak kasar pegagan. (James dan Dubery, 2006)

Untuk tahap awal dilakukan optimasi kondisi yang terbaik terlebih dahulu. Optimasi ini cukup memakan waktu yang lama, dikarenakan preparasi jika menggunakan KLT cukup rumit. Untuk mendapatkan kurva kalibrasi dengan koefisien korelasi (r) yang baik saja harus dilakukan percobaan berulang-ulang kali karena banyak faktor eksternal yang mempengaruhi analisis kuantitatif, seperti cara penotolan, kejenuhan bejana, pencampuran beberapa pelarut yang digunakan sebagai eluen, dan ditambah dengan zat yang akan diukur berasal dari bahan alam yang belum mencapai kemurnian yang tinggi. Penggunaan penampak bercak juga mempengaruhi hasil kuantitatif. Setelah dilakukan pengelusian di dalam bejana yang jenuh, kemudian disemprot dengan penampak bercak dan dikeringkan di dalam oven kurang lebih selama 10 menit hingga warna ungu tampak pada lempeng. Setelah itu harus sesegera mungkin lakukan *scanning* dengan densitometri, karena semakin lama warna perlahan-lahan akan menghilang, tentu saja sangat berpengaruh terhadap pengukuran luas puncak. Oleh karena itu, penting untuk selalu menyertakan perhitungan persamaan regresi linear setiap penggantian lempeng apabila akan mengukur suatu sampel di lempeng yang sama.

Untuk perhitungan kadar asiatikosid pada ekstrak pegagan dilakukan secara duplo, pada percobaan pertama dibuat kurva kalibrasi asiatikosid dalam dapar fosfat pH 7,4 dengan konsentrasi 1000 ppm, 140 ppm, 100 ppm, 50 ppm, dan 25 ppm. Persamaan kurva kalibrasi yang didapat adalah $y = 13494,46734 + 20,7991x$ dengan $r = 0,99777$. Dari persamaan itu dihasilkan konsentrasi asiatikosid sebesar 119,2731 $\mu\text{g/ml}$ dan didapatlah persentase kadarnya sebesar 10,54%. Sedangkan, untuk percobaan kedua dibuat kurva kalibrasi dengan konsentrasi 1000 ppm, 250 ppm, 140 ppm, 100 ppm, dan 50 ppm. Persamaan kurva kalibrasi yang didapat adalah $y = 2038,53851 + 2,99852x$ dengan $r =$

0,96288. Dari persamaan itu dihasilkan konsentrasi asiaticosid sebesar 95,1174 µg/ml dan didapatlah persentase kadarnya sebesar 8,40%. Hasil persentase dari percobaan pertama dan kedua dirata-ratakan, didapat hasil kadar rata-rata asiaticosid sebesar 9,47%.

Perhitungan kadar ini dilakukan untuk membuktikan kebenaran proses pemurnian ekstrak pegagan dengan cara partisi menggunakan n-heksan dan diklormetan seperti yang telah dijelaskan pada poin **4.1**. Ternyata dapat diketahui, seiring dengan peningkatannya kadar yang terdapat dalam ekstrak serbuk kering pegagan, maka proses pemurnian ekstrak kental pegagan dikatakan berhasil. Ekstrak yang digunakan untuk preparasi liposom telah mengandung senyawa asiaticosid yang lebih murni.

4.3 Pembuatan Liposom

Metode pembuatan liposom yang digunakan adalah metode hidrasi lapis tipis yang merupakan metode umum yang dipakai untuk pembuatan liposom. Metode ini terdiri dari dua tahap, yaitu pembentukan lapisan lipid tipis dan hidrasi lipid lapis tipis oleh pelarut, yaitu larutan dapar fosfat pH 7,4. Bahan penyusun liposom yang utama digunakan adalah fosfatidilkolin dan kolesterol. Pada penelitian ini, ada empat formula yang diteliti terhadap penambahan fosfatidilkolin dan perbandingannya dengan kolesterol sesuai yang tertera pada **Tabel 3.1**. Zat aktif yang digunakan adalah asiaticosid yang didapat dari ekstrak serbuk kering pegagan. Asiaticosid adalah zat yang bersifat hidrofil sehingga aplikasinya pada sediaan topikal akan sulit karena tidak dapat menembus kulit hingga lapisan dermis (Karina, 2009). Ditambah sifatnya yang berasal dari bahan herbal yang hanya diolah menjadi ekstrak kasar serbuk kering dengan tingkat kemurnian yang masih rendah, yang tentunya masih sulit untuk berpenetrasi melewati kulit. Oleh karena itu, asiaticosid memerlukan suatu sistem pembawa obat, yaitu dengan teknologi liposom sehingga dapat masuk ke dalam lapisan dermis memberikan efek antikeloid atau penyembuh bekas luka (Kwon, *et al.*, 2011).

Fosfatidilkolin merupakan salah satu jenis fosfolipid yang berasal dari alam yaitu telur. Fosfatidilkolin dari telur memiliki rantai asil tersaturasi pada posisi R1 dan rantai tidak tersaturasi pada posisi R2 (Boylard dan Swarbick, 1994). Oleh karena itu, peroksidasi lipid dapat terjadi. Hal ini diminimalisasi dengan cara mengalirkan gas inert, yaitu gas nitrogen. Fosfatidilkolin adalah molekul utama penyusun membran lipid *bilayer* yang digunakan untuk menjerap dari senyawa obat dan bersifat *biodegradable*, potensinya sebagai sistem penghantaran sudah dibuktikan melalui penelitian ini. Dalam pembuatan liposom juga digunakan kolesterol yang berfungsi sebagai penstabil liposom yang menyebabkan liposom tidak mudah bocor (Mitsui, 1993).

Prinsip dari metode hidrasi lapis tipis ini adalah proses pengocokan mekanis. Lipid dilarutkan dalam pelarut organik, kemudian pelarut organik diuapkan dengan alat *rotary evaporator* membentuk lapisan lipid tipis (Martin, 1990), melalui proses hidrasi pada suhu transisi lipid, terbentuk fosfolipid *bilayer* disebabkan adanya ketidakstabilan termodinamik saat molekul hidrofobik terpapar fase air melebur dengan fragmen lain untuk membentuk vesikel lipid. Ketidakstabilan termodinamik pada tepi fragmen fosfolipid *bilayer* menyebabkan lengkungan dan saat fragmen lipid lapis ganda berdekatan akan terbentuk vesikel (Barenholz dan Crommelin, 1994).

Pertama dilakukan orientasi terlebih dahulu terhadap formula, waktu, temperatur, dan kecepatan *rotary evaporator* yang akan digunakan agar didapatkan kondisi optimum yang dibutuhkan pada saat pembuatan lapis tipis maupun proses hidrasi untuk menghasilkan suspensi liposom yang baik. Pada percobaan pendahuluan, liposom dibuat dalam skala kecil tanpa mengandung zat aktif asiatikosid dari ekstrak pegagan yang menghasilkan 10 ml suspensi liposom. Oleh karena itu, belum digunakan alat *rotary evaporator*, tapi dengan *hand shaking* biasa sambil dialiri gas nitrogen. Waktu yang diperlukan untuk optimasi skala kecil adalah *hand shaking* selama 20 menit dengan suhu 40⁰C dan 10 menit sambil dialiri gas nitrogen, sudah dapat membentuk lapisan lipid lapis tipis. Pada formula 1 terbentuk lipid lapis tipis yang keruh dan kurang merata pada dinding labu, formula 2 terbentuk lipid lapis tipis yang agak bening dan kurang merata, formula 3 terbentuk lipid lapis tipis yang jernih, halus, tapi kurang merata,

formula 4 terbentuk lipid lapis tipis yang merata, jernih, dan halus pada dinding labu. Setiap formula di atas setelah didiamkan selama 24 jam kemudian dihidrasi oleh dapar fosfat pH 7,4 yang belum mengandung zat aktif asiatikosid dari ekstrak pegagan pada suhu 60°C. Hasil yang didapat, tidak ada formulasi yang pecah, semua terdispersi merata membentuk suspensi liposom berwarna putih susu.

Setelah berhasil optimasi formula, selanjutnya dilakukan optimasi pembuatan liposom dengan volume sebenarnya, yaitu 50 ml. Kondisi penggunaan alat *rotary evaporator* yang dibutuhkan adalah dengan kecepatan 150 rpm, suhu 60°C, dan waktu 60 menit. Temperatur yang digunakan adalah 60°C karena temperatur tersebut di atas titik leleh lipid.

Pertama dilakukan pembentukan lapisan lipid tipis di sekeliling dinding labu bulat. Fase lipid yang digunakan adalah fosfatidilkolin dan kolesterol dilarutkan bersamaan hingga homogen dengan 20 ml kloroform, sedangkan zat aktif asiatikosid dari ekstrak pegagan karena bersifat hidrofil dilarutkan dalam fase air, yaitu larutan dapar fosfat pH 7,4. Pada pembentukan lapis tipis, dibutuhkan kondisi vakum untuk membantu mempercepat penguapan dan pembentukan lapis tipis, untuk itu diperlukan pompa vakum. Lapis tipis harus terbentuk secara merata, oleh karena itu penting untuk dilakukan kondisi optimum berupa kecepatan *rotary evaporator* yang diperlukan. Oleh karena itu, pada saat awal melakukan proses pembentukan lapis tipis, kecepatan *rotary evaporator* yang digunakan dinaikkan secara bertahap mulai dari 40 rpm, naik ke 60 rpm, 80 rpm, 100 rpm, 125 rpm, hingga akhirnya 150 rpm. Semua itu dilakukan dengan total waktu 60 menit. Penggunaan pompa vakum juga tidak dinyalakan sejak awal pembuatan agar kloroform tidak langsung habis menguap, hanya sesekali divakum seiring dengan naiknya kecepatan rpm *rotary evaporator* sambil disesuaikan dengan lapis tipis yang terbentuk di dinding labu bulat. Awalnya akan terbentuk gumpalan kental lipid di tengah bawah labu bulat, semakin dinaikkan kecepatan rpm nya, lipid akan terbentuk di sekeliling dinding membentuk lapisan tipis semakin ke bagian atas keliling dinding labu menjauhi dasar labu bulat. Hasil tersebut tidak sempurna membentuk lapisan tipis yang kering karena kloroform belum seluruhnya menguap, untuk itu dibantu penguapannya hingga benar-benar kering dengan dialiri gas nitrogen, kemudian disimpan pada kondisi vakum

selama 24 jam untuk mencegah lipid teroksidasi dan menyempurnakan penguapan kloroform, sehingga tidak mengganggu proses hidrasi.

Pada saat proses hidrasi, zat aktif asiatikosid dari ekstrak serbuk kering pegagan terlebih dahulu dilarutkan ke dalam larutan dapar fosfat pH 7,4. Dengan bantuan sonikasi selama 2 jam dengan suhu 25⁰C, dihasilkan larutan yang homogen meskipun ada sedikit pengotor dari ekstrak di dasar wadah yang tidak ikut larut. Pengelupasan lapisan tipis lipid dibantu dengan memasukkan *glass beads* ke dalam labu untuk membantu mengangkat kerak lapisan tipis yang tebal pada dasar tabung, sambil terus diputar di dalam *rotary evaporator* pada kecepatan 60 rpm selama 1 jam pada suhu 60⁰C tanpa divakum, sehingga lapisan tipis bercampur sempurna dengan fase air. Setelah lapis tipis dihidrasi, suspensi liposom divortex selama 15 menit, kemudian disimpan selama 24 jam di dalam lemari pendingin untuk menyempurnakan pembentukan dan menguatkan globul-globul liposom.

Secara fisik, hasil yang terbentuk adalah suspensi berwarna hijau kekuningan dengan bau fosfatidilkolin bercampur bau wangi ekstrak pegagan. Pada formula 4 terlihat suspensi berwarna lebih kekuningan dibanding formula 3, 2, dan 1. Semakin banyak penambahan fosfatidilkolin yang digunakan, warna hijau dari ekstrak pegagan semakin tertutupi dan viskositas dari suspensi lebih meningkat yang terlihat pada proses hidrasi lapis tipis di mana suspensi liposom yang terbentuk lebih kental.

4.4 Pengecilan Ukuran Partikel dan Pemurnian Liposom

Liposom yang telah didiamkan selama 24 jam, dilakukan pengecilan ukuran partikel dan pemurnian liposom. Pengecilan ukuran partikel dilakukan dengan menggunakan alat ultrasonikator, setelah itu dianalisa distribusi ukuran partikelnya dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA). Sedangkan, pemurnian liposom dilakukan dengan metode ultrasentrifugasi karena metode ini sangat efektif dilakukan dengan waktu yang relatif sangat singkat dibandingkan dengan metode dialisis.

Pada percobaan pendahuluan pengecilan ukuran partikel, dilakukan orientasi terhadap dua perlakuan, yaitu sonikasi 20 menit dan sonikasi 120 menit. Secara fisik, tidak ada perubahan antara liposom sebelum dan sesudah disonikasi. Hasil pengukuran distribusi ukuran partikel dengan PSA menunjukkan liposom dengan perbandingan fosfatidilkolin dan kolesterolnya yang lebih besar maka akan semakin kecil distribusi ukuran partikelnya. Liposom yang disonikasi selama 20 menit menghasilkan distribusi ukuran partikel yang lebih baik dari liposom yang disonikasi selama 120 menit, karena terjadi kenaikan distribusi ukuran partikel yang signifikan pada formula 1, 2, dan 3 walaupun terdapat juga penurunan distribusi ukuran partikel pada formula 4, namun sangat tidak signifikan. Oleh karena itu, untuk percobaan selanjutnya, waktu yang dipilih untuk pengecilan ukuran partikel adalah 20 menit. Berdasarkan hasil analisa PSA, besarnya distribusi ukuran partikel liposom berkisar dari 100-500 nm, mengidentifikasi liposom ini termasuk kedalam golongan *multilamellar vesicle* (MLV) liposom berukuran medium (Martin, 1990).

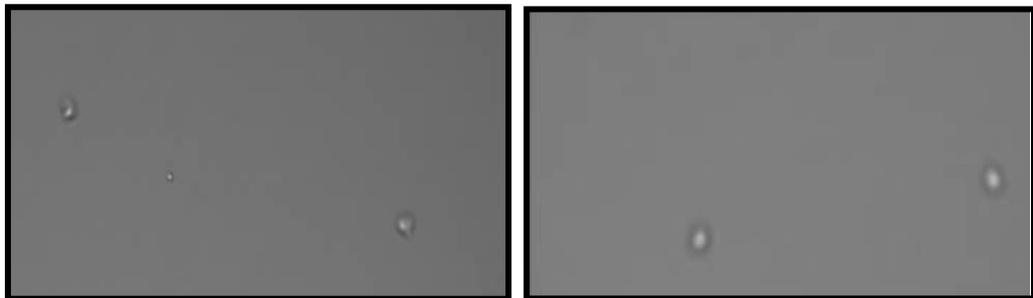
Pemurnian liposom dilakukan dengan metode ultrasentrifugasi untuk menghilangkan molekul zat aktif asiatikosid yang tidak terjerap di dalam vesikel liposom. Melalui gaya sentrifugalnya, mendorong liposom turun ke bawah terkait dengan ukuran partikelnya menjadi bentuk terflokulasi pada dispersinya. Untuk liposom berukuran kecil hingga medium, perlu diperhatikan kondisi pendinginan yang diperlukan dan dibutuhkan kecepatan putaran yang relatif tinggi (Gregoriadis, 1984). Dilakukan percobaan pendahuluan dengan alat ultrasentrifugasi pada 14.000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4⁰C. Namun hasil yang didapatkan adalah tidak adanya pemisahan yang jelas antara supernatan dan presipitat, di mana asiatikosid yang tidak terjerap dalam liposom ada pada bagian supernatan. Oleh karena itu, kecepatan sentrifugasi dinaikkan menjadi 30.000 rpm pada temperatur yang sama 4⁰C dan waktu yang sama selama 30 menit. Pada kondisi inilah, liposom terpisah dengan jelas antara supernatan dan presipitatnya. Hasil supernatan dari keempat formula liposom yang telah disentrifugasi inilah yang disimpan di dalam vial, kemudian dianalisa kadar asiatikosid yang tidak terjerap melalui KLT Densitometri. Didapatlah hasil persentase efisiensi penjerapan dari liposom.

4.5 Evaluasi Liposom

4.5.1 Morfologi

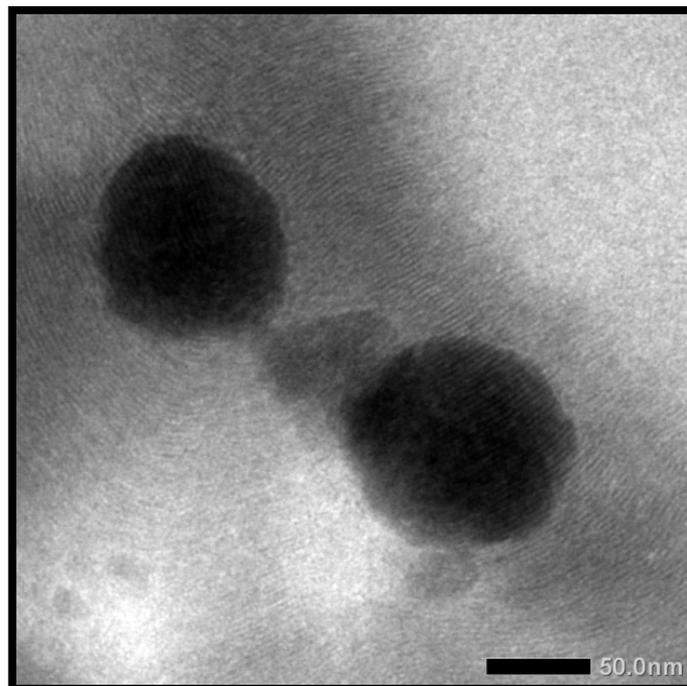
Melalui evaluasi morfologi, dapat terlihat liposom yang terbentuk dengan menggunakan mikroskop konvokal, *Scanning Electron Microscope* (SEM), dan *Transmission Electron Microscope* (TEM). Namun, terdapat kendala yang dihadapi pada evaluasi dengan menggunakan SEM, yaitu kondisi sampel yang diperlukan untuk analisa haruslah berbentuk padatan, sedangkan liposom sampel berupa suspensi cairan. Oleh karena itu, evaluasi morfologi liposom lebih ditekankan melalui TEM dan mikroskop konvokal, namun evaluasi menggunakan SEM tetap dicoba dilakukan dengan cara mengeringkan sampel dengan menggunakan *freeze dry*, yang diharapkan tidak merusak globul liposom karena kondisi pengeringan menggunakan suhu dingin. Hasil evaluasi morfologi SEM tersebut tidak memperlihatkan adanya globul-globul liposom. Hal tersebut disebabkan pecahnya globul liposom karena tekanan vakum pada saat proses pengeringan.

