

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kerusakan hati merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia dan merupakan penyakit dengan berbagai etiologi yang bervariasi atau bahkan tidak diketahui dengan pasti. Pada tahun 2017 sebanyak 1,32 juta kematian di seluruh dunia atau 2-4% dari semua kematian tahunan secara langsung disebabkan oleh sirosis hati yang merupakan hasil akhir dari berbagai penyakit hati (Higuchi and Gores, 2005; Seto and Susan Mandell, 2021).

Dilaporkan bahwa setiap harinya, manusia terpapar banyak xenobiotik, dan beberapa dari xenobiotik ini diketahui memiliki potensi hepatotoksikan (Gu and Manautou, 2012). Xenobiotik adalah bahan kimia yang tidak diproduksi atau diharapkan ada di dalam tubuh yang normal. Kerusakan hati atau disfungsi hati dapat terjadi karena kelebihan bahan kimia dan obat-obatan hepatotoksikan tersebut. Hati berfungsi untuk menyaring zat-zat beracun dari aliran darah. Ketika jumlah bahan kimia yang disaring oleh hati berlebih akan menyebabkan hepatotoksitas (Eze *et al.*, 2019). Terdapat banyak bahan kimia industri yang bersifat hepatotoksikan, contohnya yaitu N-nitrosodimethylamine (NDMA), hydrazine dan carbon disulfide (Gu and Manautou, 2012). NDMA sering terdapat dalam produk makanan hasil pertanian (Park *et al.*, 2015). Penyebab kerusakan hati lain yaitu konsumsi alkohol yang dapat menyebabkan penyakit hati alkoholik serta adanya paparan lingkungan dari senyawa anorganik (Gu and Manautou, 2012; Stubbs and Morgan, 2011).

Patogenesis kerusakan hati yang disebabkan oleh bahan kimia dimulai dari perubahan metabolik bahan kimia menjadi senyawa intermediet yang reaktif, seperti senyawa elektrofilik atau radikal bebas, yang berpotensi mengubah struktur dan fungsi makromolekul seluler (Gu and Manautou, 2012). Pemberian bahan karsinogen dapat memproduksi radikal bebas yang menyebabkan stres oksidatif dan mengarah pada kerusakan asam nukleat, protein, dan lipid, yang berperan penting dalam perkembangan kanker (Janani *et al.*, 2009).

Kerusakan hati merupakan salah satu tahapan pada proses pembentukan kanker hati yang meliputi tahapan awal paparan agen etiologi seperti virus, bahan kimia dan sebagainya, lalu tahap pembentukan penyakit hati kronis, berkembang ke tahap fibrosis

hati, kemudian menuju tahap inisiasi lesi praneoplastik dan akhirnya berkembang menjadi kanker hati (Hoshida *et al.*, 2013). Aktivitas enzim tertentu dengan cepat berubah dalam kondisi kerusakan hati, contohnya enzim transaminase SGOT dan SGPT yang dikenal sebagai penanda vital fungsi hati. Enzim-enzim tersebut secara sensitif mencerminkan status kerusakan hati dan juga hilangnya integritas fungsional membran (Eze *et al.*, 2019). SGPT merupakan biomarker yang lebih spesifik untuk penyakit hati. Aktivitas transaminase meningkat secara konsisten pada metastasis (Jana *et al.*, 2018). Meningkatnya pelepasan enzim transaminase (SGOT/AST, SGPT/ALT, dan ALP) dari sel parenkim hati ke plasma menunjukkan cedera sel hati yang cukup besar (Ali *et al.*, 2019).

Terdapat beberapa penyebab kerusakan hati salah satunya paparan bahan kimia yang bersifat karsinogenik contohnya N-nitrosodiethylamine (NDEA). Senyawa N-nitrosamine tersebut dapat terbentuk pada beberapa proses pemasakan seperti penggorengan atau pemanggangan melalui reaksi amina yang secara alami ada dengan oksida nitrat (NO) dalam gas api, atau melalui percepatan reaksi amina dengan NO yang ada dalam makanan karena suhu yang meningkat (Crews, 2014). Dari hasil penelitian diketahui bahwa NDEA dapat menginduksi nekrosis hati pada tikus, mencit, kelinci, babi dan anjing (Tolba *et al.*, 2015) melalui peningkatan stress oksidatif dan kerusakan DNA (Bilal *et al.*, 2017). NDEA menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) sehingga menyebabkan stress oksidatif dan cedera seluler (Ali *et al.*, 2014). Produksi ROS meningkat akibat dari aktivasi metabolik dan detoksifikasi NDEA yang menyebabkan cedera hepatosit, inflamasi, infiltrasi neutrofilik, dan nekrosis hati yang luas (George *et al.*, 2019). Produk reaktif dan radikal bebas juga mengakibatkan peningkatan indeks serum fungsi hati seperti alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (GGT), dan bilirubin total, serta pada lesi histopatologi yang parah dapat menyebabkan transformasi neoplastik (Arul and Subramanian, 2013). Spesies oksigen reaktif (ROS) juga menghasilkan karbonilasi protein, peroksidasi lipid, dan kerusakan DNA yang menyebabkan sitotoksitas, karsinogenisitas, dan mutagenisitas. Suplementasi antioksidan dapat digunakan untuk perlindungan terhadap stres oksidatif (Ali *et al.*, 2014).

Asam ursolat (AU) merupakan senyawa pentasiklik triterpenoid alami yang ditemukan pada beberapa tanaman atau buah. Senyawa ini memiliki berbagai aktivitas farmakologi antara lain sebagai antikanker, hepatoprotektif, antiangiogenesis, induksi apoptosis, antioksidan dan antiinflamasi (Seo *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2020). Pada

