

KK
KK8
CP. 11/12
KUS
P

LAPORAN AKHIR

Judul Penelitian yang Diusulkan

**Pemanfaatan Teknologi Phytosome
untuk meningkatkan bioavailabilitas produk obat herbal**

PROGRAM INSENTIF RISET TERAPAN

No. Pendaftaran On-Line : RT-2011-0525

Fokus Bidang Prioritas :

2 .Teknologi Kesehatan dan Obat

Kode Produk Target :

2.04 Obat herbal dari tanaman Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto untuk pengobatan sindrom metabolit dan penyakit lainnya.

2.04.07 Pengembangan teknologi ekstrak terstandar dari tanaman obat (temulawak, jahe, kencur, pegagan dan sambiloto) untuk memenuhi kebutuhan bahan baku ekstrak

Kode Kegiatan : RT (Insentif Riset Terapan)

Peneliti Utama : Dr. Idha Kusumawati, S.Si., M.Si

Lembaga penelitian dan Pengabdian Masyarakat
Universitas Airlangga

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo surabaya 60115

031-5995246-48/081331378831/031-5962066/

lpunair@rad.net.id

25 Oktober 2011

Lembar Pengesahan

Judul Penelitian : Pemanfaatan Teknologi Phytosome untuk meningkatkan bioavailabilitas produk obat herbal

Fokus Bidang Prioritas :

1. Ketahanan pangan
2. Sumber energi baru dan terbarukan
3. Teknologi dan manajemen transportasi
4. Teknologi informasi dan komunikasi
5. Teknologi pertahanan dan keamanan
6. Teknologi kesehatan dan obat

Lokasi Penelitian: Universitas Airlangga

Keterangan Lembaga Pelaksana/Pengelola Penelitian	
A. Lembaga Pelaksana Penelitian	
Nama Koordinator/Peneliti Utama	Dr. Idha Kusumawati, S.Si., Apt., M.Si
Nama Lembaga/Institusi	LPPM
Unit Organisasi	Universitas Airlangga
Alamat	Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115
Telepon/HP/Faksimile/email	031-5995246-48/081331378831 /031-5962066/ lpunair@rad.net.id
B. Lembaga lain yang terlibat (dapat lebih dari satu)	
Nama Pimpinan	-
Nama Lembaga	-
Alamat	-
Telepon/Faksimile/e-mail	-

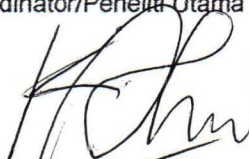
Jangka waktu kegiatan : 2 tahun
 Biaya Tahun I : Rp. 241.415.000,-
 Total Biaya : Rp. 429.415.000,-
 Kegiatan (baru / lanjutan) : baru

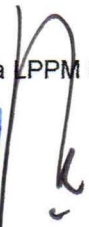
Rekapitulasi Biaya Tahun yang Diusulkan

No.	Uraian	Jumlah (Rp)
1.	Gaji dan Upah	43.415.000,-
2.	Bahan Habis Pakai	221.450.000,-
3.	Perjalanan (tidak untuk perjalanan luar negeri)	7.000.000,-
4.	Lain-Lain	17.000.000,-
	Jumlah biaya tahun yang diusulkan	221.415.000,-

Koordinator/Peneliti Utama

Ketua LPPM Unair


 Dr. Idha Kusumawati, S.Si., Apt., M.Si
 NIP. 130541815


 Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MS
 NIP. 19590805 198701 1 001



Daftar Isi

	hal
Halaman depan.....	i
Halaman pengesahan.....	ii
Summary report.....	iii
Pendahuluan.....	1
1. Latar belakang	5
2. Ruang lingkup dan batas-batas penelitian.....	5
3. Tujuan Penelitian.....	5
4. Manfaat Penelitian.....	6
5. Tahapan Penelitian.....	6
6. Perumusan Masalah.....	6
Metodologi.....	8
1. Bahan	8
2. Alat	8
3. Tahapan Penelitian.....	8
3.1. Tahun II.....	8
3.1.1. Formulasi Produk Analgesik Oral.....	8
3.1.2. Formulasi Produk Analgesik Topikal.....	8
3.1.3. Validasi Metode Penentuan Kadar Apms/Epms	8
3.1.4. Uji Pelepasan senyawa marker.....	9
Hasil Yang Diperoleh	10
1. Formulasi Sediaan Analgesik Oral.....	10
2. Formulasi Sediaan Analgesik Topikal.....	10
3. Optimasi Metode Penetapan Kadar Apms Dalam Darah Kelinci.....	11
4. Penentuan Parameter Bioavailabilitas.....	13
5. Uji Penetrasi Bahan Aktif Sediaan Topikal In Vivo.....	18
6. Irisan Histologi Melintang	19
7. Karakterisasi permukaan lapisan Stratum corneum.....	21
KESIMPULAN.....	28

Summary Report

Sebagian besar senyawa aktif dari obat herbal merupakan senyawa dengan struktur yang besar sehingga menyebabkan rendahnya absorpsi senyawa-senyawa ini. Juga diketahui bahwa senyawa-senyawa aktif dalam herbal pada umumnya memiliki kelarutan yang rendah di dalam lemak. Untuk itu diperlukan suatu teknologi yang dapat meningkatkan absorpsi dan kelarutannya dalam lemak sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas senyawa-senyawa yang ada di dalam ekstrak atau produk herbal.

Teknologi Phytosome atau Liposom adalah suatu teknologi pembentukan kompleks antara senyawa-senyawa di dalam ekstrak dengan fosfolipid. Dengan teknologi phytosome/liposom, molekul hidrofilik senyawa menjadi hidrofobik sehingga dapat mempermudah proses penembusan lapisan membran bagian luar dari sel-sel dalam saluran pencernaan, sehingga dapat mudah masuk ke peredaran darah.

Fosfolipid yang umum digunakan adalah fosfatidilkolin yang larut dalam fasa air dan lemak dan absorpsinya sangat baik bila diberikan secara oral. Analisis kimia menunjukkan bahwa unit phytosome biasanya terdiri dari satu molekul senyawa dalam herbal berikatan dengan setidaknya satu senyawa fosfatidilkolin. Ikatan kedua molekul ini sangat larut dalam lemak sehingga mudah menembus lapisan membran bagian luar sel-sel saluran pencernaan sehingga dapat masuk ke dalam peredaran darah. Dalam beberapa penelitian telah terbukti bahwa dengan menggunakan teknologi phytosome, produk dapat diabsorpsi dengan lebih baik dan mempunyai efikasi yang lebih tinggi. Sedangkan teknologi liposom adalah mengkombinasikan fosfatidilkolin dengan lipid lain seperti kolesterol untuk meningkatkan stabilitasnya.

Pada tahun pertama riset ini, telah berhasil dikembangkan suatu bahan aktif obat analgesik untuk pemakaian oral maupun topical dari ekstrak kencur dengan menggunakan teknologi phytosom dan liposom. Dari ekstrak kencur telah dibuat beberapa macam bahan aktif yaitu ekstrak (E = rimpang kencur yang diekstraksi dengan alkohol), minyak atsiri (MA), isolat EPMS (etil p-metoksi sinamat) dan isolat APMS (asam p-metoksi sinamat). Masing-masing bentuk ini dibuat digunakan dalam bentuk awalnya, bentuk phytosomnya dan bentuk liposomnya. Untuk pemakaian peroral, pengujian bioaktivitasnya dilakukan dengan cara writhing test dengan kontrol obat pembanding paracetamol. Dan hasilnya menunjukkan bahwa untuk pemakaian peroral ekstrak kencur dalam bentuk phytosom menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan aktivitas paracetamol, sedangkan aktivitas EPMS dalam bentuk phytosom menunjukkan aktivitas yang terbaik dibandingkan keduanya. Hasil kesimpulan sementara adalah untuk sediaan peroral lebih baik digunakan EPMS dalam bentuk phytosom daripada ekstrak kencur dalam bentuk phytosom.

