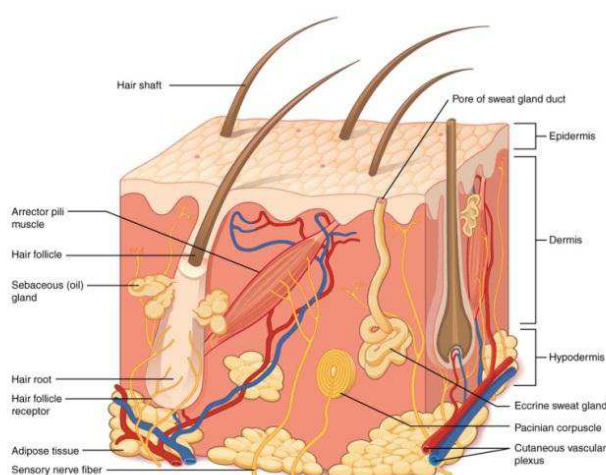


BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

Kulit adalah organ kompleks yang menutupi seluruh permukaan tubuh. Mempunyai fungsi perlindungan fisik antara tubuh dan lingkungan, mencegah hilangnya air dan elektrolit, mengurangi penetrasi dari bahan kimia, dan melindungi terhadap mikroorganisme patogen. Selain itu komponen paling luar yang begitu penting untuk kecantikan dan merupakan fokus utama dari berbagai prosedur bedah kulit. Kulit salah satu organ tubuh yang secara langsung akan memperlihatkan terjadinya proses penuaan pada seseorang. Perubahan yang terlihat pada penuaan kulit diantaranya adalah menjadi kering, kendur, kasar, dan keriput disertai garis-garis halus (Lejiden, 1990). Perubahan terkait *photoaging*, seperti kerutan dan perubahan pigmentasi, akan mendorong seseorang untuk mencari kosmetik agar memperbaiki kulit penampilan yang lebih baik (Jeannie K, 2011).



Gambar 2.1 Struktur Kulit

Kulit terbagi atas tiga lapisan pokok, epidermis, dermis atau korium, dan hipodermis.

1. Epidermis : merupakan lapisan tipis pada bagian terluar kulit dan langsung berhubungan dengan bagian luar. Tersusun atas sel-sel tanduk (keratinosit) dan sel melanosit. Epidermis mempunyai lima lapisan dan empat tipe sel. Lima lapisan epidermis meliputi lapisan bagian paling luar adalah stratum korneum, stratum lusidum, stratum granulosum, stratum malpigi, dan stratum germinativum (Tartowo, 2009).
2. Dermis : merupakan struktur dibawah epidermis, dan keduanya dipisahkan oleh membrane basal. Ketebalan dermis sekitar 15 hingga 40 kali ketebalan epidermis. Dermis merupakan lapisan kedua kulit yang tebal, berserat, dan elastis (tersusun atas kolagen, elastin, dan fibrilin), memberikan efek kulit fleksibilitas. Dermis dibagi menjadi beberapa lapisan yakni lapisan papilaris, lapisan subpapilaris, dan lapisan retikular (Tartowo, 2009).
3. Hipodermis : merupakan lapisan kulit terdalam dan terletak di bawah dermis dan diatas otot. Berfungsi melindungi tubuh dan cedera mekanis, serta sebagai energi cadangan. Sel-sel utama dari hipodermis adalah adiposity yang tersusun dalam *lobules* yang dipisahkan oleh jaringan ikat. Ketebalan lapisan ini menunjukkan variasi anatomi dan status gizi dari masing-masing individu (Jeannie K, 2011; Tartowo, 2009).

2.1.1 Fungsi Kulit

1. Pelindung : serat elastis dari dermis dan jaringan lemak subkutan berfungsi untuk mencegah guncangan dari luar yang akan langsung diterima oleh bagian dalam tubuh. Kulit mempunyai kapasitas

penetrasi alkali dan permukaan kulit disimpan pada pH asam lemah untuk melindunginya terhadap racun kimia. Lapisan kulit terluar dan lipid pada permukaan kulit berfungsi sebagai penghalang terhadap penetrasi air dan kehangatan cairan pada tubuh. Selain itu, mereka dapat membentuk suatu penghalang terhadap racun eksternal. Asam lemak tak jenuh pada lipid kulit memiliki sifat antibakteri. Kulit memiliki sel-sel yang terkait dengan kekebalan tubuh dengan respon imun. Pigmentasi melanin pada kulit menyerap dan melindungi tubuh dari bahaya radiasi UV. (takeo mitsui., 1993)

2. Mengatur suhu tubuh : kulit menyesuaikan suhu tubuh dengan mengubah jumlah darah yang mengalir kulit dengan pelebaran dan penyempitan kapiler darah kulit dan penguapan keringat. Kapiler darah kulit dan kelenjar *eccrine* berada di bawah kendali otonom. Pusat pengatur suhu tubuh ditemukan pada hipotalamus, ketika suhu tubuh turun, hal tersebut meningkatkan aktivitas saraf vasokonstriksi kulit untuk menyempitkan pembuluh kapiler darah dan mencegah turunnya suhu. Ketika suhu tubuh meningkat, aktivitas saraf berkurang, dan kapiler darah membesar meningkatkan kehilangan panas (takeo mitsui., 1993)
3. Merupakan organ raba dan sensasi lain yang membuat kita peka terhadap lingkungan : kulit merasakan tekanan, sentuhan, suhu, dan rasa sakit. Berbagai reseptor di kulit untuk mendeteksi perubahan lingkungan seperti itu contohnya; sel-sel tubuh *meissner*, *merkel discs*, *golgi mazzoni* yang bertanggung jawab atas sensasi sentuhan.

Rangsangan eksternal merangsang ujung saraf sensorik yang menyampaikan informasi melalui sumsum tulang belakang, batang otak dan hipotalamus ke serebral korteks yang merasakan sensasi. (takeo mitsui., 1993)

4. *Absorptions* : berbagai zat diserap dari kulit ke dalam tubuh. Ada Dua jalur penyerapan, satu melalui epidermis, dan satu melalui kelenjar sebaceous dari folikel rambut. Steroid seperti hormon wanita, hormon pria dan *adrenocorticosteroid*, sebagai bahan-bahan yang larut dalam lemak seperti vitamin A, D, E, dan K diserap melalui kulit, tetapi bahan yang larut dalam air tidak mudah diserap sebagai hasil dari penghalang air dan bahan yang larut dalam air yang dibentuk oleh lapisan tanduk. Kelarutan lemak dari bahan yang akan diserap, usia individu, suplai darah kulit, suhu kulit, air pada lapisan tanduk, tingkat kerusakan pada kulit tanduk, dan suhu lingkungan dan kelembaban semuanya memainkan peran utama dalam penyerapan transdermal. Satu manfaat dari tipe ini adalah penyerapan transdermal telah menjadi pengembangan sistem penghantaran obat ke kulit sebagai metode untuk memasok obat ke tubuh. (takeo mitsui., 1993)

2.2 Aging

Merupakan suatu proses menghilangnya kemampuan jaringan secara perlahan-lahan untuk memperbaiki atau mengganti dan mempertahankan struktur, serta fungsi normalnya. Akibatnya tubuh tidak dapat bertahan terhadap kerusakan

tersebut (Cunningham, 2003). Proses penuaan ini akan terjadi pada seluruh organ seperti jantung, otak, paru-paru, ginjal dan kulit (Yaar dan Gilchrest, 2007).

2.2.1 Mekanisme *Aging*

Penuaan kulit merupakan fenomena multifaktorial yakni terjadi pengurangan baik dalam jumlah maupun ukuran dari sel-sel dan pengurangan kecepatan berbagai fungsi organik baik pada tingkat seluler maupun molekuler (Breinneisen et al, 2002). Ada dua proses penuaan kulit, yaitu proses penuaan yang disebabkan oleh faktor intrinsik (*intrinsic aging*), yaitu proses penuaan yang berlangsung secara alamiah yang disebabkan oleh berbagai faktor fisiologik dari dalam tubuh seperti genetik, ras, hormon, dan usia (Yaar dan Gilchrest, 2008).

Proses kedua ialah penuaan ekstrinsik (*extrinsic aging, photoaging, premature aging*), merupakan proses penuaan yang terjadi akibat berbagai faktor dari luar tubuh salah satunya sinar Ultraviolet (UV), kelembaban udara, suhu, polusi, dan lainnya (Baumann dan Saghari, 2009). Perubahan kulit yang terjadi tidak menyeluruh dan tidak sesuai dengan usia sebenarnya. Proses penuaan dini dapat digambat atau dicegah dengan menghindari faktor yang mempercepat proses ini (Baumann dan Saghari, 2009).

