

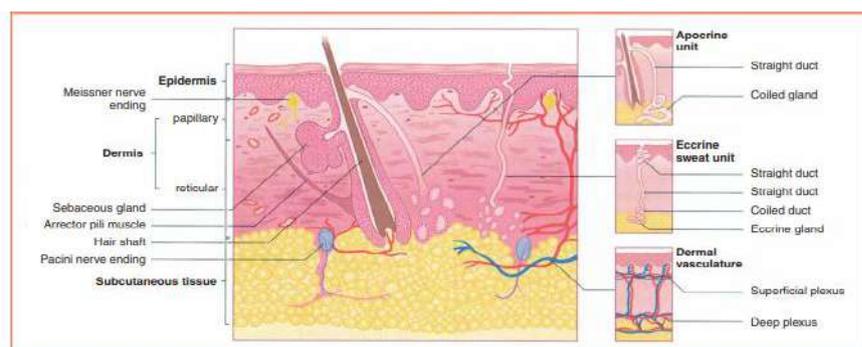
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

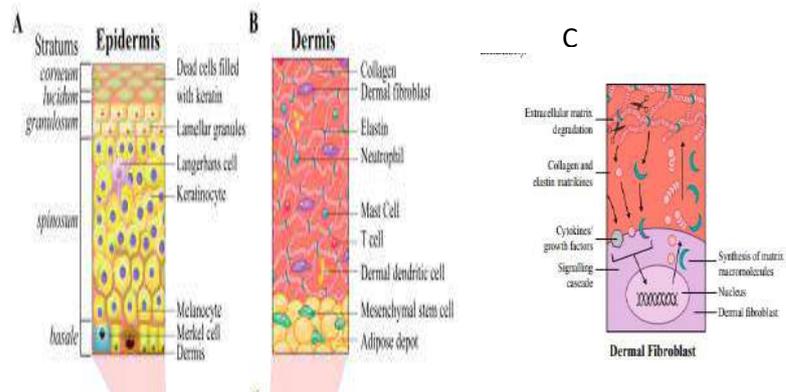
2.1 Tinjauan Kulit

2.1.1 Anatomi dan fisiologi kulit

Kulit adalah organ terbesar dari tubuh yang merupakan 16 % dari total berat tubuh dengan luas permukaan 1,8 m². Kulit memiliki beberapa fungsi yang paling penting sebagai penghalang fisik terhadap lingkungan, memungkinkan dan membatasi aliran air, elektrolit dan berbagai zat yang masuk atau keluar, memberikan perlindungan terhadap mikroorganisme, radiasi ultraviolet, zat toksik dan gangguan mekanik. Ada tiga lapisan struktural pada kulit yaitu epidermis, dermis dan subkutis. Rambut, kuku, sebaceous, keringat dan kelenjar apokrin dianggap sebagai turunan dari kulit. Kulit adalah organ yang dinamis dalam keadaan dan perubahan yang konstan, seperti sel-sel luar terus mati dan digantikan oleh sel-sel dalam yang bergerak ke permukaan. Meskipun secara struktural konsisten di seluruh tubuh, ketebalan kulit bervariasi sesuai anatomi dan usia individu (James *et al.*,2006).



Gambar 2.1 Struktur dan anatomi kulit (James *et al.*,2006)



Gambar 2. 2 Struktur kulit terperinci dari (A) epidermis ditunjukkan dengan lapisan stratum dan (B) komposisi seluler dan dermis ditunjukkan, (C) Dermal Fibroblast (Meenaski *et al.*,2017)

Tabel 2. 1 Deskripsi lapisan kulit (Paul *et al.*,2006)

Lapisan Kulit	Deskripsi
Epidermis	Lapisan eksternal terutama terdiri dari lapisan keratinosit tetapi juga mengandung melanosit, Sel Langerhans dan sel Merkel
Membran dasar	Struktur berlapis-lapis membentuk penghubung dermoepidermal
Dermis	Area jaringan ikat yang mendukung antaraepidermis dan subkutis di lapisan dibawahnya : mengandung keringatkelenjar, akar rambut, sel saraf dan serat, darah dan pembuluh getah bening
Subkutan	Lapisan jaringan ikat longgar dan lemak di bawah dermis

1. Epidermis

Epidermis adalah epitel squamosa, sel-sel utama epidermis adalah keratinosit yang mensintesis protein keratin. Ketebalan epidermis bervariasi dari 0,05 mm pada kelopak mata dan $0,8 \pm 1,5$ mm pada telapak kaki dan telapak tangan. Lapisan epidermis dari bawah ke atas permukaan terdiri menjadi empat lapisan yaitu :

a. Stratum basal (lapisan sel basal atau germinativum)

Stratum basal merupakan lapisan paling dalam dari epidermis yang terletak berdekatan dengan dermis. Sel basal adalah bagian kulit yang memproduksi pigmen (melanin) melanosit. Melanin terakumulasi dalam melanosom yang ditransfer ke keratinosit. Pigmen melanin memberikan perlindungan terhadap radiasi ultraviolet (UV); paparan kronis terhadap cahaya meningkatkan rasio melanosit ke keratinosit sehingga lebih banyak ditemukan di kulit wajah dibandingkan dengan punggung dan jumlah yang lebih besar pada lengan luar dibandingkan dengan lengan dalam. Jumlah melanosit pada bagian tubuh sama pada warna kulit putih dan hitam tetapi distribusi dan laju produksi melanin yang berbeda.

b. Stratum spinosum (lapisan sel spinous atau prickle)

Saat sel basal berproduksi dan menjadi dewasa, bergerak menuju lapisan luar kulit, awalnya membantuk stratum spinosum. Terdiri dari sel langerhans yaitu sel dendritik, sel-sel aktif secara imunologis yang berasal dari sumsum tulang dan memegang peranan penting dalam reaksi kekebalan pada kulit.

c. Stratum granulosum (lapisan sel granular)

Melanjutkan transisi untuk meratakan permukaan sel, sel kehilangan nukleus dan sitoplasma tampak granular pada tingkat ini.

d. Stratum corneum (lapisan tanduk)

Hasil akhir dari maturasi keratinosit ditemukan di stratum korneum yang terdiri dari lapisan-lapisan yang berbentuk heksagonal. Setiap korneosit

dikelilingi oleh selubung protein dan dilapisi dengan keratin penahan protein air. Pergerakan sel epidermis ke lapisan ini biasanya memakan waktu sekitar 28 hari dan dikenal sebagai waktu transit epidermis.

2. Penghubung Dermoepidermal / Membran dasar

Dermoepidermal merupakan struktur kompleks yang terdiri dari dua lapisan. Strukturnya sangat tidak beraturan dengan papilla dermal dari papiler dermis diproyeksikan ke permukaan kulit. Tanda-tanda visual penuaan akan mulai nampak pada lapisan ini.

3. Dermis

Dermis terdiri dari blast yang menghasilkan kolagen, elastin dan struktural proteoglikan. Berasal dari sel mast dan makrofag yang imunokompeten. Elastin mempertahankan elastisitas normal dan fleksibilitas sementara proteoglikan memberikan viskositas dan hidrasi. Ketebalan dermis bervariasi antara 0,6 mm pada kelopak mata hingga 3 mm bagian belakang telapak tangan dan kaki. Dermis terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan papiler tipis dan lapisan reticular yang lebih tebal.

4. Subkutan

Lapisan ini terdiri dari jaringan ikat longgar dan lemak yang bisa mencapai 3 cm di area perut.

5. Pembuluh darah dan limfatik

Dermis menerima suplai darah yang kaya. Pembuluh darah mengalir ke jaringan vena mid-dermal dan subkutan. Dilatasi atau penyempitan loop kapiler ini memainkan peranan langsung dalam termoregulasi kulit.

2.1.2 Fungsi kulit

1. Perlindungan

Perlindungan dan perbaikan yang dilakukan terutama oleh keratinosit sementara perlindungan UV oleh melanosit. lapisan subkutan melindungi organ tubuh yang lebih dalam. Gesekan pada kulit dengan benda tumpul dapat menyebabkan respons garis putih yang terutama disebabkan oleh penyempitan kapiler. Pelepasan histamin yang bertindak sebagai vasodilator sebagai respons lokal terhadap cedera.

2. Warna kulit diberikan oleh melanosit yang mengandung melanin.

3. Pengaturan suhu dan ekskresi produk limbah

Kelenjar keringat menghasilkan keringat yang mengandung urea dan air dan berperan dalam pengaturan suhu. untuk memfasilitasi kehilangan panas pada suhu panas, pembuluh darah di kulit membesar dan kelenjar keringat menjadi aktif. sebagai alternatif, pada suhu dingin pembuluh darah kulit mengerut untuk menghemat panas dan tubuh membakar lemak yang disimpan dalam jaringan adiposa.

4. Lubricant

Lubricant kulit disediakan oleh kelenjar sebaceous yang menghasilkan zat berminyak yang dikenal sebagai sebum. penyumbatan dan infeksi pada kelenjar ini dapat menyebabkan kondisi seperti jerawat.

5. Imunitas

Sel langerhans di kulit adalah sel dendritik yang mengambil antigen mikroba di kulit untuk berubah menjadi sel penyaji antigen dan memberikan kekebalan dengan berinteraksi dengan sel T.