kerusakan hati diketahui terjadi peningkatan stress oksidatif sehingga peran AU dalam hal ini lebih sebagai antioksidan dan hepatoprotektif. Sistem antioksidan adalah pertahanan sel utama yang melindungi membran dan komponen sitosol terhadap kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Antioksidan mampu menghambat produksi ROS, dan dengan demikian, mengurangi stres oksidatif (Janani *et al.*, 2009). Mekanisme AU dalam memberikan efek antioksidan yaitu dengan memperbaiki aktivitas *Superoxide Dismutase* (SOD), *Catalase* (CAT), *Glutathione reductase* (GSH), dan *Glutathione peroxidase* (GPx) serta mengurangi stress oksidatif dengan cara memodulasi *Receptor for Advanced Glycation End Products* (RAGE), dan menurunkan NADPH oksidase sehingga ROS tidak terbentuk. Dari penelitian sebelumnya diketahui stres oksidatif berkaitan dengan peningkatan ekspresi reseptor *Advanced glycation end product* (RAGE) yang selanjutnya mendorong perkembangan berbagai jenis kanker (Kashyap *et al.*, 2016). Selain itu, AU juga memiliki efek hepatoprotektif melalui mekanismenya dalam menjaga integritas struktur organ hati, menurunkan kadar bilirubin yang tinggi, menstabilkan konsentrasi protein serum (albumin dan globulin), serta menekan stress oksidatif, inflamasi, dan apoptosis di hati (Gharibi *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2015). Dari berbagai mekanisme tersebut dapat dikatakan AU berpotensi menjadi pencegahan kerusakan hati. Dari penelitian sebelumnya, pemberian AU pada dosis 500 mg/kgBB secara peroral pada tikus putih wistar memberikan hasil penurunan kadar enzim penanda kerusakan hati yaitu SGOT dan SGPT serta terjadi perbaikan histopatologi hati. AU mampu mengembalikan perubahan biokimia dan histologi jaringan hati tikus yang disebabkan oleh kerusakan hati yang mengarah pada *hepatocellular carcinoma* (Ali *et al.*, 2019).

Namun, penggunaan AU secara peroral memiliki keterbatasan sebab sifat kelarutan AU dalam air dan absorpsi di intestinal yang buruk sehingga termasuk golongan senyawa BCS (*Biopharmaceutics Classification System*) kelas IV (Eloy *et al.*, 2015). Untuk meningkatkan bioavailabilitas oral AU, diperlukan sistem penghantaran obat yang dapat meningkatkan kelarutan dan disolusi senyawa, salah satunya sistem penghantaran niosom. Niosom adalah sistem vasikular bilayer yang tersusun dari surfaktan non ionik dan kolesterol dalam fasa air. Dengan dibuat sistem penghantaran niosom akan meningkatkan waktu paruh obat, stabilitas, dan kemampuan dalam menghantarkan obat pada organ target secara terkontrol (Mahale *et al.*, 2012). Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa formulasi niosom span 40 dapat meningkatkan bioavailabilitas oral paclitaxel yang termasuk golongan BCS kelas IV seperti AU (Eloy *et al.*, 2015). Niosom

akan melindungi bahan obat agar terhindar dari metabolisme yang cepat sehingga bioavailabilitas oral akan meningkat (Sezgin-bayindir *et al.*, 2013). Oleh karena itu, diharapkan niosom juga dapat meningkatkan bioavailabilitas AU. Ketika digunakan secara oral, niosom AU akan melewati saluran cerna kemudian masuk ke pembuluh darah dan melalui *tight junction* menuju jaringan hati. Dengan demikian agar jumlah yang terakumulasi di hati lebih banyak maka dibutuhkan senyawa yang mampu membuat niosom lebih mudah dalam melewati *tight junction* (Moraru *et al.*, 2020).

Kitosan adalah polisakarida alami yang merupakan produk deasetilasi alkali kitin (Moraru *et al.*, 2020) yang berasal dari eksoskeleton krustasea (Wang *et al.*, 2017). Kitosan dan turunannya telah banyak digunakan dalam bidang biomedis karena sifat intrinsik polikation, toksisitas rendah, dan biokompatibilitas yang sangat baik. Dari penelitian sebelumnya diketahui modifikasi liposom asam ursolat dengan pelapisan kitosan dapat meningkatkan bioavailabilitas, pelepasan obat secara perlahan pada jaringan tumor serta menurunkan dosis dan terjadinya efek samping. Hal ini dapat terjadi karena kitosan dapat membuka *tight junction* dari sel epitel sehingga dapat melewati membran epitel dengan mudah melalui jalur paraseluler (Wang *et al.*, 2017). Kitosan juga memiliki sifat *mucoadhesive* sebagai akibat dari adanya interaksi ionik antara gugus amino yang bermuatan positif dan gugus fungsi yang bermuatan negatif pada permukaan sel epitel sehingga dapat memberi pelepasan yang terkontrol dan dapat digunakan untuk meningkatkan absorpsi di saluran cerna serta meningkatkan permeabilitas usus (Moghassemi *et al.*, 2015). Oleh karena itu, diharapkan dengan modifikasi kitosan pada permukaan niosom dapat meningkatkan absorpsi di saluran cerna dan membantu akumulasi niosom AU di hati sehingga bioavailabilitas obat meningkat.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan optimasi formula niosom AU dan didapatkan sistem niosom AU yang menghasilkan stabilitas fisik paling baik pada formula span 60- kolesterol-AU dengan perbandingan mol persen 3:2:10 (Safitri, 2018). Selain itu, juga dilakukan uji karakterisasi niosom AU dengan dan tanpa pelapisan kitosan, dimana adanya kitosan menunjukkan peningkatan stabilitas fisik niosom AU (Aquila, 2018). Pelapisan kitosan pada niosom AU mempengaruhi sifat fisikokimia niosom, dimana menyebabkan peningkatan ukuran partikel dan zeta potensial menjadi lebih positif (Cahyani, 2020). Pada uji biodistribusi dengan pelabelan coumarin-6 didapat intensitas fluoresens coumarin-6 yang tinggi menunjukkan kadar AU dalam plasma dan hati yang tinggi sehingga dapat dikatakan bioavailabilitas juga meningkat (Cahyani, 2020; Priyambudi, 2021).