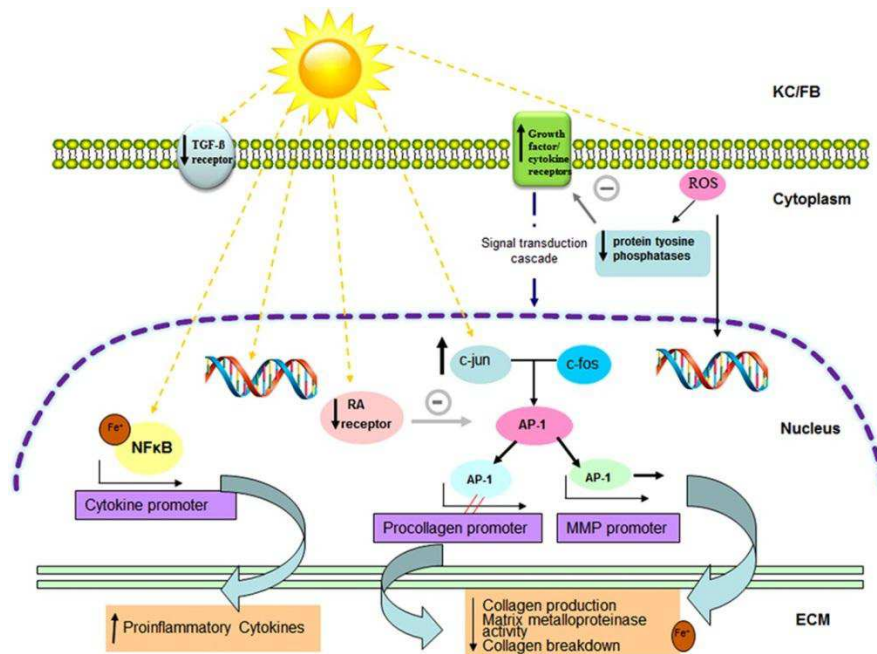
Kulit mempunyai kemampuan untuk membatasi kerusakan yang disebabkan oleh paparan sinar UV misalnya melalui penghamburan cahaya oleh stratum korneum, penyerapan cahaya oleh melanin dan perbaikan *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) dan melalui sistem antioksidan yang berfungsi mempertahankan keseimbangan antara prooksidan dan antioksidan (Dong et al, 2008). Faktor radikal bebas merupakan faktor utama yang mempengaruhi dan mempercepat terjadinya penuaan dini. Kerusakan pada berbagai struktur kulit ini memberikan gambaran

klinis yang khas pada kulit didaerah yang terpajan matahari terutama di daerah wajah dengan gambaran wajah terlihat lebih tua dari usianya (Fisher, 2002). Paparan sinar UV pada kulit akan diserap oleh kromofor yang merupakan permulaan reaksi fotokimiawi dan dapat mengakibatkan penuaan dini. Reaksi fotokimiawi ini dapat menyebabkan perubahan pada DNA yang meliputi oksidasi asam nukleat. Reaksi oksidasi juga dapat mengubah protein dan lipid yang mengakibatkan fungsi sel terganggu. Akumulasi keduanya ini mengakibatkan penuaan jaringan (Dong et al, 2008).

2.2.2 Mekanisme Molekular dari *aging*

Paparan oleh lingkungan oksidatif terutama sinar UV dapat mengakibatkan kerusakan kulit. Paparan dengan sinar UV selama 10-20 menit dapat menyebabkan kadar hidrogen peroksida pada kulit lebih tinggi dua kali lipat dibandingkan dengan kadar semula. Selanjutnya, hidrogen peroksida secara cepat dapat memicu pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Fisher, 2002).

ROS berperan penting pada metabolisme kolagen, tidak saja langsung menghancurkan kolagen interstisial, tetapi juga menginduksi sekelompok enzim yang bertanggung jawab dalam degradasi kolagen, sehingga mengakibatkan kerusakan integritas kulit (Fisher, 2002). Paparan sinar matahari, terutama UVB, terbukti dapat menghambat proliferasi fibroblas, menghambat sintesis kolagen, merusak kolagen menjadi patahan serabut kolagen akibat meningkatnya aktivitas *Matrix Metalloproteinase* (MMP). Patahan serabut kolagen tersebut terbukti dapat menghambat sintesis kolagen lebih lanjut. Menurunnya aktivitas fibroblast dan kerusakan pada serabut kolagen tersebut dianggap mendasari timbulnya penuaan dini pada kulit yang terpapar sinar matahari (Brennan 2003; Choi et al, 2007).



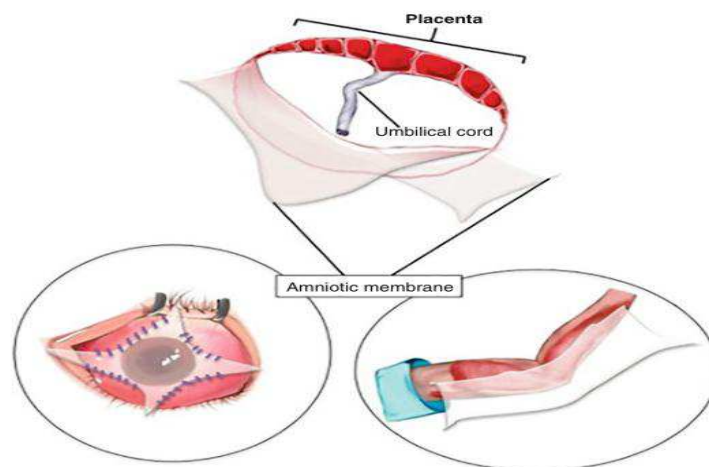
Gambar 2.2 Jalur pembentukan ROS

Radiasi UV melalui pembentukan ROS dapat menghambat fosfatase yang berfungsi untuk mempertahankan reseptor-reseptor pada keadaan tidak aktifnya; mengaktifkan reseptor permukaan sel (fosforilase) termasuk reseptor *Epidermal Growth Factor* (EGF), *interleukin-1* (IL-1) dan *Tumor Necrosing Factor- α* (TNF- α) untuk menginduksi sinyal intraseluler yang mengakibatkan pengaktifan kompleks *Activator Protein-1* (AP-1) nuklear transkripsi yang terdiri dari protein *c-jun* dan *c-fos* (Young, 2008). Peningkatan aktivitas AP-1 dapat menghalangi sintesis kolagen dermal utama I dan III dengan cara menghambat efek dari *Transforming growth Factor- β* (TGF- β) yaitu suatu sitokin yang meningkatkan transkripsi gen-gen kolagen. AP-1 juga menurunkan kadar TGF- β dengan menghambat transkripsi kolagen dan menimbulkan efek antagonis retinoit intrinsik di kulit (Young, 2008).

2.3 Stem Cell

Stem cell merupakan sel yang mempunyai sifat *self renewal* dan plastisitas serta memperbanyak diri menjadi berbagai macam sel untuk membentuk individu. Sel induk ditemukan pada diri semua orang dari awal perkembangan hingga akhir hayat (Kalra et al., 2014). *Stem cell* dapat dieksplorasi dari embrional maupun dari individu yang dewasa (*adult stem cell*) yang berarti inividu yang sudah terlahir. *Stem cell* yang berasal dari embrional dapat berkembang menjadi semua sel dan organ sebagai individu. Sifat *stem cell* tersebut disebut *totipotent* karena sel dieksplorasi dari stadium blastula 3-5 hari setelah fertilisasi (Rantam., 2014). Penelitian *stem cell* mempunyai potensi yang luar biasa untuk pengembangan terapi dengan berbagai penyakit serius dan cedera (Kalra et al., 2014).

Seiring berjalannya waktu, bukti yang meningkat bahwa plasenta manusia mengandung sel induk berpotensi majemuk atau keduanya. Berbagai sel induk multipoten telah diisolasi dari bagian yang berbeda dari plasenta manusia, seperti amnion, *choricon*, tali pusar, dan darah janin. Sebagai sel-sel yang diturunkan plasenta, sel-sel induk ini memiliki kesamaan dan keuntungan (Miki., 2011).



Gambar 2.3 Pemisahan *membrane amnion* dan pemanfaatan biologis

Terapi *regenerative* menggunakan sel hidup untuk memperbaiki, mengganti, atau mengembalikan fungsi normal jaringan dan organ yang rusak. *Stem cell* diyakini sebagai kandidat yang menjanjikan untuk digunakan dalam terapi berbasis sel karena kemampuannya dalam *self renewal* dan diferensiasi menjadi sel yang lain (Rennie *et al.*, 2012). Peremajaan kulit pada *photoaging* merupakan proses yang dinamis dan matriks protein ekstraseluler. Semua proses ini diatur dengan baik oleh sel induk mesenkimal *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) endogen dengan merekrut *stem cell* lainnya dan mensekresi *growth factor*, sitokin, dan protein matriks ekstraseluler (Rennie *et al.*, 2012).