Berdasarkan data hasil SEM tersebut, untuk evaluasi formula selebihnya tidak dilakukan lagi. Melalui evaluasi mikroskop konvokal, diperlihatkan globul-globul liposom, namun tidak dapat memperlihatkan lapisan-lapisan lamellarnya, hanya terlihat bentuk-bentuk bulat dari globul. Contoh gambar hasil pengukuran dengan mikroskop konvokal dapat dilihat pada **Gambar 4.1.** dan **Gambar 4.2.** di bawah ini:

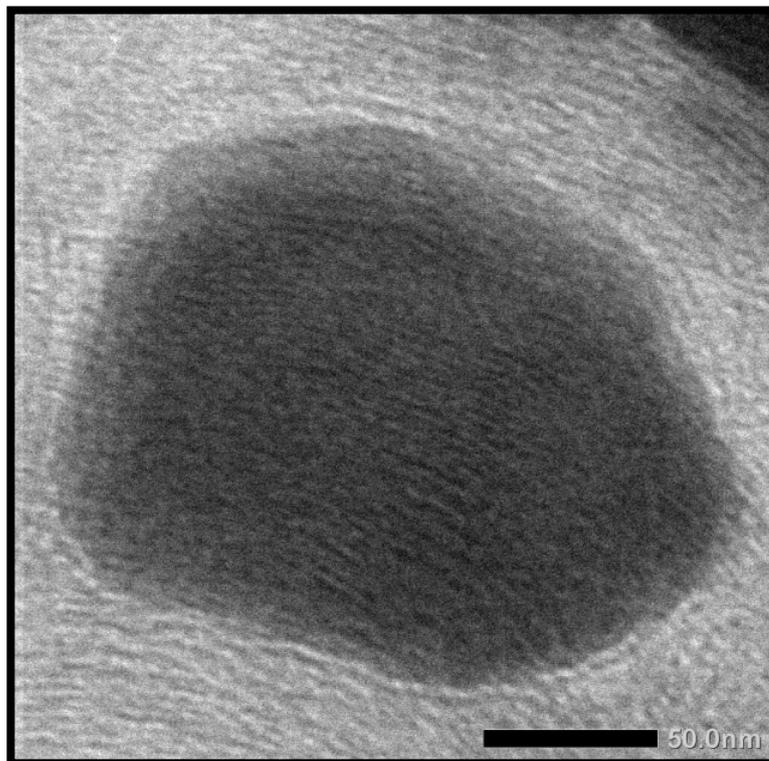


Gambar 4.1. Morfologi liposom formula 4 berbentuk bulat sferis dilihat dari mikroskop konvokal dengan perbesaran maksimum 4000x

Dilihat dari gambar di atas, globul yang terlihat hanya sedikit sekali, hal itu dikarenakan kesensitifitasan mikroskop konvokal untuk mendeteksi molekul di bawah 400 nm sangat kecil. Jadi, yang terlihat di gambar diperkirakan globul dari liposom yang berukuran besar, namun cukup mewakili dari morfologi liposom itu sendiri. Data dari mikroskop konvokal ini cukup mendukung hasil evaluasi morfologi yang didapat dari TEM. Dengan menggunakan TEM yang mempunyai resolusi gambar yang jauh lebih baik sehingga dapat memperlihatkan bentuk lamellar dari liposom. Hasil yang didapatkan ditunjukkan pada gambar di bawah ini.



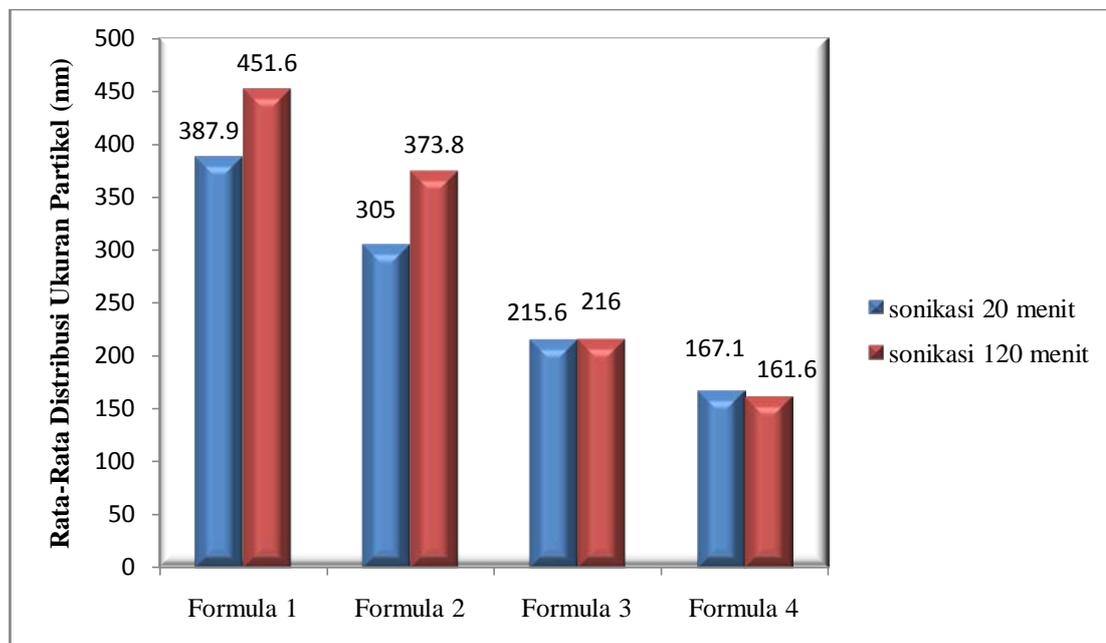
Gambar 4.2. Morfologi liposom formula 4 hasil pengukuran dengan TEM (perbesaran 80000x)



Gambar 4.3. Morfologi liposom formula 4 hasil pengukuran dengan TEM (perbesaran 120000x)

4.5.2 Distribusi Ukuran Partikel

Melalui alat *Particle Size Analyzer* (PSA) Malvern didapatkan hasil pengukuran distribusi ukuran partikel. Dapat dilihat pada grafik di bawah ini:



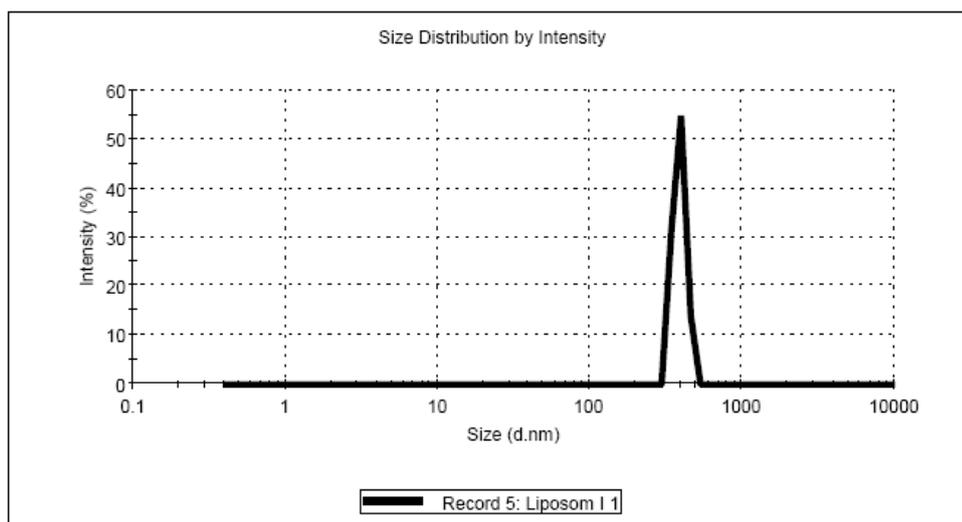
Gambar 4.4. Grafik rata-rata distribusi ukuran partikel liposom hasil pengukuran dengan PSA

Dari grafik di atas dapat dianalisa bahwa rata-rata distribusi ukuran partikel liposom formula 1, 2, 3, dan 4 yang disonikasi 20 menit sebesar 268,9 nm, sedangkan yang disonikasi 120 menit sebesar 300,8 nm. Dengan demikian, adanya penambahan waktu sonikasi hingga 120 menit malah menyebabkan memperbesar ukuran liposom, sedangkan yang diharapkan adalah ukuran yang lebih kecil dibandingkan ukuran liposom yang telah disonikasi selama 20 menit. Hal ini bisa jadi disebabkan karena terjadinya agregasi selama proses ultrasonikasi yang mana pada proses itu timbul panas di sekitar lingkungannya diakibatkan adanya perubahan energi, kemudian globul liposom terflokulasi membentuk gabungan globul yang lebih besar, sehingga terdeteksi pada PSA dengan ukuran yang lebih besar.

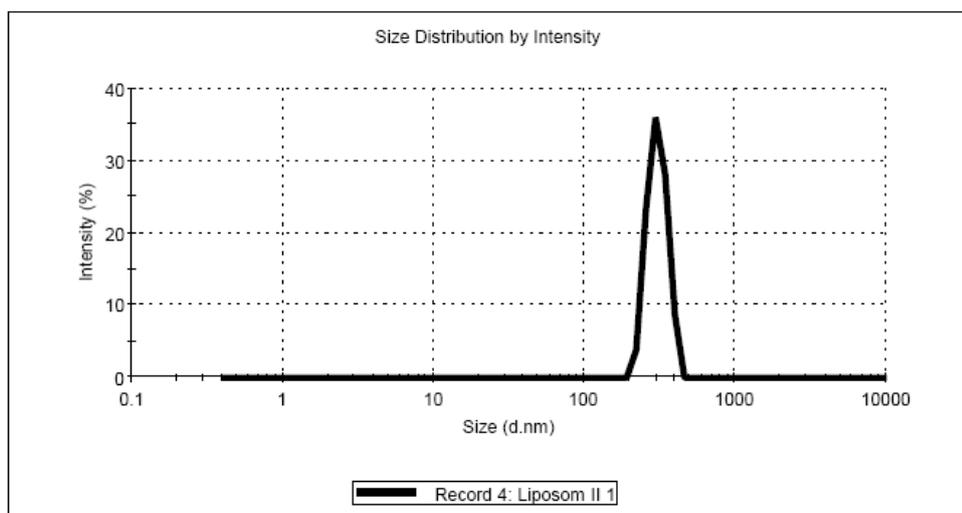
Dari hasil grafik di atas juga dapat dianalisa, semakin besar perbandingan fosfatidilkolin dan kolesterol yang digunakan dalam suatu formula, maka ukuran

partikel liposom yang terbentuk semakin kecil dengan distribusi ukuran partikel yang semakin kecil pula.

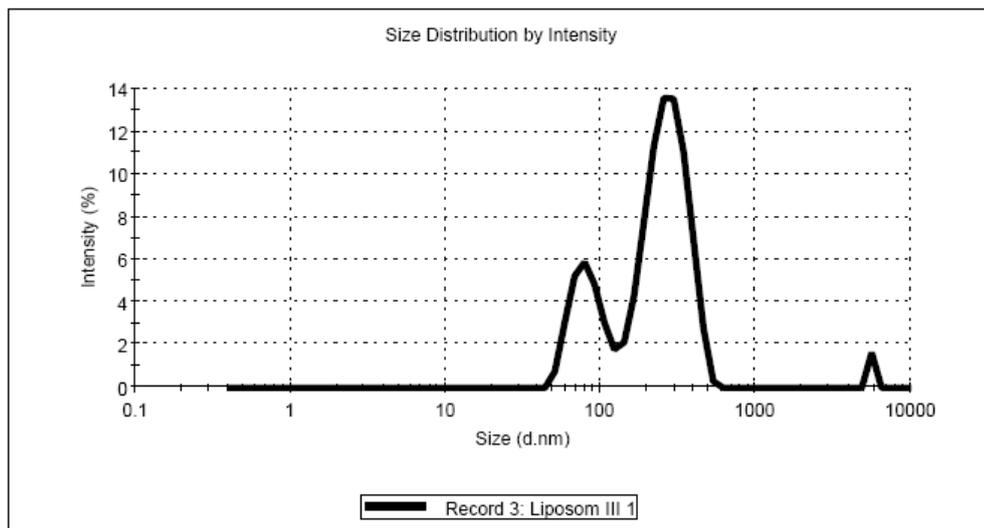
Ditinjau dari keseragaman ukuran partikel, didapat data distribusi ukuran partikel terhadap intensitas yang menunjukkan keseragaman yang tinggi pada liposom yang disonikasi selama 20 menit dibanding dengan yang disonikasi selama 120 menit. Keseragaman distribusi ukuran yang baik ditunjukkan melalui grafik di bawah ini, di mana dari 4 formula, 3 formula di antaranya menunjukkan hanya terdapat 1 *peak* saja yang muncul.



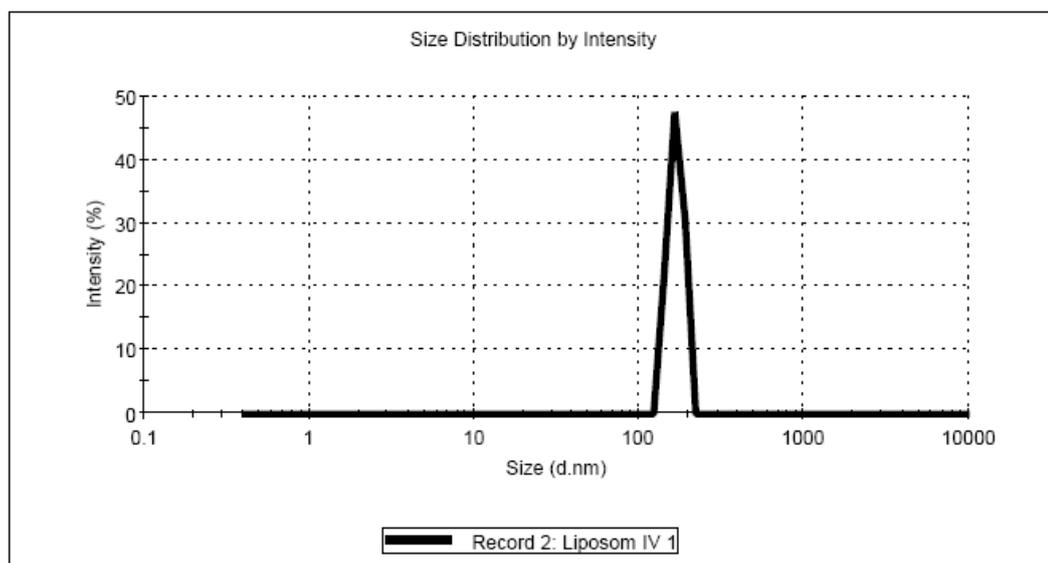
Gambar 4.5. Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 1 hasil pengukuran PSA



Gambar 4.6. Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 2 hasil pengukuran PSA



Gambar 4.7. Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 3 hasil pengukuran PSA

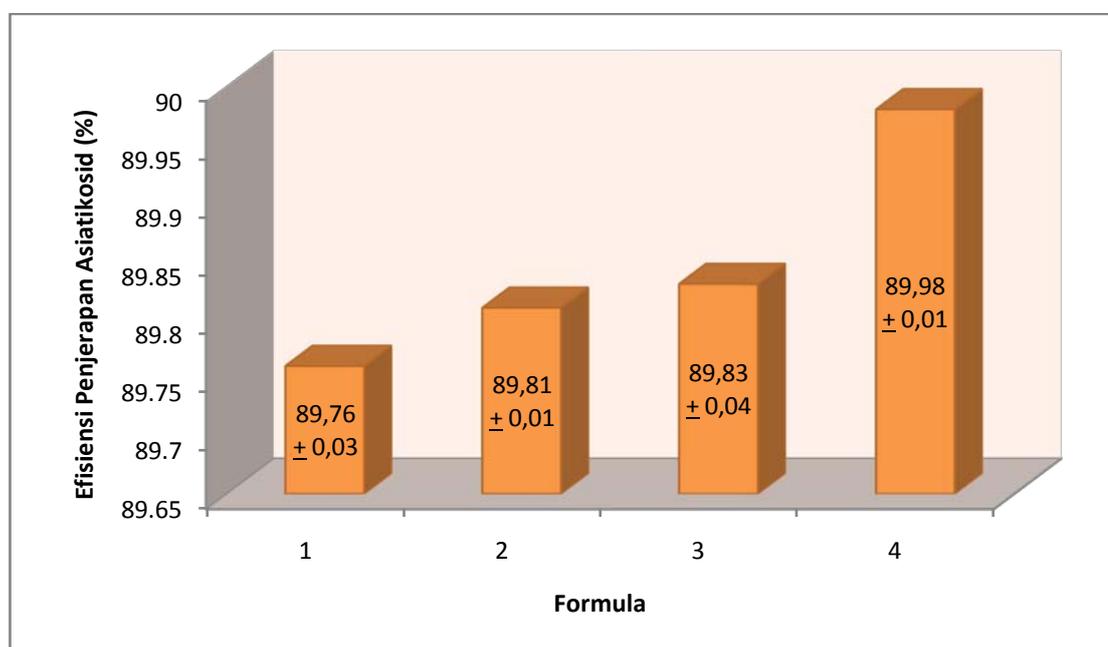


Gambar 4.8. Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 4 hasil pengukuran PSA

4.5.3 Persen Efisiensi Penjerapan Obat oleh Liposom

Persen efisiensi penjerapan dihitung dari hasil analisis konsentrasi supernatan yang terbentuk, di mana konsentrasi asiaticosid terjerap liposom ada pada presipitat. Liposom yang telah diultrasonikasi dan dimurnikan dengan cara ultrasentrifugasi selama 30 menit, diambil supernatannya dengan mikropipet sebesar 5,0 μL , lalu dianalisis kadar asiaticosid yang tidak terikat di dalam liposom pada supernatan dengan menggunakan metode KLT densitometri.