Pada penelitian ini, dilakukan uji efektifitas niosom asam ursolat dengan pelapisan kitosan yang diberikan secara peroral sebagai terapi untuk mencegah terjadinya kerusakan hati secara *in vivo* pada mencit yang diinduksi NDEA. Parameter yang akan diamati adalah parameter darah meliputi uji kadar serum SGOT dan SGPT. Selain itu, juga diamati histopatologi jaringan hati untuk mengetahui ada tidaknya kerusakan hati pada masing-masing kelompok.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah niosom asam ursolat dengan pelapisan kitosan dapat memperbaiki morfologi organ, berat relatif organ, dan berat badan mencit yang mengalami kerusakan hati akibat induksi NDEA?
2. Apakah niosom asam ursolat dengan pelapisan kitosan dapat meningkatkan efektivitas AU sebagai pencegahan kerusakan hati pada mencit yang diinduksi N-Nitrosodiethylamine ditinjau dari parameter histopatologi jaringan hati?
3. Apakah niosom asam ursolat dengan pelapisan kitosan dapat meningkatkan efektivitas AU sebagai pencegahan kerusakan hati pada mencit yang diinduksi N-Nitrosodiethylamine ditinjau dari kadar serum SGPT dan SGOT?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan efektivitas niosom asam ursolat dengan pelapisan kitosan terhadap perbaikan morfologi organ, berat relatif organ, dan berat badan mencit yang mengalami kerusakan hati akibat induksi NDEA.
2. Menentukan efektivitas niosom asam ursolat dengan pelapisan kitosan untuk pencegahan kerusakan hati pada mencit yang diinduksi NDEA ditinjau dari parameter histopatologi jaringan hati.
3. Menentukan efektivitas niosom asam ursolat dengan pelapisan kitosan untuk pencegahan kerusakan hati pada mencit yang diinduksi NDEA ditinjau dari kadar serum SGPT dan SGOT.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efektifitas niosom asam ursolat dengan pelapisan kitosan untuk pencegahan kerusakan hati ditinjau dari beberapa parameter yaitu histopatologi, kadar serum SGPT dan SGOT pada mencit yang diinduksi N-Nitrosodiethylamine, sehingga dapat dikembangkan untuk terapi preventif kerusakan hati rute peroral.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kerusakan Hati

Hati merupakan salah satu organ metabolisme utama dalam tubuh yang rentan terhadap cedera yang disebabkan oleh berbagai faktor termasuk paparan bahan kimia (Garrido and Djouder, 2021). Patogenesis kerusakan hati yang disebabkan oleh bahan kimia dimulai oleh perubahan metabolik bahan kimia menjadi senyawa intermediet yang reaktif, seperti senyawa elektrofilik atau radikal bebas, yang berpotensi mengubah struktur dan fungsi makromolekul seluler. Senyawa antara yang reaktif sering kali menghasilkan stress oksidatif (Gu and Manautou, 2012). Paparan stres akan merangsang berbagai jalur yang mengarah pada peningkatan produksi radikal bebas. Perubahan stress oksidatif telah dikaitkan dengan beberapa penyakit kronis pada manusia termasuk kanker (Bilal *et al.*, 2017).

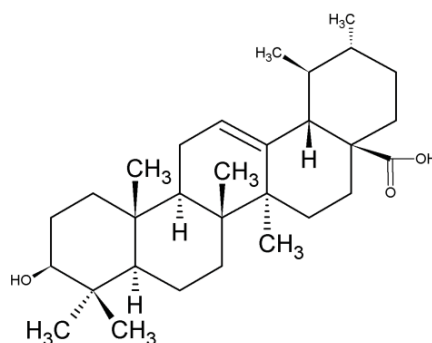
Radikal bebas memicu kerusakan sel melalui dua mekanisme yaitu, ikatan kovalen dengan makromolekul seluler dan degradasi peroksidatif dari membran lipid dan retikulum endoplasma (Naik and Panda, 2007). Hal ini mengarah pada pembentukan peroksida lipid, yang pada gilirannya menghasilkan produk seperti malondialdehida (MDA) yang menyebabkan hilangnya integritas membran sel dan kerusakan jaringan hati. Malondialdehida langsung bereaksi dengan DNA untuk membentuk adduct DNA oksidatif sehingga menyebabkan kerusakan DNA dan mengganggu mekanisme perbaikan DNA (Bilal *et al.*, 2017). Radikal bebas menyebabkan cedera seluler sebab radikal bebas yang dihasilkan menginduksi pemutusan untai dan menyebabkan oksidasi sehingga terjadi modifikasi basa DNA (Bilal *et al.*, 2017). Ketidakseimbangan status pro-oksidan/antioksidan menunjukkan peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (ROS), seperti peroksida, hidroksil, dan radikal anion superoksida (Muqbil *et al.*, 2006), yang menginduksi kerusakan oksidatif seluler melalui pemutusan untai DNA dan peroksidasi lipid (Batcioglu *et al.*, 2002). Dengan demikian, kerusakan DNA yang disebabkan oleh stres oksidatif serta kemampuan perbaikan DNA yang berkurang memiliki peran etiologis atau prognostik pada kanker (Musarrat *et al.*, 1996).

Paparan kronis yang kuat terhadap ROS dapat menginduksi perkembangan penyakit inflamasi kronis dan karsinogenesis (Uchida *et al.*, 2020). Peradangan kronis di hati merupakan faktor penting dalam perkembangan *Hepatocellular carcinoma* (HCC)

karena menginduksi stress oksidatif dan menghasilkan sitokin proinflamasi interleukin (IL)-1 β , IL-6, CXCL-8/IL-8 dan faktor nekrosis (TNF)- α . Produksi ini meningkatkan sitokin atipikal dan ROS yang menyebabkan kerusakan DNA dan dapat berkembang menjadi hepatokarsinogenesis (Wang *et al.*, 2016). Ketika sistem pertahanan mendapat paparan zat toksik berlebih, adanya senyawa antara yang reaktif menyebabkan desregulasi jalur pensinyalan sel dan disfungsi biomolekul sehingga terjadi kegagalan fungsi organel dan akhirnya menyebabkan kematian sel. Berbagai faktor genetik menentukan kerentanan individu tertentu terhadap kerusakan hati akibat bahan kimia. Faktor lingkungan, gaya hidup dan kondisi patologis yang sudah ada sebelumnya juga memiliki peran dalam patogenesis cedera hati yang disebabkan paparan bahan kimia (Gu and Manautou, 2012).

Diketahui bahwa kerusakan hati dapat diinduksi oleh NDEA yang disebabkan oleh peningkatan proliferasi sel, penurunan rasio redoks, peradangan, gangguan metabolisme dan lainnya (Qiu *et al.*, 2017). Paparan NDEA menyebabkan induksi stres oksidatif dan kerusakan DNA oleh pembentukan dan akumulasi radikal bebas dalam jumlah besar sehingga meningkatkan risiko terkena kanker (Bilal *et al.*, 2017).