6. Penyimpanan

Kulit adalah organ yang dapat menyimpan dengan cepat untuk cadangan. Hal ini biasanya terdapat pada lapisan subkutan.

7. Sensasi

Terjadi melalui struktur khusus yang dikenal sebagai mechanoreceptors.

8. Sintesis vitamin D

Kulit adalah sumber yang kaya 7-dehydrocholesterol dan di bawah pengaruh sinar UV diubah menjadi vitamin D (cholecalciferol) yang dicerna terutama dari makanan seperti susu dan produk susu.

9. Estetika

Kulit dapat dilihat sebagai mode dari komunikasi atau daya tarik.

10. Penyerapan

Kulit memiliki kemampuan menyerap oksigen dan air. obat-obatan tertentu seperti steroid topikal yang dioleskan dapat diserap melalui permukaan kulit.

2. 2. Tinjauan Penuaan (*aging*)

2.2.1 Pengertian penuaan (*aging*)

Penuaan merupakan proses multifaktorial yang kompleks yang menghasilkan beberapa perubahan fungsional dan estetika pada kulit. Perubahan ini merupakan akumulasi dari proses intrinsik maupun ekstrinsik, seperti radiasi

ultraviolet. Proses penuaan (*aging*) merupakan proses fisiologis yang bersifat dinamis dan merupakan akumulasi secara progresif di dalam sel dan jaringan yang terjadi seiring dengan berjalannya waktu yang akan terjadi pada semua makhluk hidup yang meliputi seluruh organ tubuh termasuk kulit (Cunningham, 2005).

2.2.2 Tipe *aging*

Secara garis besar, Penuaan (*aging*) dikelompokkan menjadi dua :

1. Penuaan Intrinsik (*intrinsic aging, true aging, chronologic aging*)

Penuaan Intrinsik merupakan proses penuaan alami (fisiologis) yang disebabkan berbagai faktor dari dalam tubuh sendiri seperti genetik, hormonal, dan rasial. Proses ini berlangsung normal mulai usia pertengahan dua puluhan. Proses ini mengakibatkan perubahan pada kulit seiring dengan perjalanan waktu (Peres *et.al.*,2011).

2. Penuaan ekstrinsik

Penuaan Ekstrinsik (*photoaging*) yang disebabkan oleh proses oksidasi yang menyebabkan penurunan aktivitas enzim antioksidan dan kapasitas pertahanan antioksidan yang bersama-sama menyebabkan akumulasi kerusakan dan produk oksidatif, imunomodulasi dan stimulasi melanogenesis dan karsinogenesis. (Fisher *et.al.*,2002). *Photoaging* pada kulit akibat oksidasi menyebabkan penurunan tingkat aktivitas enzim antioksidan dan kapasitas pertahanan antioksidan yang semuanya mengarah pada akumulasi kerusakan oksidatif dan produk oksidatif, imunomodulasi, stimulasi, melanogenesis dan karsinogenesis (Fisher *et.al.*,2002).

Klasifikasi *Photoaging* menurut Glogow dibagi menjadi 4 tipe yaitu :

a. Tipe 1

- 1) *Photoaging* ringan (20-30)
- 2) Tidak ada / sedikit kerut
- 3) Sedikit perubahan pigmen
- 4) Tidak ada tumor kulit

b. Tipe II

- 1) *Photoaging* sedang (umur 30-40 tahun)
- 2) Kerut pada kontraksi otot wajah, lekuk senyum lebih dalam
- 3) Mulai ada bercak kehitaman
- 4) Mulai ada tumor kulit

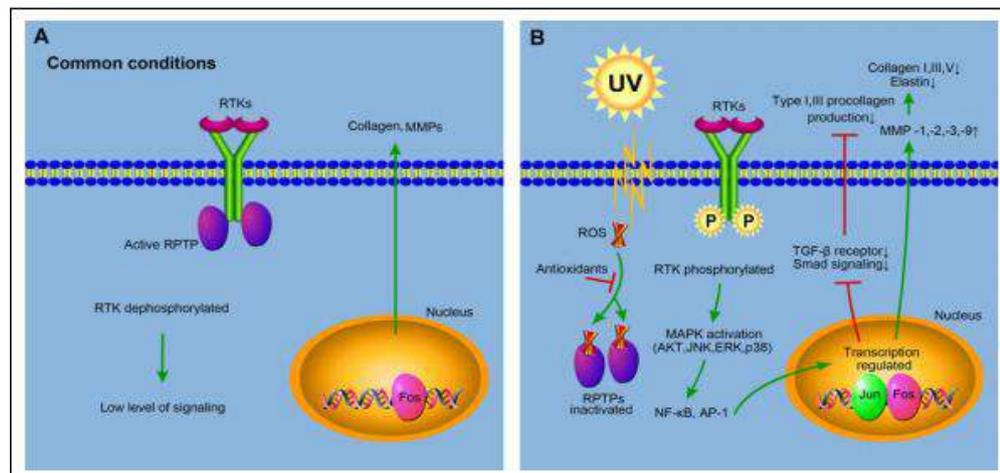
c. Tipe III

- 1) *Photoaging* berat (umur 50-an tahun)
- 2) Adanya kerut walaupun dalam keadaan istirahat
- 3) Perubahan warna kulit dan pelebaran pembuluh darah
- 4) Adanya tumor-tumor kulit

d. Tipe IV :

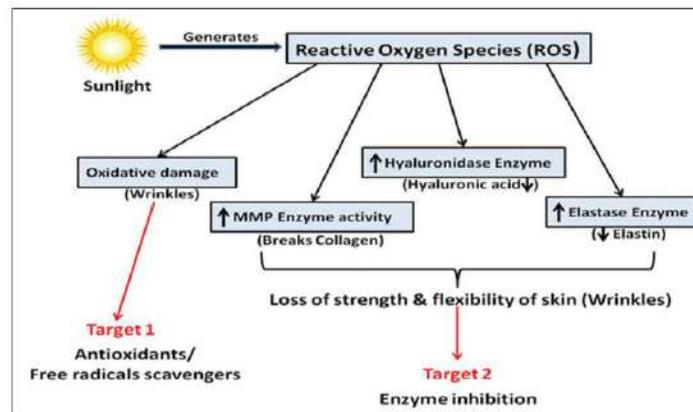
- 1) *Photoaging* lebih berat (umur 60-70 tahun)
- 2) Hampir tidak ada kulit normal, semua kerut

2.2.3 Mekanisme *photoaging*



Gambar 2. 3 Mekanisme Reaktif Oksigen Species (ROS) pada penuaan kulit (Zhang, 2018)

(A) Pada kondisi umum tanpa ligan, aktivitas reseptor tirosin kinase (RTKs) pada permukaan dihambat oleh Reseptor Protein Tirosin Kinase (RPTPs) yang memfosforilasi RTK dan menjaga pada kondisi rendah, menghasilkan kolagen dan matriks metaloproteinasi (MMP) yang normal. (B) Dibawah radiasi ultraviolet, ROS diproduksi sehingga menghambat aktivitas RPTPs dengan mengikat katalisator RPTPs, meningkatkan jumlah RTK yang terfosforilasi dan memicu jalur pensinyalan termasuk aktivasi protein kinase teraktivasi mitogen (MAPK) dan NF- κ B dan faktor transkripsi dan AP-1 menurunkan regulasi transformasi TGF β reseptor tipe II sehingga mengurangi fosforilasi dan selanjutnya mengurangi produksi kolagen (Zhang, 2018).



Gambar 2. 4 Skema mekanisme photoaging (Garg et al. 2017)

Mekanisme molekuler *photoaging* pada kulit terjadi melalui 4 cara yaitu (Garg *et al.* 2017):

1. MMP/ Collagenase

MMPs merupakan kelompok proteinase ekstraseluler yang mengandung zink yang juga disebut matrixin atau collagenases yang membantu memperbarui matriks ekstraseluler (ECM). Ekspresi MMP diinduksi dan diaktifkan setelah adanya paparan radiasi sinar UVB ke kulit. (Fisher *et al.*,2002) Radiasi UV memicu berbagai faktor pertumbuhan dan reseptor sitokin yang ada dipermukaan sel. Hal ini menstimulasi sinyal protein kinase yang selanjutnya mengaktifkan aktivator protein-1 (AP-1), faktor transkripsi yang terdiri dari protein c-Jun dan c-Fos dan nuclear factor B (NF- κ B) dalam nukleus. Induksi AP-1 mengarah ke peningkatan ekspresi MMP bersama dengan peningkatan MMP-1 (collagenase), MMP-3 (stromelysin-1) dan MMP 9 (gelatinase) yang selanjutnya mengarah pada degradasi komponen matriks ekstraseluler pada kulit manusia. Hasil degradasi, ada akumulasi terfragmentasi, serat kolagen tidak teratur. Produk kolagen terganggu ini menurunkan regulasi sintesis

kolagen baru. Jadi, kolagen sintesis diatus secara negatif oleh pemecah kolagen. Tindakan gabungan dari degradasi MMP-1, MMP-3 dan MMP-9 dan sebagian besar jenis -1 dan III kolagen kulit. Selanjutnya viosintesi prokolagen dihambat oleh AP-1 dengan menekan jenis I dan III procollagen di dermis menyebabkan jumlah kolagen berkurang.