Hasil evaluasi persen penjerapan dapat terlihat pada grafik di bawah ini, menunjukkan terjadinya kenaikan persentase efisiensi penjerapan asiaticosid dalam liposom dari formula 1 hingga formula 4, yaitu $89,76 \pm 0,03\%$; $89,81 \pm 0,01\%$; $89,83 \pm 0,04\%$; $89,98 \pm 0,01\%$, meskipun kenaikannya secara signifikan tidak jauh berbeda.



Gambar 4.9. Diagram persentase efisiensi penjerapan asiaticosid dalam liposom

Kenaikan persentase efisiensi penjerapan asiaticosid dalam liposom sebanding dengan meningkatnya perbandingan jumlah fosfatidilkolin dengan kolesterol pada formula 1 hingga formula 4. Dengan semakin banyaknya jumlah fosfatidilkolin yang ada pada suatu formula, maka akan semakin banyak pula asiaticosid yang terjerap. Dikarenakan asiaticosid dilarutkan bersama dengan fase air, maka asiaticosid akan terjerap berada di tengah-tengah liposom di bagian

hidrofiliknya dikelilingi oleh *lipid bilayer* dari liposom. Walaupun, efisiensi penyerapan secara signifikan tidak jauh berbeda, apabila besarnya persentase efisiensi penyerapan di atas 67% sudah merupakan hasil yang relatif tinggi untuk zat aktif yang berasal dari ekstrak tumbuhan (Kwon, *et al.*, 2011). Dengan jumlah konsentrasi kolesterol yang digunakan pada formula sebanyak 70 mg, bisa saja jumlah ini hampir mendekati konsentrasi optimumnya, karena keberadaan kolesterol dalam liposom akan meningkatkan stabilitas dengan menurunkan mobilitas molekul dan mengurangi permeabilitasnya, sehingga akan meningkatkan rigiditas dinding vesikel pada konsentrasi optimum (Yunianto, 2007). Hal ini pula yang mungkin menyebabkan kenaikan persentase efisiensi penyerapan asiaticosid secara signifikan tidak jauh berbeda. Faktor lain juga dapat disebabkan oleh sifat zat aktif asiaticosid itu sendiri yang hidrofil, pengaruh kejenuhan dari formula, dan pengaruh penghomogenan pada saat proses penghidrasian fase air yang mengandung zat aktif asiaticosid pada fase lipidnya.

4.5.4 Uji Penetrasi secara *In Vitro* Melalui Sel Difusi Franz

4.5.4.1 Uji Perolehan Kembali Asiaticosid

Penetapan kadar asiaticosid dalam liposom ditetapkan secara KLT Densitometri dengan menggunakan pelarut dapar fosfat pH 7,4. Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil kadar yang diperoleh dengan kadar yang sebenarnya. Kriteria cermat diberikan jika hasil analisis memberikan rasio antara 80-120% (Harmita, 2006). Dalam hal ini uji perolehan kembali asiaticosid dapat diketahui melalui persen efisiensi penyerapan pada evaluasi liposom, karena mempunyai prinsip perhitungan yang sama. Kadar perolehan kembali asiaticosid untuk formula 1 sebesar 89,76%; formula 2 sebesar 89,81%; formula 3 sebesar 89,83%; dan formula 4 sebesar 89,98%. Berdasarkan hasil tersebut, keempat formula memenuhi persyaratan yang dinyatakan dalam spesifikasi kecermatan.

4.5.4.2 Uji Penetrasi Asiaticosid

Dalam penelitian ini, dilakukan uji penetrasi secara *in vitro* dengan menggunakan sel difusi Franz. Pengujian dilakukan untuk mengetahui jumlah

asiatikosid yang dapat berpenetrasi melalui kulit selama interval waktu tertentu dari sediaan liposom.

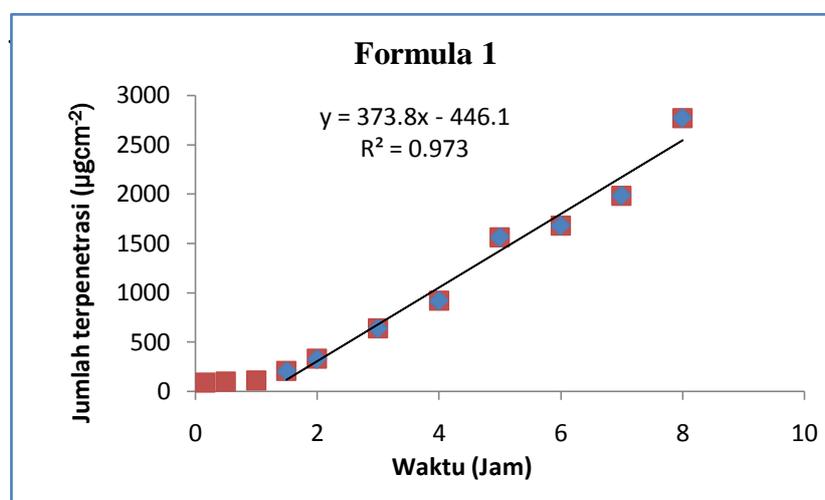
Membran yang digunakan yaitu kulit bagian abdomen tikus betina dari galur *Sprague-Dawley* yang berumur 2 - 3 bulan dengan berat $\pm 180 - 200$ gram dengan ketebalan membran $0,6 \pm 0,1$ mm dan luas membran $2,0117 \text{ cm}^2$. Alasan penggunaan kulit tikus sebagai membran karena cukup mudah diperoleh dan telah dilaporkan bahwa permeabilitas kulit tikus yang telah dicukur bulunya mirip dengan permeabilitas kulit manusia.

Kulit tikus dicukur terlebih dahulu secara hati-hati, kemudian dihilangkan lemak subkutan yang masih terdapat pada kulit, dimaksudkan agar tidak mengganggu uji penetrasi asiatikosid melalui kulit. Setelah itu, kulit dimasukkan ke dalam medium larutan reseptor yaitu dapar fosfat pH 7,4 untuk proses hidrasi yang bertujuan untuk mengembalikan kulit ke kondisi semula sebelum disimpan dalam lemari pendingin sampai sebelum digunakan. Dapar fosfat pH 7,4 dipilih sebagai cairan reseptor karena simulasi kondisi pH cairan biologis manusia yaitu pH 7,4, selain itu asiatikosid dapat larut dalam dapar fosfat pH 7,4 dan juga merupakan media yang digunakan dalam pembuatan liposom pada bagian fase airnya. Membran diletakkan diantara kompartemen reseptor dan donor, dimana membran harus kontak dengan cairan reseptor agar sediaan yang diaplikasikan pada membran dapat berpenetrasi menembus kulit menuju cairan reseptor. Pengadukan pada kompartemen reseptor berfungsi untuk homogenisasi yang dapat mempercepat proses pelarutan zat yang terpenetrasi. Pengadukan tersebut dilakukan dengan menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan 300 rpm. Selama proses berlangsung, suhu dijaga dengan menggunakan mantel air pada $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ yang menggambarkan suhu tubuh manusia dengan menggunakan air yang mengalir keluar dari termostat.

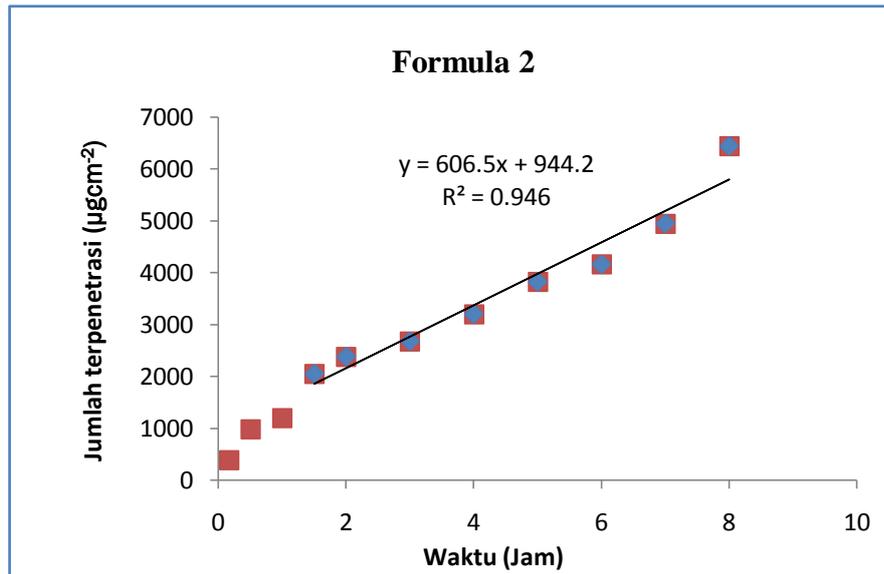
Pengujian dilakukan selama 8 jam dan pengambilan sampel dilakukan sebanyak 11 kali yaitu pada menit ke-10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, dan 480. Sampel setiap kali diambil sebanyak 0,5 mL disimpan di dalam vial-vial kecil untuk selanjutnya dianalisis konsentrasi asiatikosid dengan metode KLT Densitometri. Larutan kompartemen reseptor diganti kembali dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 sejumlah volume yang sama setiap kali dilakukan

pengambilan sampel yang bertujuan untuk menjaga volume cairan reseptor tetap konstan selama percobaan. Untuk setiap formula, uji penetrasi dilakukan sebanyak tiga kali.

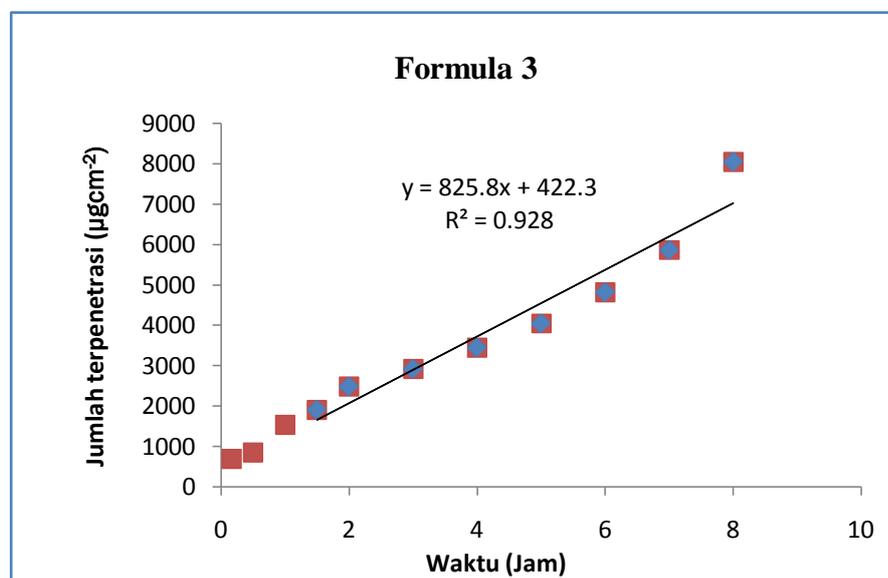
Penetrasi asiatikosid melalui membran kulit tikus selama 8 jam dari liposom formula 1, 2, 3, dan 4 berturut-turut adalah $2768,72 \pm 1046,70$; $6442,74 \pm 309,34$; $8048,17 \pm 3100,18$; dan $13821,33 \pm 4067,74 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dengan persentase jumlah kumulatif asiatikosid yang terpenetrasi pada liposom formula 1, 2, 3, dan 4 berturut-turut adalah $10,88 \pm 3,66 \%$; $24,30 \pm 3,69 \%$; $31,94 \pm 6,05 \%$; dan $55,61 \pm 16,37 \%$. Berdasarkan hasil tersebut, jumlah asiatikosid yang terpenetrasi terbanyak yaitu pada liposom formula 4. Kemudian fluks diperoleh pada keadaan *steady state* dengan mengikuti kaidah hukum Fick. Hukum Fick pertama memberikan aliran (laju difusi melalui satuan luas) dalam aliran pada keadaan *steady state* (Martin dan Cammarata, 1983). Jumlah kumulatif obat terpenetrasi melalui membran kulit tikus diplotkan terhadap waktu dan dibuat persamaan regresi linier sehingga dapat ditentukan nilai fluks asiatikosid (dapat dilihat pada **Gambar 4.10** hingga **Gambar 4.13**). Fluks ditentukan dari kemiringan grafik tersebut pada keadaan *steady state*. Kondisi *steady state* terlihat sebagai suatu garis mendatar pada kurva fluks yang diplotkan terhadap satuan waktu. Berdasarkan grafik tersebut dapat dibandingkan formula yang terbaik berdasarkan nilai fluks yang diperoleh.



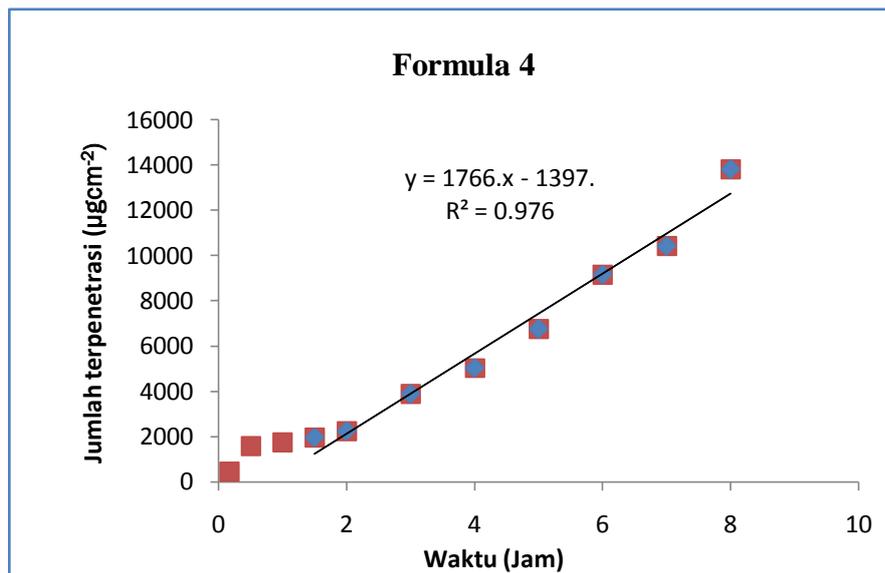
Gambar 4.10. Jumlah kumulatif asiatikosid yang terpenetrasi per satuan luas membran dari liposom formula 1



Gambar 4.11. Jumlah kumulatif asiatikosid yang terpenetrasi per satuan luas membran dari liposom formula 2

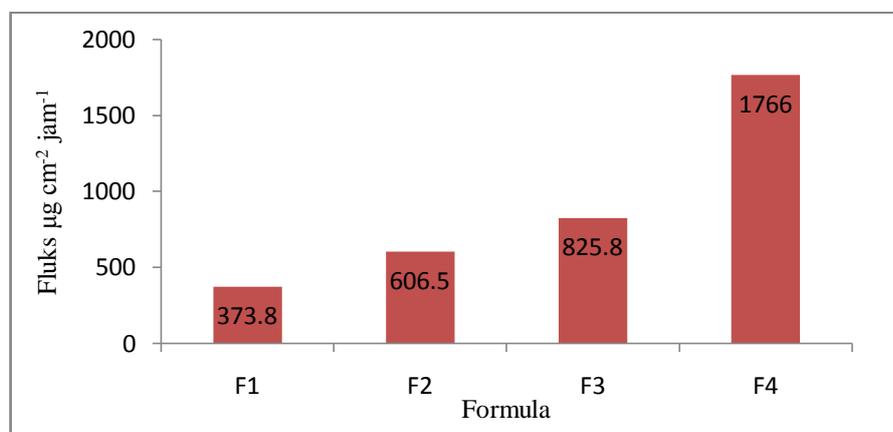


Gambar 4.12. Jumlah kumulatif asiatikosid yang terpenetrasi per satuan luas membran dari liposom formula 3



Gambar 4.13. Jumlah kumulatif asiaticosid yang terpenetrasi per satuan luas membran dari liposom formula 4

Bila dilihat dari grafik, formula liposom belum mencapai kondisi *steady state* selama 8 jam, hal ini mungkin dikarenakan oleh sifat struktural dan elektrik yang terkandung pada nanopartikel tersebut yang meningkatkan laju permeasinya (Kwon, *et al.*, 2011). Dari persamaan regresi linear yang didapat dari grafik, nilai fluks asiaticosid formula 1, 2, 3, dan 4 berturut-turut adalah 373,8; 606,5; 825,8; dan 1766,0 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$. Formula 4 memiliki nilai fluks yang tertinggi yang mengandung pengertian bahwa formula tersebut memiliki kecepatan penetrasi obat yang paling tinggi.



Gambar 4.14. Fluks asiaticosid dari liposom formula 1, 2, 3, dan 4

Salah satu faktor yang mempengaruhi penetrasi melalui membran adalah bahan-bahan yang digunakan dan pelepasan obat dari pembawa. Jumlah terpenetrasi tertinggi dicapai pada formula 4 yang mempunyai jumlah perbandingan fosfatidilkolin dan kolesterol sebesar 10 banding 1. Hal ini dikaitkan dengan kekuatan liposom dalam menjerap zat aktif. Kekuatan tersebut salah satunya dipengaruhi oleh sifat zat aktif yang bersifat hidrofil, di mana asiatikosid terjerap di tengah-tengah lipid *bilayer* liposom. Jumlah terpenetrasi tertinggi kedua dicapai pada formula 3 diikuti formula 2 dan 1. Selain itu, faktor yang mempengaruhi penetrasi lainnya yaitu besarnya distribusi ukuran partikel. Semakin nanopartikel, maka penetrasi akan semakin mudah melewati pori-pori kulit. Bila dibandingkan dengan jumlah penetrasi asiatikosid yang masih dalam bentuk ekstrak kasar pegagan, ditunjukkan bahkan setelah 24 jam pengaplikasian sampel di atas kulit tikus pun belum dapat menembus lapisan epidermis, sedangkan ekstrak pegagan di dalam pembawa liposom sudah terpenetrasi 80%, tentunya hal ini bermanfaat dalam meningkatkan efikasi (Win dan Feng, 2005).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Formulasi liposom berhasil membentuk suatu sistem penghantaran obat nanopartikel dengan ukuran berkisar antara 100-500 nm, diperlihatkan dari hasil pengukuran melalui mikroskop konvokal, *Particle Size Analyzer* (PSA) dan *Transmission Electron Microscope* (TEM). Penambahan fosfatidilkolin dapat meningkatkan efisiensi penjerapan terhadap zat aktif asiatikosid, memperkecil distribusi ukuran partikel, dan meningkatkan jumlah kumulatif, fluks, serta persentase jumlah asiatikosid yang terpenetrasi berdasarkan uji penetrasi *in vitro* selama 8 jam dari liposom formula 1, 2, 3, dan 4.