2.3.1 Amniotic Membrane Stem Cell

Amniotic membrane stem cell (AMSC) mempunyai kapasitas proliferasi yang tinggi, multipotensi, mempunyai aktifitas imunomodulator, resiko imunogenitasnya rendah (hipoalergik) dan tidak berpotensi menimbulkan tumor seperti pada sel induk embrional produk metabolit *stem cell* yang mengandung *growth factor* dan sitokin diperoleh dari medium kultur sel manusia (Kamadajaja *et al.*, 2014)

Peran alamiah *Amniotic membrane stem cell* (AMSC) yang penting dalam peremajaan kulit pada *photoaging* menimbulkan pemikiran untuk mencoba mengaplikasikan AMSC dan produk metabolitnya secara eksogen, tampaknya cara ini menjadi solusi yang menjanjikan dalam upaya peremajaan kulit dan *aging*. AMSC eksogen diperoleh dengan teknik biologi yaitu dengan mengisolasi dan kultur *stem cell* manusia. *Amniotic membrane* yang berasal dari kantung membran janin manusia adalah sumber *stem cell* berlimpah yang terdiri dari *epithelial* dan *stromal cell*. Penelitian baru-baru ini telah menunjukkan bahwa *stroma cell* dari

membrane amniotic manusia, yang disebut juga *human amniotic mesenchymal stem cell* (hAMSC) (Jones *et al.*, 2011).

TGF- β merupakan model peran untuk desain peptida yang digunakan dalam peremajaan kulit. Berawal dari identifikasi struktur yang memicu kegiatan biologis yang diperlukan untuk manfaat perawatan kulit. Seseorang dapat melakukan skrining acak dengan dengan beragam struktur peptida yang berbeda. Memerlukan pemahaman yang mendalam mengenai struktur biologi kulit untuk mengidentifikasi regulator biologis yang tepat untuk kesehatan dan integritas kulit. Transformasi TGF- β yang diketahui memainkan peran penting dalam penuaan kulit, merupakan salah satu dari sel *switch master*. Protein homodimerik ini mempunyai berat molekul sekitar >25 kilodaltons (kDa) yang berfungsi sebagai multifungsi sitokin untuk mengatur pertumbuhan, diferensiasi dan fungsi lainnya dalam berbagai tipe sel (Dominic *et al.*, 2015).

2.3.2 Isolasi dan kultur *Amniotic membrane stem cell metabolite product*

Tamagawa *et al* (2004) pertama kali mengemukakan pluripotensialitas *human amniotic epithelial cell* (hAEC). Mereka mengisolasi *epithelial* dan *mesenchymal cell* dan *Amniotic Membrane* (AM) manusia dan mampu membuat *xenogenic chimera* “*in vitro*” dengan sel embrio tikus, yang menunjukkan peran sel manusia dalam tiga lapisan germinal. Kemudian, penelitian lain menunjukkan karakteristik *stem cell* dari epitelium amniotik dan membuktikan kemampuannya untuk berdiferensiasi menjadi tiga lapisan germinal *ectoderm*, *mesoderm*, dan *endoderm* (Insausti *et al.*, 2010).

Beberapa metode isolasi hAEC berbeda telah dijelaskan. Semuanya berdasarkan AM dari dasar chorion dan paparan berikutnya dengan tripsin dan

enzim pencernaan lain dalam konsentrasi berbeda atau periode waktu yang berbeda yang melepaskan sel dari basal membran. Rata – rata 100×10^6 hAEC ($800 - 300 \times 10^6$) didapat dari satu AM dengan berbagai metode (Insausti et al., 2010). Secara rutin hAEC dikultur pada *Dulbecco modified eagle's media*, yang ditambahkan dengan 5 hingga 10% *fetal bovine serum* dan *epidermal growth factor* (EGF). Sel yang berproliferasi menunjukkan kejadian *mitotic* dan membentuk suatu lapisan dengan morfologi epitel *kubold* (Insausti et al., 2010).

AM didapatkan dari proses *section caesaria neonates atern* yang sehat pada gedung bedah pusat terpadu RSUD Dr. Soetomo Surabaya sesuai protokol dan persetujuan komite etik dan medis RSUD Dr. Soetomo donor sebelumnya diseleksi ada tidaknya riwayat keganasan baik pada pendonor dan keluarga, penyakit menular (HIV, hepatitis B dan C, TBC, penyakit menular seksual dan malaria), serta penyakit autoimun. Pemeriksaan fisik dan pemeriksaan skrining laboratorium pada calon donor untuk mendeteksi adanya penyakit menular sesuai standar nasional meliputi HIV, hepatitis B dan C, skrining prenatal untuk TORCH (toxoplasma, rubella, cytomegalo virus, herpes simplek) juga dilakukan pada donor (Depkes RI).

Prosedur isolasi dan kultur hAMSC dilakukan di laboratorium *stem cell, institute of tropical disease*, universitas airlangga, Surabaya. Metode isolasi menggunakan *modified soncinis protocol*. Membran amnion dipotong dengan pisau menjadi potongan halus dengan ukuran kurang lebih $2 \times 2 \text{ cm}^2$ kemudian ditambahkan enzim tripsin 0,25% dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada temperature 4°C . Supernatan dibuang setelah proses sentrifugasi selesai. Proses tersebut dilakukan sebanyak 2 kali. Suspense sel yang

telah tercerna tersebut ditambah PBS yang mengandung *collagenase* IV 0,75 mg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) dan Dnase 1 0,075 mg/ml (Takara Bio, Shiga, Japan) dan diinkubasi pada temperature 37°C selama 60 menit. Setelah penyaringan dengan saringan sel dilakukan sentrifugasi kembali selama 5 menit kemudian didapatkan sel-sel yang diperlukan untuk kultur. Hasilnya berupa cairan yang tidak stabil dalam suhu ruang oleh karena itu dilakukan metode *freeze dry* untuk memperpanjang masa simpan.

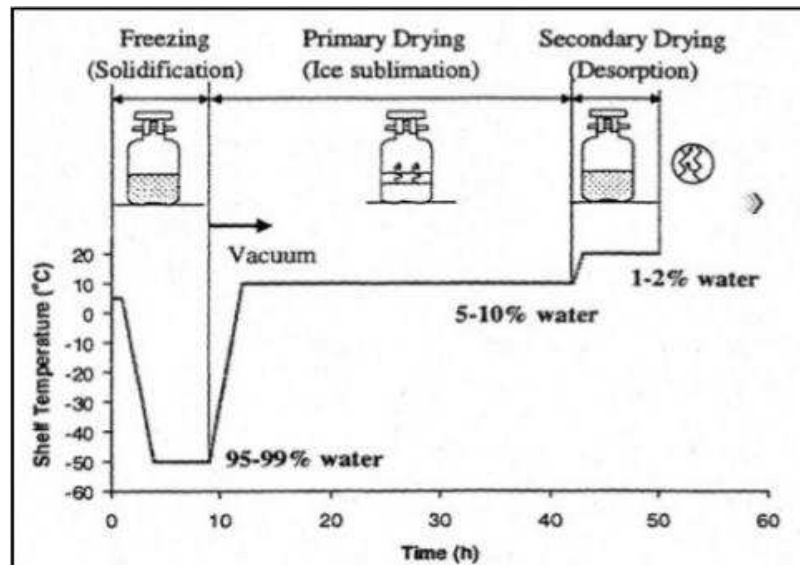
2.4 Freeze Dry

Freeze dry atau *lyophilization* merupakan proses dimana air akan dibekukan, dilanjutkan dengan dikeluarkannya solven dari sampel, awalnya dengan sublimasi (*primary drying*) kemudian desorpsi (*secondary drying*). *Freeze dry* berlaku untuk pembuatan obat-obatan yang bersifat termolabil atau tidak stabil dalam larutan berair untuk periode penyimpanan yang lama tetapi stabil pada kondisi yang kering (Kunal A, 2015).

Bahan yang akan dikeringkan pertama-tama dibekukan dibawah vakum dengan keadaan konduksi atau radiasi sehingga hanya menyisakan komoponen padat dan kering dari bentuk awal. Gradien konsentrasi uap air antara bagian depan pengering dan kondensor merupakan faktor pendorong untuk menghilangkan air selama proses liofilisasi. Liofilisasi terdiri dari :

1. Pembekuan formula sehingga air dalam produk menjadi bentuk es
2. Di bawah ruang hampa udara, sublimasi bentuk es langsung menjadi uap air
3. Pemindahan atau penghilangan uap air

4. Setelah disublimasikan, produk dibekukan dan dapat dikeluarkan dari mesin.



Gambar 2.4 : Proses liofilisasi

2.4.1 Proses Dasar

1. Freezing

Pada kondisi ini zat harus didinginkan pada suhu dimana air dan padatan sepenuhnya dikristalisasi dan ditutup pada zona padatan yang terkonsentrasi dan amorf air tetap dalam keadaan padat secara mekanis. Di zona beku, kristal es pertama kali akan tumbuh dengan demikian memusatkan larutan yang tersisa dan dapat divariasikan nilai pH nya. Kristalisasi tergantung pada beberapa faktor yang saling mempengaruhi : *cooling rate, initial concentration, end temperature of cooling* dan *time at this temperature*. Beberapa produk tidak terjadi kristalisasi dan tetap dalam fase amorf.