Untuk pemakaian topical juga dilakukan dengan metode writhing test dengan obat pembanding menggunakan counterpain dan voltaren. Hasil sementara sampai saat ini, menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kencur dalam bentuk phytosom menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan obat pembanding counterpain dan voltaren, sementara untuk bentuk liposom dalam

tahap pengerjaan untuk karakterisasi dan uji bioaktivitasnya. Dari hasil sementara tahun pertama, terlihat suatu potensi dari EPMS untuk dapat dibuat sediaan analgesic oral dalam bentuk phytosom yang mempunyai aktivitas yang lebih baik dibandingkan obat pembanding paracetamol. EPMS sangat mudah diisolasi dari kencur dengan jumlah rendemen yang besar sehingga potensi ini menjadi suatu yang sangat penting untuk dikembangkan. Begitu juga dengan potensi ekstrak kencur phytosom sebagai analgesic topical, yang tentunya dapat dikembangkan dalam bentuk krim/gel maupun dalam bentuk aerosol seperti yang banyak digunakan oleh para atlet.

Pada akhir penelitian tahun pertama berhasil ditentukan bahan aktif dari kencur yang mempunyai potensi besar (aktivitas lebih baik dibandingkan dengan obat pembanding) untuk dikembangkan dalam bentuk formula obat analgesic oral dan topical pada tahun berikutnya. Pada tahun kedua dilakukan formulasi baik untuk sediaan peroral maupun topical, melakukan karakterisasi formula yang dibuat dan melakukan pengujian pelepasan bahan aktif (bioavailabilitas untuk sediaan oral dan penetrasi untuk sediaan topical) dari beberapa formula terpilih. Sehingga diperoleh suatu formula yang siap untuk diproduksi dan diadopsi oleh industri.

Tujuan akhir penelitian yang dikerjakan dalam waktu 2 tahun ini adalah untuk mengangkat potensi tanaman obat Indonesia menjadi produk herbal dengan menggunakan teknologi phytosome dan membuktikan secara ilmiah efikasi dan safety-nya.

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan landasan ilmiah tentang pengembangan produk bahan obat yang berasal dari tanaman Indonesia khususnya yang berasal dari rimpang kencur dengan senyawa marker etil-parametoksisinamat (EPMS) untuk sediaan oral dan APMS (asam parametoksisinamat) untuk sediaan topikal, sehingga akan diperoleh produk yang mempunyai efikasi dan safety yang lebih baik, sebab teknologi phytosome dapat menjamin penghantaran senyawa-senyawa yang ada dalam produk sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas dari produk.

Hasil penelitian tahun kedua telah berhasil dilakukan validasi penentuan kadar APMS dalam daah kelinci. Pada kromatogram, peak apms terlihat pada Rf 0,4 yang selanjutnya akan dibuktikan kecocokan spektranya dengan spectra peak apms standart. Korelasi spectra amps dalam darah dan apms standart adalah 0,97. Hasil perolehan kembali atau % recovery berkisar antara 89 – 95% dengan presisi menunjukkan 0.22 %. Pada penentuan parameter bioavailabilitas menunjukkan bahwa Cmaks, tmaks dan AUC bentuk fitosom lebih besar dan lebih cepat dibandingkan dengan bentuk bebasnya.

Pada uji penetrasi dengan menggunakan sediaan histology dari kulit tikus yang sudah diolesi dengan sampel menunjukkan bahwa pada lapisan stratum corneum dari irisasi kulit tikus dengan pewarnaan HE terlihat adanya lekukan-lekukan ke dalam yang menunjukkan masuknya gel ke dalam melalui lekukan-lekukan tersebut. Juga terlihat bahwa ketebalan stratum corneum meningkat setelah diberi perlakuan. Hal ini disebabkan masuknya fase air dari gel dan sehingga memudahkan masuknya bahan aktif ke lapisan yang lebih dalam.

Pada pemberian sampel, pada susunan stratum corneum terlihat merenggang dan berbentuk lubang-lubang atau pore. Tampaknya bentuk fitosom

atau liposom menyebabkan lapisan stratum corneum menjadi lebih permeabel sehingga memungkinkan masuknya gel sampel menjadi lebih mudah ke lapisan yang lebih dalam. Hasil yang ditunjukkan dari gambar histologi irisan melintang kulit dan gambar karakterisasi lapisan stratum corneum menunjukkan hasil yang saling mendukung. Yang dapat disimpulkan bahwa bentuk fitosom atau liposom membantu penetrasi bahan aktif sehingga lebih mudah untuk masuk ke lapisan yang lebih dalam.

Pendahuluan

1. Latar belakang

Pengolahan dan diversifikasi produk tanaman obat akan meningkatkan nilai jualnya. Pengembangan dari simplisia menjadi ekstrak terstandart, lalu menjadi fraksi aktif bahkan pada isolat senyawa aktif yang kemudian dengan teknologi terbaru menjadi suatu produk yang disebut "*phytosome*" atau "liposom" tentunya akan lebih meningkatkan nilai jual dari produk tanaman obat. Hal ini terlihat dari adanya nilai tambah rimpang menjadi simplisia mencapai 7 - 15 kali dan pengolahan menjadi ekstrak mencapai 80 - 280 kali [1]. Dan apabila Indonesia juga mampu menyediakan ekstrak dalam bentuk *phytosome*/liposom, yang dilandasi bukti ilmiah, tentunya akan dapat menjadi salah satu negara penyedia bahan baku obat herbal yang sejajar dengan India dan China sehingga meningkatkan nilai ekspor negara.

Phytosome merupakan bentuk produk tanaman obat terbaru yang dapat diabsorpsi lebih baik dan lebih berkhasiat dibandingkan ekstrak tanaman obat yang konvensional. Dalam bentuk *phytosome*, kandungan bahan aktif tanaman diselubungi oleh fosfolipida alami seperti soy fosfolipida, sehingga kandungan bahan aktif dalam ekstrak tanaman dapat terlindungi dari kerusakan oleh sekresi pencernaan dan bakteri dalam usus. *Phytosome* dapat bertransisi dari lingkungan yang hidrofilik ke dalam lingkungan yang lebih hidrofobik dari membrane sel, kemudian akan masuk ke dalam aliran darah [2].

Penelitian tentang *Phytosome* telah membuktikan bahwa *phytosome* diabsorpsi dengan lebih baik di saluran pencernaan dan memberikan efek klinis yang lebih baik pula. Teknologi ini merupakan terobosan baru untuk meningkatkan bioavailabilitas dan efek klinisnya karena mampu menjamin bahan aktif sampai ke jaringan [3].

Kencur merupakan salah satu dari empat tanaman obat yang paling banyak dipakai di Industri Obat Tradisional sehingga keberhasilan penelitian ini akan dapat meningkatkan nilai jual dari tanaman ini, sekaligus dapat memperbesar peluang untuk mendapatkan paten riset (HAKI) sebab penerapan teknologi

phytosom/liposom pada tanaman obat Indonesia merupakan hal yang baru. Kencur juga merupakan tanaman dari famili Zingiberaceae yang sangat mudah dibudidayakan sehingga keberhasilan penelitian ini tentu akan dapat meningkatkan komoditas pertanian dari tanaman ini [1].

Rimpang kencur yang mengandung minyak atsiri banyak digunakan untuk expectorant, headache, toothache, abdominal pain, carminative, rheumatism dan tonics. Lotion atau liniment-nya banyak digunakan untuk swelling dan muscular rheumatism [4,5,6]. Ekstrak etanol kencur juga mampu menurunkan aktivitas motorik dan kecepatan pernafasan serta menunjukkan aktivitas analgesik, hal ini menunjukkan aktivitasnya sebagai CNS depresan [7]. Pada riset sebelumnya juga diketahui bahwa ekstrak etanol mempunyai aktifitas analgesic per oral yang setara dengan 60% aktivitas analgesic dari morphin [8]. Pada penelitian yang telah dilakukan ekstrak etanol 50% kencur menunjukkan aktivitas analgesik, dengan metode writhing test, yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak etanol 70% atau ekstrak etanol 96% dan ekstrak air dengan kadar EPMS yang setara [9].