5.2 Saran

1. Dilakukan pemurnian ekstrak asiatikoasid dengan lebih terperinci agar didapatkan hasil pemurnian yang lebih tinggi lagi.
2. Analisis kuantitatif dipilih metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) agar tingkat keakuratan lebih tinggi lagi.
3. Perlu dilakukan perbaikan formula pada penelitian selanjutnya untuk mendapatkan persentase penjerapan yang lebih tinggi lagi di atas 90%.
4. Analisis sisa kloroform tidak hanya dilakukan secara kualitatif tapi juga secara kuantitatif dengan menggunakan kromatografi gas (GC-MS).

DAFTAR ACUAN

- American Botanical Council. (1996). *Natural Medicine*. Vol. 3. No. 6, 22-25.
- American Pharmaceutical Association. (1994). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2nd ed.). London: Pharmaceutical Press.
- Anggraeni, C. A. (2007). *Pengaruh Bentuk Sediaan Krim, Gel, dan Salep Terhadap Penetrasi Aminofilin sebagai Antiselulit Secara In Vitro Menggunakan Sel Difusi Franz*. Skripsi Sarjana Farmasi. Depok: FMIPA UI.
- Avanti Polar Lipids. *Formulation*. Januari 24, 2012. <http://www.avantilipids.com/Preparationofliposomes2Big.html>
- Awang, D. V. (2009). *Tyler's Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals* (3rd ed.). New York: Taylor dan Francais Group, LLC.
- Barenholz, Y., dan Crommelin, D. J. (1994). Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms. Dalam J. Swarbrick, dan J. C. Boyland, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Third ed., Vol. 9, 1-39). New York: Marcel Dekker.
- Benita, S. (1996). *Microencapsulation Methods and Industrial Application*. New York: Marcel Dekker.
- Betz, G., Aeppli, A., Menshutina, N., dan Leuenberger, H. (2005). In vivo Comparison of Various Liposome Formulations for Cosmetic Application. *Int. J. Pharm.*, 296, 44-54.
- Biju, S.S., Talegaonkar, S., Mishra, P.R., dan Khar, R.K. (2006). Vesicular Systems: An Overview. *Indian J. Pharm. Sci.*, 142-144.
- Boyland, J.C., dan Swarbick, J. (1994). Liposome as Pharmaceutical Dosage Form to Microencapsulation. Dalam *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Vol.9, 1-30).New York: Marcel Dekker.
- Brandl, M.M., Bachmann, D., dan Drechsler,M. (1993). Liposome Preparation Using High-pressure Homogenizers. Dalam Gregoriadis, G, *Liposom Technology* (2nd ed., 49-65). Boca Raton: CRC.

- Chen, J., et al. (2006). Liposomes Containing Asiatikosid and The Uses Thereof. *United States Patent Application Publication*. US 2006/0210619 A1.
- Cicatrix. *Crema Para Cicatrices Scar Cream, Directions for Use*. Februari 06, 2012. www.cicatrix.us/en/modo_empleo_cicatrix.htm.
- Crandal, W. T. (2005). *Method For Topical Treatment of Carpal Tunel Syndrome*. United States of America.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1977). *Materia Medika Indonesia Jilid 1*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia.(1979). *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia Volume 1*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI - Direktorat Jendral Badan POM RI.
- Bonte, F., M. Dumas, C. Chaudagne, dan A. Meybeck. (1994). Influence of Asam asiatik, Asam madekassik, and Asiatikosid on Human Collagen I Synthesis. *Planta Med.*, 60, 133–135.
- Fang, Jia-You, et al. (2005). Enhancement of The Transdermal Delivery of Catechins by Liposomes Incorporating Anionic Surfactants and Ethanol. *Int. J. Pharm.*, 310, 131-138.
- Gnanapragasam, A., K.K. Ebenezer, V. Sathish, P. Govindaraju, dan T. Devaki. (2004). Protective Effect of *Centella asiatica* on Antioxidant Tissue Defense System Against Adriamycin Induced Cardiomyopathy in Rats. *Life Sci.*, 76, 585–597.
- Ganesan, M.G., Weiner, N.D., dan Flynn, G.L. (1984). Influence of Liposomal Drug Entrapment on Precutaneous Absorption. *Int. J. Pharm.*, 20, 139-154.
- GEA Process Engineering. (2012). *Liposome Homegenization*. Januari 24, 2012. http://www.niroinc.com/gea_liquid_processing/homogenization_liposomes.asp
- Gregoriadis, Gregory. (1984). *Liposom Technology Volume I, Preparation of Liposomes*. Florida: CRC Press.

- Gupta, Y.K., Kumar, M.H., dan Srivastava, A.K. (2003). Effect of *Centella asiatica* on Pentylentetrazole-induced Kindling, Cognition and Oxidative Stress. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 74, 579-584.
- Hamid, A.A., Shah, Z.M., dan Muse, R. (2002). Characterisation of Antioxidative Activities of Various Extracts of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chem*, 77, 465-469.
- Harmita. (2006). *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Honeywell-Nguyen, P.L., de Graaf, A.M., dan Groenink, H.W.W. (2002). The in vivo and in vitro Interactions of Elastic and Rigid Vesicles with Human Skin. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 130-140.
- Inui, Y., Matsuda, H., Ueda, Y., Yamamouchi, K., dan Hirma, M. (1991). *Patent No. 90119235.1*. Osaka.
- Iswandana, Raditya. (2009). Penetapan Daya Penetrasi Secara In Vitro dan Uji Stabilitas Fisik Sediaan Krim, Salep, dan Gel yang Mengandung Kurkumin dari Kunyit (*Curcuma longa* L.). *Skripsi Sarjana Farmasi*. Depok: FMIPA UI.
- James, J., dan Dubery, I. (2011). Identification and Quantification of Triterpenoid Centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by Densitometric TLC. *Journal of Planar Chromatography*, 24, 1, 82-87.
- Karina, Y.D. (2009). Formulasi Lipstik Menggunakan Liposom Magnesium Askorbil Fosfat dengan Metode *Reverse Phase Evaporation*. *Skripsi Sarjana Farmasi*. Depok: FMIPA UI.
- Kirby, C. dan Gregoriadis, G. (1984). Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Entrapment in Liposome. *Biotechnology*, 979-984.
- Kurkani, S.B., Singh, M., dan Betagent, G.V. (1997). Encapsulation, Stabilizing and in vivo Release Characteristic of Liposome form of Colchines. *J. Pharmacol.*, 49, 491-495.

- Kwon, M.C., Choi, W.Y., Seo, Y.C., Kim, J.S., Yoon, C.S., dan Lim, H.W. (2011). Enhancement of The Skin-Protective Activities of *Centella asiatica* L. Urban by a Nano-encapsulation Process. *Journal of Biotechnology*, 157, 100-106.
- Lasmadiwati, E., M.M. Herminati, dan Y.H. Indriani. (2003). *Pegagan: Penebar Swadaya*. Jakarta.
- Leung A.Y., dan Foster, S. (1998). *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics* (2nd ed.). New York: John Wiley dan Son.
- Liu, M., Y. Dai, X. Yao, Y. Li, Y. Luo, Y. Xia, dan Z. Gong. (2008). Anti-rheumatoid Arthritic Effect of Madekassosid on Type II Collagen-induced Arthritis in Mice. *Int. Immunopharm*, 8, 1561–1566.
- Maquart F.X., et al. (1990). *Stimulation of Collagen Synthesis in Fibroblast Cultures by a Triterpene Extracted from Centella asiatica*, *Connect Tissue Res.*, 24, 107-120.
- Martin, F.J. (1990). Pharmaceuticals Manufacturing of Liposomes. Dalam P. Tyle, *Specialized Drug Delivery Systems Manufacturing and Production Technology*. New York: Marcel Dekker. 278-294.
- Martin, A., Swarbick J., dan Cammarata, A. (1983). *Farmasi Fisik*. Jilid II edisi ketiga (Joshita, Penerjemah). Jakarta: UI Press.
- Mitsui, Takeo. (1993). *New Cosmetic Science*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Natural Remedies. (2001). *Master Document Centella asiatica*. Bangalore: Quality Control Department of Natural Remedies Private Limited.
- PermeGear. (2005). *Franz Cell*. Februari 08, 2012. <http://www.permegear.com/Franz.htm>.
- Poedjiadi, Anna. (1994). *Dasar-Dasar Biokimia*. Depok: Penerbit Universitas Indonesia.
- Quality Control Departement. (2001). *Master Document Centella asiatica*. Bangalore: Natural Remedies-Research Center Pvt.

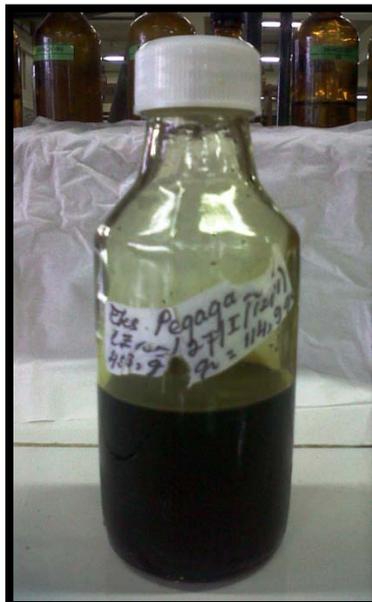
- Ramadhani, Hanifah. (2011). *Pengaruh Penambahan Asam Oleat Terhadap Sensitivitas Liposom Pada Berbagai Kondisi pH dan Penjerapan Spiramisin oleh Liposom*. Skripsi Sarjana Farmasi. Depok: FMIPA UI.
- Riaz, Mohammad. (1996). Liposomes Preparation Methods. *Pakistan J. Pharm. Sci.*, Vol. 19(1), 69.
- Rosen, Meyer R. (2005). *Delivery System Handbook of Personal Care and Cosmetic Products*. USA: William Andrew, 286.
- Schroeder, A., Kost, J., dan Barenholz, Y. (2009). Ultrasound, Liposomes, and Drug Delivery: Principles for Using Ultrasound to Control the Release of Drugs from Liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* , 1-16.
- Sou, K. (2003). Effective Encapsulation of Proteins Into Size-Controlled Phospholipid Vesicles Using The Freeze-Thawing and Extrusion. *Biotechnol Prog* 19, 1547-1552.
- Szoka, Jr.F., dan D. Papahadjopoulos. (1976). Procedure for Preparation of Liposome with Large Internal Aqueous Space and High Capture by Reverse Phase Evaporation. *Proc. Natl. Acad.* 75(9), 4194-4198.
- Touchstone, J. C., dan M. F. Dobbins. (1983). *Practice of Thin Layer Chromatography 2nd Edition*. New York: John Wiley and Sons, 1-15, 171-172, 207, 135-136, 248-271.
- Toutou, E., Dayan, N., dan Bergelson, L. (2000). Ethosomes-novel Vesicular Carriers for Enhanced Delivery: Characterization and Skin Penetration Properties. *J. Control Release* 65, 403-418.
- Tsai, W.C., Li, W.C., Yin, H.Y., Yu, M.C., dan Wen, H.W. (2011). Constructing Liposomal Nanovesicles of Ginseng Extract Against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage to L929 Cells. *Food Chem.*, 132, 744-751.
- Voight, R. (1994). *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi* (Ed. Ke-5). Terjemahan dari *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie* oleh Soendani Noerono Soewandhi. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Wang, B., Siahaan, T., dan Soltero, R.A. (2005). *Drug Delivery Principles and Applications*. New Jersey: John Wiley dan Sons.

- Williams, R. O., dan Vaughn, J. M. (2007). Nanoparticle Engineering. Dalam J. Swarbrick, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Informa Health Care USA, 2393-2397.
- Win, K.Y., dan Feng, S.S. (2005). Effects of Particle Size and Surface Coating on Cellular Uptake of Polymeric Nanoparticles for Oral Delivery of Anticancer Drugs. *Biomaterials* 26, 2713-2722.
- Windholz, Martha. (1976). *The Merck Index – An Encyclopedia of Chemical and Drugs: Phospholipid and arteriosclerosis* (9th ed.). USA: Merck & Co.
- Witt, Krista, dan D. Bucks. (2003). Studying In Vitro Skin Penetration and Drug Release to Optimize Dermatological Formulations. Dalam *Pharmaceutical Technology*. New York: Anvanstar Communication.
- Wu, R.Y., Chung, Y.S., dan Siu, M.L. (2009). Process for The Preparation of Plant Extracts for Treating Skin Disorders and Enhancing Healing of Wounds. *United States Patent Application Publication*, US2009/0060985 A1.
- Wu, J., Zhao, X., dan Lee, R.J. (2007). Lipid-based Nanoparticulate Drug Delivery Systems. Dalam e. Deepak Thassu, *Nanoparticulate Drug Delivery Systems* (Vol. 166, hal. 89-92). New York: Informa Health Care USA.
- Yang, X., Lee, H.Y., You, S.G., dan Kim, J.C. (2009). pH and Temperature Dependent Release from Cationic Vesicles Coexisting with Copolymer of N-isopropylacrylamide and Methacrylic Acid. *Colloids Surf A: Physicochem. Eng. Asp.*, 348, 109-115.
- Yunianto, E. P. (2007). *Formulasi Liposom Curcumin Menggunakan Metode Hidrasi Lapis Tipis*. Skripsi Sarjana Farmasi. Depok: FMIPA.

GAMBAR



Gambar 4.15. Tanaman Pegagan dengan nama latin *Centella asiatica* (L.) Urban yang diambil dari BALITTRO Bogor



Gambar 4.16. Ekstrak kental *Centella asiatica* (L.) Urban dari maserasi dengan pelarut etanol 70%



Gambar 4.17. Ekstrak serbuk kering *Centella asiatica* (L.) Urban yang telah dipartisi dengan pelarut n-heksan dan diklormetan



Gambar 4.18. Alat *Rotary Evaporator Vacuum* Hahn Shin



Keterangan: (a) formula 1, (b) formula 2, (c) formula 3, (d) formula 4

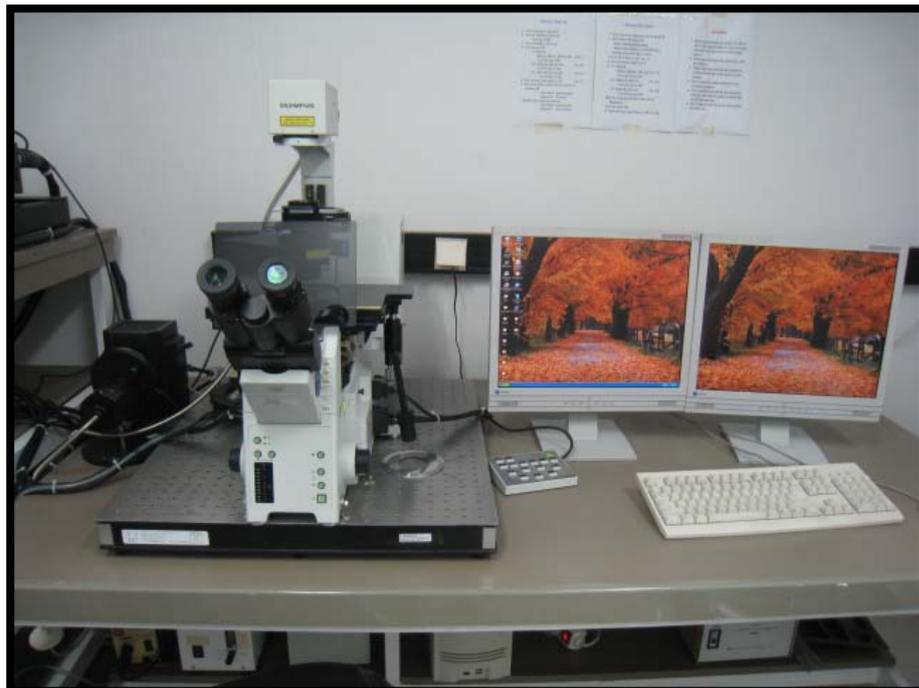
Gambar 4.19. Hasil pembuatan suspensi liposom



Gambar 4.20. Alat KLT Densitometri (*TLC Scanner Camag*)



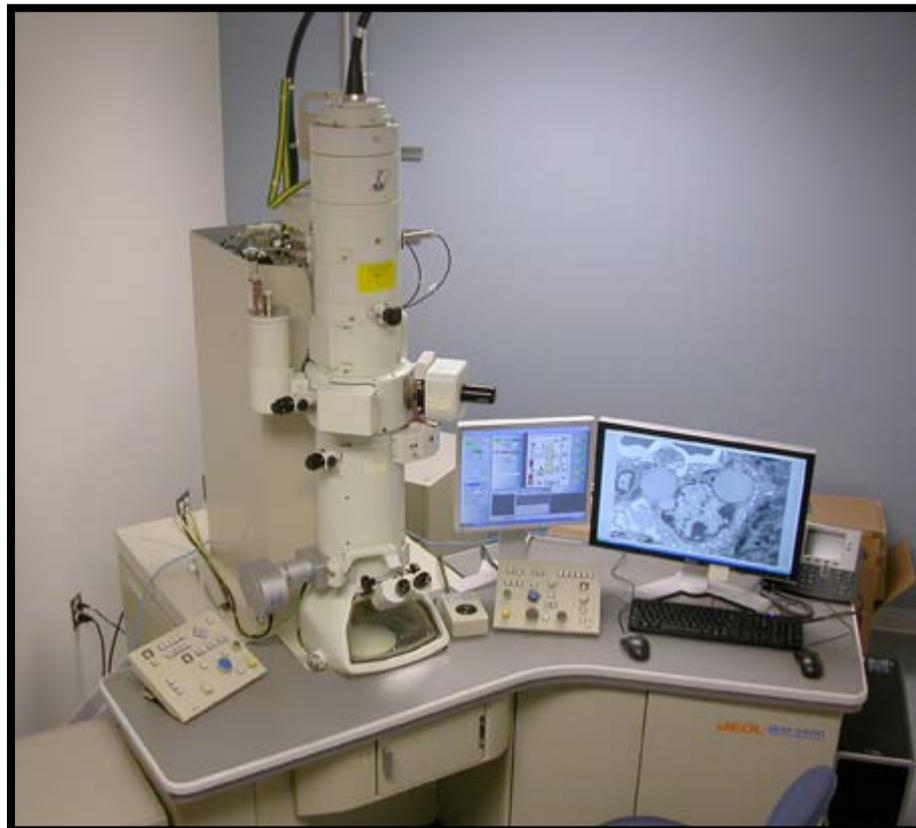
Gambar 4.21. Alat ultrasonikasi Branson



Gambar 4.22. Alat mikroskop konvokal (*Convocal Laser Scanning Biological Microscope*)



Gambar 4.23. Alat *Particle Size Analyzer* (PSA) Malvern Zetasizer Ver. 6.20



Gambar 4.24. Alat *Transmission Electron Microscope* (TEM) Jeol Jem 1400

Size Distribution Report by Intensity

v2.1



Sample Details

Sample Name: Liposom I 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: Dian r. b.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 5	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Thursday, March 29, 2012 ...

