

KARAKTERISASI FITOSOM EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*)

Alifia Putri Febriyanti¹, Pipit Sulistiyani²

¹Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Alauddin Makassar

²Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

Jl. H.M. Yasin Limpo No. 36, Samata - Gowa

Email : alifia.putri@uin-alauddin.ac.id

ABSTRAK

Pegagan (*Centella asiatica*) dapat digunakan untuk obat luka. Pemanfaatan pegagan secara modern dalam bentuk topikal membutuhkan sistem penghantaran yang baik untuk meningkatkan bioavailabilitas dan bioekivalensinya sehingga dikembangkan teknologi penghantarannya melalui *Drug Delivery System* (DDS) dengan sistem partikulat seperti fitosom. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik fitosom ekstrak pegagan (*Centella asiatica*). Penambahan kolesterol dapat meningkatkan ukuran partikel fitosom ekstrak pegagan secara signifikan, meningkatkan *entrapment efficiency* fitosom ekstrak pegagan, meningkatkan pH fitosom ekstrak pegagan namun menurunkan kadar asiatikosida didalam fitosom. Fitosom ekstrak pegagan yang dihasilkan dengan penambahan kolesesterol berbentuk sferik dengan ukuran partikel antara 1,13- 1,59 μm , *entrapment efficiency* sebesar $\pm 85\%$, pH sebesar $\pm 5,6$ dan kadar asiatikosida sebesar 0,215%..

Kata Kunci : Karakteristik fitosom, ekstrak, pegagan

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman etnis yang melahirkan keragaman dalam penggunaan sumber daya yang tersedia sebagai upaya menjaga kesehatan berupa pengobatan tradisional di masyarakat atau biasa disebut etnomedisin. Jenis tumbuhan obat, ramuan jamu, dan kearifan lokal masyarakat dalam pemanfaatannya sehari-hari sangat berpengaruh terhadap ragam etnomedisin. Salah satu tumbuhan obat yang banyak dimanfaatkan oleh beberapa etnis di Indonesia adalah pegagan (*Centella asiatica*). Tumbuhan ini secara empiris digunakan untuk obat luka, koreng, borok, eksema, asma, darah tinggi. Bagian tanaman yang digunakan adalah herba (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).

Pemanfaatan pegagan sebagai obat luka secara modern dalam bentuk topikal membutuhkan sistem penghantaran yang sesuai karena senyawa aktif dalam pegagan yaitu asiatikosida memiliki kecenderungan bersifat polar, sehingga berlawanan dengan karakteristik dari lapisan kulit yang tersusun dari membran sel yang cenderung bersifat lipofil (World Health Organization, 1999).

Sistem penghantaran obat yang baik akan meningkatkan bioavailabilitas dan bioekivalensi, oleh karena itu ekstrak pegagan dan fitokonstituennya mulai dikembangkan teknologi penghantarannya ke dalam tubuh melalui *Drug Delivery System* (DDS) dengan sistem partikulat seperti fitosom (Chaturvedi M., et al, 2011). Fitosom merupakan pengembangan dari liposom.

Formula yang selama ini digunakan dalam pembuatan fitosom yaitu hanya dengan menggunakan fitokonstituen dan fosfolipid seperti lesitin, sedangkan pada pembuatan liposom selalu ditambahkan bahan peningkat stabilitas cangkang seperti kolesterol.

Untuk memenuhi kriteria fitosom yang baik, maka penggunaan bahan peningkat stabilitas cangkang perlu dipertimbangkan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik fitosom ekstrak pegagan dengan penambahan kolesterol sebagai peningkat stabilitas cangkang dengan memperhatikan parameter-parameter seperti morfologi dan ukuran partikel, kestabilan pH, penentuan kadar asiatikosida didalam fitosom serta penentuan *entrapment efficiency* (EE).

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah Penelitian Eksperimental Laboratorium dengan pendekatan kuantitatif (Siswanto, S., Susila, & Suyanto. 2015.).

Uji stabilitas fisika dan kimia dari fitosom ekstrak pegagan melalui pendekatan *intermediate stability testing*.

Variabel dalam penelitian ini ada 2 yaitu Variabel bebas adalah kadar kolesterol dan Variabel terikat adalah morfologi dan ukuran partikel, pH, kadar asiatikosida, *Entrapment Efficiency* (EE).

Penelitian dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), di Laboratorium Farmasetika Fakultas

Kedokteran Universitas Brawijaya Malang (FKUB), Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi FKUB dan Laboratorium Jurusan teknik Kimia Politeknik Negeri Malang, pada bulan Januari sampai Mei 2014.