2. Hyaluroinidases

Penuaan kulit juga berkorelasi dengan hilangnya kelembaban kulit yang dipengaruhi oleh hyaluronan atau HA, sebuah glukosaminoglikan yang memiliki sifat unik yaitu mengikat dan menahan molekul air. HA paling banyak terdapat pada kulit terhitung 50 % dari total HA pada tubuh. HA diproduksi terutama oleh sel mesenchymal. Hal itu membuat tubub tetap halusm lembab dan dilumasi. Selama penuaan, jumlah HA pada kulit berkurang sehingga menyebabkan kulit kering dan keriput. HA terdegradasi oleh enzim HYAL dengan menghidrolisis hubungan heksominid β (1-4) antara residu N-asetil D-glukosamin dan asam D-glukuronat. HA dihidrolisis oleh HYAL dengan menurunkan viskositanya dan meningkatkan permeabilitas.

3. Elastases

Matriks ekstraseluler mengandung elastin yang bertanggung jawab untuk menjaga elastisitas dan ketahanannya. Selama penuaan, elastisitas kulit berkurang oleh enzim elastase yang menyebabkan kulit menjadi kendur. Elastin, serat elastin protein yang tidak larut bersama dengan kolagen mempengaruhi sifat-sifat mekanis dari jaringan ikat yang hanya terdegradasi oleh enzim elastase. Elastase merupakan kelas *chymotrypsin* sebuah enzim yang

mampu menghidrolisis bahan seperti bahan elastin dan fibrillin yang merupakan bahan serat yang ditemukan didalam *Extracellular Matriks* (ECM). Sekresi dan aktivasi elastase dari fibroblast dermal sebagai respon terhadap iradiasi UV dan terhadap sitokin dilepaskan oleh keratinosit bertanggung jawab atas degenerasi serat elastis yang menyebabkan keriput. Elastase memiliki dampak signifikan pada metabolisme serat elastis di jaringan kulit selama *Photoaging*.

4. *Reactive Oxygen Reaction* (ROS) / Antioksidan

Ketika kulit terus menerus terpapar radiasi UV, produksi radikal bebas yang menginduksi rusaknya membran biologis. Radikal bebas (ROS) mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan yang terbentuk sebagai hasil dari metabolisme reaksi oksidatif sel. Kulit merupakan target utama dari stres oksidatif yang kaya akan lipid, protein, karbohidrat, dan DNA sangat rentan terhadap proses oksidatif dan efek ROS yang dihasilkan sebagai akibat dari stres oksidatif. Proses oksidatif yang diinduksi oleh ROS menghasilkan peroksidasi lipid, mutasi DNA dan kerusakan protein membran yang berperan dalam penuaan kulit. Peroksidasi lipid menyebabkan perubahan dalam fluiditas membran plasma dan kebocoran molekul dan akibatnya gangguan pada peran utama mereka. Enzim dapat secara langsung dinonaktifkan oleh ROS yang mungkin menyebabkan degradasi protein. ROS juga menyebabkan oksidatif kerusakan DNA yang dapat menyebabkan efek samping bahkan kanker. Stres oksidatif ini muncul sebagai pigmentasi tidak merata, noda dan mengganggu struktur dasar kulit, akibatnya menimbulkan keriput dan kendur. Meskipun

epidermis kulit memiliki pertahanan antioksidan alami yang efektif termasuk berbagai enzim antioksidan seperti peroksidase, katalase, dan glutathione, perlindungannya dibatasi karena produksi ROS yang sangat besar. Hal ini menyebabkan stres oksidatif pada sel karena ketidakseimbangan antara antioksidan dan oksidan pada kulit.

2.2.4 Tanda-tanda *aging*

Aging terjadi dengan dimulainya tanda-tanda yang muncul antara lain kerutan atau garis-garis halus diarea sudut mata, kening, dan sekitar bibir. Bila garis-garis halus di daerah tersebut mulai muncul maka menjadi penunjuk bahwa kulit membutuhkan perawatan yang lebih (Mulyawan *et al.*, 2013).

Ciri-ciri penuaan dini menurut Noormindhawati (2013)

- a. Keriput dan mengendur
- b. Muncul *age spot* (noda hitam)
- c. Kulit kasar
- d. Pori-pori membesar

2.2.5 Terapi *aging*

Primary	Secondary	Tertiary
Photoprotection		
	Retinoic Acid	
	Antioxidants	
	Estrogens	
	Growth factors/ cytokines	
		Chemical peels
		Microdermabrasion/ Microcoblation
		Laser
		Botulinum toxins
		Soft tissue augmentation

Gambar 2. 5 Terapi *aging* (Garg *et al.* 2017)

Terapi aging dapat dibedakan menjadi terapi kimiawi dan fisika, yaitu

1. Secara fisik
 - a. Dermabrasi mikrodermabrasi
 - b. *Skin Filler* (injeksi kolagen, Injeksi lemak autolog)
 - c. Toksin Botulinum (*Botox*)
 - d. *Laser resurfacing*
 - e. *Intense Pulsed Light* (IPL)
2. Kimiawi
 - a. (Pemakaian obat topikal) :
 - 1) Asam hidroksi / asam beta hidroksi / asam polihidroksi
 - 2) Tretinoin
 - 3) Asam Hialuronat
 - 4) anti oksidan (vitamin C, E, ekstrak teh hijau, *alpha lipoic acid* (ALA) dan lain-lain
 - 5) Hormon estrogen
 - 6) Stem sel : *Growth factor* dan sitokin
 - b. Pengelupasan kulit secara kimiawi (*chemical peeling*) : superfisial / medium / dalam.

2.3 Stem Cell

2.3.1 Definisi *stem cell*

Stem Cell adalah sel yang tidak terspesialisasi yang berkembang menjadi terspesialisasi. Sel-sel yang membentuk berbagai jenis jaringan pada tubuh manusia ditandai dengan kemampuan untuk memperbarui diri melalui pembelahan mitosis

dan berdiferensiasi menjadi beragam jenis sel khusus. *Stem Cell* sangat penting untuk perkembangan, pertumbuhan, pemeliharaan dan perbaikan jaringan seperti otak, tulang, otot, saraf, darah, kulit dan organ-organ lainnya. Penelitian *Stem Cell* memberikan dampak yang luar biasa untuk pengembangan terapi berbagai penyakit dan cedera serius (Karla *et al.*, 2014).

2.3.2 Klasifikasi *stem cell*

Klasifikasi *Stem Cell* berdasarkan potensinya diklasifikasikan menjadi 4 jenis, yaitu :

a. *Totipoten*

Kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi semua kemungkinan. Contohnya adalah zigot terbentuk pada saat pembuahan sel telur dan beberapa sel pertama yang dihasilkan dari pembelahan zigot.

b. *Pluripotent*

Kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi hampir semua jenis sel. Contohnya termasuk sel embrionik dan sel yang berasal dari mesoderm, endoderm dan ectoderm yang terbentuk pada tahap awal dari diferensiasi *stem cell* embrionik.

c. *Multipoten*

Kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi keluarga sel yang terkait erat. Contohnya termasuk sel induk hematopoetik (dewasa) dapat menjadi sel darah merah atau putih atau trombosit.

d. *Oligopoten*

Kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi beberapa sel. Contohnya termasuk limfoid (dewasa) atau sel myeloid.

e. *Unipotent*

Kemampuan *stem cell* untuk berdiferensiasi menjadi jenis sel yang sama persis dengan sel itu sendiri, namun memiliki kemampuan untuk memperbarui dirinya sendiri. Contohnya adalah *stem cell* sel otot dewasa.

2.3.3 Sumber *stem cell*

Klasifikasi *Stem Cell* berdasarkan sumber diperolehnya dibagi menjadi dua jenis, yaitu :

a. *Embryonic Stem cell*

Merupakan sel *pluripotent* yang mereplikasi diri sendiri yang dihasilkan dari embrio pada tahap perkembangan sebelum waktu implantasi dan biasanya terjadi di dalam rahim. *Embryonic stem cell* biasanya berumur empat atau lima hari dan pada mikroskop berbentuk bola yang disebut *blastocyst*.

b. *Mature Stem Cell*

Mature stem cell atau *adult stem cell* merupakan sel yang tidak berdiferensiasi, sel totipoten atau multipoten dan ditemukan diseluruh tubuh setelah perkembangan embrio yang dikaitkan dengan pembelahan sel untuk mengganti sel yang rusak atau regenerasi sel yang mati.