2.2 Asam Ursolat



Gambar 2.1 Struktur Asam Ursolat (Kashyap *et al.*, 2016)

Asam ursolat (asam 3 β -hidroksi-urs-12-en-28-oat) merupakan asam karboksilat triterpen pentasiklik yang dapat diekstraksi dari berbagai tanaman misalnya, *Sanguisorba officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, dan sebagainya (Liu *et al.*, 2017). AU memiliki rumus molekul C₃₀H₄₈O₃ dengan berat molekul 456,71 g/mol. AU berbentuk padatan kristal atau seperti jarum, memiliki titik leleh 283°C-285 °C dengan panjang gelombang maksimum serapan UV sekitar 450 nm. Struktur AU terdiri dari isoprenoid C-30 berupa triterpenoid pentasiklik. AU memiliki kelarutan yang buruk

dalam air, tetapi larut dalam asam asetat glasial panas dan NaOH alkohol (Kashyap *et al.*, 2016)

AU memiliki beberapa sifat farmakologis antara lain sebagai antidiabetes, anti-inflamasi, antioksidan, antimikroba, dan anti-hiperlipidemia (Liu *et al.*, 2017). Diperkirakan AU dapat menghambat stress oksidatif yang diinduksi NDEA di hati disebabkan oleh aktivitas antioksidan dan penangkal radikal bebas yang kuat (Ma *et al.*, 2014). Mekanisme AU sebagai antioksidan yaitu dengan memperbaiki aktifitas sistem antioksidan enzimatik antara lain, *Superoxide Dismutase* (SOD), *Catalase* (CAT), *Glutathione reductase* (GSH), dan *Glutathione peroxidase* (GPx) serta mengurangi stress oksidatif dengan cara memodulasi RAGE, dan menurunkan NADPH oksidase sehingga ROS tidak terbentuk (Kashyap *et al.*, 2016). Efek hepatoprotektif dari AU dapat terjadi mungkin karena aktivitas antioksidannya (Saravanan *et al.*, 2006).

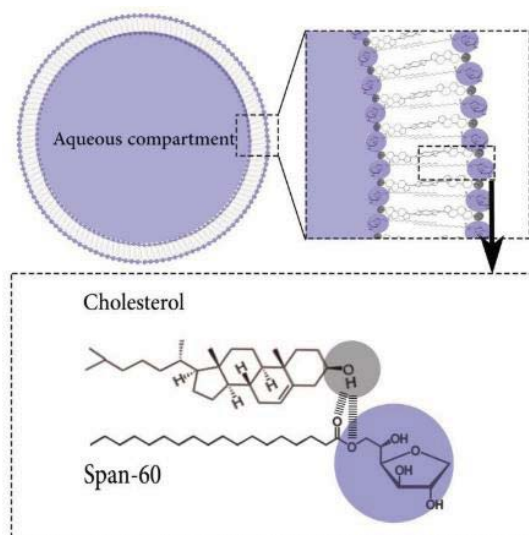
Penyakit hati dengan kerusakan hepatosit parah yang disebabkan oleh infeksi virus, steatohepatitis non-alkohol atau agen hepatotoksik lainnya sangat terkait dengan peradangan akut atau kronis (Tacke *et al.*, 2009; Tseng *et al.*, 2014). Peradangan hati dianggap sebagai ciri fibrosis tahap awal, yang dapat berkembang menjadi fibrosis luas dan sirosis. Kerusakan yang terkait dengan peradangan hati dimediasi oleh sitokin proinflamasi tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) dan *cyclooxygenase-2* (COX-2) (Shin *et al.*, 2013). AU mampu menghambat upregulasi dari TNF- α , IL-1 β , dan COX-2 sehingga dapat dikatakan AU dapat meringankan cedera hati melalui penekanan respon inflamasi (Ma *et al.*, 2014). Produksi beberapa molekul proinflamasi dikaitkan dengan aktivasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) dan faktor nuklir kappa B (NF-kB) (C *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). ROS mengaktifkan jalur pensinyalan MAPK, yang selanjutnya mengaktifkan beberapa sitokin inflamasi. AU dapat melindungi sel dari respon inflamasi melalui jalur pensinyalan MAPK serta menghambat aktivitas NF-kB (Ma *et al.*, 2014).

Kadar plasma aspartat transaminase (AST) dan alanin transaminase (ALT), yang merupakan biomarker penyakit hati, juga menurun dengan pengobatan AU. Hal ini menunjukkan bahwa AU dapat mengurangi cedera hepatosit (Seo *et al.*, 2018). Pemberian AU melebihi nilai LD50 9,26 g/kg pada uji toksisitas akut dalam waktu yang lama pada mencit berpotensi menyebabkan sitotoksitas hati yang tidak diklasifikasikan sebagai toksisitas genetik (Sun *et al.*, 2020). AU tergolong kelompok BCS kelas 4 dimana memiliki permeabilitas dan kelarutan yang rendah (Sun *et al.*, 2020) sehingga diperlukan

sistem penghantaran obat berbasis nanoteknologi agar obat dapat mencapai target site dengan maksimal (Bethlehem, 2011).

2.3 Niosom

Niosom merupakan salah satu sistem penghantaran obat nanopartikel yang berbentuk vesikel bilayer tersusun dari surfaktan non ionik dan kolesterol dalam fase air. Niosom dapat digunakan sebagai alternatif dari liposom karena stabilitasnya lebih tinggi, kemudahan produksi, lebih murah dan lebih fleksibel untuk berbagai jenis surfaktan. Niosom dapat mengenkapsulasi obat hidrofilik dibagian kompartemen hidrofilik dan obat lipofilik akan terperangkap di kompartemen hidrofobik dari bilayer (Kazi *et al.*, 2010; Mohsen *et al.*, 2017). Niosom memiliki *shelf life* yang lebih lama dan mampu untuk menghantarkan obat pada target site secara terkontrol dan berkelanjutan sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas suatu senyawa obat (Mahale *et al.*, 2012). Berdasarkan ukuran vesikel, niosom dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu *small unilamellar vesicles* (SUV, ukuran 0.025-0.05 μm), *multilamellar vesicles* (MLV, ukuran 0.05 μm), dan *large unilamellar vesicles* (LUV, ukuran 0.10 μm) (Kazi *et al.*, 2010).