2. Drying

Drying pada dasarnya dipahami dengan baik dan diatur oleh dua mekanisme transportasi yakni : (i) transportasi energy untuk mengubah es menjadi uap air (antara -21 dan -30°C) sekitar 2805 kJ/kg) dan (ii) transport uap air dari permukaan sublimasi melalui produk yang sudah dikeringkan ke dalam ruang pengering ke kondensasi atau sistem penyerap uap.

a. Keuntungan

Zat yang teroksidasi terlindungi dengan baik di bawah kondisi vakum, masa penyimpanan lama karena air yang terbuang sekitar 95%-99,5%, kontaminasi sedikit karena prosesnya aseptik, perubahan sifat fisika sangat minimal karena minimalnya pertumbuhan mikroba, penyimpanan pada suhu normal, konstituen dari bahan yang kering tetap terdispersi secara homogen dan sterilitas produk dapat dipertahankan .

b. Kerugian

Senyawa volatil bisa hilang dengan suhu vakum yang tinggi, peralatan mahal, stabilitas yang terkait dengan pengobatan secara individu, terkait sterilitas ruang pengering pada vial yang digunakan

2.4.2 Karakteristik hasil *freeze dry*

Produk utuh, warna yang seragam, kadar air yang cukup, steril, bebas pirogen, bebas partikulat dan stabil secara kimiawi

2.4.3 *Excipients* dalam formulasi *freeze dry*

Eksperimen untuk menentukan bagaimana kondisi pada proses *freeze dry* dipengaruhi oleh perubahan komposisi pada suatu produk (formula) sehingga sangat berguna untuk membantu kualitas produk yang baik, perubahan pH, konsentrasi obat dan eksipien tambahan dapat memberikan perbedaan hasil yang

mencolok pada hasil *freeze dry*. Jika diperlukan *buffer* dalam proses *freeze dry* maka harus dipilih konsentrasi sekecil mungkin.

Desain formula dalam proses *freeze dry* tergantung pada persyaratan *Active Pharmaceutical Ingredient* (API) serta rute pemberian. Formulasi dapat terdiri dari satu atau lebih eksipien yang mempunyai fungsi lebih dari satu. Eksipien yang mungkin dapat dikarakterisasi adalah *buffer*, *bulking agent*, *stabilizer*, dan *tonicity modifier*.

a. *Buffer*

Buffer diperlukan dalam formulasi sediaan farmasi untuk menstabilkan pH. Pengembangan formulasi yang di *freeze dry*, pilihan *buffer* menjadi sangat penting. *buffer phosfat*, khususnya natrium fosfat, mengalami perubahan pH secara drastis saat pembekuan. Pendekatan yang baik dengan menggunakan konsentrasi rendah dari *buffer* yang mengalami perubahan pH minimal selama pembekuan seperti *buffer citrate* dan histidin.

b. *Bulking agents*

Tujuan dari *bulking* adalah memberikan *bulk* untuk formulasi. Kristal *bulking agents* menghasilkan struktur yang bagus dengan sifat mekanik yang baik. Namun, bahan ini sering tidak efektif untuk menstabilkan produk seperti emulsi, protein, dan liposom tetapi cocok untuk beberapa jenis peptida. Contohnya adalah manitol dan sukrosa.

c. *Stabilizer*

Selain *bulking agents*, disakarida pembentuk amorf dan telah terbukti paling efektif dalam menstabilkan produk seperti liposom dan protein

selama proses liofilisasi. Sukrosa dan trehalosa bersifat *inert* dan telah digunakan untuk menstabilkan formulasi liposom, protein, dan virus. Glukosa, laktosa dan maltosa adalah gula pereduksi dan dapat mereduksi protein melalui *mallard reaction*.

d. *Tonicity adjusters*

Dalam beberapa hal, formulasi isotonik mungkin diperlukan. Kebutuhan formulasi semacam itu dapat ditentukan oleh persyaratan stabilitas atau rute pemberian. Eksipien seperti manitol, sukrosa, glisin, gliserol, dan natrium klorida adalah *tonicity adjusters* yang baik. *Tonicity adjusters* juga dapat digunakan sebagai pengencer dari suatu formulasi.

2.4.4 Proses *freeze dry*

- a. *pre freezing* : *freeze dry* adalah perubahan kondisi dari fase padat ke fase gas, material *freeze dry* terlebih dahulu harus benar-benar dibekukan. Metode *pre freezing* dan suhu akhir dari produk yang beku dapat mempengaruhi kemampuan untuk membekukan dengan sempurna. Hasil pendinginan cepat, berguna untuk mempertahankan struktur yang akan diperiksa secara mikroskopis. Hasil pendinginan yang lambat akan menghasilkan kristal yang lebih besar dan saluran yang kurang restriktif dalam matriks tersebut selama proses pengeringan.
- b. *Primary drying* atau *Main Drying* : Beberapa faktor dapat mempengaruhi kemampuan untuk membekukan suatu suspensi atau larutan. Setelah melakukan pra produksi, kondisi harus

berubah dari padat ke bentuk gas disebut proses sublimasi, menghasilkan bubuk kering dan secara struktur produk harus utuh. Hal ini memerlukan kontrol yang sangat hati-hati terhadap dua parameter yakni suhu dan tekanan. Tingkat sublimasi dari produk beku tergantung pada perbedaan tekanan uap produk berbanding dengan uap tekanan dari kolektor es. Molekul bermigrasi dari sampel bertekanan tinggi ke area bertekanan rendah.

Pertama, setelah dimulainya PD, udara yang dilarutkan atau dimasukkan ke dalam es yang beku akan dilepaskan saat es tersebut disublimasikan. Jumlah gas yang dimasukkan bervariasi dengan faktor hampir 100, tergantung pada bahan yang digunakan.

Kedua, Jika kapasitas pompa vakum lebih kecil dari jumlah gas yang dilepaskan pada tekanan yang diinginkan, kondensor semakin terisi oleh gas permanen. Gas permanen memiliki kepadatan lebih tinggi dibanding uap uap air. Jika koneksi vakum tidak diarea terendah kondensor maka secara perlahan gas akan mengisi ruang kondensor dari bawah ke atas, sehingga akan mengurangi efisiensi kondensor (Rey L dan Joan M, 2010).

- c. *Secondary drying* atau *desorbtion drying process* : adalah pemanasan material di bawah suhu yang lebih tinggi daripada proses *primary drying* , untuk memutus interaksi fisika kimia yang telah terbentuk antara molekul air dan metrial serta menyebabkan

“*the bound water*” menjadi “*free water*” lalu menguap menjadi uap.

Dari sudut pandang teknologi, *desorbtion drying* terjadi setelah proses pengeringan sublimasi, air yang telah beku telah dihilangkan sepenuhnya dalam *sublimation drying*. Namun ada beberapa air beku yang tersisa setelah proses *sublimation drying* setelah itu, akan diuapkan dan dilakukan dalam proses *secondary drying* (Rey L dan Joan M, 2010).

Primary drying dan *secondary drying* memiliki mekanisme dan parameter operasional yang sangat berbeda. Oleh karena itu, penilaian titik akhir waktu dan awal sangat penting. jika terlalu awal atau lambat dari *primary drying* ke *secondary drying* akan menyebabkan hasil akhir dari produk menjadi buruk.

Pada akhir proses *secondary drying*, kadar air dalam material harus memenuhi persyaratan tertentu. *Residual moisture final* (RMF) yang terlalu tinggi atau rendah sangat merugikan. Kadar air yang terlalu tinggi tidak baik untuk penyimpanan, kadar air yang rendah dapat merusak aktivitas dari material tersebut. Secara umum kadar air akhir yang didapatkan sebesar 5% dari literatur (Rey L dan Joan M, 2010).

2.4.5 *Storage temperature*

Suhu penyimpanan adalah faktor terpenting yang mempengaruhi stabilitas produk *freeze dry*. Pengaruh suhu pada sediaan padat sangat kompleks. Secara umum, semakin tinggi suhu, semakin buruk stabilitasnya. Temperature yang lebih

tinggi akan mempercepat kondensasi protein. Ketika suhu meningkat, beberapa fenomena dapat muncul dalam produk *freeze dry* tambahan, bahan yang sudah dibekukan seperti makanan kering, obat-obatan dan bahan tambahan, seperti peleburan, transformasi polimorfisme dan pengurangan kadar air. Selain itu, suhu yang tinggi juga dapat mempercepat reaksi kimia dan menyebabkan degenerasi produk. Produk *freeze dry* memiliki struktur yang longgar, mudah rehidrasi.

Ketika suhu penyimpanan lebih rendah dari *collapse temperature*, suhu dari struktur bahan yang longgar tidak dapat diubah. Namun jika bahan menyerap kelembaban secara perlahan, *collapse temperature* akan turun secara bertahap. Ketika *collapse temperature* lebih rendah dari suhu penyimpanan, beberapa fenomena akan muncul seperti aglomerasi, perubahan warna dan rasa. Suhu penyimpanan yang optimal harus ditentukan oleh kadar air dari produk. Secara umum suhu yang lebih rendah akan selalu menguntungkan untuk penyimpanan yang lama.