Prosedur yang dilakukan mulai dari pembuatan ekstrak pegagan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, remaserasi 4 kali. Maserat yang didapatkan divacuum *drying* dengan suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental dengan kandungan air minimum yang ditandai dengan berat ekstrak menjadi konstan (Borhan, MZ., R, Ahmad & Abdullah, S. 2013). Uji kualitatif ekstrak pegagan dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dimana pada uji ini digunakan standard pembanding yaitu standard asiatikosida sehingga R_f yang nanti dihasilkan akan dibandingkan. Prosedur uji kualitatif yang dilakukan meliputi preparasi sampel, preparasi fase gerak, dan penotolona sampel hingga evaluasi hasil (Reniza, 2003). Uji tersebut dilakukan untuk memastikan bahwa didalam ekstrak pegagan yang dihasilkan mengandung asiatikosida. Setelah didapatkan ekstrak yang memenuhi spesifikasi maka dilanjutkan dengan pembuatan fitosom ekstrak pegagan. Uji kuantitatif asiatikosida dalam fitosom ekstrak pegagan dilakukan dengan menggunakan LC MS-MS.

Fitosom dibuat dengan 2 formula. Formula 1 dibuat dengan bahan ekstrak pegagan, etanol 70%, lesitin, dan aqua bebas CO₂. Formula 2 dibuat dengan bahan ekstrak pegagan, etanol 70%, lesitin, kolesterol dan aqua bebas CO₂.

Metode pembuatan formula 1 dilakukan dengan melarutkan Ekstrak kedalam etanol 70% dengan perbandingan 1:1, kemudian dilakukan pencampuran dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. dilanjutkan dengan penambahan Lesitin (fosfatidilkolin) dengan perbandingan 1:1 terhadap Ekstrak. Dilakukan pencampuran dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 1500-2000 rpm pada suhu 40°C selama ± 4 jam. Untuk membentuk lapisan tipis dan menghilangkan pelarutnya, dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator*. Setelah itu dihidrasi menggunakan Aqua bebas CO₂ dan dilakukan pengadukan menggunakan *magnetig stirrer* selama ± 5 jam, sehingga membentuk kompleks fitosomal (Kareparamban, 2012). Untuk memperkecil ukuran partikel, dapat dilakukan dengan metode sonikasi.

Metode pembuatan formula 2 dilakukan dengan melarutkan ekstrak kedalam etanol 70% dan dipanaskan pada suhu 40°C, pada saat bersamaan kolesterol dilarutkan pada lesitin pada suhu 40°C. Setelah kolesterol larut dalam lesitin kemudian dimasukkan kedalam

campuran ekstrak dan etanol dengan tetap dilakukan pengadukan dengan menggunakan *overhead stirrer*. Setelah tercampur kemudian pencampuran dilanjutkan dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 1500-2000 rpm dengan suhu 40°C selama ± 4 jam. Untuk membentuk lapisan tipis dan menghilangkan pelarutnya, dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator*. Setelah itu dihidrasi dan dilakukan pengadukan menggunakan *magnetig stirrer* (1700 rpm, ± 5 jam) sehingga membentuk kompleks fitosomal dan untuk memperkecil ukuran partikel, dilakukan dengan metode sonikasi.

Evaluasi dan Karakterisasi yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi morfologi dan ukuran partikel dianalisis menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dengan spesifikasi Ukuran partikel ≤ 100 nm, pH menggunakan pH meter dengan spesifikasi 4-5, kadar asiatikosida dalam fitosom diukur menggunakan LC MS-MS dengan spesifikasi kadar yang diperoleh mendekati atau sama dengan kadar asiatikosida pada ekstrak pegagan yang dihasilkan, spesifikasi *entrapment efficiency* yang dihasilkan antara 80-100% dihitung menggunakan rumus:

$$EE = \frac{b - a}{a} \times 100\%$$

Keterangan :

a : jumlah asiatikosida pada supernatan
b : jumlah total asiatikosida pada phytosome (saat penentuan kadar asiatikosida dalam fitosom)

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi Pegagan

Persen rendamen yang dihasilkan dari 81,5525 gram ekstrak pegagan adalah sebesar 20,39%.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi, merupakan metode ekstraksi cara dingin (tanpa pemanasan). Pemilihan metode ekstraksi berdasarkan pada karakteristik dari senyawa asiatikosida yang tidak tahan terhadap pemanasan. Dalam proses ekstraksi, memperkecil ukuran partikel simplisia dibutuhkan untuk memperbesar luas permukaan total dari simplisia yang akan disari, sehingga akan memperbesar terjadinya kontak antara partikel simplisia dengan cairan penyari, yang selanjutnya dapat memperbesar hasil ekstraksi (Reniza, 2003). Herba pegagan digunakan karena senyawa marker asiatikosida tersebar pada seluruh bagian tanaman (WHO, 1999).

