



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara yang berada tepat di garis khatulistiwa dan beriklim tropis sehingga intensitas paparan sinar matahari sangat tinggi. Paparan sinar matahari dapat menyebabkan kerusakan kulit melalui penyinaran ultraviolet (UV). Sinar UV terbagi atas 3 yaitu UVA (316-400 nm), UVB (281-315 nm) dan UVC (100-280 nm). Sinar UVC dapat diserap oleh lapisan ozon, UVB hanya diserap sebagian oleh lapisan ozon, dan UVA tidak diserap karena lapisan ozon hanya dapat menyerap panjang gelombang UV yang lebih pendek sehingga UVA dan UVB masih dapat masuk ke permukaan bumi. Hal tersebut bisa menyebabkan hiperpigmentasi kulit, kulit kusam, bahkan bisa meningkatkan risiko terkena kanker kulit. Hiperpigmentasi adalah gangguan pada kulit akibat produksi melanin yang berlebihan sehingga kulit menjadi lebih gelap. Hiperpigmentasi jika tidak diobati dapat menyebabkan penderitanya mengalami gangguan psikososial bahkan bisa meningkatkan risiko terkena kanker kulit sehingga diperlukan pengobatan untuk mengatasi hiperpigmentasi (Ashar & Riyaningrum, 2022).

Salah satu pengobatan yang dapat dilakukan untuk mengatasi hiperpigmentasi yaitu menggunakan agen anti hiperpigmentasi seperti *hydroquinone* (HQ), *kojic acid* (KA), dan arbutin. Akan tetapi penggunaan senyawa-senyawa tersebut memiliki efek samping seperti HQ yang menyebabkan iritasi, hipopigmentasi, sensitisasi, okronosis, dan eritema sehingga penggunaan HQ disarankan berada dalam pengawasan medis (Fabian *et al.*, 2023). Penggunaan KA juga menyebabkan iritasi, kulit meradang, nyeri, gatal, ruam, bahkan bisa menyebabkan kanker kulit jika digunakan pada kulit yang rusak (Saeedi *et al.*, 2019). Oleh karena itu, dibutuhkan agen anti hiperpigmentasi yang memiliki efek samping lebih sedikit dan efektif untuk digunakan.

Agen anti hiperpigmentasi yang populer saat ini yaitu glutathione. Glutathione (GSH) merupakan senyawa tripeptida yang terbentuk dari 3 asam amino yaitu L-sistein, glisin dan asam glutamat. Mekanisme kerja GSH sebagai anti hiperpigmentasi yaitu menghambat enzim tirosinase dengan cara pengikatan gugus tiol dengan situs aktif enzim yang mengandung tembaga, sebagai antioksidan dengan cara berikatan dengan radikal bebas sehingga terjadi detoksifikasi, dan mengubah produksi eumelanin (yang menghasilkan warna coklat tua) menjadi pheomelanin (yang menghasilkan warna kuning-merah) sehingga terjadi perubahan warna kulit menjadi lebih putih dan cerah (Sonthalia *et al.*, 2018). Berdasarkan nilai IC_{50} HQ, KA, dan arbutin yaitu 1,1 μ M, 10,33 μ M, dan 40 μ M sedangkan GSH yaitu 1,18 μ M. Jadi kemampuan GSH dalam menghambat enzim tirosinase lebih kuat dibandingkan KA dan arbutin (Masum *et al.*, 2019; Banna *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2019). GSH sebagai anti hiperpigmentasi memiliki target berupa lapisan basal epidermis. Oleh karena itu, diperlukan sistem penghantaran obat yang efektif untuk mencapai lapisan kulit yang lebih dalam (Mahmood, 2022).

Pada penelitian Liu, *et al* (2023), glutathione diformulasikan dalam bentuk *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN). SLN merupakan penghantaran obat yang terdiri atas lipid padat dan surfaktan. SLN memiliki beberapa kekurangan yaitu kapasitas muatan obat



terbatas, profil pelepasan obat yang tidak terkontrol, rentan terhadap transisi morfik, pelepasan obat yang tidak diinginkan selama penyimpanan, tidak stabil dan uap air yang tinggi. Oleh karena itu, dibutuhkan penghantaran obat yang lebih efektif (Liu *et al*, 2023; Viegas *et al*, 2023).