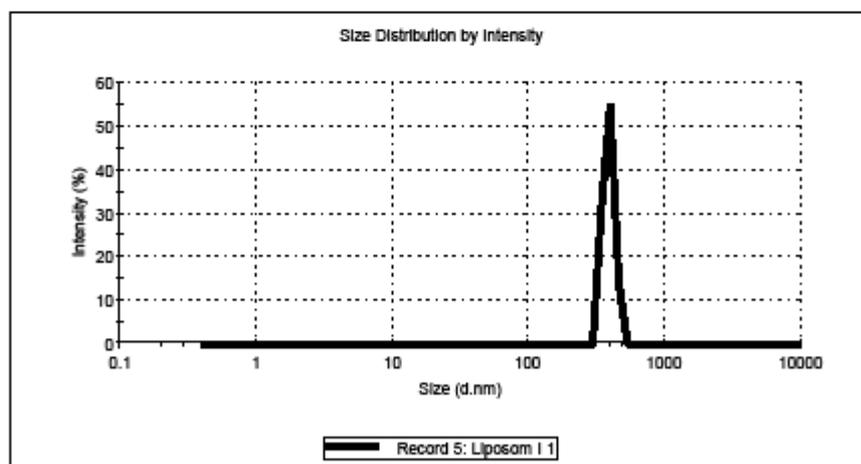
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 388.2	Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 8

Results

	Size (d.nm...)	% Intensity	Width (d.n...
Z-Average (d.nm): 1188	Peak 1: 387.9	100.0	37.34
Pdl: 0.437	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.938	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality **Refer to quality report**



Gambar 4.25. Hasil *Particle Size Analyzer* (PSA) liposom formula 1 setelah disonikasi selama 20 menit

Size Distribution Report by Intensity

v2.1



Sample Details

Sample Name: Liposom II 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: Dian r. b.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 4	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Thursday, March 29, 2012 ...

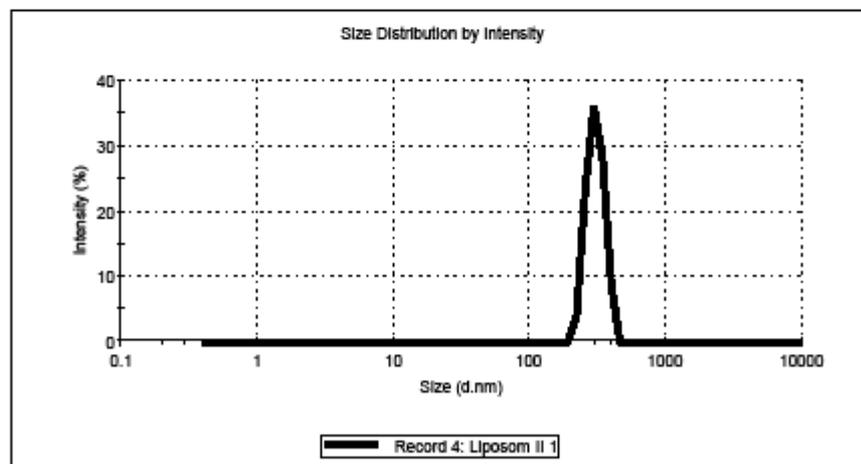
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 419.0	Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 8

Results

	Size (d.nm)	% Intensity	Width (d.nm)
Z-Average (d.nm): 501.9	Peak 1: 305.0	100.0	44.83
Pdl: 0.428	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.928	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality **Refer to quality report**



Gambar 4.26. Hasil *Particle Size Analyzer* (PSA) liposom formula 2 setelah disonikasi selama 20 menit

Size Distribution Report by Intensity

v2.1



Sample Details

Sample Name: Liposom III 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: Dian r. b.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 3	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbion: 0.01	Measurement Date and Time: Thursday, March 29, 2012 ...

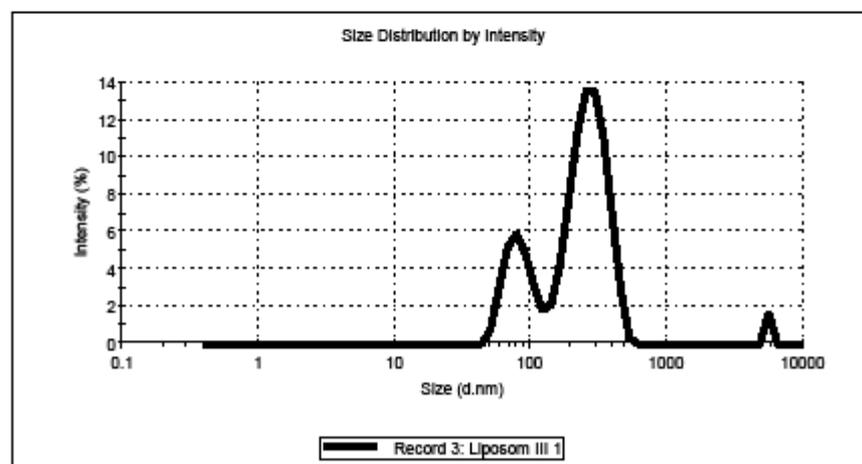
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 482.3	Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 8

Results

	Size (d.nm)	% Intensity	Width (d.nm)
Z-Average (d.nm): 215.6	Peak 1: 273.2	74.2	81.40
PdI: 0.571	Peak 2: 82.13	24.2	18.63
Intercept: 0.927	Peak 3: 5580	1.6	8.104e-5

Result quality **Good**



Gambar 4.27. Hasil *Particle Size Analyzer* (PSA) liposom formula 3 setelah disonikasi selama 20 menit

Size Distribution Report by Intensity

v2.1



Sample Details

Sample Name: Liposom IV 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: Dian r. b.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 2	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.50	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Thursday, March 29, 2012 ...

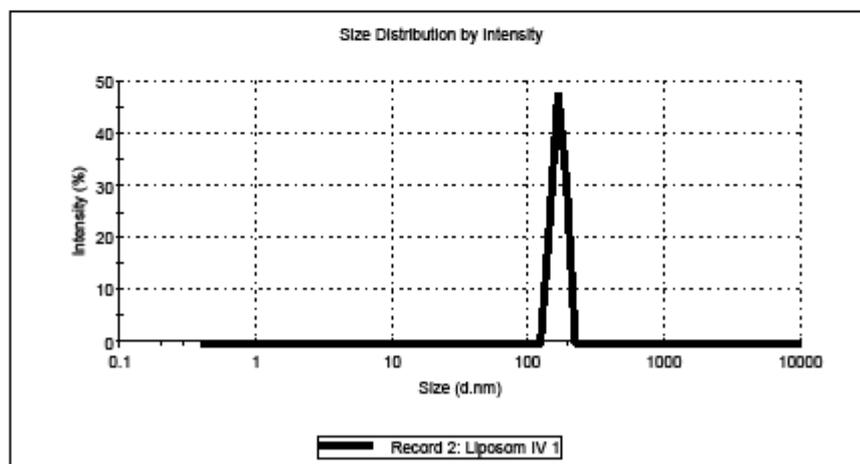
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 277.3	Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 8

Results

	Size (d.nm...)	% Intensity	Width (d.n...
Z-Average (d.nm): 1081	Peak 1: 167.1	100.0	17.52
Pdl: 0.848	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.898	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality **Refer to quality report**



Gambar 4.28. Hasil *Particle Size Analyzer* (PSA) liposom formula 4 setelah disonikasi selama 20 menit



(a)



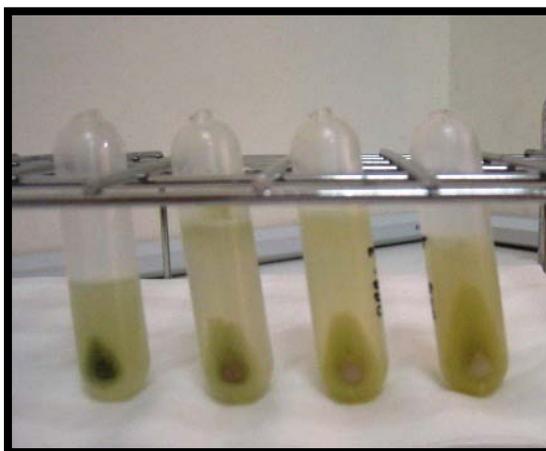
(b)



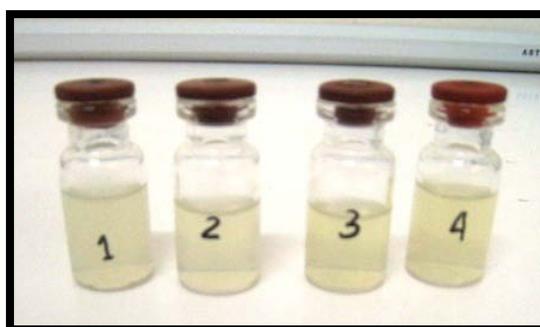
(c)

Keterangan: (a) ultracentrifugator Hitachi, (b) *tube* dan *seal tube*, (c) rotor ultracentrifugator tampak atas *fixed type*

Gambar 4.29. Seperangkat alat ultracentrifugasi



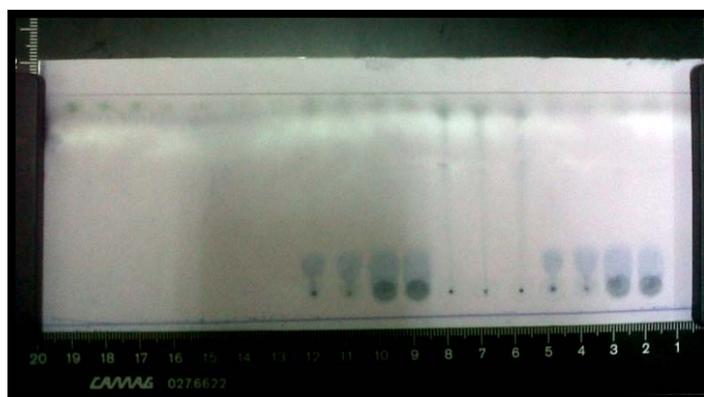
(a)



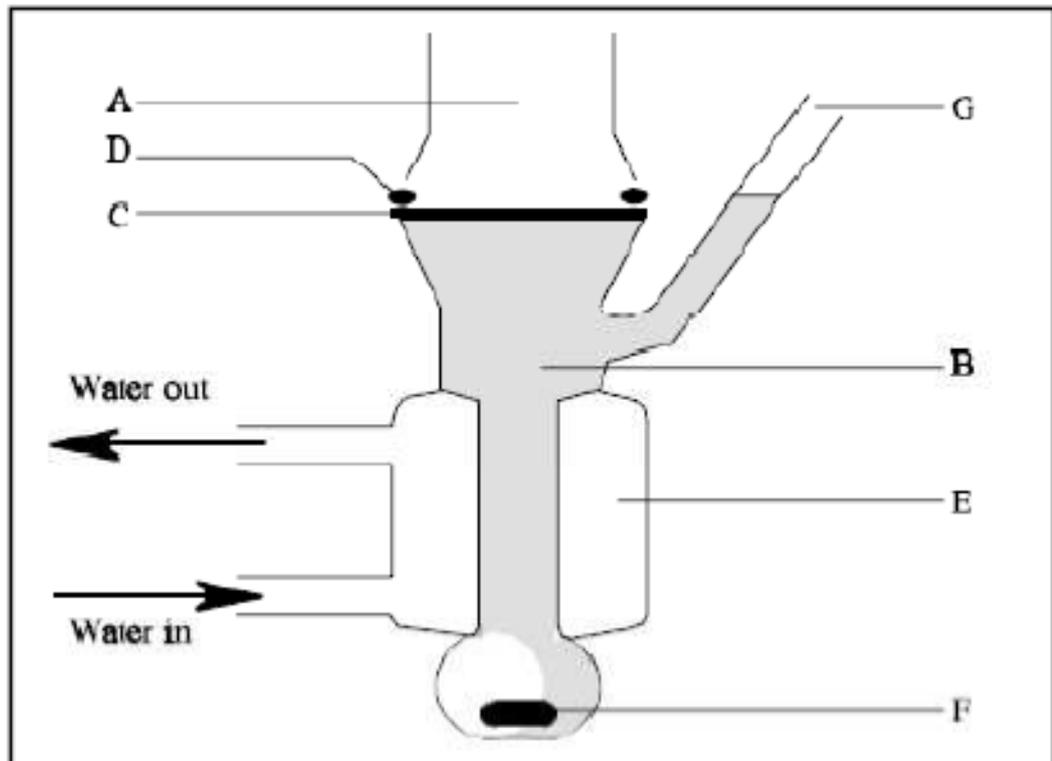
(b)

Keterangan: (a) supernatan dan presipitat yang terbentuk pada pemurnian liposom, dari kiri ke kanan formula 1, formula 2, formula 3, dan formula 4; (b) supernatan yang telah dipisahkan dari presipitat sebanyak 3 ml dimasukkan ke dalam vial untuk dianalisis kuantitatif

Gambar 4.30. Hasil ultrasentrifugasi liposom dengan kecepatan 30.000 rpm selama 30 menit



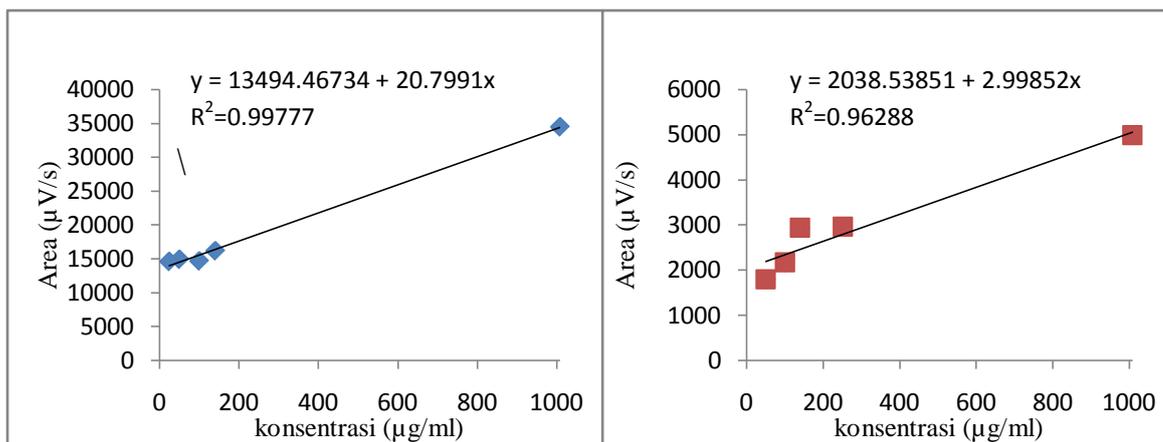
Gambar 4.31. Lempeng yang telah melalui proses KLT sesaat sebelum akan *discan* dengan densitometri



[Sumber : Bosman, Lawant, Avegart, Ensing, dan Zeeuw, 1996, telah diolah kembali]

Keterangan: A: Kompartemen donor, B: Kompartemen reseptor, C: Membran, D: Cincin O, E: Pelapis air, F: Batang pengaduk, G: Tempat pengambilan sampel

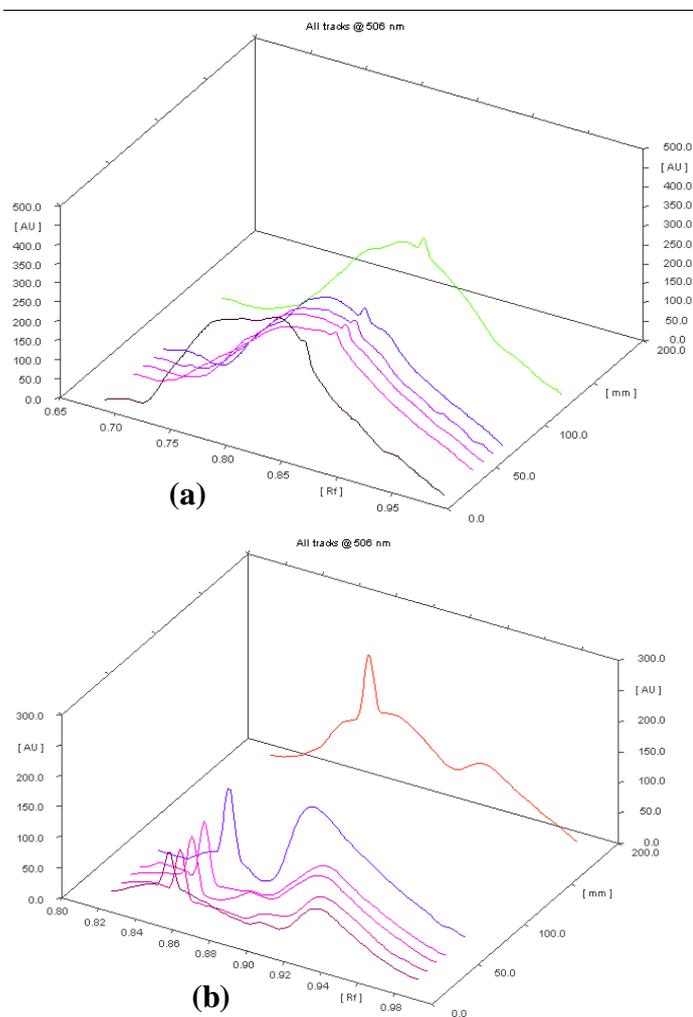
Gambar 4.32. Sel Difusi Franz



(a)