Gambar 2.2 Struktur Niosom (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014)

2.3.1 Kelebihan dan Kelemahan Niosom

Kelebihan Niosom: (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014; Rajera *et al.*, 2011)

1. Niosom dapat meningkatkan efek terapeutik molekul obat dengan melindungi obat dari lingkungan biologis, menghasilkan bioavailabilitas yang lebih baik dan penghantaran obat yang terkontrol dan menunda *clearence* dari sirkulasi obat dalam tubuh

2. Niosom dapat digunakan dalam penghantaran berbagai macam obat karena memiliki kemampuan untuk menjebak obat hidrofilik, lipofilik serta amfifilik
3. Niosom bersifat biodegradable, biokompatibel dan non imunogenik bagi tubuh
4. Niosom telah digunakan secara efektif dalam menargetkan obat ke berbagai organ
5. Niosom dapat diberikan melalui berbagai rute seperti oral, parenteral dan topikal

Kelemahan Niosom: (Kazi *et al.*, 2010; Moghassemi and Hadjizadeh, 2014)

1. Tidak stabil secara fisik pada suspensi niosom dalam air
2. Dapat mengalami agregasi, fusi dan kebocoran sehingga memerlukan perhatian tambahan dalam proses penyimpanan, distribusi hingga penetapan dosisnya
3. Membutuhkan lebih banyak waktu dalam prosesnya
4. Memerlukan peralatan khusus

2.3.2 Komponen Niosom

2.3.2.1 Surfaktan Non Ionik

Surfaktan non-ionik tersusun dari kisi-kisi bilayer di mana kepala polar atau hidrofilik sejajar menghadap fase air sedangkan kepala hidrofobik atau bagian hidrokarbon akan tersusun sejajar sedemikian rupa sehingga kontak dengan media berair akan minimal (Rajera *et al.*, 2011). Surfaktan nonionik adalah komponen dasar niosom yang setelah dihidrasi membentuk lamellar mikroskopis dan nanoskopik vesikel. Surfaktan nonionik disukai karena sifat dan kemampuannya dapat membentuk formulasi yang stabil. Surfaktan non ionik digunakan dalam formulasi niosom karena memiliki sifat yang stabil, kompatibel dan tidak beracun, kemampuan untuk mempertahankan pH pada pH fisiologis, dan meningkatkan permeabilitas (Mahale *et al.*, 2012). Beberapa klasifikasi surfaktan nonionik yang digunakan dalam pembuatan niosom antara lain turunan alkil eter, alkil ester, dan ester asam lemak. Kelompok surfaktan nonionik yang telah digunakan secara luas adalah alkil ester, seperti *sorbitan fatty acid esters* (Spans) dan *polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters* (Tweens) (Khoee and Yaghoobian, 2017). Surfaktan nonionik meningkatkan permeabilitas dan fluiditas membran biologis sehingga obat-obatan seperti podophylotoxin, etoposide, dan methotrexate menunjukkan peningkatan bioavailabilitas melalui rute transdermal melalui niosom (Mahale *et al.*, 2012)

2.3.2.2 Kolesterol

Steroid merupakan komponen penting dari membran sel dan keberadaannya dapat mempengaruhi fluiditas dan permeabilitas membran. Kolesterol adalah turunan steroid

yang digunakan untuk formulasi niosom. Secara umum, kolesterol dapat mempengaruhi sifat niosom seperti permeabilitas membran, kekakuan, efisiensi enkapsulasi, kemudahan rehidrasi niosom *freeze dried* dan toksisitasnya (Rajera *et al.*, 2011). Jumlah kolesterol yang akan ditambahkan tergantung pada nilai HLB dari surfaktan. Jika nilai HLB meningkat hingga di atas 10, maka gugus hidrofilik menjadi lebih besar. Sehingga untuk menyeimbangkan perubahan tersebut maka diperlukan peningkatan jumlah minimum kolesterol yang akan ditambahkan (Khoee and Yaghoobian, 2017).

2.3.2.3 Molekul Bermuatan

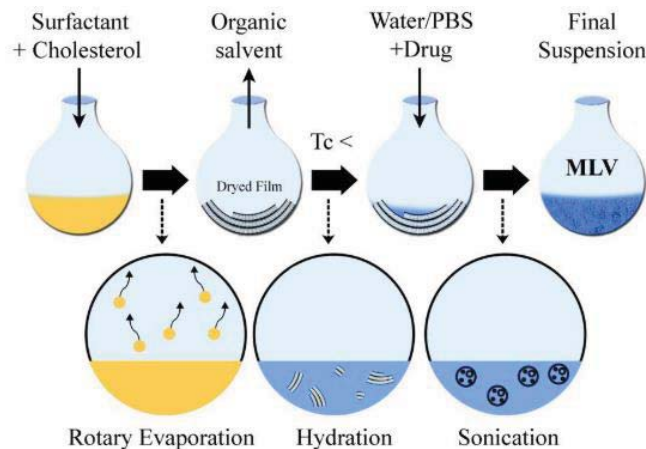
Beberapa molekul bermuatan ditambahkan ke niosom untuk meningkatkan stabilitas niosom melalui gaya tolak elektrostatis yang mencegah *coalescence*. Molekul bermuatan negatif yang digunakan adalah *diacetyl phosphate* (DCP) dan *phosphatidic acid*. Untuk molekul bermuatan positif yang sering digunakan dalam preparasi niosom adalah *stearylamine* (STR) dan *stearyl pyridinium chloride*. Molekul bermuatan ini digunakan terutama untuk mencegah agregasi niosom. Hanya konsentrasi 2,5-5 mol persentase molekul bermuatan yang dapat ditoleransi karena konsentrasi tinggi dapat menghambat pembentukan niosom (Rajera *et al.*, 2011).

2.3.3 Metode Pembuatan Niosom

Terdapat beberapa metode untuk pembuatan niosom antara lain: metode injeksi eter, metode hidrasi lapis tipis, metode sonikasi, metode *reverse phase evaporation*, transmembran pH gradient, metode ekstrusi, dan metode mikrofluidasi (Rajera *et al.*, 2011). Pemilihan metode tersebut tergantung dari ukuran vesikel, jumlah lapis ganda, efisiensi penjemuran fase air serta permeabilitas membran vesikel (Kazi *et al.*, 2010). Metode yang paling umum digunakan yaitu metode hidrasi lapis tipis atau *Thin-Film Hydration*. Pada metode ini, langkah pertama yang dilakukan adalah mencampurkan surfaktan dan kolesterol yang telah dilarutkan dalam pelarut organik pada labu alas bulat. Kemudian pelarut organik diuapkan menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* (Rotavapor) hingga seluruh pelarut habis dan terbentuk lapis film tipis di bagian dinding dalam labu alas bulat. Selanjutnya dilakukan hidrasi dengan menambahkan larutan aqueous seperti air atau *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang sudah mengandung obat diatas suhu transisi surfaktan (T_c) selama waktu tertentu dengan pengocokan terus menerus. Selama proses hidrasi akan terbentuk *Multilamellar Vesicles* (MLV) (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014; Rajera *et al.*, 2011). Rentang ukuran niosom yang terbentuk antara 300-500 nm dengan polidispersi index yang rendah. Metode ini

menghasilkan MLV yang telah digunakan pada proses pembuatan niosom untuk enkapsulasi nimesulide, insulin, hidroksil camptothecin, minoxidil, glukokortikoid, asam salisilat dan p-hidroksil asam benzoat, 5-fluorouracil, transferrin, methotrexate, antioksidan (Khoee and Yaghoobian, 2017).