Persen rendamen yang dihasilkan telah sesuai berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Harwoko 2014, yaitu persentase rendemen yang dihasilkan dari proses maserasi dengan pelarut etanol 70% sebesar 20,66% (Mora, E dan Fernando, A. 2012).

B. Uji Kualitatif Ekstrak Pegagan

Uji kualitatif asiatikosida pada ekstrak pegagan dilakukan dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Uji KLT menggunakan larutan standar asiatikosida 1 mg /1 ml metanol

dan ekstrak pegagan 30 mg / 3 ml metanol, menggunakan eluen dengan perbandingan pelarut kloroform:asam asetat glasial:metanol:air (60:32:12:8).

Berdasarkan pengamatan secara visual menunjukkan bahwa noda senyawa asiatikosida didalam ekstrak terdapat pada $R_f = 0.2750$ dan standard asiatikosida terletak pada $R_f = 0.2875$, menurut Wagner tahun 1996, noda senyawa asiatikosida terletak pada rentang 0.2 – 0.35. Dengan hasil tersebut secara kualitatif senyawa asiatikosida terdapat pada ekstrak etanol 70% pegagan .



A B.

Gambar 1. A. Hasil KLT pada UV 366 nm; B. Hasil KLT setelah disemprot penampak bercak dan dipanaskan diatas *hotplate*.

Retardation factor (R_f) standard asiatikosida sebesar 0,875 dan R_f ekstrak pegagan sebesar 0,2750. Hal ini dikarenakan asiatikosida akan cenderung terikat kuat oleh lempeng KLT yang berupa gel silika yang bersifat polar sedangkan eluen lebih cenderung bersifat nonpolar. Nilai R_f yang didapatkan sudah

sesuai dengan nilai Rf yang telah ditetapkan pada *Plant Drug Analysis* yang berkisar antara 0.2-0.35 dengan eluen yang sama.

C. Uji Kuantitatif Asiatikosida dalam Ekstrak Pegagan

Penetapan kadar asiatikosida pada ekstrak pegagan menggunakan metode LC MS-MS. Eluen yang digunakan pada LC MS-MS yaitu asetonitril dan air. Kadar asiatikosida dalam ekstrak etanol 70% pegagan sebesar 0.232 %.

Untuk menentukan kadar asiatikosida didalam ekstrak, dilakukan pembuatan kurva baku dari larutan standard asiatikosida. Larutan standard asiatikosida yang digunakan sebesar 400, 600, 800, 1000, 2000, 4000 ppm, dimana penentuan konsentrasi ini didasarkan pada penentuan nilai LOD yang telah dilakukan pada peneliti sebelumnya yaitu Zulkarnaen tahun 2014. Dari persamaan kurva baku didapatkan persamaan regresi sebesar $Y = 123,68x - 343,75$ dengan R^2 sebesar 0,9992.

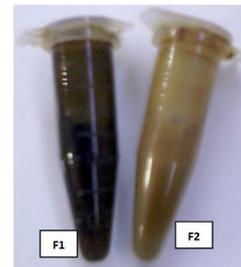
D. Formulasi Fitosom Ekstrak Pegagan

Formula fitosom dalam penelitian ini dibuat menjadi dua formula yang berbeda, yaitu F1 dan F2 dibuat dengan menggunakan perbandingan sebagai berikut:

Tabel 1. Perbandingan Formula Fitosom Ekstrak Pegagan

Nama Bahan	Formula 1 (F1)	Formula 2 (F2)
Ekstrak Pegagan	10 gram	10 gram
Lesitin	10 gram	10 gram
Kolesterol	-	5 gram
Etanol 70%	10 ml	10 ml
Aqua bebas	20 ml	20 ml
CO ₂		
Berat total	43 gram	48 gram

Dari formula yang dihasilkan terdapat perbedaan konsistensi antara F1 dan F2, yaitu F2 konsistensinya lebih kental dibandingkan dengan F1. Selain itu F2 berwarna lebih terang dibandingkan dengan F2 seperti yang terlihat pada gambar 2.



Gambar 2. F1 dan F2 Fitosom Ekstrak Pegagan

Formula 1 dan 2 selama optimasi metode pembuatan digunakan dua alat yang berbeda untuk mencampuran bahan yaitu dengan menggunakan over head stirrer dan magnetig stirrer. Namun setelah dibandingkan dari hasil *Scanning Electron Mycroscopy* menunjukkan pembuatan fitosom dengan magnetig stirrer membentuk fitosom lebih baik dibandingkan dengan menggunakan over head stirrer.

