

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Produk perawatan kulit (*skin care*) merupakan salah satu produk kebutuhan yang penting digunakan sebagai perawatan dan kesehatan kulit, maupun memperbaiki dan meningkatkan penampilan kulit (Adjeng *et al.*, 2023). Di zaman ini, dikatakan memiliki penampilan yang sempurna ketika memiliki kulit wajah yang putih dan sehat. Sekitar 49,38% wanita menggunakan *skin care* pemutih kulit (*skin whitening*) agar kulit terlihat lebih halus dan sehat, serta sekitar 30,86% wanita menggunakan *skin whitening* untuk terlihat lebih cantik (Than *et al.*, 2023). Sehingga, saat ini penggunaan produk untuk *skin whitening* paling banyak beredar di pasaran (Harini, Sinaga, & Apriani, 2022). Selain itu, mayoritas kulit masyarakat Indonesia memiliki warna kulit yang gelap terutama disebabkan oleh paparan sinar matahari yang kuat. Penyebab gelapnya warna kulit karena adanya produksi pigmen warna kulit (melanin) yang berlebih atau biasa disebut hiperpigmentasi (Soyata & Chaerunisaa, 2021). Bahan-bahan yang bisa digunakan untuk mengatasi hiperpigmentasi, yaitu arbutin, asam kojic, niasinamida, lignin peroksida, dan asam *allegic* (Hollinger, Angra, & Halder, 2018).

Bahan *skin care* topikal yang telah terbukti mengatasi hiperpigmentasi, yaitu arbutin ($IC_{50}=6 \mu M$) dan asam kojic ($IC_{50}=10,33 \mu M$) (Banna *et al.*, 2018). Selain itu, salah satu bahan yang dapat menghambat aktivitas enzim *tirosinase* yaitu glutathione dengan nilai $IC_{50}=1,18 \mu M$ yang menunjukkan bahwa glutathione memiliki aktivitas penghambatan enzim *tirosinase* lebih tinggi dari pada arbutin dan asam kojic (Masum, Yamauchi, Mitsunaga., 2019). Produk pemutih kulit telah banyak dikembangkan dalam bentuk *sunscreens*, *cream*, ataupun *lotion* (Soyata & Chaerunisaa., 2021). Namun, bentuk sediaan topikal tersebut memiliki keterbatasan tertentu dan dapat mengganggu keamanan serta target pengobatan. Sehingga, telah dikembangkan produk perawatan kulit nanopartikel berbasis lipid untuk membantu sistem penghantaran obat pada target pengobatan (Rohmah *et al.*, 2019).

Berbagai jenis produk nanopartikel berbasis lipid yang biasa diterapkan untuk topikal, yaitu liposom, nanoemulsi lipid, *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN), dan *Nanostructured Lipid Carriers* (NLC) (Mohd-Setapar *et al.*, 2022). NLC merupakan salah satu sistem berbasis lipid nanopartikel yang dikembangkan dari SLN. NLC memiliki stabilitas yang baik, mampu mengatasi masalah degradasi obat, memberikan pelepasan yang terkendali, dan memungkinkan muatan obat yang tinggi (Aldawsari *et al.*, 2018). Struktur yang dimiliki NLC lebih unggul dan memiliki ukuran lebih kecil yang dapat meningkatkan daya rekat kulit dan luas permukaan yang berpotensi



obat melalui kulit (Elmowafy, 2019). NLC menggunakan sistem terdiri dari campuran lipid cair dan lipid padat yang menyediakan ung senyawa zat aktif (Rahmasari, 2022).

id cair yang biasa digunakan dalam NLC yaitu asam oleat, erol, dan squalena. Sedangkan lipid padat yang biasa digunakan, gliseril monostearat, *cetyl palmitate*, dan *Gelucire*[®]. Selain itu, an lipid padat yang biasa digunakan dalam NLC, yaitu lesitin dan

Compritol[®] 888. Lesitin adalah fosfolipid yang sangat murni dan dapat digunakan sebagai bahan baku untuk persiapan vesikel lipid yang merupakan lipid pembawa dalam beberapa sistem penghantaran obat (Jala & Prasad, 2015). *Compritol*[®] 888 adalah salah satu eksipien yang paling baik untuk preparasi nanopartikel berbasis lipid karena memiliki daya serap obat yang tinggi, potensi penghantaran obat hidrofilik dan lipofilik, memiliki sifat yang non-polar, dan sitotoksitasnya yang rendah dibandingkan dengan lipid lainnya (Rao *et al.*, 2022). Bahan pembawa lipid dapat mempengaruhi ukuran partikel NLC yang akan berperan dalam sistem penghantaran obat menuju target pengobatan (Campos *et al.*, 2023).