Pada uji toksisitas akut yang dilakukan pada tahun pertama, penggunaan oral dengan dosis 5 g/kg ekstrak rimpang kencur tidak menunjukkan kematian dan juga tidak menunjukkan perbedaan pada berat badan, berat organ, perubahan histopatologis pada hewan coba kontrol dan yang diberi perlakuan. Pada uji toksisitas sub akut, ekstrak ethanol rimpang kencur dengan dosis 25, 50 or 100 mg/kg yang diberikan secara oral selama 28 hari, tidak menunjukkan perbedaan dengan control pada berat badan, berat organ, analisa hematologi dengan parameter WBC count, platelet, hematocrit dan hemoglobin estimation, kimia darah dengan parameter glucose, creatinine, blood urea nitrogen (BUN), aspartate transami-nase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (Alk-P), total protein and albumin, perubahan histopatologi. Pada pengujian dermal irritation test yang telah dilakukan, ekstrak kencur tidak menimbulkan iritasi [10].

Pada tahun pertama riset ini, telah berhasil dikembangkan suatu bahan aktif obat analgesik untuk pemakaian oral maupun topical dari ekstrak kencur dengan menggunakan teknologi phytosom dan liposom. Dari ekstrak kencur telah dibuat beberapa macam bahan aktif yaitu ekstrak (E = rimpang kencur yang diekstraksi dengan alkohol), minyak atsiri (MA), EPMS (isolat etil p-metoksi

sinamat) dan APMS (isolat asam p-metoksi sinamat). Masing-masing bentuk ini digunakan dalam bentuk awalnya, bentuk phytosomnya dan bentuk liposomnya. Untuk pemakaian peroral, pengujian bioaktivitasnya dilakukan dengan cara writhing test dengan kontrol obat pembanding paracetamol. Dan hasilnya menunjukkan bahwa untuk pemakaian peroral ekstrak kencur dalam bentuk phytosom menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan aktivitas paracetamol, sedangkan aktivitas EPMS dalam bentuk phytosom menunjukkan aktivitas yang terbaik dibandingkan keduanya. Hasil kesimpulan sementara adalah untuk sediaan peroral lebih baik digunakan EPMS dalam bentuk phytosom daripada ekstrak kencur dalam bentuk phytosom. Untuk pemakaian topical juga dilakukan dengan metode writhing test dengan obat pembanding menggunakan counterpain dan voltaren. Hasil sementara sampai saat ini, menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kencur dalam bentuk phytosom menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan obat pembanding counterpain dan voltaren, sementara untuk bentuk liposom dalam tahap pengerjaan untuk karakterisasi dan uji bioaktivitasnya.

Dari hasil sementara tahun pertama, terlihat potensi dari EPMS untuk dapat dibuat sediaan analgesik oral dalam bentuk phytosom yang mempunyai aktivitas yang lebih baik dibandingkan obat pembanding paracetamol. EPMS sangat mudah diisolasi dari kencur dengan jumlah rendemen yang besar sehingga potensi ini menjadi suatu yang sangat penting untuk dikembangkan. Khususnya apabila diformulasikan bersama dengan herbal lain yang memerlukan analgesic dalam terapi seperti OHT untuk hemorrhoid dan OHT untuk menurunkan kadar asam urat dalam darah. Pada uji klinik OHT untuk hemorrhoid, ekstrak kencur diformulasikan dengan ekstrak Daun Ungu, sedangkan pada Uji klinik untuk menurunkan kadar asam urat, ekstrak kencur diformulasikan dengan ekstrak Daun Salam. Hasil riset membuktikan bahwa pasien tidak membutuhkan tambahan analgesic selama menggunakan OHT tersebut [11, 12]. Analgesik oral dari kencur ini juga memungkinkan untuk penggunaan dalam terapi jangka panjang seperti pada pasien kanker sebab terbukti bahwa dalam uji toksisitas sub akut atau penggunaan jangka panjang tidak menunjukkan toksisitas. Begitu juga dengan potensi ekstrak kencur phytosom sebagai analgesic topical, yang tentunya dapat

dikembangkan dalam bentuk krim/gel untuk penderita arthritis maupun dalam bentuk aerosol seperti yang banyak digunakan oleh para atlet.

Pemanfaatan teknologi phytosome secara nyata telah dibuktikan pada berbagai ekstrak herbal dapat meningkatkan bioavailabilitas senyawa-senyawa yang ada di dalam ekstrak, menjamin penghantaran senyawa-senyawa tersebut sehingga dapat lebih menjamin efektifitasnya. Sampai saat ini teknologi phytosome banyak diterapkan untuk senyawa-senyawa berjenis flavonoid, namun untuk itu penelitian ini akan dilakukan pada rimpang kencur dengan senyawa markernya etil para metoksi sinamat (EPMS) yang juga mempunyai sifat-sifat yang hampir sama dengan flavonoid yaitu sulit diabsorpsi sehingga bioavailabilitasnya menjadi rendah dan efektifitasnya pun tidak menentu. Untuk itu pada tahun kedua akan dilakukan formulasi baik untuk sediaan peroral maupun topical, melakukan pengujian pelepasan bahan aktif (bioavailabilitas dan atau penetrasinya) dari beberapa formula terpilih. Sehingga dengan pengujian ini akan diketahui besarnya kadar senyawa marker yang mampu dilepaskan dari produk dan untuk sediaan topical akan diketahui seberapa jauh penetrasinya ke dalam lapisan kulit. Dari hasil riset tahun kedua ini akan diperoleh suatu formula yang dapat dijamin efektifitasnya dan siap untuk diproduksi dan diadopsi oleh industri.

Tujuan akhir penelitian yang dikerjakan dalam waktu 2 tahun ini adalah untuk mengangkat potensi tanaman obat Indonesia menjadi produk herbal dengan menggunakan teknologi phytosome dan membuktikan secara ilmiah efikasi dan safety-nya. Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan landasan ilmiah tentang pengembangan produk bahan obat yang berasal dari tanaman Indonesia khususnya yang berasal dari rimpang kencur dengan senyawa marker etilparametoksisinamat (EPMS) untuk sediaan oral dan APMS (asamparametoksisinamat) untuk sediaan topikal, sehingga akan diperoleh produk yang mempunyai efikasi dan safety yang lebih baik, sebab teknologi phytosome dapat menjamin penghantaran senyawa-senyawa yang ada dalam produk sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas dari produk.

Tahapan penelitian tahun kedua adalah melakukan studi formulasi melakukan karakterisasi formula yang telah dibuat menjadi suatu bentuk sediaan

peroral dan topical dengan menggunakan bahan-bahan tambahan yang terpilih yang dapat melepaskan bahan aktif dengan baik, kemudian melakukan pengujian pelepasan bahan aktif dari produk untuk membuktikan bahwa dengan teknologi phytosome/liposom mempunyai bioavailabilitas yang lebih baik.

Dengan melihat hasil penelitian tahun pertama dan data-data ilmiah penelitian yang telah ada, maka sangatlah prospektif apabila ekstrak kencur yang dibuat dengan teknologi phytosom/liposom dijadikan Obat Herbal Terstandar sebagai analgesik oral, baik tunggal maupun ditambahkan ke dalam formula obat herbal yang memerlukan analgesik dan sebagai sediaan analgesik topical dalam bentuk krim/gel bahkan aerosol seperti yang banyak digunakan oleh para atlet. Obat Herbal Terstandar adalah obat yang berbahan baku ekstrak terstandar (terjamin keajegannya) yang telah dibuktikan efektifitas dan safety-nya pada tingkat praklinik. Sehingga pada akhir penelitian ini dapat diperoleh suatu produk yang siap diproduksi oleh Industri Obat sebab dari penelitian ini telah dihasilkan data-data ilmiah yang diperlukan untuk registrasi. Lebih jauh lagi hasil penelitian ini juga dapat meningkatkan potensi kencur sehingga dapat meningkatkan komoditas ekspor sehingga meningkatkan pula posisi Indonesia sebagai penyedia bahan baku obat herbal yang sejajar dengan India dan China.

2. Ruang lingkup dan batas-batas penelitian

Pada penelitian ini akan dilakukan pembuatan prototipe formula sediaan analgesik oral dan topikal yang menggunakan bahan aktif dari ekstrak kencur terstandart dengan teknologi phytosome dan liposom yang terjamin efektifitas dan safety-nya. Uji pelepasan bahan aktif akan dilakukan baik pada sediaan oral maupun topikal untuk memastikan bahwa tidak hanya bentuk phytosom/liposom yang dapat membantu pelepasan bahan aktif tetapi juga bahan-bahan tambahan yang digunakan dalam formula dapat menghantarkan bahan aktif dengan baik.