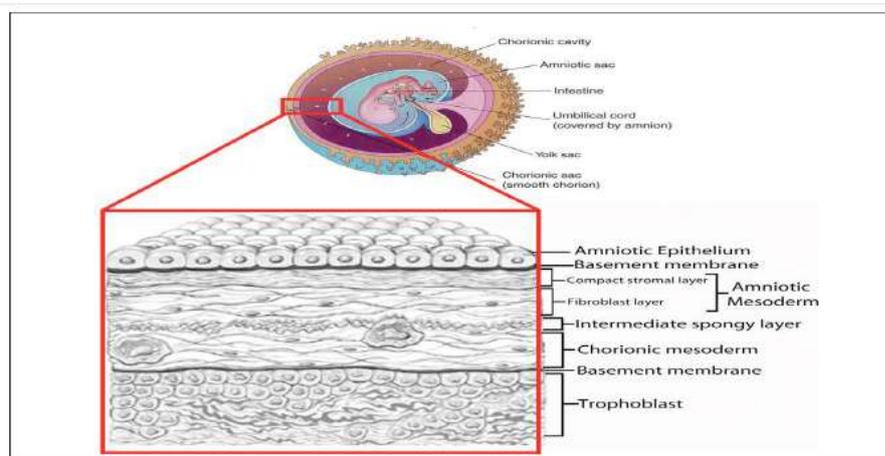
2.4 Tinjauan *Amniotic Membran Stem Cell*

Membran amnion adalah jaringan yang menarik karena sel-selnya memiliki karakteristik sel induk dengan kemampuan diferensiasi multipoten dan karena imunogenitas yang rendah dan mudah didapatkan dari plasenta, yang merupakan jaringan yang dibuang setelah proses kelahiran, sehingga menghindari

kontroversi saat ini terkait dengan penggunaan sel induk embrionik manusia. Oleh karena itu, membran amnion telah diusulkan sebagai agen yang baik untuk digunakan dalam terapi seluler dan regeneratif. (Carmen L. *et.al.*, 2010).

2.4.1 Struktur dan fungsi membran amnion

Membran amnion terdiri dari lapisan epitel bagian dalam, sel-sel yang bersentuhan langsung dengan cairan ketuban disebut sebagai epitel ketuban. Sel-sel epitel dapat mensekresi glikoprotein, kolagen dan laminins. Tepat dibagian bawah lapisan epitel adalah mesoderm amnion yang termasuk bagian lapisan stroma dan lapisan fibroblast. Fungsi dasar membran amniotik adalah memberikan perlindungan embrio yang berkembang dari gangguan eksternal. Fungsi lain dari amnion adalah untuk memberikan perlindungan janin terhadap infeksi dan racun. (Courtney *et.al.*, 2011).



Gambar 2. 6 Struktur membran amnion (Courtney *et al.*, 2011)

2.4.2 Prosedur perolehan *Amniotic Membran Stem Cell* Metabolit Produk (AMSC-MP)

Membran *amniotic* didapatkan dari proses *section caesaria* neonates aterm yang sehat pada gedung bedah pusat terpadu RSUD DR.Soetomo Surabaya, sesuai protokol dan persetujuan komite etik dan medis RSUD DR.Soetomo. Prosedur dan pengolahan dilakukan menurut standar internasional kultur *stem cell* manusia. Donor sebelumnya diseleksi ada tidaknya riwayat keganasan baik pada pendonor dan keluarga, penyakit menular (*Human Immun Deficiency Virus*, Hepatitis B dan C, Tuberkulosis, penyakit menular seksual dan malaria) serta penyakit autoimun., skrining prenatal untuk TORCH (toxoplasma, rubella, cytomegalo, virus, herpes simplek) juga dilakukan pada donor (Prakoeswa, 2018).

Metode isolasi menggunakan *modified soncinis protocol*. Setelah bayi lahir, *umbilical cord* dipotong, plasenta beserta *umbilical cord* diletakkan di wadah steril berbahan *stainless steel*. Membran amnion dipisahkan dari korion, lalu dilakukan pencucian dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) tiga kali untuk membersihkan dari sisa darah dan direndam dalam larutan ringer laktat yang mengandung 2,5 µg/mL gentamisin dan 1000 U/mL amfoterisin B selama 20 menit. Membrane amnion dipotong dengan pisau menjadi potongan halus dengan ukuran kurang lebih 2x2 cm² 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 dua kali. Suspensi sel yang telah tercerna tersebut ditambah PBS yang mengandung *collagenase IV* 0,75 mg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) dan

Dnase I 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 (Prakoeswa, 2018).

Sel-sel tersebut dikultur pada *plate/dish* berlapis kolagen menggunakan medium Dulbecco (DMEM)/F12 (1:1) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD,USA) dan ditambahkan *human leukemia inhibitory factor* (10 ng/mL) dan *fetal bovine serum* (Gibco BRL). Medium kultur diganti setiap 3 hari, sampai diperoleh proporsi kepadatan kultur sel 80 %. Setelah itu dilakukan pemisahan sel dengan menggunakan tripsin. Sel-sel dapat ditanam kembali pada medium kultur yang baru. Medium kultur yang berisi AMSC-MP kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit, kemudian dicuci dengan PBS dan didiamkan 24 jam dan akhirnya didapatkan medium kultur yang berisi AMSC-MP (Prakoeswa, 2018).

2.4.3 Mekanisme AMSC-MP untuk skin aging

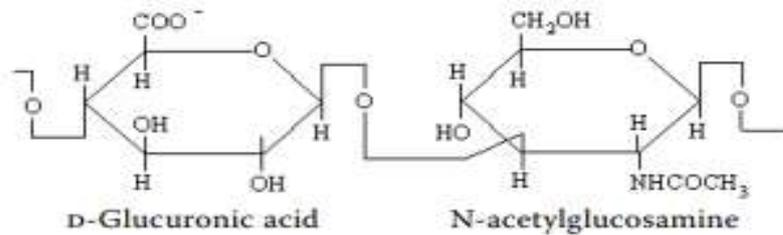
Stemcell diyakini sebagai bahan yang menjanjikan untuk digunakan dalam terapi berbasis sel karena kemampuannya dalam *self-renewal* dan berdiferensiasi menjadi sel lain (Bauman L.,*et al.*,2009). Peremajaan kulit pada *photoaging* merupakan proses yang dinamis dan membutuhkan kordinasi yang baik antara sel, faktor pertumbuhan dan matriks protein ekstraseluler. Semua proses ini diatur dengan baik oleh sel induk mesenkimal (*Amniotic Mesenchymal Stem Cell*) endogen dengan merekrut *stem cell* lainnya dan mensekresi *growth factor*, sitokin, dan protein matriks ekstraseluler. (Rennie *et al.*,2012).

Produk peremajaan kulit pada *photoaging* idealnya mengandung komponen *growth factors* dan sitokin oleh AMSC ini terbukti dapat menginduksi angiogenesis, mengurangi inflamasi, memicu migrasi *fibroblast* dan produksi kolagen. Penggunaan gabungan antara AMSC *Freeze dry* dan Asam hialuronat LMW (*Low Molecular Weight*) dapat meningkatkan kecepatan dan epitelisasi karena merupakan matriks ekstraseluler yang berperan dalam penyembuhan luka ditandai dengan jumlah lapisan epitel dan reorganisasi sitokeratin 16 filamen di sitoplasma (Susilo *et al.*,2011).

Transforming growth factor (TGF- β) merupakan salah satu *growth factor* untuk desain peptide yang digunakan dalam peremajaan kulit. Berawal dari identifikasi struktur yang memicu kegiatan biologis yang diperlukan untuk menfaat perawatan kulit. 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 20 kDA, berfungsi sebagai multifungsi sitokin untuk mengatur pertumbuhan, diferensiasi dan fungsi lainnya dalam berbagai tipe sel (Dominic *et al.*, 2015).

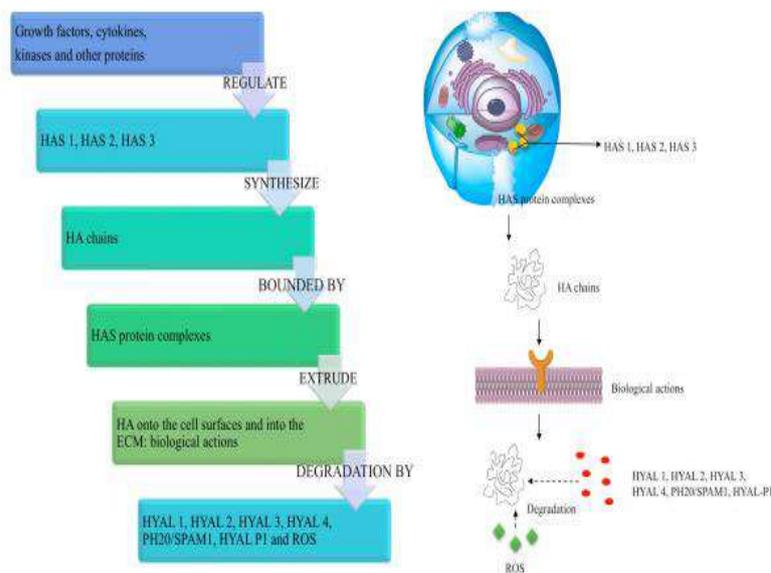
2.5 Tinjauan Asam Hialuronat

2.5.1 Sifat Fisika Kimia Asam Hialuronat (HA)



Gambar 2. 7 Struktur Kimia Asam Hialuronat (HA) (Necas *et.,al.*,2018).

Asam Hialuronat (HA) $C_{28}H_{44}N_2O_{23}$ adalah biopolimer yang terdiri dari pengulangan disakarida, yang meliputi asam D-glukoronat dan molekul N-asetilglukosamin yang dihubungkan oleh glikosida β - (1–4) dan β -(1–3). Termasuk dalam kelompok zat yang disebut mucopolysakarida kelas glycosamynoglycans (GAGs).