Nanostructured Lipid Carriers (NLC) adalah generasi kedua dari nanopartikel lipid. NLC dikembangkan untuk mengatasi kekurangan dari SLN. NLC dibuat dari campuran lipid cair dan padat yang menghasilkan matriks tidak terstruktur. NLC memiliki beberapa kelebihan yaitu stabil secara fisik, memiliki kapasitas pemuatan obat yang lebih tinggi, dapat meningkatkan kelarutan obat dalam matriks lipid, meningkatkan hidrasi kulit karena sifat oklusifnya, dapat menunjukkan profil pelepasan obat yang lebih terkendali dan stabil dalam penyimpanan (Ghasemiyeh & Samani, 2018). Lipid cair dan lipid padat yang biasa digunakan yaitu lesitin dan compritol 888. Lesitin atau *phosphatidyl choline* merupakan campuran dari beberapa fosfolipid seperti fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamin (PE), dan fosfatidilkolin (PC) (Nurhidayat & Mardawati, 2022). Lesitin aman diaplikasikan pada kulit, tidak menyebabkan iritasi dan dapat meningkatkan kelembaban pada kulit sehingga baik digunakan untuk sediaan topikal (Sintia *et al.*, 2023). Lesitin sebagai lipid cair memiliki beberapa kelebihan yaitu biaya rendah, tidak berbahaya, dan mampu meningkatkan permeabilitas obat (Suhandi *et al.*, 2023). Untuk lipid padat digunakan compritol 888 karena memiliki beberapa kelebihan yaitu membantu pelarutan obat yang lebih baik, meningkatkan efisiensi penyerapan dan pemuatan obat (Rao *et al.*, 2022).

Formulasi NLC yang mengandung glutathione dengan menggunakan lesitin dan compritol 888 sebagai fase lipid belum pernah diteliti hingga saat ini. Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan studi formulasi dan karakterisasi fisika kimia *glutathione-loaded nanostructured lipid carriers* untuk memperoleh nanopartikel dengan karakteristik sifat fisikokimia yang baik.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi lipid terhadap karakteristik fisikokimia Glu-LC/NLC?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi lipid terhadap karakteristik fisikokimia Glu-LC/NLC.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas (Pyrex®), *centrifuge* (MKE® 800-1), *freeze dryer* (Zhengzhou Keda® LC-10N-60E), *homogenizer* (Labo-Hub® FJ200-SH), *incubator* (Faithful®), *infusion pump* (BeneFusion SP1 Mindray®), *magnetic stirrer* (Joanlab®), *micropipette* (Joanlab®), *multiple magnetic stirrer* (Joanlab®), *Particle Size Analyzer* (NKT-N9), spektrofotometer FT-IR (Shimadzu® IRPrestige- 21), spektrofotometer UV-Vis (Jinghua® 754PC), *transmission electron microscopy* (Talos® F200C), timbangan analitik (Osuka® FA1004E), *vortex* (DLab®), *waterbath sonicator* (DigitalPro+®), dan *X-Ray Diffractometry* (Shimadzu® XRD-7000).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *aquadest* (Waterone®), *compritol*® 888 (*Sigma-Aldrich*, BM 414,7 g/mol), diklorometana (DCM 99%; LABOTIQ®), glutation (Macklin®), lesitin (Lansida®, BM 758,1 g/mol), membran selofan (MWCO 3500), *Phosphat Buffer Saline* (PBS) pH 7.0, parafilm, reagen DTNB [5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] (*Thermo Scientific*®), dan *tween*® 80 (*Sigma-Aldrich*).

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Formulasi Glu-LC/NLC

Pada penelitian ini, Glu-LC/NLC dan LC/NLC dibuat dengan 3 formulasi yang berbeda. Rancangan formula lengkap dapat dilihat pada table di bawah.

Tabel 1. Komposisi formula Glu-LC/NLC

Bahan	Fungsi	Formula					
		F1	F1B	F2	F2B	F3	F3B
Fase Air							
Glutation (mg)	Zat aktif	30	-	60	-	90	-
Tween 80 (mg)	Surfaktan	400	400	400	400	400	400
Distilled Water (ml)	Pelarut	20	20	20	20	20	20
Fase Lipid							
Lesitin (mg)	Lipid Cair	50	50	100	100	150	150
Compritol 888 (mg)	Lipid Padat	100	100	200	200	300	300

Ket: B = Blank, glutation pada setiap formula 20% dari total lipid

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 *distilled water*. Secara terpisah, fase lipid dibuat dengan melarutkan lesitin dan *compritol* 888 ATO dengan menggunakan pelarut DCM. Kemudian fase air ditambahkan pada fase lipid menggunakan *syringe pump* dengan kecepatan 4 ml/menit sambil di stirrer dengan kecepatan 500 rpm. Selanjutnya campuran ditambahkan ke dalam aquades 10 ml sambil diaduk menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 5000 rpm selama 3 menit. Lalu diuapkan dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 400 rpm selama 2 jam di lemari asam.



Analisis Morfologi dan Bentuk Partikel

logi permukaan dari formula Glu-LC/NLC divisualisasikan dengan menggunakan . Sampel diletakkan di atas *copper grid* (200-mesh *formvar copper grid*) dan dianalisis dengan metode pewarnaan negatif yang memberikan kontras untuk visualisasi agar terlihat jelas (Banna *et al.*, 2018).