3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuat prototipe sediaan Obat Herbal Terstandart dari ekstrak phytosom/liposom rimpang kencur sebagai analgesik dengan melakukan serangkaian proses formulasi, kontrol kualitas dan pengujian

preklinik (efektifitas dan safety), yang siap diadopsi oleh industri dan siap untuk dilanjutkan pada pengujian tingkat klinik.

4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini akan memberikan landasan ilmiah tentang pengembangan produk obat herbal terstandart dari rimpang kencur dengan menggunakan teknologi Phytosome untuk pemakaian tunggal sebagai analgesik maupun campuran dengan tanaman lain untuk efek terapi yang memerlukan analgesik, sehingga siap untuk diproduksi oleh Industri dan dilanjutkan pada pengujian tingkat klinik. Selain itu dapat meningkatkan potensi ekstrak kencur dengan menghasilkan produk dengan teknologi phytosom/liposom yang mempunyai bioavailabilitas yang lebih baik sehingga dapat meningkatkan nilai jual dari komoditas obat herbal Indonesia.

5. Tahapan Penelitian

Pada tahun pertama telah berhasil dibuat sediaan bahan aktif dari ekstrak kencur dengan teknologi phytosom/liposom yang mempunyai karakterisasi dan aktivitas terbaik untuk produk analgesik oral dan topikal. Pada tahun kedua akan dilakukan formulasi ekstrak phytosom/liposom terpilih menjadi produk analgesik oral dan topikal kemudian akan dilakukan pengujian pelepasan bahan aktif dari produk phytosome dan liposom yang dihasilkan. Pada tahap studi formulasi akan dibuat beberapa formula dengan berbagai bahan tambahan dan karakterisasi untuk mendapatkan formula terbaik secara farmasetis. Selanjutnya akan dilakukan pengembangan dan validasi metode untuk pengujian pelepasan bahan aktif baik untuk produk oral maupun topikal. Metode ini kemudian digunakan untuk melakukan pengujian pelepasan bahan aktif dari produk

6. Perumusan Masalah

Dari uraian tersebut di atas dan dari hasil penelitian tahun pertama, maka rumusan permasalahannya adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana validitas dari metode pengujian pelepasan bahan aktif yang dikembangkan untuk produk analgesik oral ?

2. Bagaimana validitas dari metode pengujian pelepasan bahan aktif yang dikembangkan untuk produk analgesik topikal ?
3. Apakah prototipe formula analgesik oral dari sediaan phytosom/liposom terpilih dapat melepaskan bahan aktif dengan baik ?
4. Apakah prototipe formula analgesik topikal dari sediaan phytosom/liposom terpilih dapat melepaskan bahan aktif dengan baik ?

METODOLOGI

1. Bahan

Sediaan phytosom/liposom dari ekstrak kencur, MA, EPMS dan APMS terpilih pada tahun pertama

2. Alat

Densitometer, microscop electron, DTA, Dissolution test apparatus, Convocal laser microscop

3. Tahapan Penelitian

3.1. Tahun II.

3.1.1. Formulasi Produk analgesik oral

- a. Pencampuran bahan aktif (sediaan phytosom/liposom terpilih) dengan berbagai bahan tambahan dan berbagai perbandingan menjadi bentuk granul yang siap untuk dibuat tablet ataupun kapsul
- b. Evaluasi/karakterisasi mutu fisik granul maupun tablet/kapsul

3.1.2. Formulasi Produk analgesik topikal

- a. Pencampuran bahan aktif (sediaan phytosom/liposom terpilih) dengan berbagai bahan tambahan dan berbagai perbandingan menjadi krim/gel
- b. Evaluasi/karakterisasi mutu fisik krim/gel

3.1.3. Validasi metode penentuan kadar APMS/EPMS

Metode pengukuran senyawa marker/profil metabolit dari pelepasan in vivo

Pada pengujian pelepasan secara in vivo dilakukan dengan menggunakan hewan coba, hal ini tentunya senyawa marker/profil metabolit yang dilepaskan harus diukur dalam cairan tubuh (darah/urine) yang berbeda dengan ekstrak sehingga memerlukan pengembangan dan validasi metode pengukurannya.

3.1.4. Uji Pelepasan senyawa marker

In vivo

- Produk analgesik oral diberikan pada kelinci secara per oral setelah kelinci dipuasakan selama 7 Jam. Cuplikan darah diambil dari vena marginalis kelinci sebanyak 1,5 ml. Pengambilan dilakukan sebelum pemberian bahan uji dan $\frac{1}{2}$; $\frac{3}{4}$; 1; 1 $\frac{1}{2}$; 2; 2 $\frac{1}{2}$; 3 dan 7 jam setelah pemberian bahan uji. Cuplikan disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm dan didiamkan 15 menit. Plasma yang diperoleh dipisahkan, kadar EPMS dalam serum ditentukan menggunakan HPLC setelah diekstraksi dengan pelarut yang sesuai. Data yang diperoleh dinyatakan dalam bentuk kurva hubungan antara kadar plasma dan waktu. Kemudian ditentukan harga T_{max} , C_{max} , K_a , K_e , $T_{1/2}$, AUC dan bioavailabilitas relative.
- Produk analgesik topikal yang telah dilabel dengan FITC diberikan pada punggung tikus yang telah dicukur dengan luas area tertentu. Jaringan pada daerah yang telah diaplikasi tersebut diambil pada 30 menit, 60 menit dan 120 menit setelah aplikasi, selanjutnya difiksasi kemudian dibuat irisan histopatologi dan dianalisis dengan mikroskop fluoresens.

HASIL YANG DIPEROLEH

1. FORMULASI SEDIAAN ANALGESIK ORAL

Dari hasil penelitian tahun I diketahui bahwa untuk bahan aktif yang mempunyai aktivitas analgesic oral yang terbaik adalah fitosom epms namun kalau dilihat dari lama kerjanya fitosom ekstrak lebih lama.

Untuk itu pada penelitian ini akan diformulasi keempat bahan aktif yaitu epms, fitosom epms, ekstrak dan fitosom ekstrak.

Dari optimasi pada penelitian sebelumnya, campuran aerosol : avicel (4 : 6) menghasilkan karakteristik granul yang baik yaitu mempunyai sifat alir yang baik sehingga akan menghasilkan tablet yang mempunyai karakteristik yang baik pula (apabila akan dibuat dalam bentuk tablet)

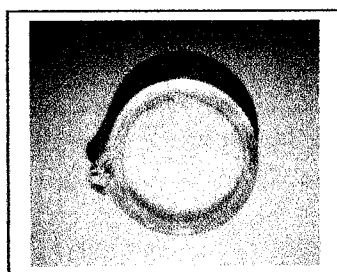
Sistem granulasi yang dipilih adalah granulasi kering sebab bahan aktif dalam bentuk fitosom akan rusak bila dibuat dengan system granulasi basah.

2. FORMULASI SEDIAAN ANALGESIK TOPIKAL

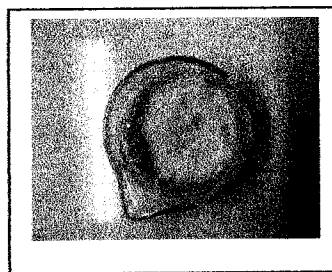
Dari hasil penelitian tahun pertama bahan aktif yang mempunyai aktivitas analgesic topical terbaik adalah ekstrak fitosom namun karena akan dibuat dalam bentuk krim atau gel dan untuk pengeringan ekstrak fitosom diperlukan aerosol hal ini tidak memungkinkan sehingga ekstrak akan dibuat dalam bentuk liposom. Pada penelitian ini akan dibandingkan dengan apms liposom

	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
Apms/ekstrak/liposomnya	30 mg	30 mg	30 mg	30 mg
Xanthan Gum	3%	1,5%	3%	1,5%
S-acrylic	0,5%	1%	1%	0,5%
HEC	1%	1%	1%	1%
Glicerin	25%	25%	25%	25%
TEA	-	500 ul	-	500 ul
Aquadest	Ad 100%	Ad 100%	Ad 100%	Ad 100%
hasil	Kasar kuning	Halus Putih berminyak	Kasar putih	Halus putih