Gambar 2. 8 Skema sintesis dan degradasi Asam Hialuronat (Syed *et.al.*,2018)

Asam Hialuronat adalah satu-satunya mucopolysaccharida yang tidak disintesis dalam *apparatus golgi*. Ada tiga sintesis HA yang bertanggung jawab

dalam pembentukannya (HaS1, HaS2, dan HaS3). Sintesis berlangsung di sisi dalam membran. Katabolisme asam hialuronat dapat terjadi secara enzimatik yang terkait dengan lisosom yang mendegradasi HA menjadi tetraskarida, HYAL2 mendegradasi HA dengan massa molekul tinggi dalam ukuran 20 kDa, HYAL-3 adalah enzim yang tidak diketahui banyak tentang peranannya. Degradasi kimia asam hialuronat dikaitkan dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS).

2.5.2 Mekanisme Asam Hialuronat (HA) pada Kulit

Tubuh manusia dengan berat 70 kg mengandung 15 gr asam hialuronat (HA) dan sebagian besar senyawa tersebut berada pada kulit (sekitar setengah dari total HA). Asam Hialuronat (HA) berperan dalam mengatur berbagai fungsi biologis seperti perbaikan kulit, diagnosa kanker, penyembuhan luka, regenerasi jaringan, antiinflamasi dan imunomodulasi. Karena potensi regenerasi jaringan dan biomedisnya yang luar biasa, HA telah banyak digunakan sebagai salah satu komponen penting dari kosmetik dan produk nutrikosmetik. Formulasi berbasis HA yaitu gel, krim, suntikan pengisi intra kulit, pengisi kulit, pengisi wajah, gel lemak autologousm lotion, serum, implan menunjukkan efek *anti wrinkle* yang luar biasa, lipatan *antinasobial*, *antiaging*, mengisi ruang dan memberikan efek peremajaan pada wajah. Hal ini dicapai melalui augmentasi jaringan lunak, peningkatan hidrasi kulit (Syed *et al.*,2018).



Gambar 2. 9 Efek kosmetik dan nutrikosmetik dari HA (Syed *et.al.*, 2018)

Struktur asam hialuronat menunjukkan kemampuan luar biasa untuk menahan atau menjebak sekitar 1.000 kali berat air. HA berperan dalam mengatur berbagai proses biologis dan mempertahankan homeostatis di dalam tubuh. HA ditemukan pada pinggiran dan antarmuka serat kolagen dan elastis dimana memfasilitasi dan mempertahankan serat kolagen dan elastin. Pada kulit yang tua, koneksi dengan HA tidak ada yang dapat menyebabkan disorganisasi serat kolagen dan elastin sehingga dapat menyebabkan garis halus, kerut dan lipatan nasolabial. Hampir semua produk kosmetik memiliki pelembab, pelindung kulit dan *antiaging* yang terdiri dari HA karena telah diakui kemampuannya untuk mengisi kelembaban kulit, kemampuan menahan air dari HA menghasilkan kulit yang lebih lembut, halus dan bercahaya. Hidrasi kulit dan efek antioksidan dari HA juga mendorong regenerasi sel dan merangsang produksi kolagen. Efek peremajaan kulit dan efek anti kerut oleh aplikasi HA adalah karena kemampuannya untuk merangsang sintesis kolagen melalui induksi fibroblast di dermis. HA tidak beracun dan tidak menyebabkan iritasi oleh karena itu aman digunakan untuk semua jenis kulit tanpa resiko alergi.

Sifat hidrasi, viskoelastik dan biokompatibilitas yang unik dari HA, dalam produk kosmetik HA digunakan secara luas sebagai pelembab, pengental dan stabilisator. Karena HA adalah produk yang larut dalam air maka HA dapat dengan mudah dimasukkan ke dalam formulasi kosmetik. Konsentrasi HA dalam kosmetik yang dikhususkan untuk perawatan kulit dan dirancang untuk aplikasi topikal bervariasi antara 0,01 dan 0,2 % (Smejkalova *et al.*, 2015).

Sifat pengiriman topikal asam hialuronat dengan cara mempengaruhi tingkat hidrasi *stratum corneum* yang mempengaruhi permeabilitas kulit. Peningkatan hidrasi akan membuka *stratum corneum* dengan melonggarkan sel-sel padat sehingga meningkatkan permeabilitas terhadap bahan aktif, menghambat kehilangan air transepidermal dan meningkatkan hidrasi *stratum corneum* menghasilkan peningkatan perkutan dari bahan aktif yang diformulasikan. Polisakarida umumnya sebagai agen pengontrol kelembaban namun sifat hidrasi kulit asam hialuronat dianggap jauh lebih tinggi daripada polisakarida lainnya karena kapasitasnya yang cukup besar untuk mengikat air. Pergerakan asam hialuronat ke dalam keratin dapat disebabkan oleh tiga faktor yaitu adanya reseptor HA kulit yang dapat mengarahkan lokalisasi HA yang diharapkan. Kedua, struktur spesifik HA terhidrasi dan keberadaan area hidrofobik memungkinkan penyerapan makromolekul ini melintasi membran. Peningkatan hidrasi pada lapisan kulit tidak hanya meningkatkan penyerapan bahan aktif di seluruh *stratum corneum* tetapi juga memfasilitasi retensi bahan aktif dalam lapisan epidermis yang terhidrasi yang dipengaruhi oleh potensi pengikatan bahan aktif sehingga mengurangi difusi ke lapisan kulit bawah.

Asam hialuronat menurut *European pharmacopeia* bersifat sedikit larut hingga larut dalam air. Kecepatan kelarutannya bergantung pada bobot molekul (MW), semakin rendah MW semakin cepat larut. Perubahan pada bobot molekul dapat terjadi karena pemanasan atau pH ekstrim. Ketika dilarutkan dalam air, asam hialuronat memiliki biokompatibilitas yang baik (*European pharmacopeia*, 2017).

2.6 Sistem Penghantaran Obat secara Topikal

2.6.1 Definisi penghantaran obat secara topikal

Penghantaran obat secara topikal adalah pemberian obat melalui kulit. Bahan aktif yang dapat diberikan melalui kulit dapat berbentuk cair atau semipadat seperti emulsi, larutan, lotion, krim, gel, salep maupun patch. Administrasi obat melalui kulit menjadi salah satu sistem penghantaran obat potensial yang saat ini banyak dikembangkan. Terdapat beberapa keuntungan apabila bahan aktif diberikan secara topikal yaitu mencegah pengaruh obat karena proses pengosongan lambung, pH, dan enzim pada saluran pencernaan, mencegah bahan aktif mengalami *first hepatic metabolism*, dapat memberikan efek lokal maupun sistemik, serta bahan aktif lebih mudah digunakan oleh pasien. Penghantaran bahan aktif secara topikal juga memiliki beberapa keterbatasan, diantaranya adalah jumlah bahan aktif yang dapat diabsorpsi melalui kulit dipengaruhi oleh keadaan pasien meliputi umur, penyakit, luas permukaan tempat absorpsi, beberapa bahan aktif mengalami *first skin metabolism*, terjadi iritasi dan toksisitas pada kulit, dosis obat yang dapat masuk kecil bergantung pada sifat fisika kimia bahan aktif (Muzaffar, 2013)

Bahan aktif yang dapat diformulasikan menjadi obat topikal atau transdermal harus memenuhi syarat *Lipinski's Rule of Five* agar dapat mengabsorpsi melalui kulit, yakni bahan aktif harus memiliki ukuran molekul yang kecil dengan berat molekul kurang dari 500 dalton, memiliki titik leleh rendah, memiliki jumlah ikatan hidrogen donor < 5 (Van *et al.*, 2011). Nilai koefisien partisi (Log P) 2-3 merupakan keadaan yang optimal untuk penetrasi obat pada kulit (Benson *et al.*, 2012). Bahan aktif diaplikasikan pada kulit harus dapat menembus *barrier* kulit agar dapat memberikan efek terapi secara lokal maupun sistemik.

2.6.2 Jalur Penetrasi pada kulit (Absorpsi Perkutan)

Absorpsi bahan dari luar kulit ke posisi di bawah kulit tercakup masuk ke dalam aliran darah, disebut sebagai absorpsi perkutan. Absorpsi perkutan suatu zat aktif pada umumnya disebabkan oleh penetrasi langsung obat melalui stratum korneum 10-15 μm , tebal lapisan datar mengeringkan sebagian demi sebagian jaringan mati yang membentuk permukaan kulit paling luar. Komponen lemak dipandang sebagai faktor utama yang secara langsung bertanggung jawab terhadap rendahnya penetrasi obat melalui stratum korneum. Sekali molekul zat aktif melalui stratum korneum kemudian dapat terus melalui jaringan epidermis yang lebih dalam dan masuk ke dermis apabila zat aktif mencapai lapisan kulit maka zat aktif tersebut siap untuk diabsorpsi ke dalam sirkulasi umum.

Stratum korneum sebagai jaringan keratin akan berlaku sebagai membran buatan yang semi permeabel dan molekul obat berpenetrasi dengan cara difusi pasif. Jadi, jumlah obat yang pindah menyeberangi lapisan kulit tergantung pada konsentrasi obat, kelarutannya dalam air dan koefisien partisi minyak atau

airnya. Bahan-bahan yang mempunyai sifat larut dalam keduanya, minyak dan air, merupakan bahan yang baik untuk difusi melalui stratum korneum seperti juga melalui epidermis dan lapisan-lapisan kulit. (Ansel, 1989).