Motawea *et al.* (2019) telah meneliti NLC fenitoin dan mendapatkan ukuran partikel 150 nm dengan profil pelepasan $82,65 \pm 4,71\%$ selama 2 hari. Sriarumtias *et al.* (2017) telah meneliti emulsi retinil palmitat dan NLC retinil palmitat yang mendapatkan ukuran partikel sebesar 60 nm dengan profil pelepasan $52,58 \pm 4,37\%$ selama 6 jam, dan ukuran partikel emulsi retinil palmitat yang lebih besar dengan profil pelepasan $18,22 \pm 1,5\%$ selama 6 jam. Hal ini menunjukkan ukuran partikel sediaan dapat mempengaruhi pelepasan obat. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode untuk mengetahui profil pelepasan obat dalam sediaan topikal (Sriarumtias *et al.*, 2017).

Metode pelepasan obat topikal dapat dilakukan menggunakan *Franz Diffusion Cell* (FDC). Prinsip metode *Franz Diffusion Cell* adalah mensimulasikan proses difusi dan penyerapan zat pada kulit. Membrane akan memisahkan kumpulan menjadi dua bagian (kompartemen donor dan reseptor). Sampel uji diaplikasikan pada permukaan kulit (membran) dan media akseptor dikumpulkan pada waktu yang berbeda (Liang *et al.*, 2024).

Berdasarkan uraian tersebut, menunjukkan bahwa ukuran partikel dapat mempengaruhi pelepasan obat. Oleh karena itu, penting untuk mengetahui pengaruh ukuran partikel terhadap pelepasan Glu-LC/NLC. Maka akan dilakukan penelitian mengenai pengaruh ukuran partikel terhadap pelepasan Glutathione *loaded* lesitin dan *Compritol*[®] 888 *Nanostructured Lipid Carriers* secara *in vitro*

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka masalah yang dapat dirumuskan adalah bagaimana pengaruh ukuran partikel terhadap pelepasan Glu-LC/NLC yang menggunakan lesitin dan *Compritol*[®] 888 sebagai fase lipid?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ukuran partikel terhadap pelepasan Glu-LC/NLC yang menggunakan lesitin dan *Compritol*[®] 888 sebagai fase lipid.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas (Pyrex[®]), *freeze dryer*, *magnetic stirrer* (Joanlab[®]), *high speed dispersion homogenizer* FJ200-SH (AIK[®]), *high speed refrigerated centrifuge* MK-20RB (SCI Material Hub[®]), mikropipet (Joanlab[®]), PSA (NKT-N9[®] *Nanoparticle Sizer Analysis*) *syringe pump* (BeneFusion SP1 Mandray[®]), spektrofotometer UV-Vis (Jinghua[®] 754PC), timbangan analitik (Sojilab[®] HPSJ5001), vortex (DLab[®]), *ultrasonic homogenizer* (Scientz-IID[®]), *waterbath sonicator* (DigitalPro+[®]), zeta sizer (Malvern Nano Zeta-Size[®]).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *aquadest* (Waterone[®]), diklorometana (DCM) (Macklin[®]), *Compritol 888* (*Sigma-Aldrich*, BM 414,7 g/mol), Glutation (Macklin[®], BM 307,33 g/mol), *Lecitin* (Lansida[®], BM 758,1 g/mol), *membrane cellophane* (MWCO 3500), PBS (*Phosphate-Buffer Saline*) (pH 7,4), reagen Ellman DTNB [5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] (*Thermo Scientific*[®]), dan *Tween*[®] 80 (*Sigma-Aldrich*).

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Formulasi NLC

Glu-LC/NLC dibuat dalam tiga formula sediaan, yaitu F1, F2, dan F3 dengan jumlah konsentrasi lipid dan zat aktif yang berbeda-beda. Lipid cair dan lipid padat yang digunakan adalah lesitin dan *Compritol*[®] 888, serta menggunakan *Tween* 80 sebagai surfaktan.

Tabel 1. Komposisi formula Glu-LC/NLC

Bahan	Fungsi	Formula		
		F1	F2	F3
Fase Air				
<i>Glutathione</i> (mg)	Zat Aktif	30	60	90
<i>Tween</i> 80 (mg)	Surfaktan	400	400	400
<i>Aquadest</i> (ml)	Pelarut	20	20	20
Fase Lipid				
Lesitin (mg)	Lipid Cair	50	100	150
<i>Compritol</i> [®] 888 (mg)	Lipid Padat	100	200	300

Pembuatan Glu-LC/NLC dibuat dengan menggunakan teknik W/O/W *Emulsification with Controlled External Phase Injection*. Pada fase air, dibuat dengan mencampurkan *Tween* 80, glutation, dan *aquadest*. Secara terpisah, fase lipid dilarutkan dengan lesitin dan *Compritol*[®] 888 dalam pelarut DCM.



fase air ditambahkan ke dalam fase lipid dengan menggunakan kecepatan 4 mL/menit sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* rpm, sehingga terbentuk sistem W/O. Selanjutnya, campuran W/O ke dalam 10 mL *aquadest* dan dihomogenisasi menggunakan kecepatan 5000 rpm selama 3 menit untuk membentuk sistem Campuran tersebut diupkan dengan *magnetic stirrer* dengan

kecepatan 400 rpm selama 2 jam di lemari asam (Banna, *et al.*, 2018). Glu-LC/NLC kemudian disimpan pada suhu -4°C untuk penggunaan selanjutnya.