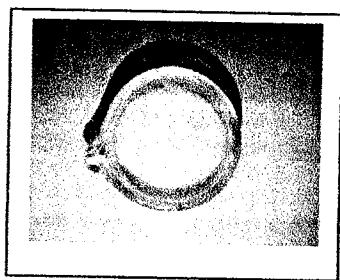
Dari hasil tersebut dipilih formula ke empat. Dari formula keempat didapatkan hasil sebagai berikut :



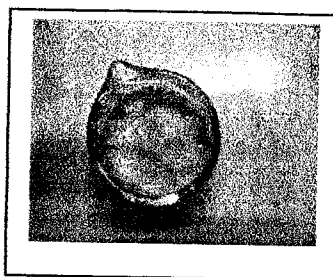
Basis



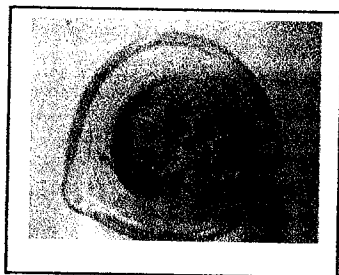
APMS



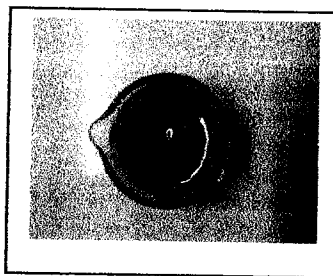
Fitosom APMS



Liposom APMS



Ekstrak



Fitosom Ekstrak

3. OPTIMASI METODE PENETAPAN KADAR APMS DALAM DARAH KELINCI

Sampai saat ini belum ada publikasi baik nasional maupun internasional mengenai penetapan kadar apms dalam darah kelinci. Penelitian yang ada adalah tesis yang dilakukan oleh Sadono, 2001 yang menggunakan HPLC.

Pada penelitian ini akan dilakukan dengan metode HPTLC. Untuk itu perlu dilakukan optimasi fase gerak, validasi metode terutama adalah persen recovery.

Hasilnya adalah sebagai berikut :

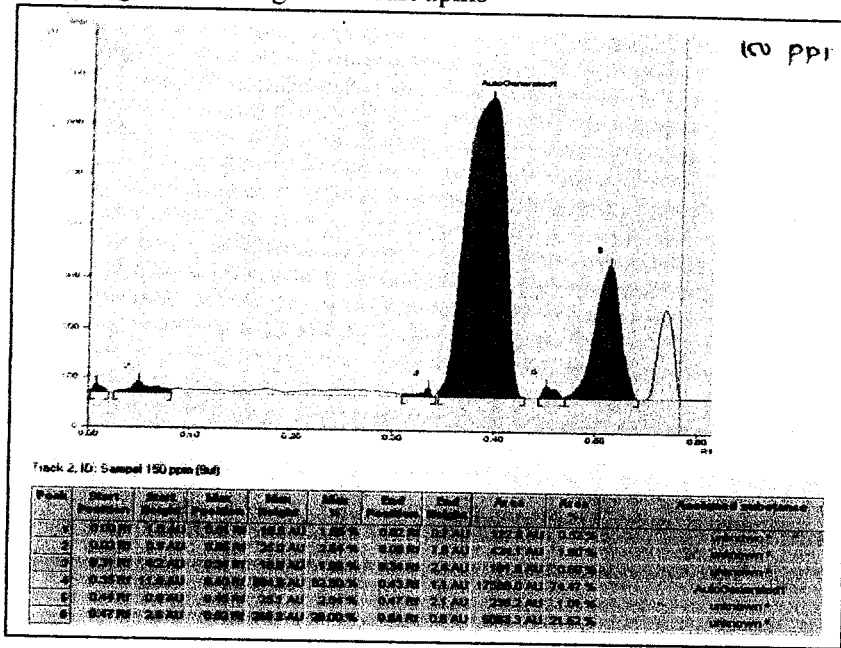
Fase gerak yang diperoleh adalah kloroform : aseton : asam formiat (4,5-2-1)

Pada proses preparasi sampel darah, hal yang harus diperhatikan adalah protein dalam darah yang bisa mengganggu pemisahan apms. Dari hasil optimasi, proses preparasi adalah sebagai berikut :

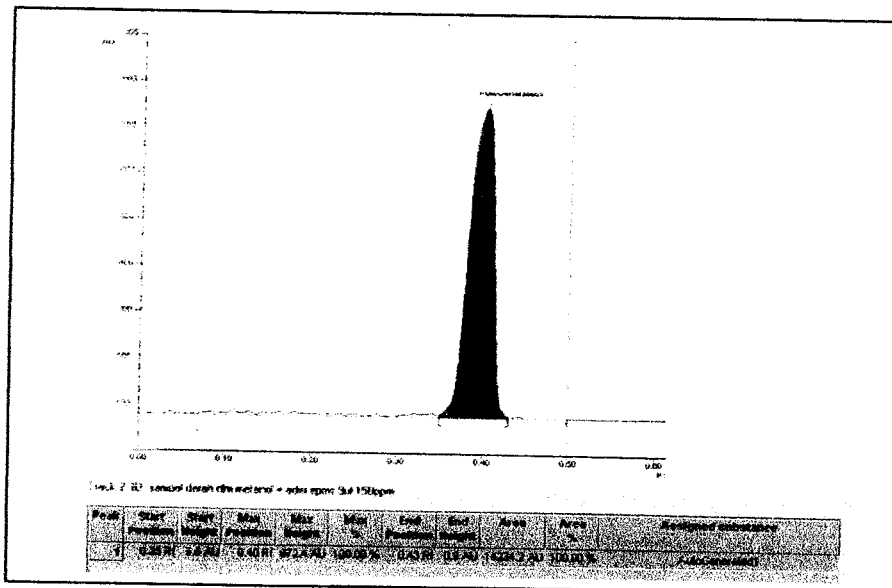
Diambil darah 2,0 ml dari pembuluh darah di telinga kelinci, ditambah dengan 0,20 ml larutan heparin disentrifus untuk mendapatkan plasma, ditambah EA 1,0 ml divorteks dan diultrasonik untuk mengambil apms dari plasma, EA dipisahkan sebanyak 500,0 ul diuapkan dengan N₂ sampai kering, ditambahkan EA 50,0 ul lalu ditotolkan sebanyak 30,0 ul.

Pada kromatogram di bawah peak apms terlihat pada R_f 0,4 yang selanjutnya akan dibuktikan kecocokan spektranya dengan spectra peak apms standart

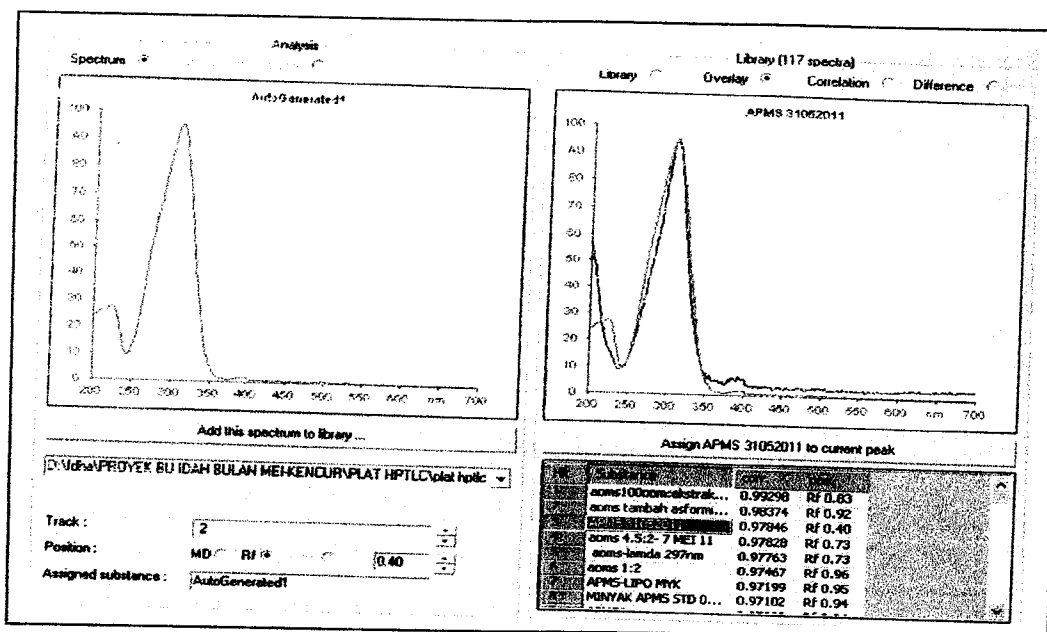
Darah yang diadisi dengan standart apms



Standart apms



Korelasi spectra apms dalam darah dan apms standart adalah 0,97 seperti terlihat pada gambar di bawah ini



Yang berikutnya dilakukan penentuan % recovery dari metode preparasi sampel tersebut, hasilnya adalah sebagai berikut :

Penambahan apms dalam darah	replikasi	% recovery
50 ng	1	89%
	2	92%
	3	93%
75 ng	1	93%
	2	95%
	3	95%

Dari data-data di atas dapat disimpulkan bahwa metode penetapan kadar menggunakan HPTLC yang telah dioptimasi tersebut mempunyai validitas yang memenuhi syarat.