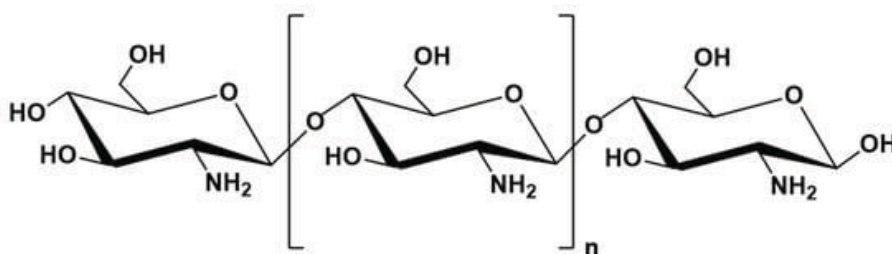
2.3.4 Aplikasi Niosom Peroral



Gambar 2.3 Pembuatan niosom dengan metode hidrasi lapis tipis (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014)

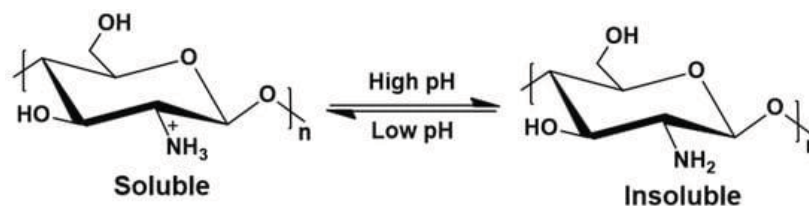
Terdapat beberapa masalah terkait obat ketika digunakan dengan rute peroral antara lain adanya interaksi dengan asam atau enzim pencernaan di lambung ataupun usus halus, absorpsi yang rendah, dan bioavailabilitas obat yang bervariasi. Oleh karena itu, untuk memperbaiki bioavailabilitas obat diberikan melalui sistem penghantaran obat baru seperti niosom (Khoee and Yaghoobian, 2017). Penelitian sebelumnya melaporkan formulasi niosom yang terdiri dari Span 40, Span 60, dan kolesterol diusulkan sebagai sistem penghantaran oral Ganciclovir. Dari studi *in vivo* pada tikus memberikan hasil peningkatan bioavailabilitas yang signifikan setelah penggunaan oral niosom dibanding dengan pemberian tablet (Akhter *et al.*, 2012). Studi lain juga menunjukkan niosom mampu meningkatkan bioavailabilitas oral cefdinir yang merupakan obat golongan BCS kelas IV (Bansal *et al.*, 2013). Studi lain melaporkan bahwa campuran niosom disiapkan untuk pemberian oral Candesartan Cilexetil sebagai model obat yang sukar larut dalam air menghasilkan pelepasan obat *in vitro* pada niosom meningkat dibanding Candesartan Cilexetil bentuk bebas (Sezgin-Bayindir *et al.*, 2015).

2.4 Kitosan



Gambar 2.4 Struktur Kitosan (El-banna *et al.*, 2019)

Kitosan (CS) adalah turunan paling penting dari kitin yang dibuat oleh deasetilasi alkali dari kitin (Patil *et al.*, 2018). Struktur kitosan terdiri dari unit β -1,4-linked 2-amino-2-deoxy- β -D-glucose (deasetilasi D-glukosamin) dan N-asetil-D-glukosamin (Reddy *et al.*, 2012). Kitin adalah salah satu polisakarida amino alami paling melimpah yang diperoleh dari komponen dinding sel jamur dan struktur keras tertentu pada invertebrata dan ikan. Kitosan memiliki gugus fungsi hidroksil ($-\text{OH}$) dan amin ($-\text{NH}_2$) yang berlimpah, yang dapat digunakan untuk bereaksi dengan *cross linking agent* untuk membentuk *in situ chemical cross linking*. Selain itu, pada jaringan tubuh terdapat enzim tertentu yang dapat mengurai kitosan menjadi oligosakarida yang sifatnya tidak beracun sehingga kitosan aman untuk penggunaan klinis (Rizeq *et al.*, 2019). Kitosan memiliki sifat-sifat seperti biokompatibilitas, biodegradabilitas, hidrofilisitas, tidak beracun, bioavailabilitas tinggi, mudah untuk modifikasi, permeabilitas air yang menguntungkan, ketahanan kimia yang sangat baik, kemampuan untuk membentuk film, gel, nanopartikel, dan mikropartikel (Shariatnia, 2019). Kitosan tidak larut dalam air, pelarut organik dan basa. Namun, larut setelah diaduk dalam asam seperti asetat, nitrat, hidroklorat, perklorat dan fosfat (Kazi *et al.*, 2010).



Gambar 2.5 Struktur kimia kitosan dalam pH tinggi dan pH rendah (El-banna *et al.*, 2019)

Penggunaan kitosan dianggap sangat menjanjikan pada terapi kanker yang merupakan fase lanjut dari kerusakan hati karena sifatnya yang *mucoadhesive*, cenderung terakumulasi secara selektif dalam mukosa, terutama pada permukaan sel kanker anionik

karena kitosan bersifat kationik (Duttagupta *et al.*, 2015). Dua hal penting terkait bioaplikasi kitosan adalah kelarutannya yang rendah pada pH fisiologis (~7.4) dan disolusinya yang cepat di lambung. Pada pH asam (di bawah pKa kitosan yaitu 6,3) ikatan antar rantai melemah karena adanya protonasi amino menjadi bentuk ion terlarut $R-NH_3^+$ menyebabkan kitosan mengalami disolusi. Di sisi lain, sensibilitas pH kitosan dapat menjadi keuntungan dalam hal penghantaran obat yang strategis, misalnya, dalam mencegah pelepasan obat pada pH fisiologis dan meningkatkan pelepasannya dalam lingkungan asam seperti pada tumor (Rizeq *et al.*, 2019). Karena memiliki kemampuan *mucoadhesive*, kitosan dapat memberi pelepasan yang terkontrol sehingga dapat digunakan untuk meningkatkan absorpsi di saluran cerna serta meningkatkan permeabilitas. Kitosan dapat berinteraksi secara ionik antara muatan positif dari gugus amino dengan muatan negatif pada permukaan sel (Moghassemi *et al.*, 2015). Selain itu, kitosan juga dapat membuka *tight junction* dari sel epitel dan menghasilkan jalur *paracellular* melalui barrier epitel sehingga dapat meningkatkan penetrasi ke dalam peredaran sistemik (Wang *et al.*, 2017).