(b)

Keterangan: (a) percobaan pertama, (b) percobaan kedua

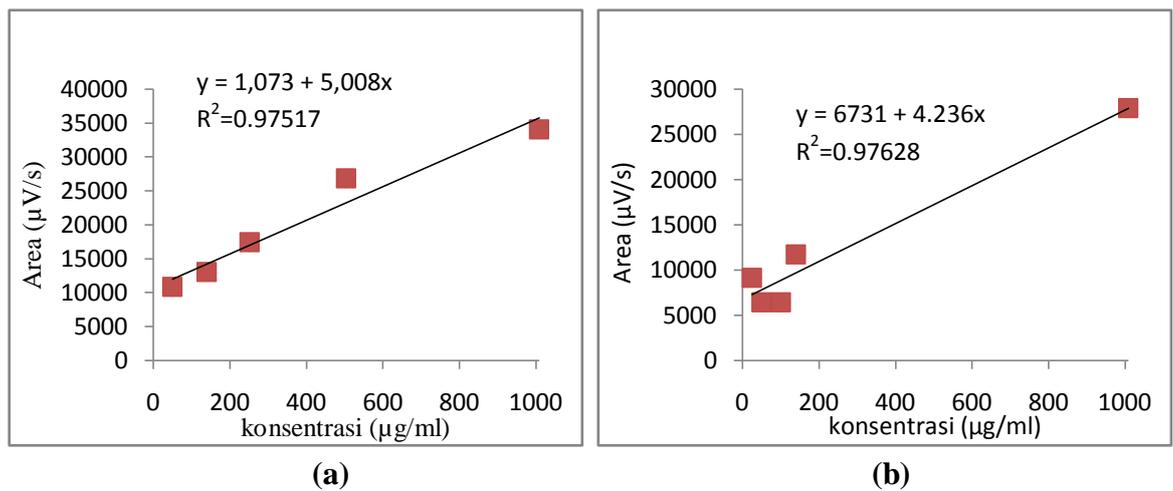
Gambar 4.33. Kurva kalibrasi asiatikosid dalam larutan dapar fosfat pH 7,4

(a)

(b)

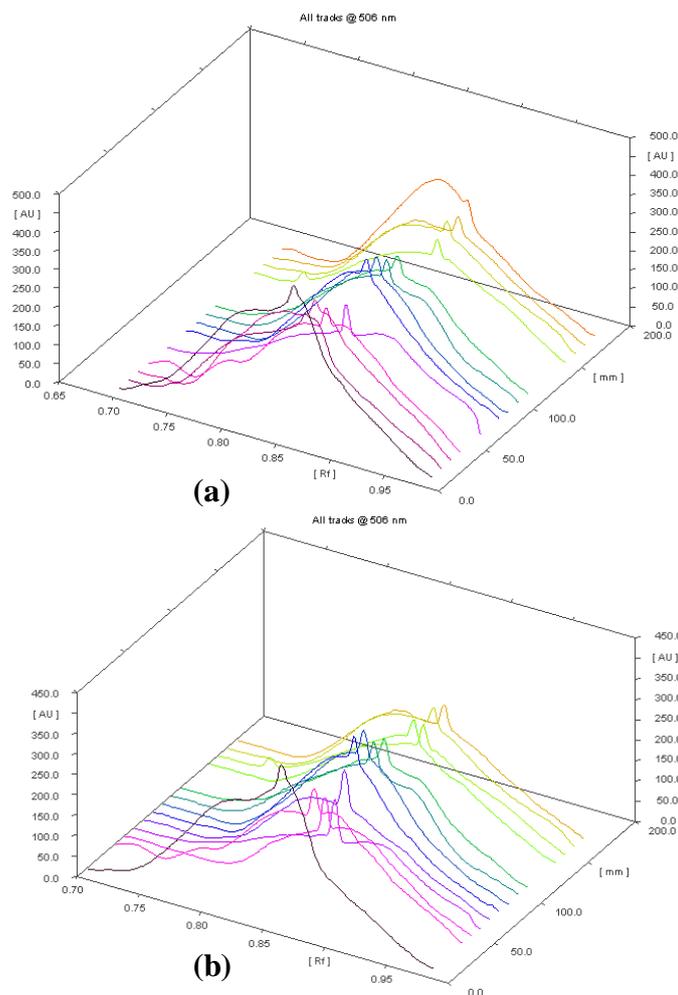
Keterangan: (a) percobaan pertama, (b) percobaan kedua

Gambar 4.34. Tampilan 3D kurva kromatogram penetapan kadar asiatikosid



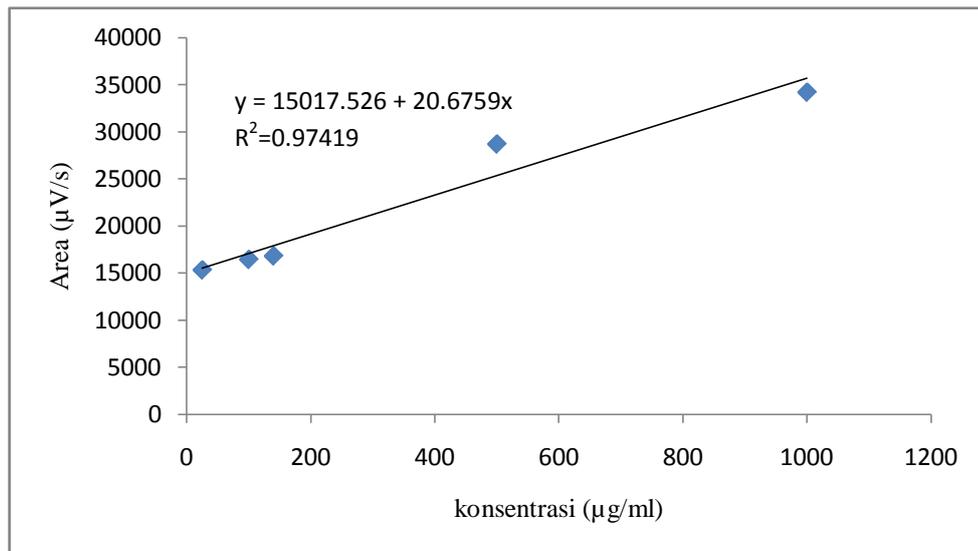
Keterangan: (a) percobaan pertama, (b) percobaan kedua

Gambar 4. 35. Kurva kalibrasi efisiensi penjerapan asiatikosid

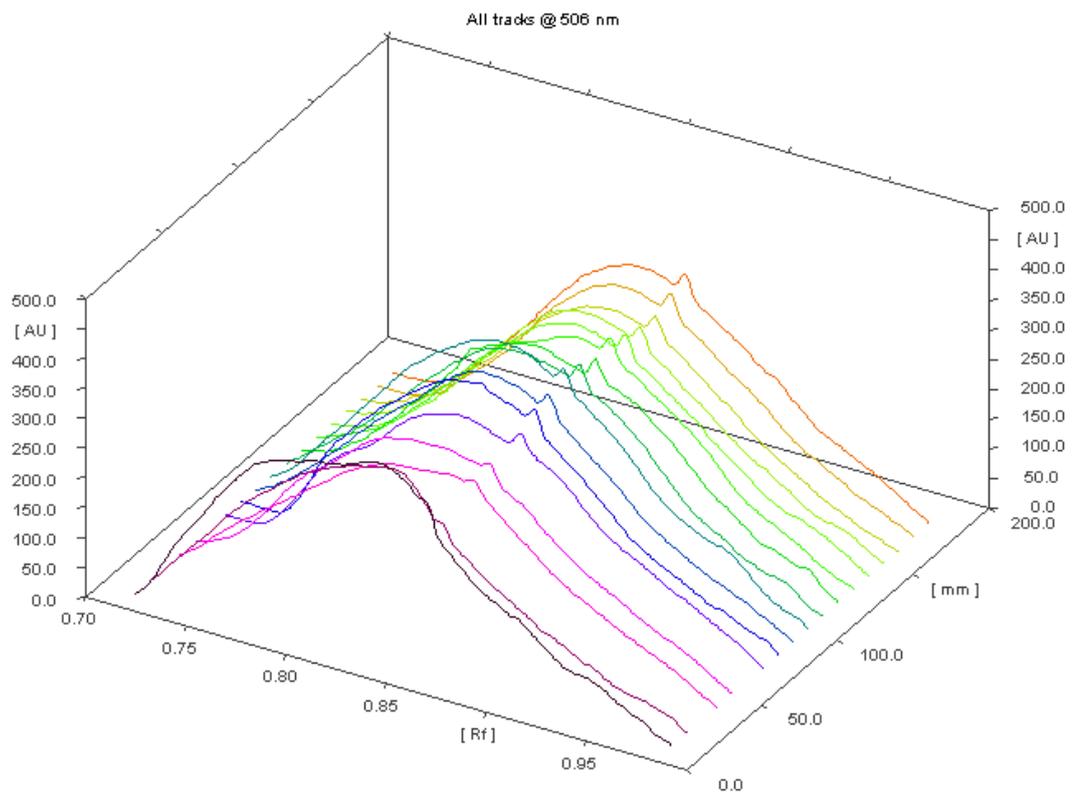


Keterangan: (a) percobaan pertama, (b) percobaan kedua

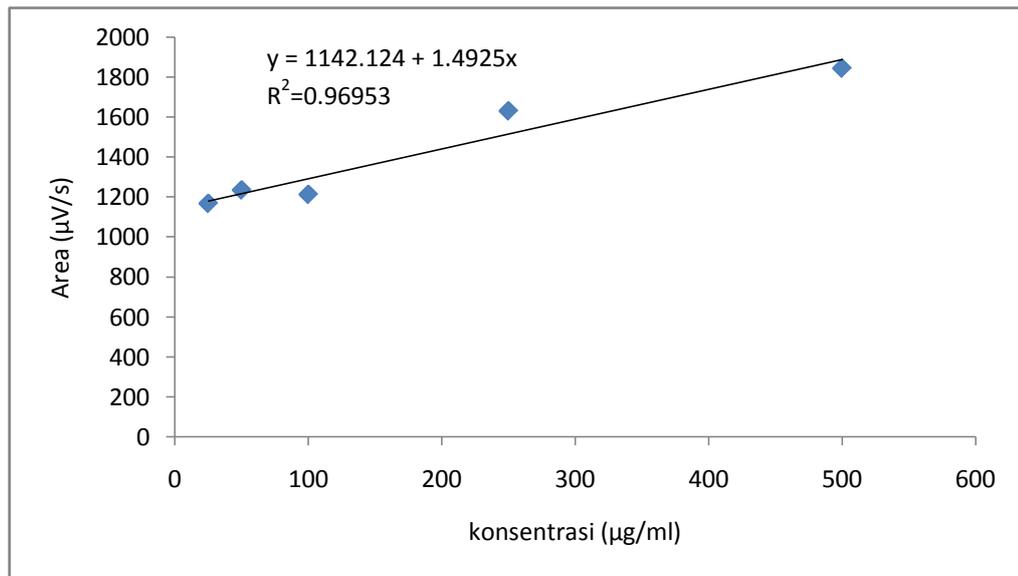
Gambar 4.36. Tampilan 3D kurva kromatogram efisiensi penjerapan asiatikosid



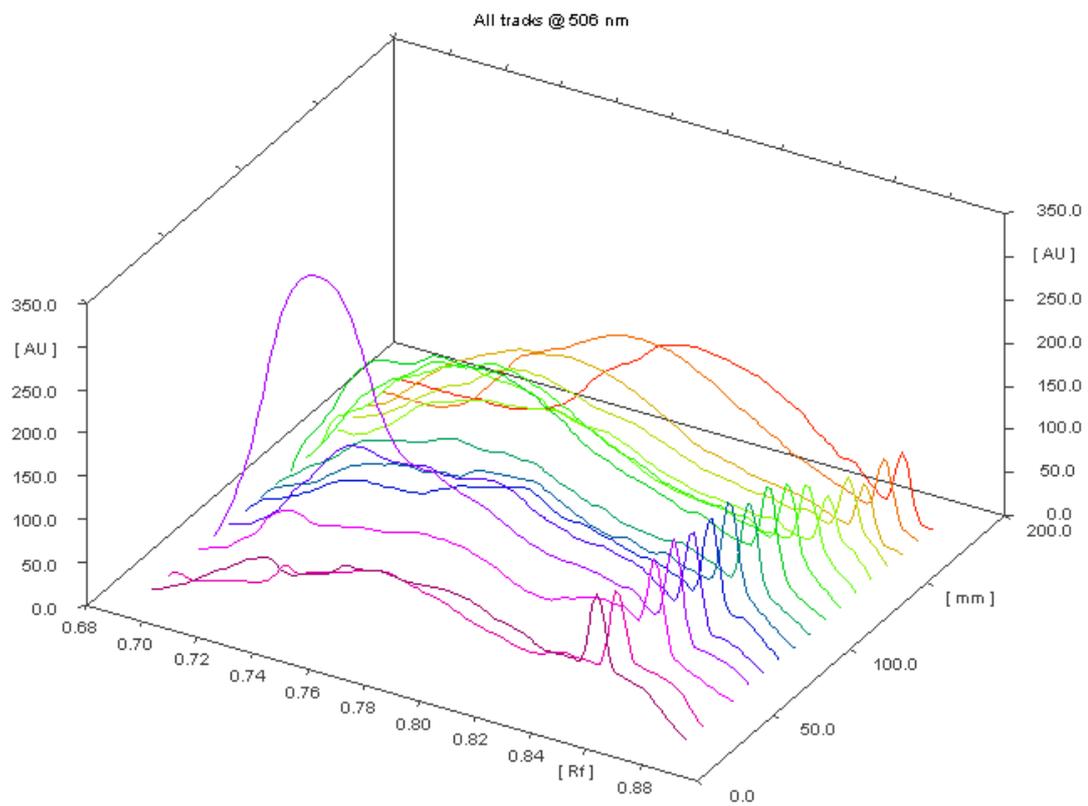
Gambar 4.37. Kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz formula 1



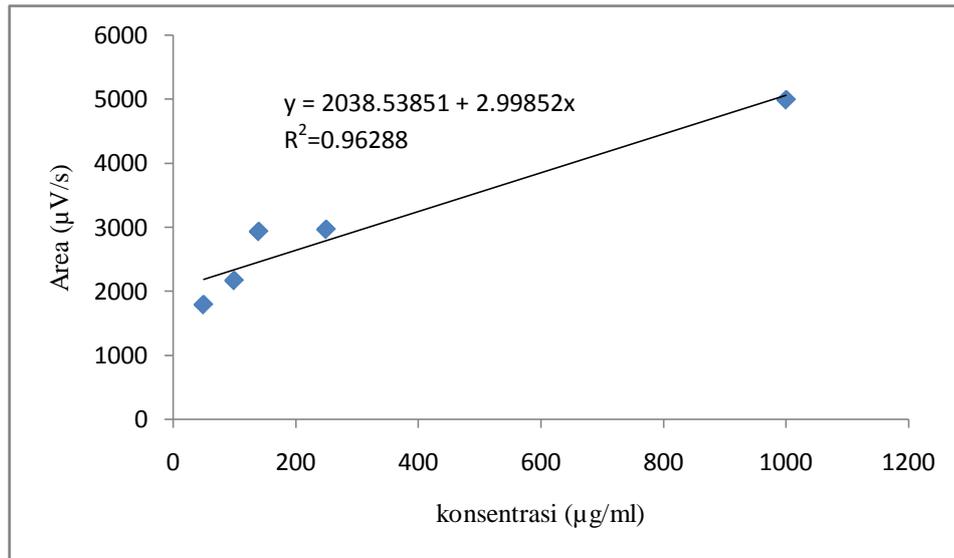
Gambar 4.38. Tampilan 3D kurva kromatogram uji penetrasi sel difusi Franz Formula 1



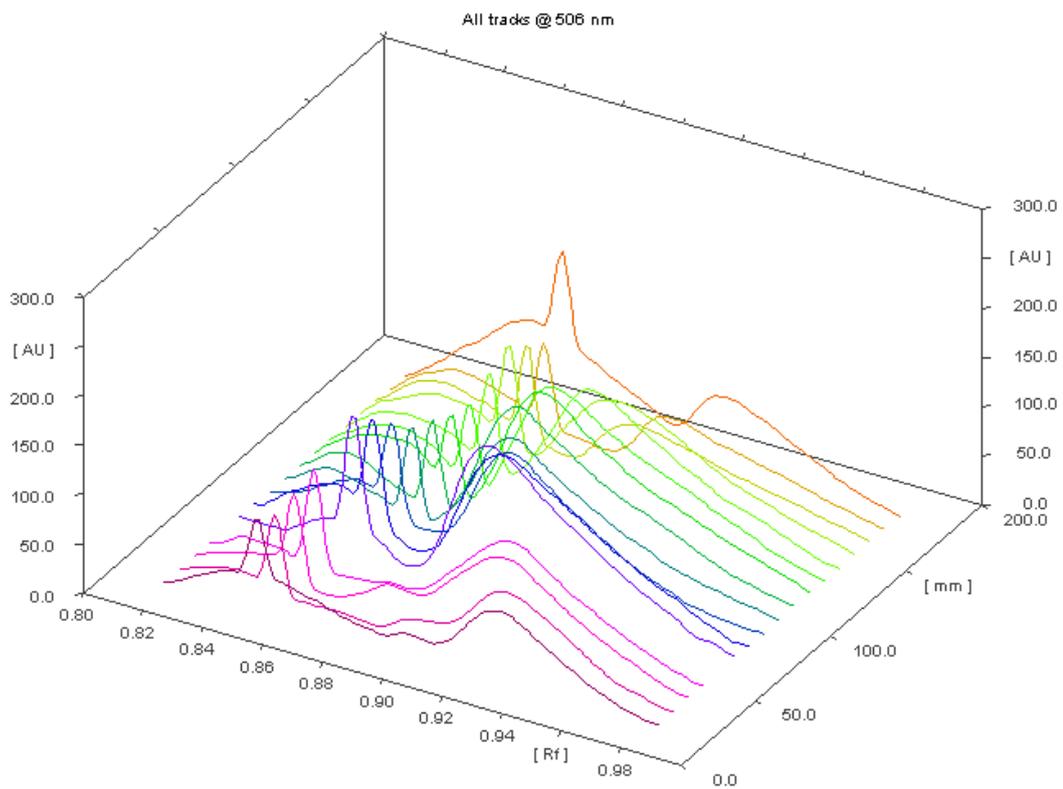
Gambar 4.39. Kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz formula 2