2.2.2 Analisis Ukuran Partikel

Bentuk dan ukuran partikel NLC dapat diukur menggunakan alat PSA. Cara pengukuran sediaan NLC adalah dengan mengambil sebanyak 1 - 2 tetes sediaan dan dilarutkan kedalam *aquadest* lalu diaduk hingga homogen. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam kuvet dan masukkan kuvet tersebut ke dalam alat *Malvern zetasisizer nano* (Rahmat & Rachmaniar., 2023).

2.2.3 Penentuan Kadar Glutation

2.2.3.1 Pembuatan larutan stok

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan menimbang glutathione sebanyak 10 mg dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml, kemudian dilarutkan dengan PBS Ph 7,4 dicukupkan hingga tanda batas. Larutan stok glutathione disonikasi hingga diperoleh larutan jernih (Al-Temimi, Al-Hilifi, Al-Mossawi., 2023).

2.2.3.2 Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum glutathione dilakukan dengan cara mengencerkan larutan stok glutathione 1000 ppm hingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Larutan kemudian ditambahkan dengan PBS (Ph 7,4) dan 20 μL larutan reagen Ellman DTNB [5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] (Ekpo *et al.*, 2024). Larutan kemudian dipindai menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang Vis 400-800 nm (Al-Temimi, Al-Hilifi, Al-Mossawi., 2023).

2.2.3.3 Pembuatan kurva baku

Pembuatan Larutan standar kurva baku glutathione dibuat dengan cara membuat 7 seri konsentrasi yaitu 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 ppm dengan PBS (Ph 7,4) dan ditambahkan 20 μL larutan reagen Ellman DTNB [5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] pada masing-masing pengenceran. Kemudian lakukan pengukuran absorbansi pada setiap seri konsentrasi menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Ekpo *et al.*, 2024). Persamaan regresi linear ($y = a+bx$) akan diperoleh dari analisis regresi hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan standar (Al-Temimi, Al-Hilifi, Al-Mossawi., 2023).

2.2.4 Uji Drug Loading dan Encapsulation Efficiency

Uji *drug loading* dan efisiensi penyerapan dilakukan dengan cara mencuplik 1 mL supernatan sampel yang telah disentrifus selama 2 jam ada kecepatan 7000 rpm.



an ke dalam 3 mL PBS (Ph 7,4) yang telah direaksikan dengan 20 telah itu, larutan akan diuji pada panjang gelombang maksimum. *loading* (DL) dan Efisiensi Penjerap (EE) ditentukan menggunakan Brito Raj *et al.*, 2019):

$$\frac{\text{glutathione yang terjerap dalam NLC (mg)}}{\text{glutathione total dan polimer (mg)}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\% EE = \frac{\text{Jumlah glutation yang terjerap dalam NLC}}{\text{Jumlah glutation dalam sediaan secara teoritis}} \times 100\% \quad (2)$$

2.2.5 Uji Drug Release Secara In Vitro

Uji pelepasan dilakukan dengan menggunakan alat *Franz Diffusion Cell*. Uji pelepasan dilakukan untuk mengetahui perbandingan jumlah Glu-LC/NLC yang dilepaskan selama interval waktu tertentu. Membran selofan adalah membran artifisial selofan yang sengaja dibuat untuk digunakan sebagai model membran pada kulit. Pengujian dilakukan dengan cara 1 mL NLC disimpan pada membran selofan dan diposisikan di antara kompartemen donor dan kompartemen reseptor. Sebanyak 25 mL (37°C) larutan buffer fosfat pH 7,4 dimasukkan pada kompartemen reseptor. Kompartemen reseptor diaduk dengan kecepatan 100 rpm menggunakan stir bar untuk menjaga cairan agar tetap homogen. Tidak diperuntukkan menggunakan kecepatan pengadukan yang tinggi karena dapat menyebabkan timbulnya gelembung gas pada cairan kompartemen reseptor dan diantara membrane (Annisa, Hendradi & Melani., 2016). Dilakukan pengambilan cairan medium dari kompartemen reseptor sebanyak 0,3 mL menggunakan *syringe* dan segera mengganti cairan medium kembali sebanyak 0,3 mL, lakukan pengulangan pada menit ke- 15, 30, 60, 120, 240, dan 480 (Tajudin *et al.*, 2023). Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi sampel dengan menambahkan 20 μL larutan DTNB, lalu dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (Turkey *et al.*, 2019). Jumlah pelepasan kumulatif Glu-LC/NLC per luas area difusi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dihitung dengan rumus (Chandra, 2019):

$$Q = \frac{[C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C \cdot S]}{A} \quad (3)$$