Penelitian sebelumnya telah membuktikan pada studi *in vivo* dengan pemberian liposom AU dengan pelapisan kitosan dapat meningkatkan kecepatan penghambatan tumor dibanding dengan pemberian AU bebas ataupun liposom AU (Wang *et al.*, 2017). Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya pelapisan kitosan dapat meningkatkan bioaktivitas AU dan menunjukkan efek penghambatan tumor yang lebih baik sebab kitosan dapat meningkatkan kerapatan muatan positif pada permukaan liposom sehingga dapat berinteraksi dengan muatan negatif pada permukaan sel tumor. Selain itu, muatan positif pada liposom AU yang dilapisi kitosan dapat memfasilitasi pelepasan obat berdasarkan pH serta obat dapat menembus jaringan tumor melalui EPR effect (Wang *et al.*, 2017). Terdapat juga penelitian pada niosom atorvastatin didapatkan efisiensi terapeutik tertinggi didapat secara berurutan pada formula niosom yang dienkapsulasi kitosan > niosom yang tidak dienkapsulasi > suspensi obat (Fayed *et al.*, 2021). Oleh karena itu, liposom atau niosom yang dilapisi kitosan dapat digunakan sebagai sistem penghantaran obat yang menjanjikan.

2.5 Induksi NDEA

N-Nitrosodiethylamine (NDEA) adalah hepatotoksikan, karsinogen dan mutagen yang efektif yang banyak digunakan sebagai model eksperimental (Mukherjee and Ahmad, 2015). NDEA merupakan salah satu hepatotoksin yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan hati (Mukherjee and Ahmad, 2015). NDEA mengalami reaksi alfa-

hidroksilasi dan dealkilasi, sehingga menghasilkan molekul etil diazonium hidroksida yang tidak stabil yang dapat menghasilkan spesies ion karbonium seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang sangat reaktif dan dapat mengikat biomolekul yang berbeda, termasuk DNA dan protein (Romualdo *et al.*, 2021). Biotransformasi NDEA menjadi metabolit alkilasi diperantarai oleh sitokrom P450 termasuk CYP2E1 (Romualdo *et al.*, 2021). Dari penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian NDEA meningkatkan kerentanan hepatosit terhadap karsinogenesis dengan mengurangi aktivitas SOD dan CAT. Stres oksidatif melalui pembentukan ROS menyebabkan denaturasi protein/enzim dengan pembentukan karbonil protein yang mungkin menyebabkan penghambatan aktivitas enzimatis (Höhn and Grune, 2014). Stres oksidatif yang disebabkan oleh ROS selama metabolisme NDEA diketahui berkontribusi pada hepatokarsinogenesis karena menyebabkan kerusakan DNA, protein, dan lipid (Yim and Lee, 2019). Selain itu, disregulasi apoptosis juga terkait dengan hepatokarsinogenesis yang disebabkan oleh banyak bahan kimia termasuk NDEA (Zhang *et al.*, 2012). Stres oksidatif terkait hepatokarsinogenesis melibatkan modifikasi faktor nuklir-eritroid 2 (Nrf2), regulasi antioksidan, ekspresi gen enzim fase II, kerusakan DNA, peroksidasi lipid, peningkatan sitokin proinflamasi, penipisan enzim perbaikan DNA, mutasi gen p53, dan disfungsi mitokondria (Masarone *et al.*, 2018; Raghunath *et al.*, 2018; Uchida *et al.*, 2020).

Efek hepatokarsinogenik nitrosamin diperkirakan juga tergantung dari genetika hewan, jenis kelamin, usia, dan faktor lain yang mungkin memengaruhi hasil dari percobaan (Tolba *et al.*, 2015). Peningkatan kerusakan hati yang dikombinasikan dengan imunosupresi yang diinduksi nitrosamin dapat menyebabkan peradangan sistemik dan dapat berkembang terus menerus hingga mengakibatkan tingkat kematian yang tinggi. NDEA menginduksi kerusakan hati, fibrosis, sirosis, dan HCC. Terjadinya kerusakan tersebut berkorelasi dengan peningkatan aktivitas serum aminotransferase, sehingga meningkatkan ekspresi gen marker fibrotik seperti kolagen, dan kadang-kadang juga meningkatkan biomarker tumor seperti serum α -fetoprotein (Tolba *et al.*, 2015). NDEA umumnya diberikan melalui injeksi intraperitoneal (IP) karena dengan rute ini memungkinkan pemberian dosis yang tepat dan menjamin setiap hewan mendapat jumlah NDEA yang sama (Tolba *et al.*, 2015).

2.6 SGOT dan SGPT

Hati merupakan organ yang sensitif terhadap zat toksik dan berperan penting dalam proses detoksifikasi. Zat-zat yang diabsorpsi dari saluran cerna akan masuk ke peredaran

darah dan dibawa ke hati untuk dimetabolisme menjadi zat nontoksik dan kemudian diekskresikan. Ketika hati terpapar zat toksik dan terjadi nekrosis pada sel hati, sel hati akan melepaskan enzim-enzim yang ada di dalamnya ke peredaran darah. Perubahan kadar enzim-enzim tersebut dalam darah dapat digunakan sebagai parameter terjadinya kerusakan pada hati. SGOT dan SGPT merupakan salah satu enzim yang peka terhadap kerusakan sel-sel hati (Rosida, 2016).