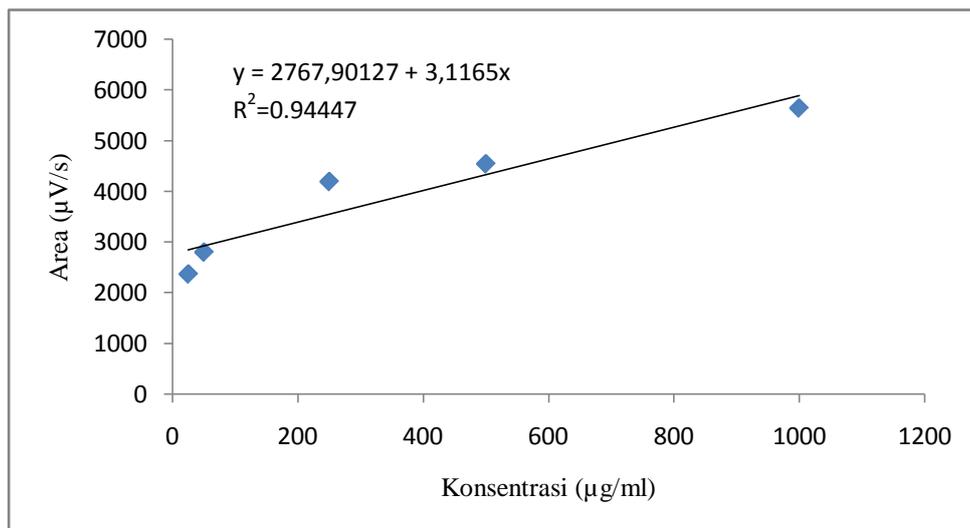
Gambar 4.40. Tampilan 3D kurva kromatogram uji penetrasi sel difusi Franz Formula2



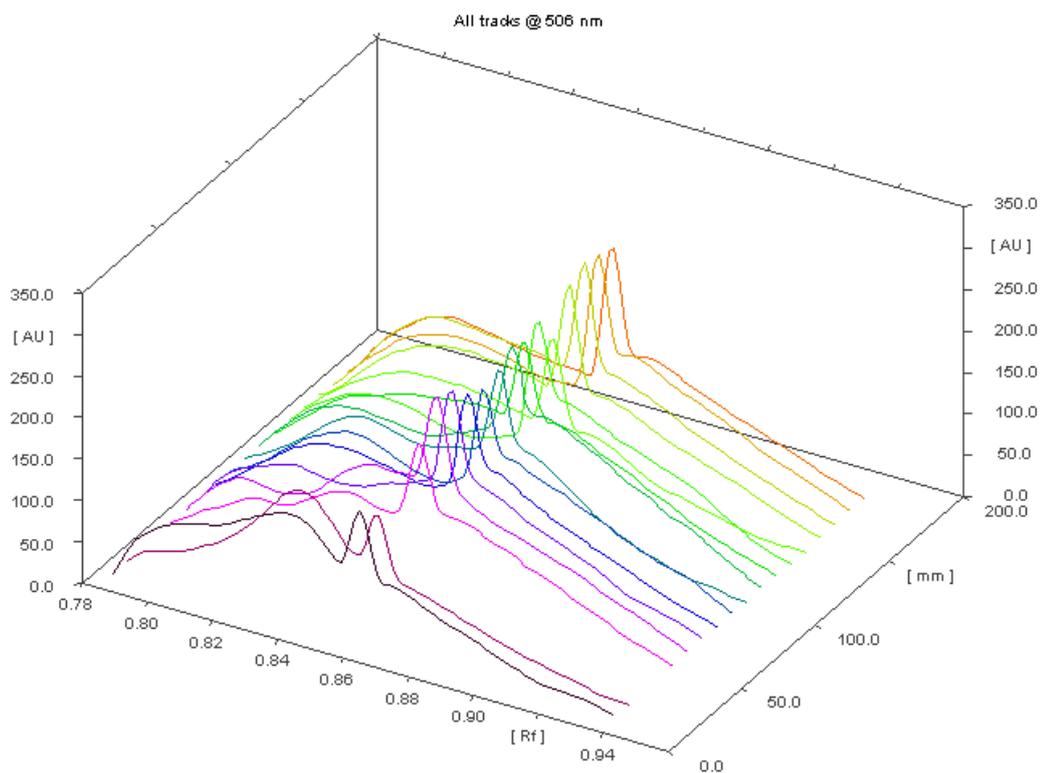
Gambar 4.41. Kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz formula 3



Gambar 4.42. Tampilan 3D kurva kromatogram uji penetrasi sel difusi Franz Formula 3



Gambar 4.43. Kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz formula 4



Gambar 4.44. Tampilan 3D kurva kromatogram uji penetrasi sel difusi Franz Formula 4

TABEL

Tabel 4.1. Kosentrasi dan area kurva kalibrasi penetapan kadar asiaticosid dalam larutan dapar pH 7,4 pada $\lambda = 506$ nm dengan berat standar 50,4 mg

Percobaan Pertama		Percobaan Kedua	
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)
1008	34541,86	1008	4989,33
141,12	16225,52	252	2965,99
100,8	14710,27	141,12	2932,84
50,4	14937,41	100,8	2167,97
25,2	14628,54	50,4	1791,22

Tabel 4.2. Kosentrasi dan area kurva kalibrasi efisiensi penjerapan asiaticosid pada $\lambda = 506$ nm dengan berat standar 50,4 mg

Percobaan Pertama		Percobaan Kedua	
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)
1008	34077,72	1008	27898,99
504	26848,43	141,12	11689,16
252	17426,22	100,8	6430,06
141,12	13024,77	50,4	6391,68
50,4	10822,88	25,2	9098,89

Tabel 4.3. Kosentrasi dan area kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz liposom formula 1 pada $\lambda = 506$ nm

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)
1000	34229,45
500	28271,91
140	16827,22
100	16460,04
25	15342,02

Tabel 4.4. Kosentrasi dan area kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz liposom formula 2 pada $\lambda = 506$ nm

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)
500	1844.95
250	1631,14
100	1212,73
50	1234,82
25	1167,55

Tabel 4.5. Kosentrasi dan area kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz liposom formula 3 pada $\lambda = 506$ nm

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)
1000	4989.33
250	2965.99
140	2932.84
100	2167.97
50	1791.22

Tabel 4.6. Kosentrasi dan area kurva kalibrasi uji penetrasi sel difusi Franz liposom formula 4 pada $\lambda = 506 \text{ nm}$

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)
1000	5636,42
500	4537,83
250	4188,75
50	2797,34
25	2366,77

Tabel 4.7. Hasil uji penetrasi asiaticosid dalam larutan dapar fosfat pH7,4 dari liposom formula 1,2,3, dan 4 selama 8 jam

Waktu (menit)	Jumlah asiaticosid terpenetrasi ($\mu\text{g/cm}^2$)			
	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
10	85.28 \pm 26,40	386.11 \pm 100,45	685.85 \pm 278,31	450.41 \pm 209,55
30	97.46 \pm 32,26	984.38 \pm 71,74	842.88 \pm 207,90	1574.71 \pm 594,15
60	105.71 \pm 36,35	1193.61 \pm 273,04	1534.08 \pm 908,28	1742.16 \pm 413,99
90	203.39 \pm 20,96	2052.26 \pm 463,85	1903.96 \pm 478,06	1963.76 \pm 609,08
120	326.89 \pm 40,83	2382.41 \pm 206,41	2483.10 \pm 1309,45	2244.98 \pm 481,09
180	637.26 \pm 66,31	2679.87 \pm 487,58	2914.34 \pm 943,66	3884.34 \pm 2537,58
240	917.16 \pm 208,13	3201.95 \pm 373,62	3442.92 \pm 1373,03	5029.25 \pm 2055,01
300	1561.10 \pm 554,85	3825.46 \pm 1172,14	4043.79 \pm 1498,59	6756.74 \pm 2073,21
360	1678.40 \pm 593,58	4160.23 \pm 886,42	4819.59 \pm 1111,83	9163.63 \pm 2526,13
420	1982.84 \pm 536,00	4949,00 \pm 1534,62	5864.66 \pm 1916,85	10425.45 \pm 2514,98
480	2768.72 \pm 1046,70	6442.74 \pm 309,34	8048.17 \pm 3100,18	13821.33 \pm 4067,74

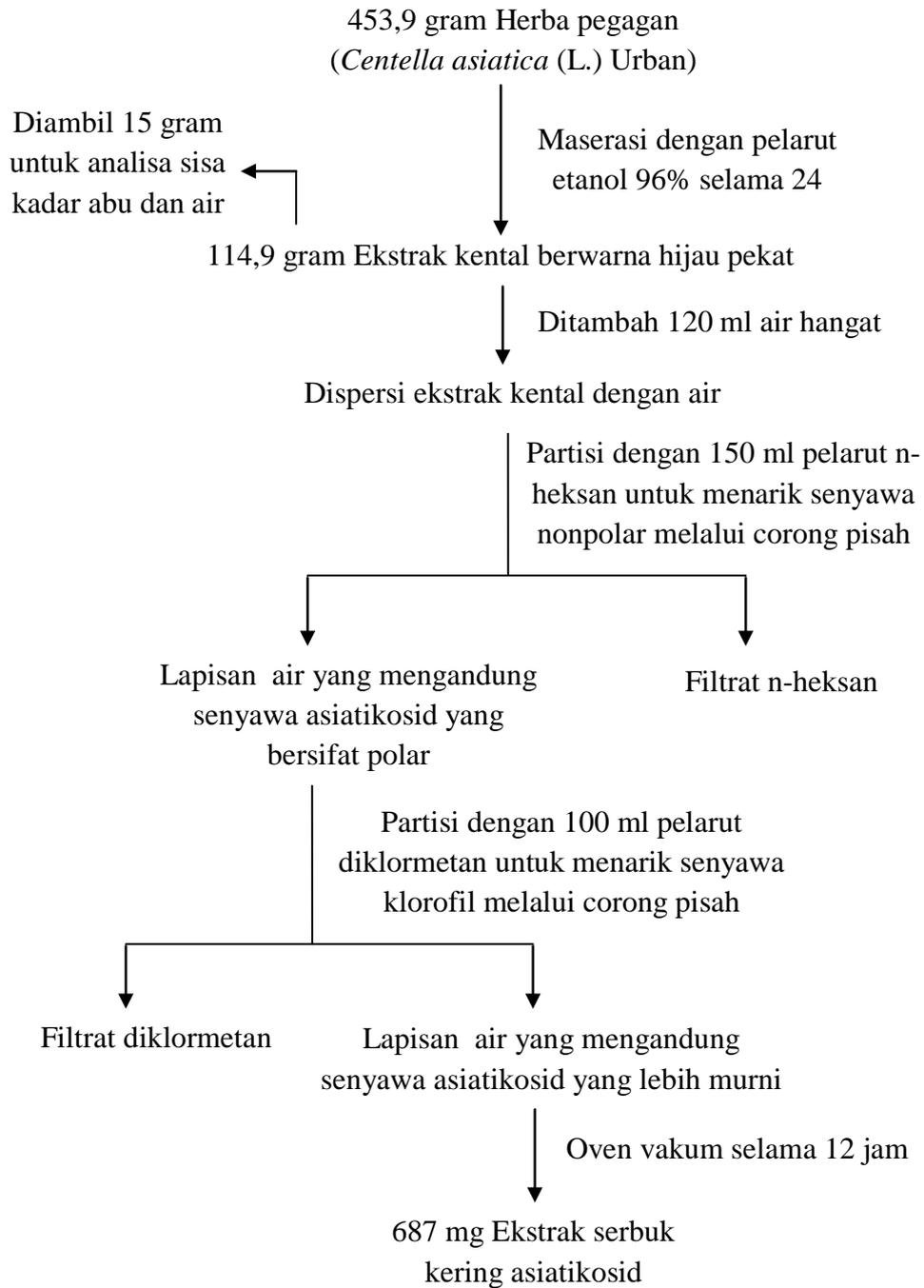
Tabel 4.8. Hasil perhitungan fluks asiaticosid tiap waktu pengambilan dari liposom formula 1, 2, 3, dan 4 berdasarkan uji penetrasi selama 8 jam

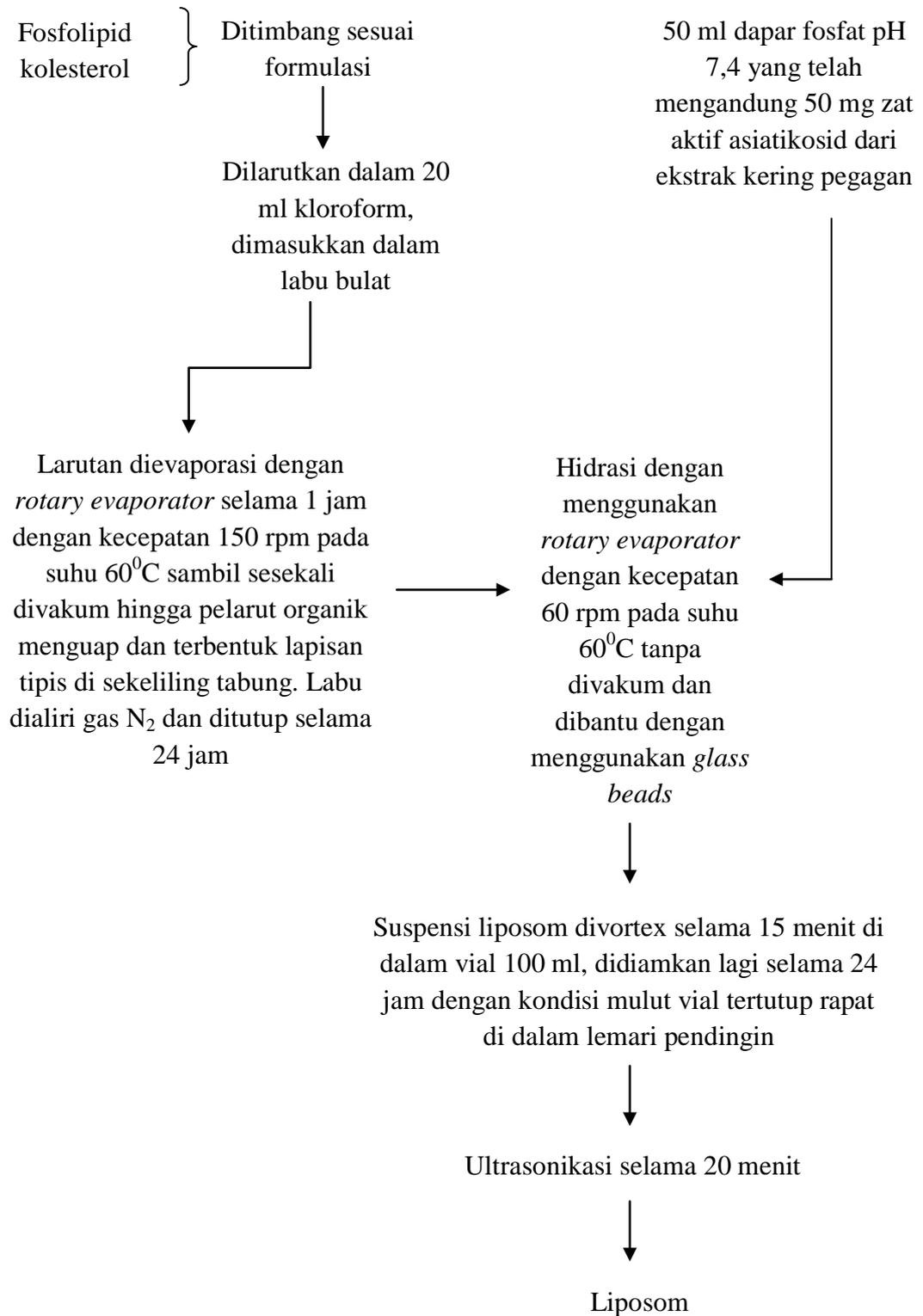
Waktu (menit)	Fluks asiaticosid ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ jam}$)			
	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
10	10.66 \pm 3,30	56.30 \pm 12,56	85.73 \pm 34,79	56.30 \pm 26,19
30	12.18 \pm 4,03	123.05 \pm 8,97	105.36 \pm 25,99	196.84 \pm 74,27
60	13.22 \pm 4,54	149.20 \pm 34,13	191.76 \pm 98,95	217.77 \pm 51,75
90	25.42 \pm 2,62	256.53 \pm 57,98	237.99 \pm 159,22	245.47 \pm 76,14
120	40.86 \pm 5,10	297.80 \pm 25,80	310.39 \pm 163,68	280.62 \pm 60,14
180	79.66 \pm 8,29	334.98 \pm 60,95	364.29 \pm 117,96	485.54 \pm 317,20
240	114.64 \pm 26,02	400.24 \pm 46,70	430.37 \pm 179,88	628.66 \pm 256,88
300	195.14 \pm 69,36	478.18 \pm 146,52	505.47 \pm 186,20	844.59 \pm 259,15
360	209.80 \pm 128,76	520.03 \pm 110,80	602.45 \pm 243,75	1145.45 \pm 315,77
420	247.85 \pm 67,00	618.62 \pm 86,95	733.08 \pm 239,61	1303.18 \pm 314,37
480	346.09 \pm 130,84	805.34 \pm 38,67	1006.02 \pm 187,86	1727.67 \pm 508,47

Tabel 4.9. Hasil jumlah kumulatif asiaticosid yang terpenetrasi, persentase jumlah asiaticosid yang terpenetrasi dan fluks asiaticosid dari liposom formula 1, 2, 3, dan 4 berdasarkan uji penetrasi selama 8 jam

Formula	Jumlah kumulatif asiaticosid yang terpenetrasi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% jumlah kumulatif asiaticosid yang terpenetrasi	Fluks ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ jam}^{-1}$)
Formula 1	2768.72 \pm 1046,70	10.88 \pm 3,66	346.09 \pm 130,84
Formula 2	6442.74 \pm 309,34	24.30 \pm 3,69	805.34 \pm 38,67
Formula 3	8048.17 \pm 3100,18	31.94 \pm 6,05	1006.02 \pm 187,86
Formula 4	13821.33 \pm 4067,74	55.61 \pm 16,37	1727.67 \pm 508,47