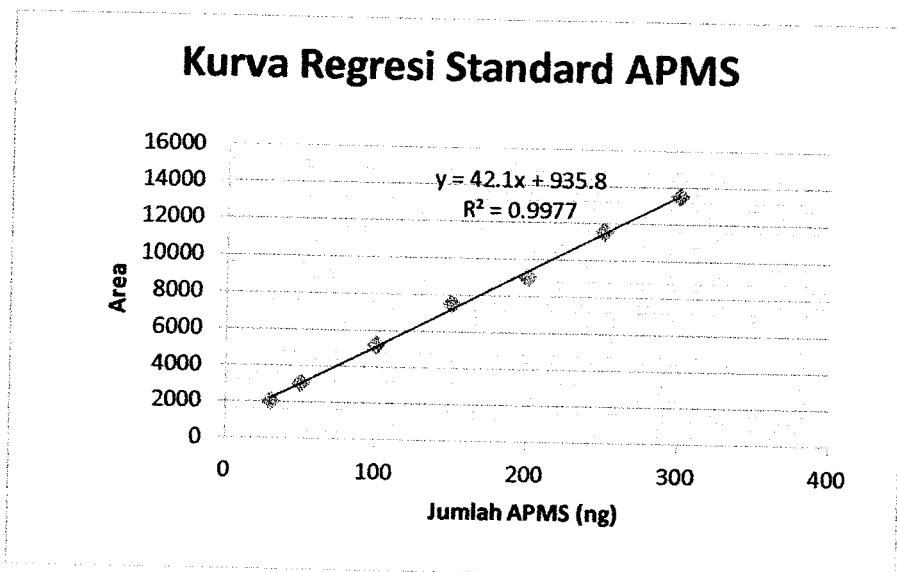
4. PENENTUAN PARAMETER BIOAVAILABILITAS

Selanjutnya akan dilakukan penetapan kadar apms dalam darah kelinci yang diberi sediaan analgesic oral dengan bahan aktif epms, fitosom epms, ekstrak dan fitosom ekstrak. Akan ditentukan beberapa parameter yaitu Tmaks, C maks dan AUC sebagai parameter bioavailabilitas dari sediaan

Contoh perhitungan adalah sebagai berikut :

Tabel Standard APMS dan Area

Jumlah APMS (ng)	Area
30	2051.8
50	3059.9
100	5245.5
150	7549
200	9012.8
250	11551.5
300	13548



t	t pengambilan darah (menit)	Vol. plasma (ml)	Etil asetat yang ditambahkan (ml)	Etil asetat yang didapat (ml)	Area
0	00.00	1.00	1.500	0.700	0
2	02.00 – 04.00	0.300	1.500	1.050	3064.7
5	05.05 – 08.30	1.050	1.500	0.950	7606.2
10	10.15 – 16.15	0.950	1.500	0.870	9223.8
60	60.00 – 66.00	0.800	1.500	1.100	3995.6
120	124.00 – 134.00	0.900	1.500	1.100	1478.9

Etil asetat yang didapat tersebut kemudian dikeringkan dengan dialiri gas N₂ lalu ditambahkan 50,0 µl Etil asetat p.a. lalu semuanya ditotolkan pada plat kaca HPTLC yang telah diimpregnasi.

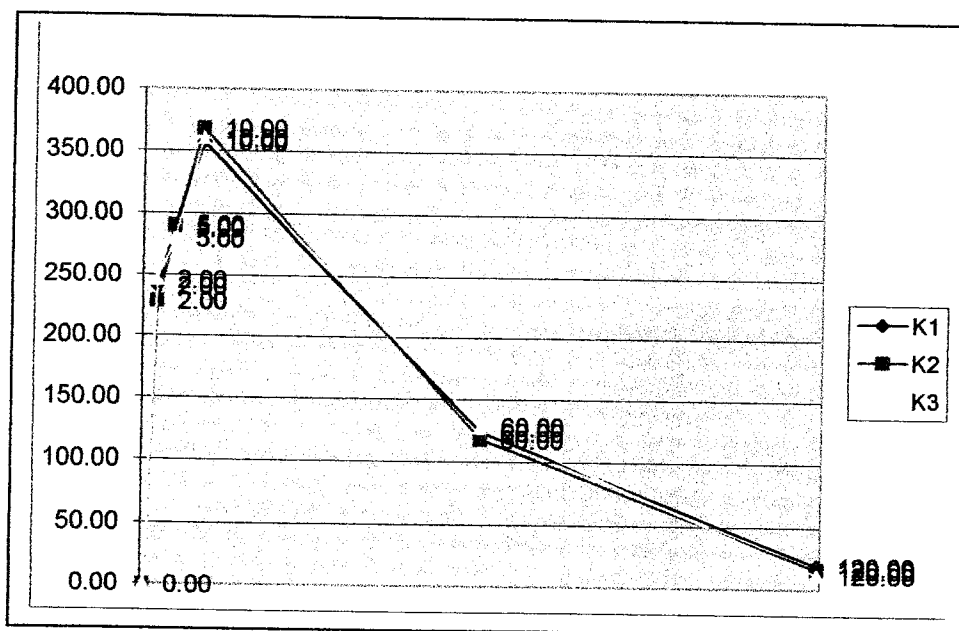
t	APMS dalam EA yang didapat (ng)	APMS dalam EA yang ditambahkan = dalam plasma (ng)	APMS dalam 1 ml plasma (ng)
0	0	0	0
2	50.5677	72.23956566	240.7985522
5	158.4418	250.1712714	238.2583537
10	196.8646	339.4217381	357.2860401
60	72.6793	99.10818398	123.88523
120	12.9002	17.591233	19.54581444

Masing-masing sediaan dilakukan dengan 3 ekor kelinci dan hasilnya adalah sebagai berikut :

Sediaan analgesic oral dengan bahan aktif epms

Kadar apms (ng/ml) dalam darah kelinci

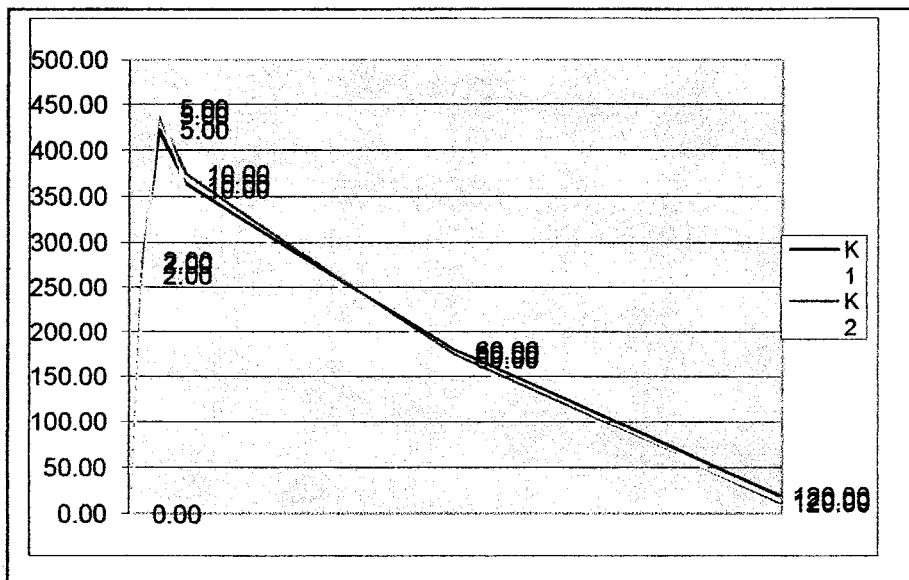
Waktu (menit)	K1	K2	K3	rerata
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.00	240.80	228.60	246.30	238.57
5.00	288.26	290.40	280.12	286.26
10.00	357.29	368.12	360.24	361.88
60.00	123.89	118.34	128.12	123.45
120.00	19.55	16.88	12.34	16.26