Penetrasi pada kulit dapat terjadi dengan cara difusi melalui tiga jalur yaitu :

a. Penetrasi Transeluler (menyebrangi sel)

Pada jalur ini bahan aktif dapat berdifusi menembus dinding sel korneosit yang telah mati dan melewati matriks lipid protein pada stratum korneum. Kemudian bahan aktif yang telah melewati stratum korneum akan menuju lapisan epidermis. Molekul hidrofil lebih cenderung berpenetrasi ke kulit melalui jalur ini (Bolzinger *et al.*, 2012).

b. Penetrasi interseluler (antar sel)

Jalur interseluler termasuk salah satu jalur transepidermal. Pada jalur ini, bahan aktif menembus stratum korneum melalui ruang antar sel dan terjadi difusi pada matriks lipid protein yang mengelilingi sel korneosit. Setelah berhasil menembus stratum korneum, bahan aktif akan menembus lapisan epidermis yang ada dibawahnya (Sharma *et al.*, 2008). Sebagian besar bahan aktif sediaan topikal berpenetrasi masuk ke kulit melalui jalur ini. Bahan-bahan yang bersifat hidrofob cenderung berpenetrasi ke kulit melalui jalur interseluler (Bolzinger *et al.*, 2012).

c. Penetrasi transappendageal (melalui folikel rambut, keringat, kelenjar lemak, dan perlengkapan pilo sebaceous)

Sediaan topikal dengan molekul bahan aktif yang kecil dapat berpetrasi secara transepidermis menembus stratum korneum dan juga melalui jalur transappendageal. Bahan aktif dapat menembus celah folikel rambut dan kelenjar keringat (transglandular) (Otberg *et al.*,2007). Jalur ini juga turut berkontribusi dalam penetrasi bahan aktif karena folikel dan kelenjar keringat memenuhi kulit sebanyak 0,1 % dari total permukaan kulit (Bolzinger *et al.*,2012).

Beberapa faktor yang mempengaruhi absorpsi perkutan, antara lain :

a. Perbedaan spesies

Perbedaan spesies juga akan memperlihatkan perbedaan anatomi kulit seperti perbedaan stratum korneum, jumlah kelenjar keringat dan folikel per unit permukaan kulit, dimana hal ini akan menyebabkan perbedaan profil penetrasi obat (Brounough *et al.*,2001).

b. Umur kulit

Umur yang semakin bertambah menyebabkan permeabilitas kulit menurun. Hal ini dikarenakan terjadi perubahan elastisitas, struktur, komposisi kimia, dan lapisan pelindung (Brounough *et al.*,2001).

c. 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 dan radang dapat menyebabkan penetrasi di kulit meningkat (Brounough *et al.*,2001).

d. Lokasi dan ketebalan kulit

Permeabilitas kulit tergantung dari ketebalan dan sifat alamiah stratum korneum dan densitas kelenjar di kulit. Permeabilitas kulit berbanding terbalik dengan ketebalan stratum korneum. Laju penetrasi akan meningkat apabila stratum korneum tipis (Brounough *et al.*,2001).

e. Hidrasi kulit

Hidrasi stratum korneum dapat mempengaruhi laju bahan yang berpenetrasi ke dalam kulit. Hidrasi yang disebabkan oleh difusi air dari bawah lapisan epidermis akan menyebabkan jaringan melunak dan membentuk *sponge effect* sehingga akan meningkatkan ukuran pori kulit (Ansel, 1989).

f. Suhu

Suhu kulit dapat mempengaruhi penetrasi obat karena adanya sifat oklusifitas. Dalam keadaan oklusif, air pada kulit tidak dapat menguap sehingga suhu permukaan kulit meningkat (Brounough *et al.*,2001).

g. Sirkulasi darah

Perbedaan sirkulasi perifer dapat menyebabkan perubahan absorpsi percutan. Peningkatan aliran darah dapat menyebabkan waktu penetrasi menjadi lebih singkat dan meningkatkan penetrasi yang melewati kulit (Brounough *et al.*,2001).

Selain faktor internal yang mempengaruhi absorpsi percutan, absorpsi percutan juga dipengaruhi oleh sifat fisikokimia bahan obat, antara lain :

a. Kelarutan bahan obat

Kelarutan bahan obat dalam air akan menentukan konsentrasi bahan aktif yang terabsorpsi. Semakin banyak obat dalam keadaan terlarut akan semakin besar pula kemampuan obat menembus membran. (Lachman, 1994).

b. Koefisien Partisi

Penetrasi langsung melalui epidermis dipengaruhi oleh koefisien partisi lemak dalam air (Brounough *et al.*, 2001). Koefisien partisi merupakan ukuran affinitas relatif dari obat untuk kulit dan pembawa. Nilai koefisien partisi yang rendah menunjukkan affinitas yang tinggi antara bahan obat (Martin, 1993).

c. Koefisien difusi

Koefisien difusi menggambarkan tahanan pergerakan molekul pembawa obat dan pembatas kulit yaitu stratum korneum. Makin besar koefisien difusi suatu zat maka semakin besar jumlah zat aktif yang berpenetrasi di kulit (Martin, 2008).

d. Konsentrasi bahan obat

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

e. Ukuran dan bentuk partikel

Ukuran partikel yang kecil dan bentuk partikel yang sferis menyebabkan struktur antar partikel rapat sehingga menyebabkan terjadinya hidrasi dan *swelling* sehingga bahan obat mudah untuk terpenetrasi (Ansel, 1989).

f. Bahan-bahan peningkat penetrasi (*enhancer*)

Enhancer dapat meningkatkan permeabilitas kulit dengan cara mengubah sifat fisika kimia stratum korneum sehingga mengurangi daya tahan difusi . contohnya DMSO, urea, dan lain-lain (Ansel,1989).

2.7 Gel

2.7.1 Definisi Gel

Gel didefinisikan sebagai suatu sistem setengah padat yang terdiri dari suatu dispersi yang tersusun baik dalam partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar dan saling diresapi cairan, Makro molekul pada sediaan gel disebarkan keseluruh cairan sampai tidak terlihat ada batas diantaranya. Cairan ini disebut dengan gel satu fase. Jika masa gel terdiri dari kelompok-kelompok partikel kecil berbeda. maka gel ini dikelompokkan dalam sistem dua fase (Ansel, 1989). Gel kadang disebut Jeli, merupakan sistem semipadat terdiri dari suspensi yang dibuat dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar, terpenetrasi oleh suatu cairan (Depkes RI, 2014).

2.7.2 Tipe sediaan gel

Menurut FI IV penggolongan sediaan gel dibagi menjadi dua yaitu :

1. Gel sistem fase tunggal

Gel fase tunggal terdiri dari makromolekul organik yang tersebar serba sama dalam suatu cairan sedemikian hingga tidak terlihat adanya ikatan antara molekul makro yang terdispersi dan cairan. Gel fase tunggal dapat dibuat dari

makromolekul sintetik misalnya karbomer atau dari gom alam misalnya Tragakan.

2. Gel dua fase, jika ukuran partikel dari fase terdispersi relatif besar massa gel kadang-kadang dinyatakan sebagai magma (misalnya *magma bentonit*). Baik gel maupun magma dapat berupa tiksotropik membentuk semipadat jika dibiarkan dan menjadi cair pada pengocokan. Sediaan harus dikocok dahulu sebelum digunakan untuk menjamin homogenitas dan hal in tertera pada etiket.

2.7.3 Keuntungan gel

Kelebihan sediaan gel adalah dapat memberikan sensasi dingin pada kulit saat digunakan, penampilan sediaan yang jernih dan elegan pada pemakaian di kulit setelah kering meninggalkan film tembus pandang, elastis, daya lekat tinggi yang tidak menyumbat pori sehingga pori tidak terganggu; mudah dicuci dengan air, pelepasan obatnya baik, kemampuan penyebarannya pada kulit baik (Lachman, *et al.*, 1989)

2.7.4 Karakteristik gel

1. Pemeriksaan Organoleptis

Pengujian organoleptis gel AMSC-MP secara visual meliputi warna, bau, dan bentuk sediaan. Spesifikasi gel yang diinginkan yaitu :

Warna : Bening/ tidak berwarna

Bau : Tidak berbau

Bentuk sediaan : Gel homogen yang tidak terlalu kental atau terlalu encer serta mudah diaplikasikan pada kulit

2. Pengukuran pH sediaan dilakukan untuk mengetahui pH sediaan yang dihasilkan dan untuk menghindari reaksi-reaksi yang merugikan kulit seperti iritasi kulit karena pH sediaan tidak sesuai dengan pH fisiologis kulit. Persyaratan pH sediaan adalah 4,5-6,5 dimana masuk dalam rentang pH fisiologis kulit (Tranggono *et al*, 2007).
3. Pengujian viskositas dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui tingkat kekentalan dari sediaan yang dihasilkan. Satuan pengukuran viskositas sediaan dinyatakan dalam *centipoise* (cPs). Pengukuran viskositas sediaan dengan menggunakan viscometer Brookfield (Karla *et al*, 2013). Nilai viskositas sediaan gel pada umumnya adalah berkisar 12.000-20.000 cPs (Pena, 2012).
4. Pemeriksaan daya sebar dilakukan untuk mengetahui kemampuan sediaan tersebar pada permukaan kulit. Persyaratan daya sebar yang baik adalah dengan penambahan luas 4,0-5,6 cm (Grag *et al.*,2002).
5. Pemeriksaan homogenitas dilakukan untuk mengetahui homogenitas dari sediaan yang ditunjukkan dengan tidak terdapat butiran-butiran kasar atau pembentukan agregat dalam sediaan. Metode pemeriksaan homogenitas yang diamati adalah keseragaman warna dan adanya partikel kasar atau agregat yang terbentuk (Karla *et al.*,2013).