2.2.3 Analisis Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersitas

Analisis ukuran partikel dan PDI formulasi Glu-LC/NLC dilakukan dengan teknik DLS menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Sebelum dianalisis, NLC disuspensikan dengan *aquadest* lalu dimasukkan ke dalam kuvet. Kemudian diukur dan dianalisis dengan NKT-N9 *Particle Sizer* (Ahmad *et al.*, 2021).

2.2.4 Analisis X-Ray Diffraction (XRD)

Analisis kristalinitas Glu-LC/NLC dan glutation dilakukan dengan menggunakan alat XRD (Shimadzu® XRD-7000). Sampel dipadatkan diatas sampel *holder* hingga permukaannya rata. Kemudian dimasukkan ke dalam alat XRD untuk dianalisis pada pengukuran 2-*theta* (Jency *et al.*, 2018).

2.2.5 Analisis Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Pengujian ini dianalisis menggunakan instrumen FT-IR (Shimadzu® IRPrestige-21). Sebelum dianalisis, sampel dicampur dengan kalium bromida (KBr) sebanyak 200 mg. Kemudian dipadatkan ke dalam cakram dan dipindai satu per satu pada rentang bilangan gelombang 500-4000 cm^{-1} (Anter *et al.*, 2019).

2.2.6 Penentuan Kadar Glutation

1. Pembuatan larutan stok

Glutation ditimbang sebanyak 10 mg dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml lalu dilarutkan dengan *distilled water* hingga tanda batas (1000 ppm). Kemudian disonikasi hingga diperoleh larutan jernih (Al-Temimi *et al.*, 2023).

2. Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan stok glutation 1000 ppm diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian dianalisis dengan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang Vis 400-800 nm (Al-Temimi *et al.*, 2023).

3. Pembuatan kurva baku Glutation

Larutan kurva baku glutation dibuat pada konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12 dan 14 ppm dengan menggunakan PBS pH 7 dan penambahan DTNB. Kemudian dilakukan pengukuran pada setiap seri konsentrasi dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Kemudian akan diperoleh persamaan regresi linear ($y = a+bx$) yang merupakan analisis regresi hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan standar (Al-Temimi *et al.*, 2023).



Uji Drug Loading dan Encapsulation Efficiency

E adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui persentase obat yang berada dalam sistem NLC dan dibandingkan dengan jumlah zat aktif yang ditambahkan. Uji EE dan DL dilakukan dengan cara mengukur glutation bebas yang tidak terenkapsulasi. Sediaan di sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 14.000 rpm selama 60 menit. Supernatan yang diperoleh akan diuji pada panjang gelombang maksimum. Efisiensi penyerapan dan *drug loading* dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Ahmad *et al.*, 2021):

$$\%DL = \frac{\text{Jumlah GSH dalam sediaan secara teoritis} - \text{jumlah GSH dalam supernatan}}{\text{Total berat lipid} + \text{GSH dalam sediaan secara teoritis}} 100\% \quad (1)$$

$$\%EE = \frac{\text{Jumlah GSH dalam sediaan secara teoritis} - \text{jumlah GSH dalam supernatan}}{\text{Jumlah GSH dalam sediaan secara teoritis}} 100\% \quad (2)$$

2.2.8 Uji Oklusi Secara In Vitro

Uji oklusi dilakukan dengan menggunakan metode Wissing and coworkers. Pertama, gelas beker yang berisi air suling (50 ml) ditutup dengan membran selofan dan disegel menggunakan parafilm. Formula NLC diratakan diatas permukaan filter dengan menggunakan spatula. Sampel disimpan pada suhu 32 °C (suhu kulit) dalam inkubator selama 48 jam. Gelas beaker yang dilapisi membran tanpa sampel digunakan sebagai blank. Sampel ditimbang setelah 6, 12, 24, dan 48 jam dan eksperimen dilakukan sebanyak 3 kali (n=3). Rumus yang digunakan yaitu:

$$F = \frac{A-B}{A} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan:

F = Nilai oklusi (%)

A = Kehilangan air pada kulit tanpa sampel (blank) (mg)

B = Kehilangan air pada kulit dengan sampel (mg)

2.2.9 Analisis Statistik

Data hasil yang diperoleh dikumpulkan menggunakan *Microsoft Excel*® dan dianalisis secara statistik menggunakan *GraphPad Prism*®. Kemudian dilakukan uji normalitas, data yang terdistribusi secara normal dilanjutkan dengan uji parametrik *One-Way Anova* sedangkan data yang tidak terdistribusi secara normal dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Data dinyatakan berbeda secara signifikan apabila hasil analisis menunjukkan nilai $p < 0,05$. Selanjutnya dilakukan analisis *multiple comparison* (*Post Hoc Test*) melalui uji *Tukey's Honest Significant Difference* (HSD) dan *Dunnet*