2.5 Stabilitas

Stabilitas merupakan faktor penting dari kualitas, keamanan dan efikasi sebuah sediaan (Asean Guideline On stability study of drug product 2013). Stabilitas didefinisikan sebagai kemampuan produk untuk bertahan dalam batas yang ditetapkan dan sepanjang periode penyimpanan penggunaan, sifat dan karakteristiknya sama dengan yang dimiliki pada saat produk dibuat (Troy, 2006). Ketidakstabilan produk obat dapat mengakibatkan terjadinya penurunan sampai dengan hilangnya khasiat obat, obat dapat berubah menjadi toksik atau terjadinya perubahan penampilan sediaan (warna, bau, rasa, dan lain-lain) yang berakibat merugikan. Sediaan farmasi dapat dikatakan stabil apabila mulai dari pembuatan,

pengemasan , penyimpanan hingga penggunaannya tidak terjadi penurunan aktivitas kimia dan biologi serta tidak terjadi perubahan karakteristik fisika yang cukup besar (FI IV, 1995).

Uji stabilitas dilakukan untuk mengevaluasi efek lingkungan terhadap kualitas produk, menentukan kondisi dan lama penyimpanan yang tepat, serta sebagai penentuan instruksi penyimpanan pada suatu label produk. Selain itu, data yang dihasilkan selama pengujian stabilitas merupakan syarat penting untuk persetujuan registrasi dari setiap obat atau formula (Singh *et al.*, 2000; Bajaj *et al.*, 2012). Secara umum, terdapat 3 (tiga) uji stabilitas (Vipul dan Devesh, 2012) yaitu :

a. Uji stabilitas fisika

Sediaan akan mempertahankan sifat fisik awal termasuk organoleptis, ukuran partikel, dan morfologi partikel. Meliputi uji stabilitas termodinamika dan uji stabilitas jangka panjang.

b. Uji stabilitas kimia.

Tiap zat aktif mempertahankan keutuhan kimiawi sesuai dengan yang tertera pada etiket dalam batasan yang dinyatakan dengan spesifikasi. Meliputi uji stabilitas dipercepat dan uji stabilitas jangka panjang.

c. Uji stabilitas mikrobiologi

Uji efektivitas pengawet untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme.

2.6 Penetrasi Kulit

2.6.1 Analisis Penembusan Kulit

Percobaan penetrasi kulit biasanya dilakukan untuk mengukur jumlah yang dapat menembus melewati penghalang dari waktu ke waktu dalam kaitannya dengan area difusi. Percobaan *in vitro*, berhubungan dengan massa yang terakumulasi dalam kompartemen akseptor. Tolak ukur yang paling penting adalah penghantaran obat sistemik dan regional melalui kulit misalnya untuk mencapai tingkat obat terapeutik secara sistemik atau perawatan jaringan di bawah lokasi aplikasi (Dragicevic. N, 2017). Percobaan penetrasi biasanya diterapkan menggunakan sel difusi yang menghasilkan pemisahan domain difusi di kompartemen yang berbeda, yaitu donor kompartemen, pembatas, dan akseptor (Franz, 1975). Membran pembatas yang khas untuk penelitian terdiri dari kulit manusia atau hewan yang dipotong. Perbedaan antara dosis tak terbatas dan dosis terbatas, dalam percobaan dosis tak terbatas, dosis yang diterapkan diasumsikan sedemikian besar sehingga penguapan atau difusi melalui pembatas tidak hanya mengubah konsentrasi dalam donor kompartemen, oleh karena itu, secara matematis dosis diasumsikan tidak terbatas (Brain et al, 2002). Dosis terbatas menurut *Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)*, percobaan dosis terbatas didefinisikan oleh pengaplikasian formula volume terbatas ($\leq 10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ untuk formulasi cair) sedangkan untuk formulasi semipadat nilainya berkisar dari $1 - 10 \text{ mg}/\text{cm}^2$ (Dragicevic. N, 2017). Cairan donos atau akseptor dengan koefisien difusi obat sebesar $6.33\text{E-}5 \text{ cm}^2/\text{s}$, saluran lipid stratum korneum dengan difusi koefisien sebesar $1,87\text{E-}8 \text{ cm}^2/\text{s}$, dan koefisien partisi sebesar 6,56 digunakan untuk simulasi. Konsentrasi donor awal ditetapkan sebesar 1 mg/ml, dan simulasi dosis terbatas ditetapkan sebesar 2 μl dan 20 μl dengan masing-masing

area difusi $1,767 \text{ cm}^2$. Jalur lipid stratum korneum dengan panjang $180 \mu\text{m}$ (Talreja et al, 2001).

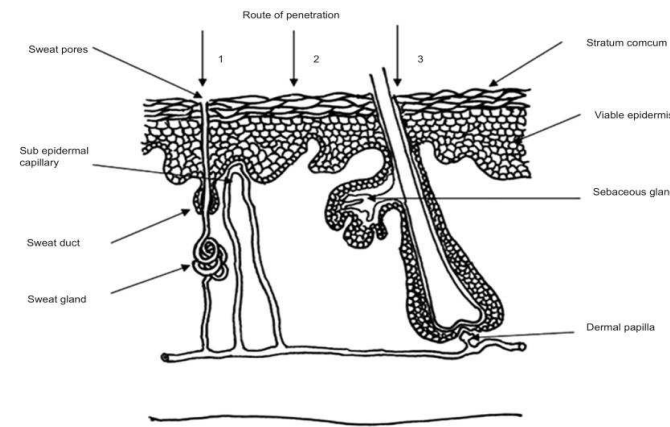
2.6.2 Mekanisme penetrasi kulit

Molekul obat yang kontak dengan permukaan kulit dapat menembus melalui tiga jalur potensial yakni : melalui saluran keringat, melalui akar rambut dan kelenjar sebacea, atau langsung melintasi stratum korneum. Banyak penelitian yang dilakukan untuk dapat memperoleh data yang lebih banyak serta lebih baik mengenai struktur dan sifat pembatas stratum korneum. Stratum korneum terdiri dari 10 -15 lapisan korneosit dan ketebalannya bervariasi sekitar $10 - 15 \mu\text{m}$ dalam keadaan kering dan mencapai $40 \mu\text{m}$ ketika terhidrasi (Menon GK, 2002).

2.6.3 Rute penetrasi obat

Obat dapat berpenetrasi ke dalam jaringan kulit melalui tiga cara, yaitu penetrasi transeluler (menembus sel), penetrasi intraseluler (diantara sel), dan penetrasi transappendageal (melalui folikel rambut, keringat, kelenjar lemak, dan perlengkapan pilo sebaceous) (Ansel, 1989). Pada rute transeluler, obat menembus ke kulit secara langsung melewati struktur lipid dari stratum korneum. Rute ini merupakan rute terpendek. Meskipun rute transeluler memiliki laju penetrasi kecil tetapi mekanisme ini lebih banyak terjadi terutama pada obat-obat yang bersifat lipofilik karena pada rute ini obat berpenetrasi melalui stratum korneum yang memiliki luas permukaan besar (Walters, 2002). Rute yang paling sering dilalui obat untuk berpermeasi ke kulit adalah rute interseluler sehingga bahan yang akan berpermeasi menembus stratum korneum dengan cara melewati korneosit. Absorpsi obat hidrofilik dapat terjadi melalui appendiks kulit (kelenjar dan folikel rambut),

tetapi hanya terjadi sekitar 0,1% dari total permukaan kulit sehingga hanya sedikit jumlah obat yang diabsorpsi (Metha, 2004).



Gambar 2.5 Rute penetrasi kulit menunjukkan 1. Melalui saluran keringat; 2. Langsung melintasi stratum korneum. 3. Melalui folikel rambut

Peningkat penetrasi dapat berfungsi dengan satu atau lebih dari tiga mekanisme utama yakni : mengganggu struktur lipid stratum korneum, interaksi dengan protein interseluler dan memperbaiki partisi obat dengan penambahan bersama pelarut ke stratum korneum (Barry, 1983). Berbagai jenis enhancer antara lain fisika dan kimia. Adapun mekanisme enhancer tergantung dari jenisnya masing-masing.

2.7 Faktor-faktor yang mempengaruhi penetrasi

A. Fisiologi kulit

1. Umur kulit

Umur yang semakin bertambah menyebabkan permeabilitas kulit menurun. Hal ini dikarenakan terjadi perubahan elastisitas, struktur, komposisi kimia dan lapisan pelindung kulit (Konda *et al.*, 2012).

2. Kondisi kulit

Kondisi kulit yang baik dan kondisi kulit yang terluka akan menghasilkan penetrasi yang berbeda. Kulit yang mengalami kerusakan karena iritasi, kekeringan, reaksi alergi, radang dapat melukai sel pelindung sehingga penetrasi kulit akan meningkat (Konda *et al.*, 2012).

3. Lokasi dan ketebalan kulit

permeabilitas kulit tergantung anatomi, sifat alamiah dan ketebalan stratum korneum. Permeabilitas kulit berbanding terbalik dengan ketebalan stratum korneum. Laju penetrasi akan meningkat apabila stratum korneum terlepas (Konda *et al.*, 2012).