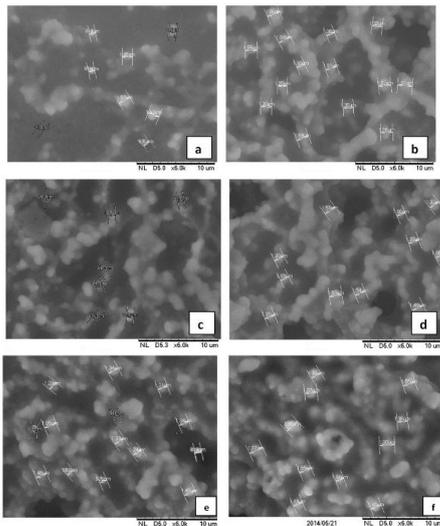
Untuk memperkecil ukuran partikelnya digunakan teknik sonikasi yaitu dengan menggunakan sonikator, pada penelitian ini menggunakan *bath sonicator*. Namun jika dibandingkan dengan tanpa menggunakan sonikasi, fitosom yang terbentuk dari metode tanpa sonikasi menghasilkan fitosom yang bagus sedangkan fitosom dengan metode sonikasi banyak mengalami kerusakan sehingga fitosom tidak terbentuk dengan baik. Banyaknya fitosom yang rusak atau tidak terbentuk, dikarenakan adanya panas yang ditimbulkan oleh sonikator. meskipun telah dilakukan pengaliran air untuk meminimalisir adanya panas yang ditimbulkan dari sonikator. Berdasarkan literatur menyebutkan bahwa penggunaan sonikator dapat menyebabkan lipid mengalami deesterifikasi sebesar 5% (Okhil, K. Nag dan Vibhudutta, Awasthi. 2013). Berdasarkan percobaan tersebut didapatkan metode yang paling optimum adalah metode pembuatan yang menggunakan magnetik stirer tanpa sonikasi.

E. Evaluasi dan Karakteristik Fitosom Ekstrak Pegagan

Evaluasi uji stabilitas menggunakan pendekatan uji stabilitas intermediate yaitu dengan penyimpanan didalam oven yang di atur pada suhu 30 °C selama 14 hari. Evaluasi uji parameter dilakukan pada minggu ke-0, ke-1 dan ke-2, kecuali pada parameter pH dilakukan setiap hari dari hari ke-1 hingga hari ke-14.

Evaluasi morfologi dan ukuran partikel fitosom ekstrak pegagan dilakukan dengan menggunakan alat *Scanning Electron Mycroscopy (SEM)* dengan kondisi operasi *accelerating voltage* sebesar 15000 volt, jarak pengamatan 6500 μm , *Emmision Current* sebesar 29500 nA, dan perbesaran 6000x.

Morfologi awal (pengamatan minggu ke-0) yang dihasilkan dari F1 dan F2 memiliki bentuk yang sama yaitu sferik, begitu pula pada minggu ke-1 hingga ke-2 menunjukkan hasil yang tetap sama. Pada gambar 3 terlihat beberapa partikel membentuk flokulasi baik pada minggu ke-0, ke-1 maupun minggu-2, namun batas antara partikel yang satu dengan yang lain masih terlihat jelas. Selain visualisasi morfologi dilakukan pengukuran diameter partikel yang terbentuk yang kemudian dilakukan pengujian dengan menggunakan ANOVA untuk melihat kestabilan ukuran partikel selama penyimpanan.



Gambar 3. Visualisasi Fitosom Ekstrak Pegagan Selama Penyimpanan. Formula 1: a. Minggu ke-0, c. Minggu ke-1, e. Minggu ke-2, dan Formula 2: b. Minggu ke-0, d. Minggu ke-1, e. Minggu ke-2.

Pada masing-masing formula terdapat beberapa ukuran partikel yang tidak seragam yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu penggunaan magnetik stirer untuk pencampurannya. Pada banyak penelitian penggunaan alat pencampur yang biasanya digunakan yaitu menggunakan *High Pressure Homogenizer* sehingga fitosom yang dihasilkan akan seragam ukuran partikelnya. Sedangkan pada penggunaan magnetik stirer sebagai alat pencampur, magnetik yang ada didalam wadah kurang menjangkau disetiap sudut wadah (gelas kaca) tempat fitosom saat pencampuran, sehingga partikel fitosom yang terbentuk masih terdapat beberapa yang berukuran partikel diluar rentang (0,081-0,0988 nm).