2.8 Penetration Enhancer

2.8.1 Definisi enhancer

Peningkat penetrasi didefinisikan sebagai zat yang mampu meningkatkan penetrasi bahan aktif ke dalam kulit. Bahan aktif dengan karakteristik seperti bersifat hidrofilik dengan berat molekul kurang dari 500 Da dan log P 1-4

memerlukan enhancer yang bersifat fisik maupun kimia untuk dapat menembus lapisan kulit (Patil *et al.*,2014).

2.8.2 Tipe dan Fungsi Enhancer

Teknik peningkatan penetrasi percutan dibagi menjadi dua kategori yaitu secara fisika dan secara kimia. Secara kimia, digunakan senyawa *enhancer* yakni senyawa yang dapat menembus stratum korneum dengan menyerupai sifat membran *lipid bilayer* pada struktur protein di korneosit. Bahan-bahan yang dapat digunakan sebagai peningkat penetrasi antara lain, sulfoksida dan senyawa sejenis ozone, pyrrolidones, asam-asam lemak, alkohol dan glikol. Surfaktan, urea, minyak atsiri, tepen dan fosfolipid(Swarbick,*et al.*,1995).

Berdasarkan konsep *lipid-protein*,terdapat tiga fungsi utama dari *enhancer* yaitu :

1. *Enhancer* mengubah struktur lipid stratum korneum dan menjadikannya permeabel terhadap bahan aktif.
2. *Enhancer* berinteraksi dengan keratin pada korneosit dan menurunkan densitas struktur protein sehingga menjadi permeabel
3. Beberapa *solvent* mengubah sifat kelarutan dan meningkatkan keterpisahan bahan aktif, coenhancer dan kosolven (Barry, 2011)

2.8.3 Peptide sebagai enhancer

Selama beberapa dekade terakhir, beberapa jenis peptide telah diidentifikasi dan di uji kemampuannya untuk meningkatkan penetrasi molekul kecil maupun besar ke dalam kulit (Rothbard *et al.*,2000; Chen *et al.*,2006). Peptide

ini disebut peptida peningkat penetrasi kulit (SPEPs). SPEPs menawarkan sejumlah keuntungan untuk trans delivery dermal, SPEPs aman, hemat biaya, non-invasif dalam aplikasi dan dengan demikian meningkatkan kepatuhan pasien dalam penggunaan.

Secara garis besar SPEPs dapat diklasifikasikan ke dalam tiga kategori utama berdasarkan penemuannya, yaitu :

1. Peptide penembus sel (CPPs)
2. Peptide Antimikroba (AMPs)
3. Phage peptide (peptide yang teridentifikasi dari phage display laboratorium teknologi)

Cell-Penetrating Peptides (CPPs) merupakan peptide pendek yang memiliki hingga 30 asam amin, dengan kemampuan untuk mentranslokasi melalui membran plasma sel dan memasuki sitoplasma (Patel *et la*, 2007). Biasanya CPPs adalah kationik atau amphipathic pada pH fisiologis kulit (Lindberg *et al.*,2011). Keuntungan utama CPP adalah mereka dapat menembus membran sel pada konsentrasi mikromolar rendah *in vivo* dan *in vitro* tanpa menyebabkan kerusakan atau keracunan membran yang signifikan (Chauhan *et al.*,2007). CPPs telah digunakan untuk mengirimkan beberapa makromolekul seperti protein, oligonukleotida, nanopartikel lipid padat dan liposom ke dalam sel (Chauhan *et al.*,2007).

Ada beberapa jenis CPPs yang dapat digunakan sebagai enhancer yaitu *SPACE* peptide , TD-1, Polyarginine (poly-R), TD-1, Demis Localizing peptide (DLP) and Linear Peptide 12 (Lp-12). Beberapa CPPs terbukti meningkatkan

penetrasi CsA ke dalam kulit. Banyak SPPs yang terbukti aman karena ditunjukkan oleh efek yang dapat diabaikan pada integritas kulit, potensi iritasi kulit minimal dan sitotoksitas. Diantara peptide yang diuji, *SPACE Peptide* ditemukan paling tidak toksik untuk keratinosit dan paling efektif dalam pengiriman (Kumar *et al.*, 2014).

2.9 Tinjauan SPACE Peptide



Gambar 2. 10 Struktur kimia SPACE Peptide (Kumar, *et al.*, 2014)

2.9.1 Sifat Fisika Kimia

SPACE Peptide adalah serbuk putih dengan rumus struktur $C_{40}H_{63}N_{15}O_{17}S_2$ dengan BM 1090.17. Stabil dalam penyimpanan dalam bentuk powder pada suhu $-80^{\circ}C$ maksimal selama 2 tahun dan pada suhu $-20^{\circ}C$ maksimal selama 1 tahun. Sedangkan dalam bentuk larutan pada suhu $-80^{\circ}C$ maksimal selama 6 bulan dan pada suhu $-20^{\circ}C$ maksimal selama 1 bulan.

2.9.2 Mekanisme *SPACE Peptide* sebagai enhancer

Secara *in vitro*, *SPACE Peptide* mampu memfasilitasi penetrasi melintasi stratum korneum ke epidermis dan dermis. *SPACE Peptide* meningkatkan penetrasi CsA kedalam kulit secara signifikan tanpa mengubah penghalang lipid kulit dengan cara berinteraksi dengan protein kulit dan menginduksi perubahan struktur sekunder protein kulit (heliks α , β -sheet, gulungan acak dan belokan). *SPACE Peptide*

meningkatkan penetrasi kulit pada Cyclosporine A (CsA) BM=1202 Da melalui jalur transeluler, meningkatkan partisi menjadi korneosit yang kaya keratin melalui pengikatan bersama *SPACE* dengan keratin dan CsA (Kumar *et al.*,2014). Peptide juga menunjukkan penetrasi ke berbagai sel termasuk keratinosit, fibroblast, dan sel endotel kemungkinan melalui jalur makropinositosis. *SPACE peptide* kombinasi dengan sistem pembawa etosom dapat meningkatkan penetrasi kulit pada siRNA BM 13 kDa (Chen *et al.*,2014). Sistem *SPACE* juga terbukti meningkatkan penetrasi makromolekul asam hialuronat (HA, MW : 200-325 kDa) ke dalam kulit babi secara *in vitro* sebesar $7,8 \pm 1,1$ kali lipat dibandingkan dengan PBS (Chen *et al.*,2013). Secara *n vivo* kemanjuran *SPACE Peptide* dalam DOTAP-SES dalam memberrikan GAPDH-siRNA ke dalam kulit pada tikus BALB/C. Aplikasi topikal DOTAP-SES pada kulit tikus menghasilkan $63,2 \% \pm 7,7 \%$ lebih tinggi dari siRNA PBS (Chen *et al.*, 2014). Sintesis dari UFH-konjugasi peptide dengan rasio (UFH:peptide 1:1 rasio molar) UFH : 15.000 Da, memberikan efek penetrasi yang baik (ACS Paragon, 2016).

2.10 Tinjauan Alat dan Metode

2.10.1 Spektrofotometer FTIR

Spektroskopi inframerah transformasi *fourier* (*Fourier Transformed Infrared* – FTIR) memiliki banyak keunggulan dibanding spektroskopi inframerah diantaranya lebih cepat karena pengukuran dilakukan secara simultan serta mekanik optic lebih sederhana dengan sedikit komponen yang bergerak.

Apabila sinar inframerah dilewatkan melalui sampel senyawa organik, maka terdapat sejumlah frekuensi yang diserap dan diteruskan atau ditransmisikan

tanpa diserap. Serapan cahaya oleh molekul tergantung pada struktur dari molekul tersebut. Molekul yang menyerap energi tersebut akan mengalami perubahan energi vibrasi dan perubahan tingkat energi rotasi. Pada suhu kamar, molekul senyawa organik dalam keadaan diam, setiap ikatan mempunyai frekuensi tertentu untuk memungkinkan terjadinya vibrasi ulur (*stretching vibration*) dan vibrasi tekuk (*bending vibration*) yang memungkinkan sinar inframerah dapat diserap pada frekuensi tersebut. Energi ulur (stretch), salah satu ikatan lebih besar daripada energi tekuk (bend) sehingga serapan ulur suatu ikatan muncul pada frekuensi lebih tinggi dalam spektrum inframerah daripada serapan tekuk dari ikatan yang sama.

Ikatan-ikatan yang berbeda seperti C-C, C=C, C-O, O-H serta N-H memiliki frekuensi karakteristik sebagai pita serapan dalam spektrum inframerah. Grafik spektrum inframerah terbentuk antara prosentase absorpsi terhadap karakteristik frekuensinya. Bentuk spektrum cahaya dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat dengan transmisi diantara tingkatan-tingkatan energi elektronik.