4. Hidrasi kulit

Hidrasi dapat mempengaruhi jaringan kulit secara fisik dan akan mengubah koefisien difusi dari bahan hidrasi dari stratum korneum dapat mempengaruhi laju penetrasi ke dalam kulit (Konda *et al.*, 2012).

5. Suhu

Kecepatan penetrasi obat melalui kulit dapat berubah apabila tubuh mengalami peningkatan suhu. Suhu kulit dapat mempengaruhi penetrasi obat karena oklusifitas. Dalam keadaan oklusif, air pada kulit tidak menguap sehingga suhu permukaan kulit meningkat. Selain itu, oklusifitas dapat meningkatkan hidrasi kulit sehingga dapat melunakkan jaringan dan membentuk *sponge effect* sehingga meningkatkan ukuran pori dan aliran darah pada lapisan dermal akan meningkat (Konda *et al.*, 2012).

6. Sirkulasi udara

Perubahan sirkulasi perifer dapat menyebabkan perubahan absorpsi percutan. Peningkatan aliran darah dapat menyebabkan waktu penetrasi lebih kecil dan meningkatkan gradient konsentrasi yang melewati kulit sehingga bahan obat menuju sistemik akan meningkat. Apabila terjadi penyempitan pembuluh darah yang akan menuju dermis maka kecepatan penetrasi kulit akan menurun (Konda *et al.*, 2012).

7. Perbedaan spesies

Perbedaan spesies akan menyebabkan perbedaan anatomi kulit seperti perbedaan ketebalan stratum korneum, jumlah kelenjar keringan dan folikel rambut per unit permukaan kulit sehingga menyebabkan perbedaan profil penetrasi obat (Barry, 1983)

B. Sifat fisikokimia bahan obat

1. Kelarutan bahan obat

Kelarutan bahan obat di dalam air akan menentukan konsentrasi yang terabsorpsi. Kelarutan relative solute pada dua fase menentukan koefisien partisi, semakin banyak obat dalam keadaan terlarut akan semakin besar pula kemampuan obat menembus membrane (Sinko *et al.*, 2011)

2. Koefisien partisi

Penetrasi langsung melalui epidermis dipengaruhi oleh koefisien partisi lemak dalam air (Barry, 1983). Koefisien partisi merupakan perbandingan antara konsentrasi obat dalam stratum korneum dengan kadar obat dalam pembawa. Apabila koefisien partisi besar, maka obat akan lebih larut dalam pembawa. Apabila koefisien

partisi kecil, maka obat akan lebih larut di dalam stratum korneum daripada di dalam pembawa obat sehingga kadar obat di dalam stratum korneum besar. Koefisien partisi berpengaruh terhadap kecepatan transport (Sinko *et al.*, 2011).

3. Koefisien difusi

Koefisien difusi menunjukkan kemampuan obat berpenetrasi ke dalam stratum korneum. Makin besar koefisien difusi bahan aktif semakin besar jumlah zat aktif yang berpenetrasi di kulit. Difusivitas merupakan pengukuran kecepatan solute melewati barrier dan dipengaruhi oleh viskositas lingkungan (Robert *et al.*, 2002)

4. Konsentrasi bahan obat

Obat yang dicampurkan dalam pembawa harus berada pada permukaan kulit dalam konsentrasi yang cukup. Makin besar kadar bahan obat, makin besar ketersediaan bahan obat untuk penetrasi (Ansel, 1989).

5. pH

pH berkaitan dengan bentuk ion atau tak terionkan dari bahan aktif. Bahan aktif dalam bentuk tak terionkan lebih mudah berpenetrasi ke dalam kulit dibandingkan dengan bahan aktif dalam bentuk terionkan (Remington, 2005). Pemeriksaan pH perlu dilakukan, agar tidak mengiritasi kulit maka diinginkan pH sediaan yang berada dalam rentang pH normal kulit (4,0-7,0) (Lambers *et al.*, 2006)

2.8 Evaluasi penetrasi obat

Evaluasi penetrasi obat merupakan evaluasi yang dilakukan untuk mengetahui bahwa sediaan yang dibuat memiliki penetrasi yang baik pada kulit. Terdapat dua metode dalam evaluasi penetrasi kulit antara lain:

2.8.1 Metode *in vitro*

Metode *in vitro* adalah metode yang dapat digunakan untuk mengukur daya penetrasi bahan kimia ke dalam kulit. Metode *in vitro* digunakan sebagai prosedur screening dan untuk mengetahui parameter fisikokimia seperti flux, koefisien partisi dan koefisien difusi (OECD, 2010). Keuntungannya adalah kondisi eksperimen dapat dikontrol, sehingga hanya beberapa variabel saja yang berpengaruh seperti kulit dan alat uji selain itu faktor individu dapat dihilangkan. Namun kekurangannya adalah tidak mencerminkan keadaan sesungguhnya dari jaringan hidup, terutama pada pengaruh suplai darah yang berubah –ubah, informasi mengenai metabolisme, distribusi, dan efek aliran darah terhadap permeasi yang yang diperoleh sedikit (Brain *et al.*, 2002). Uji penetrasi *in vitro* menggunakan membran kulit (Mukherjee *et al.*, 2005). Salah satu cara untuk mengukur jumlah obat yang terpenetrasi melalui kulit yaitu dengan menggunakan sel difusi franz (Brain *et al.*, 2002).

2.8.2 Metode *in vivo*

Metode ini dapat memberikan informasi yang baik, dalam berbagai jenis laboratorium, pada penyerapan kulit dan memungkinkan penentuan penetrasi bahan uji melalui kulit ke dalam kompartemen sistemik. Terdapat lima area sampling untuk mengetahui permeasi kulit manusia, yaitu residu permukaan, kulit, pembuluh darah balik menuju tempat target obat, sirkulasi darah, dan pada hasil ekskresi. Keuntungan dari metode *in vivo* adalah menggunakan sistem fisiologis dan

metabolik utuh, menggunakan spesies umum untuk banyak studi toksisitas dan dapat memodifikasi untuk digunakan dengan spesies lain. Kerugiannya adalah penggunaan binatang hidup, kebutuhan 35 bahan radiolabelled untuk memfasilitasi hasil yang dapat diandalkan, kesulitan dalam menentukan fase penyerapan awal dan perbedaan permeabilitas spesies disukai (contoh tikus) dan kulit manusia (Brain *et al.*, 2002).

2.9 Mikroskop fluorosen

Mikroskop fluorosen merupakan mikroskop dengan prinsip kerja hampir sama dengan mikroskop cahaya biasa, namun dengan beberapa kelebihan serta tambahan. Mikroskop biasa menggunakan sumber cahaya tampak dengan panjang gelombang antara 400-700 nm untuk mendapatkan gambar dengan perbesaran tertentu dari sampel. Mikroskop fluorosen menggunakan sumber cahaya dengan intensitas jauh lebih tinggi yang mengeksitasi fluoresensi pada sampel yang sudah diberi senyawa yang mampu berfluoresensi atau berpendar pada sampel atau dilakukan dengan pewarnaan khusus dengan senyawa yang mampu berfluoresensi. Secara umum, mikroskop fluorosen digunakan untuk mengamati senyawa tertentu terutama benda kecil yang tidak dapat diamati pada mikroskop biasa misalnya mikroba. Selain itu juga digunakan memvisualisasi gambar 3 dimensi dengan skala kecil (Bradburry dan Evennet, 1996). Prinsip kerja mikroskop fluorosen adalah membiarkan sumber cahaya bereksitasi pada fluorophore yang ada pada sampel kemudian menseleksi panjang gelombang yang ingin ditampilkan sesuai fluorophore yang sudah diberikan pada sampel. Karena cahaya yang berfluoresen ini memiliki energi yang lebih rendah dari cahaya tampak, maka agar fluorophore yang sudah ditambahkan dalam sampel bisa terlihat dengan jelas maka perlu

mengurangi cahaya yang dapat mengganggu fluoresensi dari fluorophore itu sendiri dengan cara melakukan pengamatan pada ruang yang gelap, atau membuat kompartemen tempat peletakkan sampel yang diberi fluorophore menjadi gelap dan tidak diganggu oleh cahaya dengan energi yang tinggi terutama sinar UV dari matahari (Bradburry dan Evennet, 1996).

2.10 Fluorosen label

Fluorosen timbul dari atom atau molekul yang dapat menyerap energi cahaya tinggi dan eksitasi elektron ke energi yang lebih tinggi kemudian dikembalikan lagi sehingga dapat memancarkan cahaya (Pygall *et al.*, 2007). Atom atau molekul tersebut disebut fluorophores. Fluorophores biasa digunakan sebagai penanda dalam cairan, sebagai pewarna struktur tertentu, sebagai substrat enzim, atau sebagai probe atau indikator. Fluorosens label yang umum digunakan dalam teknik imaging dengan mikroskop adalah FITC, Rhodamin, FAM, komarin, dan sianin (Rietdorf J., 2005)

2.11 Enhancer

Peningkatan penetrasi obat topikal dapat dicapai dengan penambahan beberapa senyawa yang mampu meningkatkan absorpsi di kulit. Salah satu mekanisme enhancer yaitu dengan membuat interaksi enhancer dengan gugus kepala polar dari lipid. Interaksi gugus kepala lipid-lipid dan urutan dari lipid akan terganggu sehingga akan memfasilitasi difusi obat hidrofilik. Dengan hidrasi stratum korneum, penetrasi kebanyakan obat dapat ditingkatkan. Biasanya dalam stratum korneum kadar air 5-10%. Kadar air dapat meningkat hingga 50% dalam kondisi oklusi (misalnya dengan menggunakan foil kedap atau oleh pembawa

oklusi). Penetrasi obat lipofilik difasilitasi dengan cara gangguan rangka akibat peningkatan fluidisasi oleh rantai hidrokarbon (Trommer, 2006).