Pada gambar 3. menunjukkan bahwa rata-rata ukuran partikel yang dihasilkan antara F1 dengan F2 berbeda secara signifikan, pada F1 menunjukkan rata-rata ukuran partikel 0,081-0,0988 μm (81 nm-98,8 nm) sedangkan F2 memiliki rata-rata ukuran partikel 1,13- 1,59 μm . Didukung dengan hasil spss yang menunjukkan bahwa nilai signifikasinya sebesar 0,000.

Berdasarkan rata-rata ukuran partikel tersebut fitosom yang dihasilkan dari formula 1 dapat digolongkan kedalam *Small Unilamellar Vesicle* (SUV) sedangkan formula 2 dapat digolongkan kedalam *Multilamellar Vesicle* (MUV). Perbedaan ukuran partikel antar kedua formula dikarenakan adanya penambahan kolesterol pada formula 2 yang menyebabkan ikatan antara fosfolipid (lesitin) berikatan kuat dengan kolesterol dan menjerap banyak solut. Pada penelitian sebelumnya menyatakan bahwa seiring dengan penambahan konsentrasi kolesterol dalam formulasi fitosom maka ukuran partikel fitosom juga akan mengalami peningkatan (Jain N., Gupta BP., & Thakur N 2010). Penambahan kolesterol juga meningkatkan konsistensi dari fitosom, hal ini dikarenakan struktur kolesterol yang memiliki cincin yang bergabung pada posisi trans yang membuat molekul menjadi planar dan rigid sehingga fitosom yang dihasilkan lebih kaku (Okhil, K. Nag dan Vibhudutta, Awasthi. 2013).

Tabel 2. Ukuran Partikel Fitosom Ekstrak Pegagan Selama Penyimpanan

Formula 1			
Minggu ke-	0	1	2
Ukuran Partikel	0,0819	0,0909	0,0932
	0,081	0,0811	0,0841
	0,0932	0,0841	0,0819
	0,0988	0,0841	0,0988
	0,0819	0,081	0,0925
Rata-rata	0,08736	0,08424	0,0901
SD	0,008140209		0,004023431
	0,006969577		

Formula 2			
Minggu ke-	0	1	2
Ukuran Partikel	1,22	1,3	1,32
	1,32	1,59	1,57
	1,56	1,31	1,4
	1,5	1,13	1,19
	1,39	1,49	1,56
Rata-rata	1,398	1,364	1,408
SD	0,136455121		0,179387848
	0,161771444		

Selama penyimpanan baik formula 1 maupun formula 2 tidak menunjukkan adanya perubahan morfologi dan ukuran partikel secara signifikan. Hal ini didukung dengan uji statistik ANOVA yang telah dilakukan yaitu nilai signifikansinya sebesar 0,406 untuk formula 1 dan 0,902 untuk formula 2, dimana nilai tersebut >0.05 jadi dapat disimpulkan bahwa untuk rata-rata ukuran partikel selama penyimpanan tidak mengalami perubahan atau konstan.

Pengamatan pH dilakukan mulai hari ke-1 hingga hari ke-14. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui pengaruh pH dari fitosom ekstrak pegagan dan kestabilannya selama dalam penyimpanan. Stabilitas pH seluruh sampel yang dibuat dengan formula yang berbeda, menunjukkan variasi nilai pH dari masing-masing formula (tabel 3 dan 4). berdasarkan data tersebut diketahui

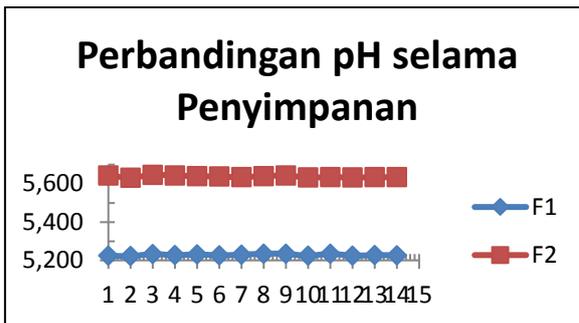
bahwa pH pada awal pengamatan (hari ke-1) yang dihasilkan dari F1 lebih rendah dibandingkan dengan F 2, begitu pula pada hari ke-2 hingga hari ke-14 pH tetap sama seperti pada saat awal pengamatan. Berikut merupakan data hasil pengamatan pH selama hari ke-1 hingga hari ke-14 :

Tabel 3. Hasil Pengamatan Terhadap pH Fitosom Ekstrak Pegagan Formula 1 (F1) selama Penyimpanan