2.11 Evaluasi Mutu Sediaan Kosmetik

Sediaan kosmetik pada dasarnya sama seperti sediaan farmasi pada umumnya, mulai dari formulasi, pembuatan hingga penjaminan mutu sediaan. Sebelum sediaan kosmetik dibuat, perlu dilakukan perencanaan dan pengujian terlebih dahulu dengan memperhatikan aspek farmasetik yang meliputi efektivitas, stabilitas, keamanan dan aseptabilitas. Bentuk sediaan dan sistem penghantaran juga perlu diperhatikan saat proses perencanaan (Soeratri, 2007).

Sediaan kosmetik yang baik mengikuti kaidah efektif, stabil, aman dan aseptabel. Sediaan kosmetik dikatakan efektif apabila sediaan tersebut

menimbulkan efek sesuai dengan klaim yang dicantumkan; stabil secara fisik, kimia dan mikrobiologis; aman apabila tidak mengganggu atau membahayakan kesehatan seperti menimbulkan iritasi dan sensitisasi; serta aseptabel bila sediaan tersebut dapat diterima konsumen karena kenyamanannya saat pengaplikasian, Selain itu, hal lain yang perlu diperhatikan adalah bahan aktif sediaan kosmetik sebaiknya tetap berada dalam kulit, berpenetrasi cukup dalam namun tidak terlalu dalam sampai ke sistemik. Penetrasi hendaknya menimbulkan efek kosmetik bukan efek farmasetik (Muller *et al.*,2002).

2.11.1 Uji stabilitas

Stabilitas merupakan suatu kemampuan produk obat atau kosmetik agar dapat mempertahankan spesifikasi yang diterapkan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan untuk menjamin identitas, kekuatan, kualitas dan kemurnian produk (Djajadisastra, 2004). Ketidakstabilan sediaan dibagi menjadi tiga antara lain : ketidakstabilan fisika, ketidakstabilan kimia dan ketidakstabilan mikrobiologi.

2.11.1.1 Stabilitas fisika

Ketidakstabilan fisika dari suatu sediaan ditandai dengan adanya pemucatan warna, timbul bau, perubahan atau pemisahan fase, pecahnya emulsi, pengendapan suspensi atau *caking*, perubahan konsistensi, pertumbuhan kristal atau perubahan bentuk kristal, terbentuknya gas dan perubahan fisik lainnya. Tiap zat aktif mempertahankan sifat fisik awal, termasuk penampilan, ukuran partikel dan morfologi partikel (Djajadisastra, 2004).

2.11.1.2 Stabilitas kimia

Ketidakstabilan kimia sediaan ditandai dengan berkurangnya konsentrasi zat aktif karena terjadi reaksi atau interaksi kimia, rusaknya eksipien karena hidrolisis dan reaksi sejenis serta pembentukan senyawa lain. Tiap zat aktif mempertahankan keutuhan kimiawi sesuai dengan yang tertera pada etiker dalam batasan yang dinyatakan spesifikasi.

2.11.1.3 Stabilitas mikrobiologi

Ketidakstabilan mikrobiologi sediaan ditandai dengan pertumbuhan mikroorganisme yang tampak maupun tidak tampak seperti *Aspergillus niger*, *Eschericia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginos*, *Staphylococcus aureus* yang mencemari produk pada waktu pembuatan (Djajadisastra, 2004)

1. Uji Stabilitas dipercepat

Uji stabilitas dipercepat adalah studi yang dirancang untuk meningkatkan tingkat degradasi kimia atau perubahan fisik zat obat atau produk obat dengan menggunakan kondisi penyimpanan berlebihan pada studi stabilitas. Data dari studi ini, selain studi stabilitas jangka panjang pada kondisi normal dan untuk mengevaluasi efek jangka pendek di luar kondisi penyimpana sesuai label, seperti kondisi yang mungkin terjadi selama pengiriman (ICH, 2003).

Pengujian yang dilakukan pada uji dipercepat antara lain :

a) *Elevated temperature*

Uji ini digunakan sebagai indikator kestabilan. Setiap kenaikan suhu 10°C akan mempercepat reaksi 2 sampai 3 kalinya, namun secara praktis cara ini

agak terbatas karena kenyataannya suhu yang jauh di atas normal akan menyebabkan perubahan yang tidak pernah terjadi pada suhu normal.

b) *Elevated humidities*

Umumnya uji ini dilakukan untuk menguji kemasan produk. Jika terjadi perubahan pada produk dalam kemasan karena pengaruh kelembaban, maka hal ini menandakan bahwa kemasannya tidak memberikan perlindungan yang cukup terhadap atmosfer.

c) *Cycling test*

Pengujian dilakukan menggunakan perubahan suhu dan atau kelembaban pada interval tertentu sehingga produk dan kemasannya mengalami tekanan yang bervariasi daripada tekanan konstan yang kadangkala lebih parah daripada penyimpanan pada satu kondisi saja (Ken, 2000).

d) *Siklus Freeze-Thaw*

Tiga siklus *Freeze-Thaw* dilakukan pada suhu antara -21°C dan $\pm 25^{\circ}\text{C}$ pada sediaan. Sediaan diletakkan pada setiap suhu dan disimpan selama tidak kurang dari 48 jam (Talengonkar *et al.*, 2010)

2. Uji stabilitas *Realtime*

Uji stabilitas jangka panjang dilakukan pada durasi yang lebih panjang untuk mengetahui degradasi sebuah produk atau sediaan yang lebih signifikan daripada uji stabilitas dipercepat (Anderson *et al.*, 1991).

2.12 Uji Efektivitas

2.12.1 Uji kedalaman penembusan kulit (penetrasi kulit)

Efektivitas sediaan kosmetik secara topikal diawali dengan proses pelepasan bahan aktif dari basisnya setelah sediaan diaplikasikan pada permukaan kulit (Sharma *et al.*,2008). Bahan aktif yang telah lepas dari basisnya akan berinteraksi dengan permukaan kulit dan segera berpenetrasi ke dalam stratum korneum. Proses penetrasi terjadi apabila sediaan tersebut diinginkan memberikan efek di dalam lapisan kulit.

Sediaan topikal yang diaplikasikan di atas permukaan kulit kemudian mengalami difusi. Difusi pasif merupakan proses suatu substansi bergerak mengikuti gradien konsentrasi. Gradien konsentrasi timbul akibat adanya perbedaan konsentrasi bahan aktif dalam sediaan yang diaplikasikan pada kulit dengan konsentrasi bahan aktif yang ada dibawahnya (Sharma *et al.*,2008).

Pengujian effektivitas sediaan kosmetik dapat dilakukan secara *in vivo* dan *in vitro*. Pengujian *in vitro* adalah pengujian yang dilakukan pada lingkungan yang terkendali di luar organisme hidup. Sedangkan pengujian *in vivo* adalah pengujian yang menggunakan keseluruhan organisme hidup.

a. Uji Penetrasi In Vitro

Uji Penetrasi secara *in vitro* biasa digunakan sebagai prosedur skrinning untuk mengetahui parameter fisikokimia seperti koefisien partisi, koefisien difusi dan fluks. Keuntungan dari metode ini adalah kondisi dari eksperimen dapat dikontrol seperti kulit dan alat uji, namun metode ini hanya mampu

memberikan sedikit informasi mengenai metabolisme, distribusi dan aliran darah terhadap permeasi (Brain, *et.al.*, 2002).

b. Uji penetrasi In Vivo

Metode ini dapat memberikan informasi yang baik dalam hal absorbsi kulit dan juga memungkinkan dilakukannya penentuan penetrasi bahan uji melalui kulit ke dalam kompartemen sistemik. Keuntungan dari metode ini adalah menggunakan sistem fisiologis dan metabolik 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).

2.13 Uji Iritasi

Iritasi kulit merupakan suatu keadaan tak berkepanjangan dimana kulit terasa nyeri, mengering, mengalami pendarahan, timbul ruam merah dan pecah-pecah akibat kontak dengan zat kimia tertentu antara lain solven, asam, alkali (basa), deterjen dan *coolant* (WHO, 2000). Timbulnya rasa panas merupakan gejala umum yang dapat timbul akibat iritasi, hal ini disebabkan karena dilatasi pembuluh darah pada daerah yang terkena iritasi, yang biasanya ditandai dengan timbulnya kemerahan pada kulit tersebut (erythema). Selain itu, iritasi dapat pula menimbulkan edema yaitu terjadinya pembesaran plasma yang membeku pada daerah yang terluka dan dipercepat dengan adanya jaringan fibrosa yang menutupi daerah tersebut (Irsan *et al.*, 2011).

Secara garis besar, uji iritasi dibagi menjadi dua yaitu : uji iritasi kulit adalah produksi kerusakan kulit yang dapat terjadi setelah aplikasi bahan uji kimia hingga 4 jam dan uji Iritasi akut dermal adalah uji pada hewan uji untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemaparan sediaan uji pada dermal selama 3 sampai 4 jam. Prinsip uji iritasi akut dermal adalah sediaan uji dalam dosis tunggal pada hewan uji dengan area kulit yang tidak diberi perlakuan berfungsi sebagai kontrol. Derajat iritasi dinilai pada interval waktu tertentu yaitu pada jam ke 1, 24, 48 dan 72 setelah pemaparan sediaan uji dan untuk melihat reversibilitas, pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari. Tujuan uji iritasi akut dermal adalah untuk menentukan adanya efek iritasi pada kulit serta untuk menilai dan mengevaluasi karakteristik suatu zat apabila terpapar pada kulit (OECD 404 , 2002).