Mekanisme Peningkat penetrasi melalui tiga mekanisme utama yakni :

1. Merusak atau mengubah struktur lipid stratum korneum
2. Interaksi dengan protein interseluler
3. Memperbaiki partisi obat, coenhancer atau pelarut ke stratum korneum

Penambahan tersebut akan mengubah salah satu dari tiga jalur diatas. Kunci untuk mengubah jalur polar adalah merubah konformasi protein atau penambahan pelarut enhancer asam lemak meningkatkan fluiditas bagian dari lipid protein stratum korneum. Beberapa peningkat bekerja pada jalur polar dan nonpolar dengan mengubah jalur multilaminat untuk penetrasi. Enhancer dapat meningkatkan difusivitas obat melalui protein kulit jenis penambah yang digunakan untuk memiliki dampak yang signifikan pada desain dan pengembangan produk. Cara yang berguna untuk mempertimbangkan faktor yang mempengaruhi tingkat penetrasi obat melalui stratum korneum adalah dengan melalui persamaan sederhana yang tercapai di bawah ini untuk flux 1. Jika memplot masa kumulatif difusi m , lewat persamaan luas melalui membran, pada waktu yang sama dari grafik mendekati linearitas kemiringannya menghasilkan flux yang stabil, dm/dt

$$dm/dt = D C_o K/h \dots (1)$$

dimana ;

C_o = konsentrasi konstan obat dalam donor larutan

K = koefisien partisi dari zat terlarut antara membrane

D = koefisien difusi

H = ketebalan membrane

Dapat disimpulkan bahwa sifat ideal dari sebuah molekul yang akan menembus stratum korneum yang baik adalah :

1. Mas
a molekul rendah, lebih disukai ≤ 500 Da, ketika D cenderung meningkat.
2. Kel
arutan yang adekuat dalam minyak dan air sehingga gradient konsentrasi membrane mungkin tinggi.
3. Tin
ggi tetapi seimbang (optimal) K (jika terlalu besar, dapat menghambat pembersihan oleh jaringan yang sehat)
4. Titi
k leleh rendah, berkorelasi dengan kelarutan

Obat yang dipilih sedemikian rupa sehingga cocok dalam kriteria pengantaran transdermal seperti yang disajikan dalam tabel dibawah ini. Pendekatan prodrug telah diteliti untuk meningkatkan penghantaran secara dermal dan transdermal dengan koefisien partisi yang tidak menguntungkan (Stoan KB, 1992)

Tabel 2.1 *Parameter for drug selection*

Parameter	<i>Ideal limit</i>
<i>Aqueous stability</i>	>1 mg / ml
<i>Liphoplicity</i>	$10 < K_{o/w} < 1000$

<i>Molecular weight</i>	< 500 dalton
<i>Melting point</i>	< 200 °C
<i>Ph of aqueous saturated solution</i>	5-9
<i>Dose de verable</i>	< 10 mg/ day

2.11.1 Jenis Enhancer

1. *Physical penetration enhancer*

- a. *Electroporation* = elektroporesis melibatkan penerapan *high voltage* untuk memicu gangguan pada struktur kulit. Tegangan tinggi sekitar > 100 V dan durasinya singkat (*milliseconds*).
- b. *Iontophoresis* = metode ini melibatkan peningkatan permeasi topical diaplikasikan agen terapeutik dengan penerapan arus listrik tingkat rendah, baik langsung ke kulit atau secara tidak langsung melalui bentuk sediaan.
- c. *Ultrasound* = melibatkan penggunaan energy ultrasonic untuk meningkatkan penghantaran transdermal pada zat terlarut baik secara bersamaan atau melalui pretreatment, dan sering disebut sebagai sonoforesis.
- d. *Magnetophoresis* = metode ini melibatkan penerapan medan magnet yang bertindak sebagai kekuatan pendorong eksternal untuk meningkatkan difusi zat terlarut diamagnetic di seluruh kulit.
- e. *Thermophoresis* = suhu permukaan kulit biasanya dipertahankan pada 32°C pada manusia oleh berbagai control homeostatic. Efek dari peningkatan suhu (nonfisiologis) pada perkutan penyerapan awalnya dicatat.

2. *Chemical penetration enhancer*

- a. *Sulfoxide = dimethyl sulphoxide* (DMSO) merupakan pelarut apotik yang kuat mengikat hydrogen daripada dengan air. Tidak berwarna, tak berbau, dan bersifat higroskopik sering digunakan sebagai pelarut universal.
- b. *Azone = azone (1-dodecylazacycloheptan-2-one* atau *laucopran*) adalah molekul pertaman yang dirancang khusus sebagai penambah penetrasi kulit. Merupakan cairan yang tidak berwarna dan tak berbau dengan titik leleh -7°C dan memiliki rasa halus, dan berminyak.
- c. *Pyrolidones* = telah digunakan sebagai peningkat penetrasi untuk berbagai molekul termasuk hidrofilik (misal; manitol dan 5-flurouracil) dan lipofilik (misal; progesterone dan hidrokortison).
- d. Urea = urea memperlihatkan permeasi transdermal dengan memfasilitasi hidrasi stratum korneum dan dengan pembentukan saluran difusi hidrofilik dalam penghalang.
- e. *Fatty acid* = penyerapan obat perkutan telah meningkat dengan berbagai macam asam lemak rantai panjang salah satu yang paling populer adalah asam oleat.
- f. *Surfactants* = biasanya, surfaktan ditambahkan ke formulasi untuk melarutkan bahan aktif lipofilik, sehingga mereka berpotensi melarutkan lemak dalam stratum korneum. Contohnya *sodium lauryl sulfat* (SLS).

Seiring berkembangnya teknologi dan penelitian, enhancer fisika dan kimia mengalami peningkatan yang signifikan, terutama enhancer kimia. Beberapa

dekade belakangan golongan enhancer baru peptide sebagai turunan dari kimia mempunyai kontribusi sangat baik terutama untuk makromolekul yang sulit penetrasi ke dalam kulit, salah satu contohnya adalah *Skin Penetrating and Cell Entering* (SPACE).

2.12 *Skin Penetrating and Cell Entering* (SPACE)

Pengantaran makromolekul ke dalam sel dan jaringan seperti kulit merupakan tantangan besar. Beberapa zat aktif seperti amnion mempunyai penyerapan yang rendah dalam melintasi stratum korneum dikarenakan ukuran molekul yang besar. Mengatasi tantangan ini penggunaan enhancer golongan peptida yang disebut *Skin Penetrating And Cell Entering* (SPACE) (Kumar S *et al*, 2015).

Studi *in vitro* menunjukkan bahwa SPACE peptida mampu memfasilitasi penetrasi melintasi stratum korneum ke epidermis, dermis hingga hipodermis. SPACE juga menunjukkan peningkatan penetrasi ke berbagai sel termasuk keratinosit, fibroblas, dan sel endotel, memungkinkan jalur makropinositosis (Tracy and Samir, 2011).

2.12.1 Mekanisme SPACE-Peptida

Skin Penetrating Peptides (SPPs) merupakan enhancer peptida yang ditemukan dalam beberapa tahun terakhir. Mekanismenya di luar ekspektasi dapat menciptakan fungsi baru. Salah satu golongan dari SPPs adalah SPACE merupakan penemuan terbaru diantara golongan lain, mempunyai mekanisme melenturkan β -sheet yang akan distabilkan oleh ikatan hidrogen antara gugus -NH dan -CO pada rantai polipeptida berlainan, sedangkan α -helix akan dilenturkan oleh ikatan hidrogen antara gugus -NH- dan -CO- pada rantai polipeptida yang sama, sehingga

apabila jarak antara lipatan satu dengan lipatan yang lain telah longgar maka obat akan mudah masuk melalui jalur transeluler pada transepidermal dengan mekanisme interaksi protein interseluler. Ikatan hidrogen berfungsi untuk memperlebar jarak antara lipatan dengan menarik atom yang memiliki sifat elektron negatif dan atom hidrogen yang terikat pada atom lain juga memiliki sifat elektron negatif (Kumar S, 2015).

2.13 Parameter Uji Karakterisasi

2.13.1 Organoleptis

Stabilitas organoleptis bisa dilakukan dengan penglihatan kasat mata, seperti perubahan warna, dimana suatu zat dalam masa penyimpanan, apabila mengalami perubahan warna dari awal penyimpanan, ditengah, atau di akhir, maka bisa disimpulkan bahwa zat tersebut tidak stabil dalam penyimpanan.