Hari ke-	Replikasi			Rata-rata	SD
	1	2	3		
1	5,225	5,224	5,226	5,225	0,001
2	5,223	5,221	5,222	5,222	0,001
3	5,234	5,232	5,233	5,233	0,001
4	5,229	5,227	5,225	5,227	0,002
5	5,231	5,230	5,233	5,231	0,001528
6	5,226	5,228	5,225	5,226	0,001528
7	5,229	5,230	5,231	5,230	0,001
8	5,232	5,235	5,234	5,234	0,002082
9	5,235	5,237	5,231	5,234	0,003055
10	5,228	5,221	5,224	5,224	0,003512
11	5,233	5,236	5,234	5,234	0,001528
12	5,225	5,223	5,227	5,225	0,002
13	5,227	5,226	5,229	5,227	0,001528
14	5,229	5,225	5,226	5,227	0,002082

Tabel 4. Hasil Pengamatan Terhadap pH Fitosom Ekstrak Pegagan Formula 2 (F2) selama Penyimpanan

Hari ke-	Replikasi			Rata-rata	SD
	1	2	3		
1	5,641	5,645	5,643	5,643	0,002
2	5,632	5,632	5,632	5,632	0,000
3	5,649	5,647	5,644	5,647	0,003
4	5,641	5,644	5,643	5,643	0,002
5	5,640	5,640	5,640	5,640	0,000
6	5,639	5,636	5,637	5,637	0,002
7	5,635	5,634	5,636	5,635	0,001
8	5,640	5,640	5,640	5,640	0,000
9	5,641	5,644	5,642	5,642	0,002
10	5,635	5,632	5,634	5,634	0,002
11	5,637	5,632	5,635	5,635	0,003
12	5,633	5,631	5,635	5,633	0,002
13	5,634	5,636	5,633	5,634	0,002
14	5,634	5,633	5,635	5,634	0,001

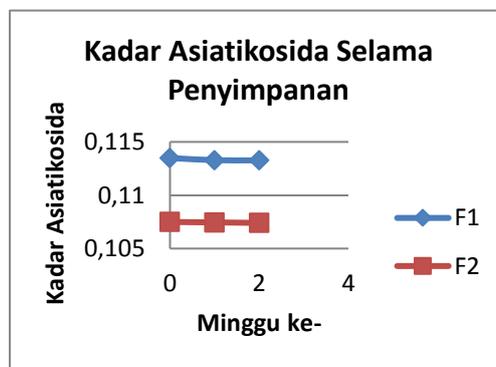


Gambar 4. Grafik Perbandingan pH antara Hari ke-1 hingga Hari ke-14 pada Masing-masing Formula

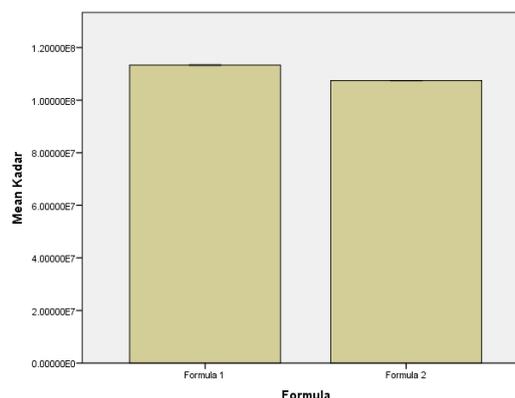
pH merupakan salah satu parameter fisika (faktor) yang dapat menyebabkan ketidak stabilan fitosom. pH formula 2 lebih tinggi dibandingkan dengan pH formula 1, dan terdapat perbedaan secara signifikan saat diuji dengan ANOVA. Berdasarkan evaluasi uji selama penyimpanan pH masing-masing formula mengalami fluktuasi hal ini dikarenakan tidak adanya penambahan buffer dalam formula fitosom. Tidak ditampakkannya buffer dalam formula karena peneliti masih ingin mengetahui pH yang dihasilkan oleh masing-masing formula tanpa adanya intervensi buffer baik pada awal pengamatan (hari ke-0) hingga akhir pengamatan (hari ke-14). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pH yang terukur selama 14 hari terjadi perubahan yang signifikan sehingga penambahan buffer perlu dipertimbangkan agar pH fitosom tetap dipertahankan sesuai spesifikasi yang diinginkan. Penetapan pH dilakukan karena pH fitosom ekstrak pegagan yang dihasilkan akan mempengaruhi efek terapi dan pemilihan

komponen penyusun cangkang karena ada beberapa bahan yang dapat terionisasi atau tidak stabil pada pH tertentu seperti natrium deoksi kolat.

Evaluasi kadar dilakukan untuk mengetahui jumlah asiaticosida yang terkandung didalam fitosom selama penyimpanan, dianalisa dengan menggunakan LC MS-MS. Metode pemisahan didasarkan pada perbedaan berat molekul.