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema pembuatan ekstrak serbuk kering pegagan

Lampiran 2. Skema pembuatan liposom menggunakan metode hidrasi lapis tipis

Lampiran 3. Contoh perhitungan penetapan kadar asiaticosid dalam ekstrak serbuk kering pegagan

Percobaan pertama:

Persamaan kurva kalibrasi $y = 13494,46734 + 20,7991x$

Dengan area (y) = 15975,24 $\mu\text{V/s}$

Maka didapat konsentrasi $x = 119,2731 \mu\text{g/ml}$

$$\text{Kadar} = \frac{\text{konsentrasi terukur}}{\text{konsentrasi total}} \times 100\%$$

Konsentrasi asiaticosid total di dalam 50 ml larutan dapar fosfat pH 7,4 dengan penimbangan 51,9 mg

$$\frac{51,9 \text{ mg}}{50 \text{ ml}} = 1,038 \text{ mg/ml}$$

Kemurnian standar asiaticosid yang digunakan adalah 91,72%

$$\text{Kadar} = \frac{119,2731 \mu\text{g/ml}}{0,001038 \mu\text{g/ml}} \times 91,72\% = 10,54\%$$

Percobaan kedua:

Persamaan kurva kalibrasi $y = 2038,53851 + 2,99852x$

Dengan area (y) = 2323,75 $\mu\text{V/s}$

Maka didapat konsentrasi $x = 95,1174 \mu\text{g/ml}$

$$\text{Kadar} = \frac{95,1174 \mu\text{g/ml}}{0,001038 \mu\text{g/ml}} \times 91,72\% = 8,40\%$$

Kadar rata-rata asiaticosid:

$$\frac{10,54 + 8,40}{2} = 9,47\%$$

Lampiran 4. Contoh perhitungan efisiensi penjerapan asiaticosid dalam liposom
formula 1

Percobaan pertama:

Persamaan kurva kalibrasi $y = 6731 + 4,236x$

Dengan area (y) = 19337,30 $\mu\text{V/s}$

Maka didapat konsentrasi $x = 2,9996 \mu\text{g/ml}$

$$\%EP = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100\%$$

Konsentrasi total asiaticosid di dalam 50 ml suspensi liposom dengan penimbangan 50,5 mg:

$$\frac{50,5 \text{ mg}}{50 \text{ ml}} = 1,01 \text{ mg/ml}$$

Maka didapat efisiensi penjerapan:

$$\%EP = \frac{1010 \mu\text{g/ml} - 2,9996 \mu\text{g/ml}}{1010 \mu\text{g/ml}} \times 91,72\% = 89,73\%$$

Percobaan kedua:

Persamaan kurva kalibrasi $y = 6731,1835 + 4,236x$

Dengan area (y) = 16848,40 $\mu\text{V/s}$

Maka didapat konsentrasi $x = 2,4074 \mu\text{g/ml}$

Maka didapat efisiensi penjerapan:

$$\%EP = \frac{1010 \mu\text{g/ml} - 2,4074 \mu\text{g/ml}}{1010 \mu\text{g/ml}} \times 91,72\% = 89,78\%$$

Percobaan ketiga:

Persamaan kurva kalibrasi $y = 10725,005 + 5,008x$

Dengan area (y) = 23330,94 $\mu\text{V/s}$

Maka didapat konsentrasi $x = 2,5374 \mu\text{g/ml}$

Maka didapat efisiensi penjerapan:

$$\%EP = \frac{1010 \mu\text{g/ml} - 2,5374 \mu\text{g/ml}}{1010 \mu\text{g/ml}} \times 91,72\% = 89,77\%$$

Rata-rata efisiensi penjerapan formula 1

$$\%EP = \frac{89,73+89,78+89,77}{3} = 89,76 \pm 0,03 \%$$

Lampiran 5. Contoh perhitungan jumlah asiatikosid yang terpenetrasi dari liposom formula 1 pada menit ke-10

Persamaan kurva kalibrasi $y = 15017,5265 + 20,67592x$

Dengan area (y) = 15538,83 $\mu\text{V/s}$

Maka didapat konsentrasi $x = 25,213 \mu\text{g/ml}$

Rumus jumlah kumulatif yang terpenetrasi:

$$Q = \frac{\{C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C \cdot S\}}{A}$$

Q = Jumlah kumulatif ekstrak pegagan yang terpenetrasi per luas area difusi ($\mu\text{g/cm}^2$)

C_n = Konsentrasi ekstrak pegagan ($\mu\text{g/ml}$) pada *sampling* menit ke- n

V = Volume sel difusi Franz (14,0 ml)

$\sum_{i=1}^{n-1} C$ = Jumlah konsentrasi ekstrak pegagan ($\mu\text{g/ml}$) pada *sampling* pertama (menit ke-10) hingga sebelum menit ke- n

S = Volume *sampling* (0,5 ml)

A = Luas area membran (1,8617 cm^2)

$$Q = \frac{(25,213 \mu\text{g/ml} \times 14 \text{ ml}) + (0 \times 0,5 \text{ ml})}{1,8617 \text{ cm}^2} = 189,6020 \mu\text{g/cm}^2$$

Jadi jumlah asiatikosid yang terpenetrasi dari liposom formula 1 pada menit ke-10 adalah 189,6020 $\mu\text{g/cm}^2$

Lampiran 6. Contoh perhitungan jumlah asiaticosid yang terpenetrasi dari liposom formula 1 pada menit ke-30

Persamaan kurva kalibrasi $y = 15017,5265 + 20,67592x$

Dengan area (y) = 15567,92 $\mu\text{V/s}$

Maka didapat konsentrasi $x = 26,620 \mu\text{g/ml}$

Rumus jumlah kumulatif yang terpenetrasi:

$$Q = \frac{\{C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C \cdot S\}}{A}$$

Q = Jumlah kumulatif ekstrak pegagan yang terpenetrasi per luas area difusi ($\mu\text{g/cm}^2$)

C_n = Konsentrasi ekstrak pegagan ($\mu\text{g/ml}$) pada *sampling* menit ke- n

V = Volume sel difusi Franz (14,0 ml)

$\sum_{i=1}^{n-1} C$ = Jumlah konsentrasi ekstrak pegagan ($\mu\text{g/ml}$) pada *sampling* pertama (menit ke-10) hingga sebelum menit ke- n

S = Volume *sampling* (0,5 ml)

A = Luas area membran (1,8617 cm^2)

$$Q = \frac{(26,620 \mu\text{g/ml} \times 14 \text{ ml}) + (25,213 \times 0,5 \text{ ml})}{1,8617 \text{ cm}^2} = 206,9543 \mu\text{g/cm}^2$$

Jadi jumlah asiaticosid yang terpenetrasi dari liposom formula 1 pada menit ke-10 adalah 206,9543 $\mu\text{g/cm}^2$

Lampiran 7. Contoh perhitungan fluks asiaticosid dari liposom formula 1

Kecepatan penetrasi asiaticosid (fluks; J ; $\mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$) dihitung dengan rumus:

$$J = \frac{M}{Sxt}$$

J = Fluks ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$)

M = Jumlah kumulatif asiaticosid yang melalui membran (μg)

S = Luas area difusi (cm^2)

t = Waktu (jam)

Diketahui:

M/S	$= 2768,718 \pm 1046,70 \mu\text{g/cm}^2$
$(M/S)_1$	$= 1141,93 \mu\text{g/cm}^2$
$(M/S)_2$	$= 4542,05 \mu\text{g/cm}^2$
$(M/S)_3$	$= 2622,18 \mu\text{g/cm}^2$

$$J_1 = \frac{1141,93 \mu\text{g/cm}^2}{8} = 142,74 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

$$J_2 = \frac{4542,05 \mu\text{g/cm}^2}{8} = 567,76 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

$$J_3 = \frac{2622,18 \mu\text{g/cm}^2}{8} = 327,77 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

$$J \text{ rata-rata} = 346,09 \pm 130,84 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

Jumlah fluks asiaticosid dari liposom formula 1 adalah $346,09 \pm 130,84 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$

Lampiran 8. Contoh perhitungan persentase jumlah kumulatif asiaticosid yang terpenetrasi dari liposom formula 2

$$\% \text{ jumlah kumulatif terpenetrasi} = \frac{\text{jumlah kumulatif terpenetrasi} \times \text{luas membran}}{\text{berat asiaticosid}} \times 100\%$$

Sampel yang diaplikasikan pada kulit sebanyak 1 g

Dalam 1 g sampel mengandung asiaticosid sebanyak 50 mg = 50.000 μg

Data 1

$$\% \text{ jumlah kumulatif terpenetrasi} = \frac{5761,63 \mu\text{g/cm}^2 \times 1,8137 \text{ cm}^2}{50000 \mu\text{g}} \times 100\% = 20,86\%$$

Data 2

$$\% \text{ jumlah kumulatif terpenetrasi} = \frac{6569,56 \mu\text{g/cm}^2 \times 1,8137 \text{ cm}^2}{50000 \mu\text{g}} \times 100\% = 23,83\%$$

Data 3

$$\% \text{ jumlah kumulatif terpenetrasi} = \frac{7007,033 \mu\text{g/cm}^2 \times 2,0117 \text{ cm}^2}{50000 \mu\text{g}} \times 100\% = 28,19\%$$

Jadi % rata-rata jumlah kumulatif asiaticosid yang terpenetrasi dari liposom formula 3 adalah $24,30 \pm 3,69 \%$

Lampiran 9. Sertifikat hasil identifikasi atau determinasi tumbuhan pegagan



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
 (Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
 (Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
 Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 10 Januari 2012

Nomor : 026a/IPH.1.02/If.8/I/2012
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/ determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Dian Rahma Bakri

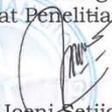
Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Pegagan	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Apiaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,



Dr. Joeni Setijoe Rahajoe
 NIP. 196706241993032004



D:\Ident 2012\Dian Rahma Bakri.doc\IS-ABR

Page 1 of 1

Lampiran 10. Sertifikat analisis pengujian kadar rendemen dan kadar asiaticosid dalam serbuk simplisia *Centella asiatica* (L.) Urban



Kementerian Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar No. 3 Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor 16111
Telepon : (0251) 8321879 Faximile : (0251) 8327010 E-mail : balitro@telkom.net

SERTIFIKAT PENGUJIAN
CERTIFICATE OF ANALYSIS
No. Adm. : 44/T/LAB/1/12

DF 5.10.1.2.

Kepada Yth.
Dian Rahma Bakti

Kondisi/Identifikasi Contoh : Serbuk
Tanggal Penerimaan : 27 Januari 2012
Tanggal Pengujian : 27 Januari & 10-15 Februari 2012

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian/Pemeriksaan	Hasil Pengujian/Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Pegagan	Ekstrak dgn etanol 70% - Rendemen (%)	25,31	Maserasi
		Analisis dari ekstrak : - Kadar asiaticosid (%)	4,29	TLC Scanner

Bogor, 15 Februari 2012
Manajer Teknis

Ma'mun, S.Si

- Laporan hasil uji ini berlaku selama 90 hari sejak diterbitkan. Surat menyurat agar mencantumkan nomor administrasi.
- Hasil pengujian di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Laporan ini dilarang diperbanyak kecuali atas persetujuan tertulis dari Laboratorium Pengujian Balitro.

Lembar kedua : disimpan oleh Manajer Administrasi

**Lampiran 11. Sertifikat analisis pengujian kadar air dan abu dalam ekstrak kental
Centella asiatica (L.) Urban**



Kementerian Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar No. 3 Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor 16111
Telepon : (0251) 8321879 Faximile : (0251) 8327010 E-mail : balitro@telkom.net

SERTIFIKAT PENGUJIAN
CERTIFICATE OF ANALYSIS
No. Adm . : 106/T/LAB/III/12

DF 5.10.1.2.

Kepada Yth.
Dian Rahma Bakti

Kondisi/Identifikasi Contoh : Ekstrak kental
Tanggal Penerimaan : 24 Februari 2012
Tanggal Pengujian : 6 - 8 Maret 2012

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian/Pemeriksaan	Hasil Pengujian/Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Ekstrak kental pegagan	- Kadar air (%) - Kadar abu (%)	26,72 5,89	Gravimetri Gravimetri

Bogor, 9 Maret 2012
Manajer Teknis

Ma'mun, S.Si

- Laporan hasil uji ini berlaku selama 90 hari sejak diterbitkan. Surat menyurat agar mencantumkan nomor administrasi.
- Hasil pengujian di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Laporan ini dilarang diperbanyak kecuali atas persetujuan tertulis dari Laboratorium Pengujian Balitro.

Lembar kedua : disimpan oleh Manajer Administrasi

Lampiran 12. Sertifikat analisis standar asiatikosid

GUANYU BIO-TECH

西安冠宇生物技术有限公司
XI'AN GUANYU BIO-TECH CO.

Certificate of Analysis

Product Name	Gotu Kola P.E.	Botanical Name	<i>Centella Asiatica (L.) Urban</i>
Batch Number	GO110224	Plant Part	Air herb
Quantity	18kgs	Analysis Date	Feb.26,2011
Manufacture Date	Feb.24,2011	Certificate Date	Feb.28,2011

Analysis	Specification	Results
Assay(BY HPLC)	Asiaticoside > 90%	91.72%
Physical & Chemical Control		
Identification	Positive	Complies
Appearance	Fine Powder	Complies
Color	White	Complies
Odor	Bitter	Complies
Taste	Lighter bitter	Complies
Mesh Size	80mesh	Complies
Loss On Drying	3%Max	2.1%
Residual Solvents	0.05%Max	Complies
Sulphated Ash	3%Max	Complies
Heavy Metals	5ppm	Complies
Pesticides	Negative	Negative
Microbiological		
Total Plate Count	<1000/gMax	Complies
Yeast & Mold	<100/gMax	Complies
Salmonella	Negative	Negative
E. Coli	Negative	Negative
Conclusion		
	Complies with specification	
Storage	Store in cool & dry place, Keep away from strong light and heat.	
Shelf life	18 Months when properly stored	

Quality Assurance Officer

Corrector

Analyst

GUANYU BIO-TECHNOLOGY CO., LTD
Add : No.212Xinhu road, Chang'an District, Xi'an China

Tel.: 0086-29-88907599
Fax: 0086-29-85658727

Lampiran 13. Sertifikat analisis fosfatidilkolin

SIGMA-ALDRICH®		 <small>Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland Tel: +41 81 755 2511 Fax: +41 81 756 5449</small>
Certificate of Analysis		
Product Name:	L- α -PHOSPHATIDYLCHOLINE from egg yolk, ~ 60 % TLC	
Product Number:	61755	
Product Brand:	Sigma	
Molecular Formula:		
Molecular Mass:		
CAS Number:	8002-43-5	
TEST	SPECIFICATION	LOT BCBD3767 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	YELLOW TO ORANGE	ORANGE
APPEARANCE (FORM)	POWDER TO SOLIDIFIED MASS OR CHUNKS	SOLIDIFIED MASS OR CHUNKS
PURITY (TLC AREA %)	≥ 55.0 %	76.5 %
WATER	≤ 2.0 %	0.7 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
QC RELEASE DATE	15/OCT/10	
 Edeltraud Schwärzler, Manager Quality Control Buchs, Switzerland		
<small>Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.</small>		

Lampiran 14. Sertifikat analisis kolesterol

SIGMA-ALDRICH®		3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
		Website: www.sigmaaldrich.com
		Email USA techserv@sial.com
		Outside USA eurtechserv@sial.com

Certificate of Origin

Product Name:	Cholesterol
	94 %
Product Number:	C75209
Product Brand:	Sigma
Lot:	STBB5512
Molecular Formula:	C ₂₇ H ₄₆ O
Molecular Mass:	386.65
CAS Number:	57-88-5
Date of Issue:	15-JUN-10
Last Update:	08-JUL-11

Country of Origin	Japan
--------------------------	-------

product is of synthetic origin	no
only synthetic materials used in the manufacturing process	no
compounds of animal origin used	yes
genetically modified organisms used	no
allergenic materials used	no
procedures in place to avoid cross contamination with residue of animal, human, GMO or allergenes in manufacturing process	yes

Sigma-Aldrich has quality systems and procedures in place for monitoring the production process, traceability and batch consistency.

Document issued by Sigma-Aldrich Corporation "Sigma-Aldrich". This document is valid without signature and has been produced digitally.

This information is to be used for the purpose of determining animal or other biological origin only and not to be confused with "Country of Origin" for import/export purposes. Data provided on this document are property of Sigma-Aldrich.

This information is considered accurate and reliable as of the date appearing on the document and is presented in good faith.

Sigma-Aldrich shall not be held liable for any damage resulting from handling or from processing the above product(s). This document does not make any warranty, express or implied, of fitness for any particular use of the product(s). Purchaser must determine the suitability of the product(s) for its use under the applicable law and regulations.

For further questions please contact your local Sigma-Aldrich representative.

We are committed to the success of our Customers, Employees and Shareholders through leadership in Life Science, High Technology and Service.

Sigma-Aldrich	Certificate of Origin - Product C75209 Lot STBB5512	Page 1 of 1
---------------	---	-------------

Lampiran 15. Sertifikat analisis tikus putih



BAGIAN PRODUKSI TERNAK DAGING KERJA DAN ANEKA TERNAK
DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR

Sekretariat : Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680
Telepon : (0251) 8624774, Fax. (0251) 8624774

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dr. Ir. Asnath M Fuah, MS
Jabatan : Kepala Bagian Produksi Ternak Daging Kerja dan Aneka Ternak
Alamat : Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga-Bogor
Telp. 0251-8624774, Fax. 0251-8624774

Menyatakan bahwa tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *sprague dawley* (SD) yang dikembangkan di Laboratorium Aneka Ternak, Fakultas Peternakan IPB, Telah memenuhi syarat sebagai hewan uji untuk penelitian atau kegiatan praktikum.

Demikian surat keterangan ini dibuat dengan sebenar-benarnya.

Bogor 8 maret 2012

Kepala Bagian
Produksi Ternak Daging, Kerja dan Aneka Ternak



Dr. Ir. Asnath M. Fuah, MS
NIP.195410151979032001