Sediaan analgesik oral dengan bahan aktif epms fitosom

Kadar apms (ng/ml) dalam darah kelinci

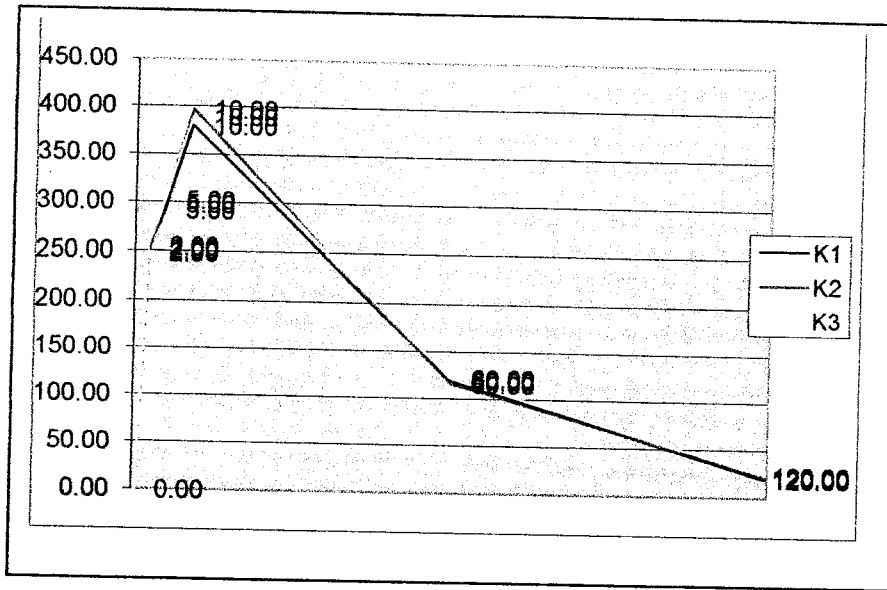
Waktu (menit)	K1	K2	K3	rerata
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.00	280.24	275.88	264.22	273.45
5.00	423.00	438.12	446.22	435.78
10.00	364.80	374.66	358.90	366.12
60.00	180.12	175.33	169.90	175.12
120.00	19.55	12.12	14.28	15.32



Sediaan analgesic oral dengan bahan aktif ekstrak

Kadar apms (ng/ml) dalam darah kelinci

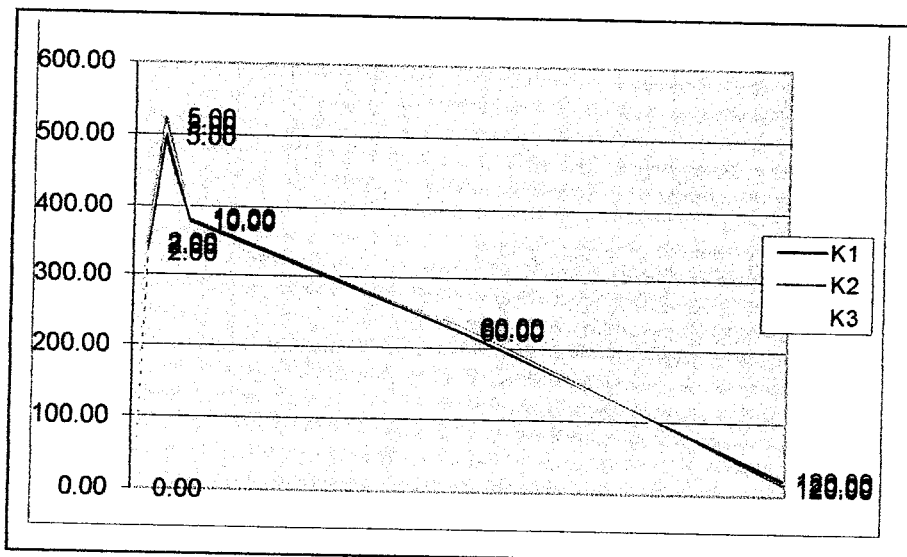
Waktu (menit)	K1	K2	K3	rerata
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.00	252.10	249.11	255.47	252.23
5.00	292.56	298.76	302.23	297.85
10.00	380.12	397.45	389.65	389.07
60.00	119.12	115.72	121.88	118.91
120.00	20.12	22.27	23.89	22.09



Sediaan analgesic oral dengan bahan aktif fitosom ekstrak

Kadar apms (ng/ml) dalam darah kelinci

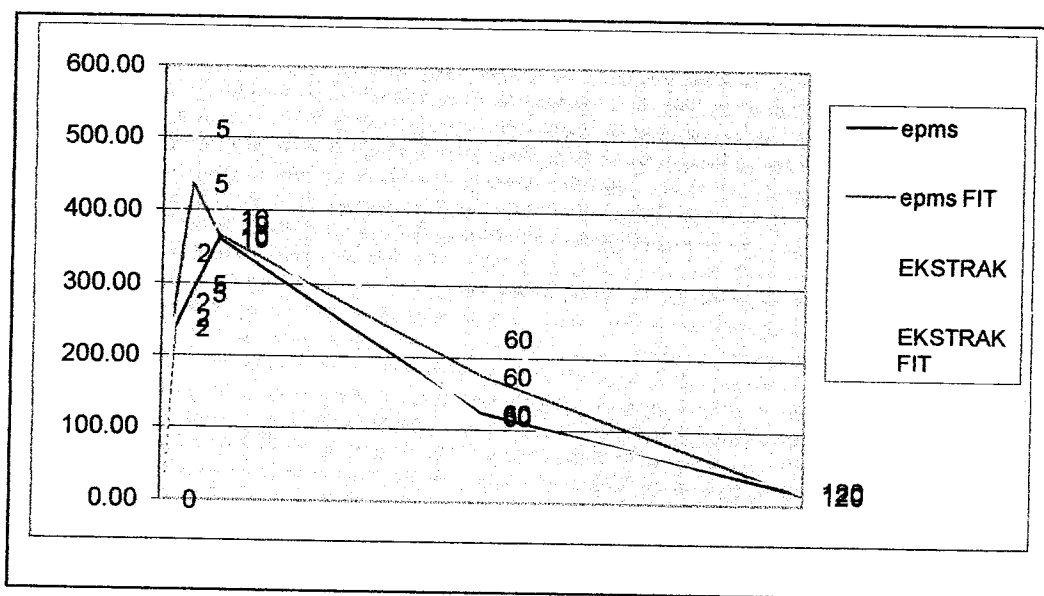
Waktu (menit)	K1	K2	K3	rerata
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.00	332.77	347.23	342.86	340.95
5.00	498.44	523.12	512.78	511.45
10.00	377.30	380.10	384.30	380.57
60.00	224.34	231.29	230.22	228.62
120.00	22.10	16.10	12.70	16.97



Dari rerata masing-masing dapat terlihat sebagai berikut :

Kadar apms (ng/ml) dalam darah kelinci

Waktu (menit)	epms	epms FIT	EKSTRAK	EKSTRAK FIT
0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	238.57	273.45	252.23	340.95
5	286.26	435.78	297.85	511.45
10	361.88	366.12	389.07	380.57
60	123.45	175.12	118.91	228.62
120	16.26	15.32	22.09	16.97



Dari masing-masing grafik dihitung AUC yang akan menunjukkan apms yang terabsorpsi selama 2 jam. Secara keseluruhan parameter bioavailabilitas dari keempat sediaan analgesic tersebut dapat dilihat dalam tabel di bawah ini :

Bahan aktif	Cmaks	tmaks	AUC
Epms	361,88	10	18970,70
Epms fitosom	435,78	5	22585,95
Ekstrak	389,07	10	19724,15
Ekstrak fitosom	511,45	5	26446,67

5. UJI PENETRASI BAHAN AKTIF SEDIAAN TOPIKAL IN VIVO

Uji penetrasi formula analgesik topikal dapat dilakukan dengan metode in vitro maupun in vivo. Untuk uji in vitro ditujukan untuk mengukur kadar bahan aktif yang dilepaskan melalui membran (kulit tikus). Sedangkan uji in vivo dilakukan dengan tujuan untuk melihat perjalanan bahan aktif menembus membran kulit

pada hewan coba.