Kadar SGOT dan SGPT dalam serum atau plasma penting untuk identifikasi dan pemantauan penyakit hati (Carobene *et al.*, 2013). *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT) dikenal juga sebagai *Aspartate Aminotransferase* (AST) sedangkan *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) juga dikenal sebagai *Alanine Aminotransferase* (ALT) (Rosida, 2016). Peningkatan kadar serum SGOT dan SGPT spesifik untuk gangguan hepatoseluler (Al-Rejaie *et al.*, 2009). SGOT maupun SGPT berperan dalam glukoneogenesis dengan mengkatalisis transfer gugus amino dari asam aspartat atau alanin ke asam ketoglutarat untuk masing-masing menghasilkan asam oksaloasetat dan asam piruvat. SGOT berada dalam isoenzim sitosol dan mitokondria yang ditemukan di hati, otot jantung, otot rangka, ginjal, otak, pankreas, paru-paru, leukosit, dan sel darah merah sehingga SGOT ini tidak sensitif atau spesifik untuk hati, maka peningkatan SGOT saja tidak dapat mencerminkan kerusakan hanya terjadi di sel hati, namun dapat pula menunjukkan adanya kerusakan pada sel otot atau otot jantung. SGPT adalah enzim sitosol yang ditemukan dalam konsentrasi tinggi di hati. Cedera hepatoseluler dan terkadang kematian sel merupakan pemicu pelepasan enzim ini ke dalam sirkulasi (Lala *et al.*, 2021). Peningkatan kadar SGOT dan SGPT disebabkan adanya perubahan permeabilitas atau kerusakan dinding sel hati sehingga digunakan sebagai penanda gangguan integritas sel hati (Rosida, 2016).

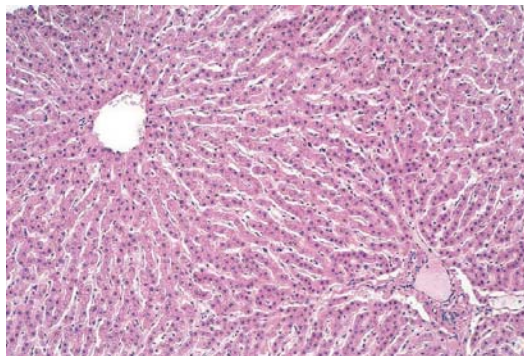
Kadar normal SGPT pada mencit (*Mus musculus* L.) berkisar antara 23,2-48,4 IU/L sedangkan kadar SGOT berkisar antara 2,1-23,8 IU/L (Smith, 1988). Kadar SGOT dan SGPT ditentukan dengan metode kinetik reaksi enzimatik sesuai dengan IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) (Sardini, 2007). Peningkatan enzim ALT dan AST sampai 300 U/L tidak spesifik untuk kelainan hati saja, tetapi jika didapatkan peningkatan lebih dari 1000 U/L dapat diperkirakan terjadi penyakit hati akibat virus, iskemik hati yang disebabkan hipotensi lama atau gagal jantung akut, dan kerusakan hati akibat obat atau zat toksin. Tumor hati dapat menunjukkan peningkatan alkali fosfatase dan gamma GT. Nilai konsentrasi SGOT dan SGPT masih normal ketika karsinoma hepatoseluler pada stadium awal tetapi pada

stadium lanjut ketika kerusakan sel lebih parah, SGOT dan SGPT akan meningkat (Rosida, 2016).

2.7 Histopatologi Jaringan Hati

Hati adalah organ kelenjar terbesar dengan berat kurang lebih 1200-1500 gram. Terletak di abdomen kuadrat kanan atas menyatu dengan saluran bilier dan kandung empedu. Hati menerima pendarahan dari sirkulasi sistemik melalui arteri hepatica dan menampung aliran darah dari sistem porta yang mengandung zat makanan yang diabsorpsi usus. Secara mikroskopis, hati tersusun oleh banyak lobulus dengan struktur serupa yang terdiri dari hepatosit, saluran sinusoid yang dikelilingi oleh endotel vaskuler dan sel kupffer yang merupakan bagian dari sistem retikuloendotelia (Rosida, 2016). Sel hati (hepatosit) berbentuk polihedral, intinya bulat terletak ditengah, nukleulus dapat satu atau lebih dengan kromatin yang menyebar. Sitoplasma hepatosit agak berbutir, tetapi dapat tergantung pada perubahan nutrisi serta fungsi seluler. Mitokondria relatif banyak dan aparatus golgi terletak dekat kanalikuli empedu (Dellmann, 1992).

Uji histopatologi dilakukan dengan pewarnaan bagian histologi hati menggunakan hematoksilin dan eosin (H&E) kemudian dibandingkan dengan gambaran histopatologi masing-masing organ kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Mikrostruktur dan penampakan histopatologi jaringan diamati dengan menggunakan light mikroskop. Hematoksilin merupakan zat warna bersifat basa yang memiliki afinitas terhadap komponen asam sel seperti asam nukleat yang ada dalam nukleus. Sedangkan eosin adalah pewarna bersifat asam yang dapat mengikat struktur sitoplasma sehingga pewarnaan H&E memberi warna bagian inti sel biru dan sitoplasma berwarna orange-merah (Slaoui and Fiette, 2011).



Gambar 2.6 Histologi Hati Mencit Normal (Victor Eroschenko Philadelphia and Williams, 2008)

Pemberian NDEA yang berkepanjangan menyebabkan terjadinya perubahan histologis pada hati ditandai dengan neutrofilik infiltrasi yang intens, nekrosis hemoragik sentrilobular yang luas, proliferasi saluran empedu, fibrosis, dan nekrosis. Terjadinya perubahan histologis ini tergantung dosis dan waktu pemberian NDEA (Tolba *et al.*, 2015). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Mukherjee dan Ahmad (2015), pengamatan histokimia dengan pewarnaan H&E antara tikus kelompok kontrol dan kelompok yang diberi NDEA menunjukkan perbedaan nyata dalam arsitektur hati. Gambaran hati dari kelompok kontrol menunjukkan arsitektur lobular yang khas dengan parenkim utuh, vena sentral dan ruang sinusoidal. Sedangkan kelompok tikus yang diberi NDEA terjadi kerusakan arsitektur hati yang bergantung pada dosis NDEA yang diberikan. Pada spesimen hati yang diinduksi dengan NDEA memiliki ciri khas adanya peradangan yang parah, perdarahan, hepatosit displastik, dan infiltrasi neutrofilik. Data histopatologi tersebut menunjukkan bahwa NDEA, termasuk nitrosamin lainnya (NDMA), dapat menyebabkan kerusakan serius pada hati dan mengganggu fungsinya.

Pada penelitian yang lain, juga diketahui pemberian NDEA menyebabkan nekrosis sel dan kerusakan dinding sel hati (Ali *et al.*, 2019). Pada penelitian tersebut juga dilakukan percobaan pada kelompok dengan pemberian asam ursolat, dimana terlihat preparat histologi hati mencit yang diberi asam ursolat diketahui tidak ada nekrosis selular dan infiltrat radang (Ali *et al.*, 2019). Hal ini menandakan asam ursolat mampu memperbaiki perubahan biokimia dan histologis yang disebabkan oleh kerusakan hati yang mengarah pada perkembangan karsinoma hepatoselular (Ali *et al.*, 2019).