Gambar 5. Grafik Perbandingan Kadar Asiatikosida Selama Penyimpanan



Gambar 6. Perbandingan Kadar Asiatikosida

Penentuan dan evaluasi kadar senyawa aktif dalam fitosom merupakan salah satu parameter yang penting untuk

dilakukan karena kadar yang ada dalam fitosom menggambarkan dosis fitosom yang akan memberikan efek terapi. Selain itu diperlukan evaluasi kadar suatu fitosom selama penyimpanan, apakah mengalami penurunan kadar. Sehingga pada penelitian ini penyimpanan dilakukan selama 14 hari dan disimpan pada suhu 30 °C. Sebelum dilakukan analisa area dari fitosom ekstrak pegagan maka dilakukan pembuatan kurva baku (linieritas) dimana kurva baku tersebut dibuat dengan 5 konsentrasi larutan standard (400, 600, 800, 1000, 2000, 4000 ppm). Pada penelitian ini persamaan kurva baku yang didapatkan adalah $Y = 123,68x - 343,75$ dengan $R^2 = 0,9992$. Dari persamaan tersebut dapat menentukan konsentrasi yang terukur oleh LC MS-MS yang didasarkan pada luas area yang terdeteksi. Berdasarkan perhitungan kadar diketahui bahwa kadar asiatikosida baik dari F1 dan F2 menghasilkan perbedaan kadar yang signifikan hal ini dibuktikan dari hasil uji statistik yang menunjukkan bahwa nilai signifikansi antara formula 1 dan formula 2 sebesar 0,000 ($<0,005$). Selain dari hasil perbandingan kadar kedua formula, dari perbandingan kadar pada saat awal pengamatan (minggu ke-0) hingga minggu ke-2, menunjukkan bahwa adanya penurunan kadar pada F1 dan F2 artinya kadar asiatikosida didalam fitosom selama penyimpanan tidak stabil. Berikut kadar F1 selama penyimpanan berturut-turut

0,1134993118 mg/50 mg (minggu ke-0), 0,113286528 mg/50 mg (minggu ke-1) dan 0,113271046 mg/50 mg. Sedangkan pada F2 juga mengalami penurunan kadar berturut-turut 0,107493519 mg/50mg (minggu ke-0), 0,107450733 (minggu ke-1), 0,107404451 (minggu ke-2). Kadar yang terdeteksi pada F1 lebih tinggi dibandingkan dengan kadar yang terdeteksi pada F2 hal ini dapat disebabkan oleh pengaruh penambahan kolesterol yang dapat mengikat kuat komponen senyawa sehingga saat preparasi pelarutan sampel tidak semua senyawa ikut terlarut dalam pelarut. Meskipun terdapat penurunan, kadar yang didapatkan formula 1 sebesar 0,226% dan formula 2 sebesar 0,215% telah sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa kadar asiatikosida yang didapatkan dari tanaman pegagan yang tersebar di Indonesia sebesar 0,15-1,49% (Mora, E dan Fernando, A. 2012). Selain itu penurunan kadar asiatikosida bisa juga disebabkan karena adanya reaksi hidrolisis asiatikosida yang berubah menjadi asam asiatik. Pada penelitian Borhan *et al* 2013 pada asiatikosida menunjukkan bahwa asiatikosida dapat terhidrolisis menjadi asam asiatik pada kondisi asam, dimana pada penelitian ini pH yang dihasilkan fitosom berkisar antara 5,2-5,6 yang cenderung bersifat asam sehingga terdapat potensi untuk terjadinya hidrolisis pada asiatikosida.

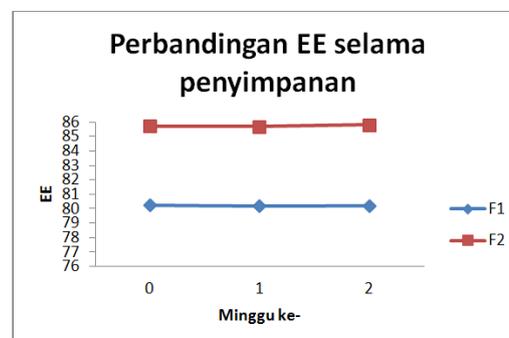
Entrapment Efficiency merupakan salah satu parameter dalam menentukan stabilitas fisik suatu fitosom untuk mengetahui kekuatan cangkang fitosom dalam mempertahankan kadar asiatikosida yang ada didalamnya. Penentuan kadar EE dengan melakukan beberapa hal, yaitu sentrifugasi yang berfungsi sebagai kekuatan dari luar yang dapat merusak cangkang fitosom. Sentrifugasi dilakukan pada 2500 rpm selama 15 menit, kemudian dilakukan pengukuran kadar dengan menggunakan LC MS-MS. EE didapatkan dari perbandingan kadar total yang terukur dibandingkan dengan kadar yang masih terjerap oleh fitosom. Jadi semakin banyak kadar yang terukur setelah sentrifugasi menggambarkan ketidak mampuan cangkang suatu fitosom dalam mempertahankan senyawa yang ada didalamnya. Nilai EE yang didapatkan pada formula 1 berturut-turut 80,26595% (minggu ke-0), 80,19525% (minggu ke-1), 80,23034% (minggu ke-2), sedangkan pada formula 2 didapatkan nilai EE sebesar 85,73451% (minggu ke-0), 85,69873% (minggu ke-1), 85,81854% (minggu ke-2). Jika dilihat dari gambar 7. EE kedua formula tetap konstan mulai dari minggu ke-0 hingga minggu ke-2. Sedangkan EE antara formula 1 dan formula 2 terdapat perbedaan namun kedua EE yang dihasilkan masih dalam batas rentang penerimaan nilai EE yang telah ditetapkan yaitu 80-100%, dimana