Pada penelitian ini akan dilakukan uji penetrasi secara in vivo dengan menggunakan tikus dengan cara sebagai berikut :

Bulu abdomen tikus dicukur. Sediaan dioleskan pada kulit yang sudah tidak berbulu dengan lebar 2 x 2 cm dengan jumlah tertentu yang sama untuk masing-masing sampel. Sampel yang digunakan adalah :

1. Normal : PBS
2. Kontrol negatif : basis gel
3. Gel dengan bahan aktif ekstrak
4. Gel dengan bahan aktif fitosom ekstrak
5. Gel dengan bahan aktif apms
6. Gel dengan bahan aktif liposom apms
7. Gel dengan bahan aktif fitosom apms

Biopsi kulit hewan coba dilakukan pada 15, 30, dan 60 menit, mengingat sediaan analgesik mempunyai onset kerja yang cepat. Hasil biopsi kulit ini dibagi 2, yang satu untuk pembuatan preparat histologi dimasukkan ke dalam bufer formalin dan yang satu untuk karakterisasi dengan SEM dimasukkan ke dalam Glutaraldehid 2 %.

Irisan histologi melintang

Irisan melintang untuk melihat pengaruh pada stuktur kulit khususnya lapisan stratum corneum dengan menggunakan pewarnaan HE

Hasilnya adalah sebagai berikut :



Kontrol



Basis gel



APMS (15)



APMS(30)



APMS(60)



Fitosom APMS (15)



Fitosom APMS(30)



Fitosom APMS(60)



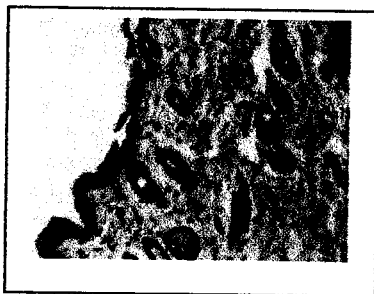
Liposom APMS (15)



Liposom APMS(30)



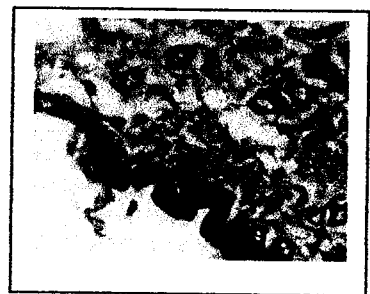
Liposom APMS(60)



Ekstrak (15)



Ekstrak(30)



Ekstrak(60)



Fitosom Ekstrak (15)

Fitosom Ekstrak(30)

Fitosom Ekstrak(60)

Dari gambar di atas terlihat bahwa pada kontrol lapisan stratum corneum tampak lurus (tidak ada lekukan ke dalam) sedangkan pada perlakuan terutama pada formula yang menggunakan bahan aktif bentuk fitosom dan liposom terlihat adanya lekukan-lekukan ke dalam yang menunjukkan masuknya gel ke dalam melalui lekukan-lekukan tersebut.

Pada gambar di atas terlihat juga bahwa ketebalan stratum corneum meningkatkan (warna biru di permukaan) setelah diberi perlakuan. Hal ini disebabkan adanya masuknya fase air dari gel dan sehingga memudahkan masuknya bahan aktif ke lapisan yang lebih dalam.

Karakterisasi permukaan lapisan Stratum corneum

Kulit tikus yang telah difiksasi dengan glutaraldehid 2% selama 2 – 3 jam pada suhu 4°C kemudian dilanjutkan dengan preparasi sebagai berikut :

- Dicuci dengan buffer fosfat pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit pada suhu 4°C
- Difiksasi dengan larutan Osmic acid 1% selama 1-2 jam pada suhu 4°C
- Dicuci dengan buffer fosfat pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit pada suhu 4°C
- Didehidrasi dengan alkohol bertingkat 30%, 50%, 70% (pada suhu 4°C), 80%, 90% dan 100%(2 kali) pada suhu ruangan, masing-masing selama 15 – 20 menit
- Difiksasi dengan amil acetat absolut untuk pengawet sampai siap digunakan
- Pada saat akan digunakan, sampel dikeringkan dengan alat CPD (critical point drying)
- Sampel kering ditempelkan pada stub holder (bahan emas murni)
- Discanning dengan SEM

Setelah discanning hasilnya adalah sebagai berikut :



Kontrol



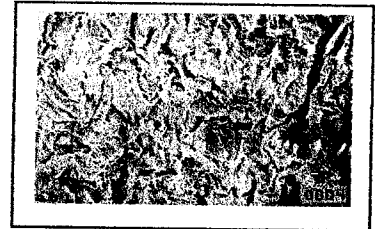
Basis gel



APMS (15)



APMS(30)



APMS(60)



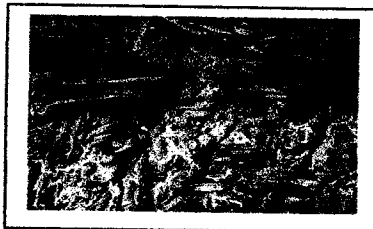
Fitosom APMS (15)



Fitosom APMS(30)



Fitosom APMS(60)



Liposom APMS (15)



Liposom APMS(30)



Liposom APMS(60)



Ekstrak (15)



Ekstrak(30)



Ekstrak(60)



Fitosom Ekstrak (15)



Fitosom Ekstrak(30)



Fitosom Ekstrak(60)

Dari gambar di atas terlihat bahwa pada kontrol permukaan stratum corneum rapat dan teratur. Pada pemberian basis, lapisan stratum corneum tampak merenggang. Pada pemberian sampel gel APMS, renggangan hampir sama dengan basis. Pada pemberian ekstrak, renggangan semakin lebar. Sedangkan pada pemberian gel fitosom apms, ekstrak dan liposom apms, terlihat renggangan semakin lebar dan berbentuk lubang-lubang atau pore.

Tampaknya bentuk fitosom atau liposom menyebabkan lapisan stratum corneum menjadi lebih permeabel sehingga memungkinkan masuknya gel sampel menjadi lebih mudah ke lapisan yang lebih dalam.

Hasil yang ditunjukkan dari gambar histologi irisan melintang kulit dan gambar karakterisasi lapisan stratum corneum menunjukkan hasil yang saling mendukung. Yang dapat disimpulkan bahwa bentuk fitosom atau liposom membantu penetrasi bahan aktif sehingga lebih mudah untuk masuk ke lapisan yang lebih dalam.

KESIMPULAN

1. Dihasilkan 4 sediaan analgesik oral, masing-masing dengan bahan aktif ekstrak kencur dan isolat EPMS, dalam bentuk bebas dan terkompleks dengan fosfolipid yang disebut fitosom, dengan karakteristik menggunakan SEM dan DTA
2. Dihasilkan 4 sediaan analgesik topikal, masing-masing dengan bahan aktif ekstrak kencur dan isolat APMS baik dalam bentuk bebas maupun terkompleks dengan fosfolipid,, dengan karakteristik menggunakan SEM dan DTA
3. Sediaan analgesik oral dengan bahan aktif ekstrak kencur dan EPMS, dalam bentuk fitosom mempunyai Cmaks yang lebih tinggi, Tmaks lebih cepat dan AUC yang lebih besar bila dibandingkan dengan bentuk bebasnya
4. Sediaan analgesik topikal dengan bahan aktif ekstrak kencur dan EPMS, dalam bentuk fitosom mempunyai kemampuan membuat lapisan stratum corneum lebih permeabel dan merenggang sehingga bahan aktif dapat menembus sampai ke lapisan yang lebih dalam.

Surabaya, 25 Oktober 2011

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Airlangga

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MS
NIP : 19590805 198701 1 001