Keterangan:

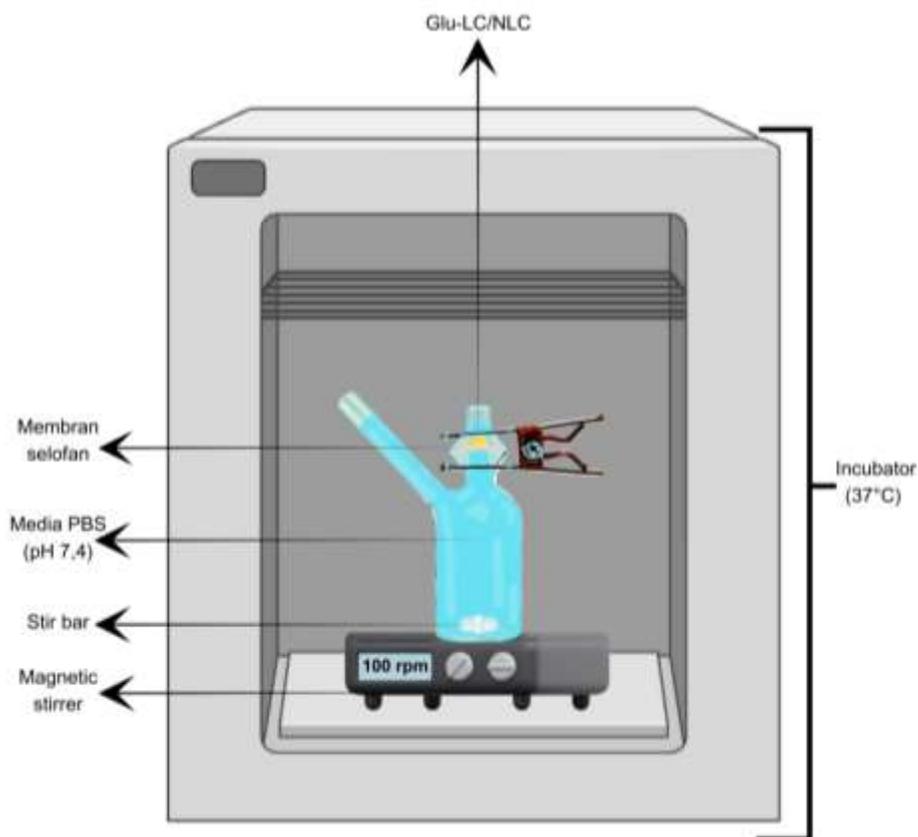
- Q = jumlah kumulatif glutation yang terlepas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
- C_n = konsentrasi glutation pada jam ke-n
- $\sum_{i=1}^{n-1} C \cdot S$ = konsentrasi obat terlepas pada sampling sebelum n
- V = volume sel difusi *Franz* (mL)
- S = volume sampling (mL)
- A = luas membran (cm^2)

Kecepatan pelepasan tiap satuan waktu (fluks) Glu-LC/NLC berdasarkan hukum Fick I: (Chandra, 2019)

$$J = \frac{M}{S \times t} \quad (4)$$



- = fluks ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$)
- = luas area difusi (cm^2)
- = berat glutation yang melalui membran (μg)
- = waktu (jam)



Gambar 1. Skema *franz diffusion cell* (dibuat menggunakan BioRender.com)

2.2.6 Pengumpulan dan Analisis Data

Data diperoleh dari hasil ukuran partikel, DL, EE, dan pelepasan sediaan Glu-LC/NLC menggunakan aplikasi IBM SPSS *Statistic*[®]. Data yang diperoleh terdistribusi secara normal sehingga dilanjutkan dengan analisis *One-Way Anova* untuk mengetahui signifikansi dari tiap formula. Hasil analisis data dinyatakan berbeda secara signifikan apabila memiliki nilai $p < 0,05$. Selanjutnya dilakukan analisis *multiple comparison (Post Hoc Test)* melalui uji *Tukey's Honest Significant Difference*. Selain itu, model kinetika pelepasan obat dianalisis menggunakan perangkat lunak DDSolver yang diintegrasikan ke dalam *Microsoft Excel*[®].