2.13.2 pH

Penurunan kapasitas *buffer* kulit terkait dengan peningkatan pH pada permukaan kulit akan terlihat pada usia lanjut. Pada pH yang tinggi dalam kondisi basal akan terlihat pada delapan titik wajah yang berbeda dan pada kulit lengan bawah pada studi kelompok usia lanjut dibanding usia muda. Perbedaan signifikan secara statistik diamati pada dahi, kelopak mata atas, leher, lengan bawah, dan pergelangan kaki (Joachim., 2011).

2.13.3 Differential Thermal Analysis (DTA)

Teknik yang digunakan untuk mengkarakterisasi sifat material yang dipelajari berdasarkan respon material tersebut terhadap temperature dengan kata lain biasa disebut titik lebur (Grega K, 2009)

2.13.4 Scanning Electron Microscope (SEM)

SEM adalah sebuah mikroskop elektron yang didesain untuk mengamati permukaan dari sebuah objek secara langsung dan bersifat kualitatif. SEM memiliki perbesaran 10-3000000x, *depth of field* 4-0,4 mm dan resolusi sebesar 1-10 nm. Elektron berinteraksi dengan sampel komposisi molekul. Energi dari elektron menuju ke sampel secara langsung dari proporsi jenis interaksi electron yang dihasilkan dari sampel (Oktaviana, 2009)

2.13.5 *X-Ray Diffraction (XRD)*

Untuk menentukan sifat kristal, metode difraksi sinar-x dapat menjelaskan parameter kisi, jenis struktur, susunan atom yang berbeda pada Kristal, adanya ketidak sempurnaan pada Kristal, orientasi, butir-butir dan ukurannya (Smallman, 1991)

2.13.6 *Fourier Transform InfraRed (FTIR)*

Digunakan untuk menganalisa senyawa kimia. Spektra inframerah suatu senyawa dapat memberikan gambaran dan struktur molekul senyawa tersebut spektra IR dapat dihasilkan dengan mengukur absorpsi radiasi, refleksi atau emisi di daerah IR (Hendayana dkk, 1994)

2.13.7 *Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*

SDS-PAGE adalah teknik elektroforesis gel yang menggunakan poliakrilamida untuk memisahkan protein yang bermuatan berdasarkan berat molekulnya saja (Martin, 2004). Sodium dodesil sulfat (SDS) merupakan detergen ionik yang dapat melarutkan molekul hidrofobik yang memberikan muatan negatif pada keseluruhan struktur protein. Cara kerja SDS-PAGE adalah menghambat interaksi hidrofobik dan merusak ikatan hidrogen (Davis L, *et al.* 1994).

2.13.8 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

ELISA adalah teknik biokimia yang digunakan untuk mendeteksi adanya keberadaan antibodi atau antigen dalam sampel. ELISA digunakan untuk menentukan jumlah antigen yang tidak diketahui pada sampel, dengan cara mengikatkan antigen dengan antibodi spesifik yang direkatkan pada permukaan dinding plate ELISA. Pengukuran kadar antigen atau antibodi dalam sampel menggunakan alat spektrofotometer.

2.14 Uji efektivitas

2.14.1 Uji penetrasi

Uji penetrasi bahan aktif merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui bahwa bahan aktif pada sediaan yang dibuat mampu menembus barrier kedalaman tertentu. Uji penetrasi dibagi menjadi dua yakni :

a. Uji penetrasi *in vitro*

Uji penetrasi ini biasanya digunakan sebagai prosedur skrining untuk mengetahui parameter fisikokomia seperti koefisien partisi, koefisien difusi, dan fluks (OECD, 2010). Keuntungan dari metode ini adalah kondisi dari eksperimen dapat dikontrol seperti kulit dan alat uji, namun metode ini hanya memberikan sedikit informasi mengenai metabolisme, distribusi, dan aliran darah terhadap permeasi (Brain, *et. al.*, 2002)

b. Uji penetrasi *in vivo*

Uji petrasi ini memberikan informasi yang baik dalam hal absorbs kulit dan juga memungkinkan dilakukannya penentuan penetrasi

bahan uji melalui kulit ke dalam kompartemen sistemik. Keuntungan dari metode ini adalah menggunakan system fisiologis dan metabolic utuh, menggunakan spesies umum untuk banyak studi toksisitas dan dapat dimodifikasi untuk digunakan pada spesies lain. Kerugiannya adalah penggunaan binatang hidup, membutuhkan bahan radiolabelled, kesulitan dalam menentukan fase penyerapan awal dan perbedaan permeabilitas spesies yang digunakan dengan kulit manusia (OECD, 2010)

2.14.2 Tinjauan Kulit Mencit

Uji penetrasi secara *in vitro* dan *in vivo* menggunakan membran kulit, dapat digunakan membrane kulit dari tikus, mencit, babi, ular, maupun kulit manusia. Penggunaan membran kulit manusia akan lebih mencerminkan keadaan sebenarnya bila obat digunakan pada manusia. Akan tetapi, membrane kulit hewan lebih sering digunakan sebagai model untuk memperkirakan absorpsi obat pada kulit manusia. Kulit tikus atau mencit lebih sering digunakan karena alasan efisien. Mencit umumnya memiliki jumlah kelenjar keringat yang sedikit tetapi memiliki folikel rambut yang lebih banyak dari manusia. Beberapa bahan kimia dapat terikat dengan kuat pada keratin rambut, sehingga jumlah bahan aktif yang dapat mencapai stratum korneum dapat berkurang dan mengurangi jumlah bahan aktif yang tersedia untuk diabsorpsi. Oleh karena itu sebelum lapisan kulit diambil, rambut mencit dicukur terlebih dahulu. Meskipun ketebalan kulit mencit dan kulit manusia berbeda, tapi permeabilitas kulit mencit menyerupai kulit manusia. Bila terjadi peningkatan penetrasi dan permeabilitas pada kulit

mencit, diperkirakan terjadi peningkatan pula pada kulit manusia (Bronaugh dan Maibach, 2005).

Perbedaan letak kulit mempengaruhi permeabilitas kulit mencit. Ketebalan kulit pada bagian perut lebih tipis daripada bagian punggung. Selain itu perbedaan jenis kelamin juga dapat mempengaruhi ketebalan dan permeabilitas dari kulit mencit. Kulit mencit jantan memiliki stratum korneum yang lebih tebal dibanding kulit mencit betina (Bronaugh *et al*, 2002).

2.15 Tinjauan Bahan

1. Phenoxyethanol

Nama Lain : *arosol, dowanol EPh, phenoxetol, phenyl cellulose*

Kegunaan : *antimicrobial preservative*

Tinjauan : Merupakan pengawet antimikroba digunakan dalam formulasi kosmetik dan sediaan topikal lainnya, konsentrasi penggunaan 0,5%-1,0%, efektif pada pH 6 (Rowe *et al*, 2009).

Aktivitas antimikroba : pengawet antibakteri yang efektif pada rentang pH yang luas terhadap strain *pseudomonas aeruginosa* dan pada tingkat yang lebih rendah terhadap *proteus vulgaris* dan organisme gram negatif lainnya. Paling sering digunakan pada kombinasi dengan pengawet lain seperti paraben untuk memperoleh spektrum aktivitas antimikroba yang lebih luas.

Stabilitas dan penyimpanan : larutan fenoksietanol dalam air bersifat stabil dan dapat disterilkan dengan autoclaving. Disimpan pada wadah tertutup di tempat sejuk dan kering. (Rowe et al, 2009).

Incompatibilities : aktivitas antimikroba fenoksietanol dapat berkurang dengan adanya penambahan surfaktan nonionik dan dapat diserap oleh polivinil klorida. Aktivitas antimikroba fenoksietanol terhadap pseudomonas aeruginosa dapat berkurang dengan adanya bahan tambahan turunan selulosa seperti metil selulosa

2. *Skin Penetrating and Cell Entering* (SPACE)

Sequence : ACTGSTQHQCG

Rumus molekul : $C_{40}H_{63}N_{15}O_{17}S_2$

Berat molekul : 1090.17

Penyimpanan : powder -80°C (2 tahun); -20°C (1 tahun)

Solvent -80°C (6 bulan); -20°C (1 bulan)

Latar belakang : Merupakan suatu enhancer peptida yang baru ditemukan oleh Kumar Sunny , telah berhasil membantu penghantaran berbagai makromolekul dan lainnya ke dalam kulit setelah dikonjugasikan langsung dengan *cargo* maupun dengan sistem nanopartikel (Ming chen et al, 2015)

Mekanisme : Ketika terkonjugasi ke muatan seperti molekul kecil dan protein, mampu memfasilitasi penetrasinya melintasi stratum korneum ke epidermis dan dermis. Peptide juga menunjukkan

peningkatan penetrasi ke berbagai sel termasuk keratinosit, fibroblas, dan endotel, kemungkinan melalui jalur makropinositosis (Hsu et al, 2011).