kriteria tersebut ditetapkan berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya. Sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan kolesterol dapat meningkatkan EE pada fitosom ekstrak pegagan.

Tabel 5. *Entrapment Efficiency* Fitosom Ekstrak Pegagan Selama Penyimpanan

Minggu ke-	Label Formula	rata-rata kadar sampel mg/5ml	%EE
0	F1	0,113493118	80,26595
	F1'	0,022396788	
	F2	0,107493519	
1	F2'	0,015334476	85,73451
	F1	0,113286528	
	F1'	0,022436112	
2	F2	0,107450733	85,69873
	F2'	0,015366822	
	F1	0,113271046	
	F1'	0,022393297	80,23034
	F2	0,107404451	
	F2'	0,015231515	

Keterangan : F1' merupakan F1 yang diberikan perlakuan sentrifugasi, F2' merupakan F2 yang diberikan perlakuan sentrifugasi



Gambar 7. Grafik Perbandingan Kadar Asiatikosida Selama Penyimpanan

KESIMPULAN

1. Penambahan kolesterol dapat meningkatkan ukuran partikel fitosom ekstrak pegagan secara signifikan, meningkatkan *entrapment efficiency* fitosom ekstrak pegagan, meningkatkan pH fitosom ekstrak

pegagan namun menurunkan kadar asiatikosida didalam fitosom.

2. Fitosom ekstrak pegagan yang dihasilkan dengan penambahan kolesterol berbentuk sferik dengan ukuran partikel antara 1,13- 1,59 μm , entrapment efficiency sebesar $\pm 85\%$, pH sebesar $\pm 5,6$ dan kadar asiatikosida sebesar 0,215%.

KEPUSTAKAAN

Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. (2013). Dokumentasi Ramuan Etnomedisin Obat Asli Indonesia. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.

Borhan, M.Z., Ahmad, R., & Abdullah, S. (2013). Green Extraction: Enhanced Extraction Yield of Asiatic Acid from *Centella asiatica* (L.) Nanopowders. *Journal of Applied Chemistry*. Volume (10) : 1-7

Chaturvedi, M., Manish, K., Amit, S., & Alimuddin, S. (2011). Recent development in novel drug delivery systems of herbal drugs. *International Journal of Green Pharmacy*. Edisi April-Juni : 87-95.

Jain N., Gupta BP., & Thakur, N. (2010). Phytosome: A Novel Drug Delivery System for Herbal Medicine. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. Volume 2(4): 224-228.

Kareparamban, J., Pravin, N., & Jadhav. (2012). Phytosome : Novel Revolution in Herbal Drugs. *International Journal of Research in pharmacy and Chemistry*. Volume 2 (2): 299-310.

Mora, E. & Fernando, A. (2012). Optimasi Ekstraksi Triterpenoid Total Pegagan (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) yang Tumbuh di Riau. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*

1(1), September 2012: 11-16. ISSN 2302-187X.

Okhil, K. & Vibhudutta, A. (2013). Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior. *Pharmaceutic*. Volume (5) : 542-569

Reniza, & Afrina, W. (2003). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Asiatikosida dari Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai Senyawa Antibakteri. Skripsi. Program Studi Biokimia Jurusan Kimia : Institut Pertanian Bogor.

Siswanto, S., Susila, & Suyanto. (2015). Metodologi Penelitian Kesehatan dan Kedokteran. Yogyakarta: Bursa Ilmu.

Wagner, H., & Bladt, S., (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. New York: Springer-Verlag.

World Health Organization. (1999). *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants Volume 1*. Geneva : World health Organization.