

**PENGEMBANGAN SISTEM PENGHANTARAN
TRANSKUTAN NANOEMULSI NATRIUM ASKORBIL
FOSFAT DENGAN PEMBENTUKAN
*SOLID-IN-OIL DISPERSION***

DISERTASI

**Karya tulis sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Doktor dari
Institut Teknologi Bandung**

**Oleh
FITH KHAIRA NURSAL
NIM : 30713010
(Program Studi Doktor Farmasi)**



**INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
Maret 2019**

**PENGEMBANGAN SISTEM PENGHANTARAN
TRANSKUTAN NANOEMULSI NATRIUM ASKORBIL
FOSFAT DENGAN PEMBENTUKAN *SOLID-IN-OIL*
DISPERSION**

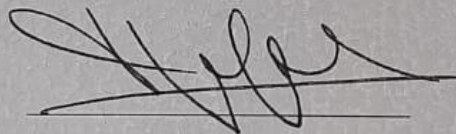
Oleh
Fith Khaira Nursal
NIM: 30713010
(Program Studi Doktor Farmasi)

Institut Teknologi Bandung

Menyetujui
Tim Pembimbing

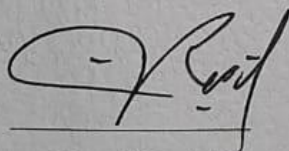
Tanggal 8 Maret 2019

Ketua



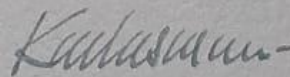
(Prof. Dr. Yeyet Cahyati Sumirtapura)

Anggota



(Dr. Tri Suciati)

Anggota



(Dr. rer. nat. Rahmana Emran Kartasasmita)

**PENGEMBANGAN SISTEM PENGHANTARAN TRANSKUTAN
NANOEMULSI NATRIUM ASKORBIL FOSFAT DENGAN
PEMBENTUKAN
*SOLID-IN-OIL DISPERSION***

DISERTASI

**Karya tulis sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Doktor dari
Institut Teknologi Bandung**

Oleh
FITH KHAIRA NURSAL
NIM : 30713010
(Program Studi Doktor Farmasi)



INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
Maret 2019

ABSTRAK

PENGEMBANGAN SISTEM PENGHANTARAN TRANSKUTAN NANOEMULSI NATRIUM ASKORBIL FOSFAT DENGAN PEMBENTUKAN *SOLID-IN-OIL DISPERSION*

Oleh

Fith Khaira Nursal

NIM : 30713010

(Program Studi Doktor Farmasi)

Sistem penghantaran bahan aktif melalui kulit saat ini mengalami kemajuan yang cukup pesat baik dibidang kosmetika maupun pengobatan. Penghantaran molekul aktif melalui kulit secara topikal, transkutan ataupun transdermal dibatasi oleh ukuran dan berat molekul serta afinitas molekul terhadap lapisan kulit yang tersusun atas komponen lipid. Secara teoritis, molekul hidrofilik akan mengalami hambatan permeasi kedalam lapisan kulit dan diperlukan satu teknik dalam penghantarannya. Melalui sistem *solid-in-oil dispersion* (SOD) hambatan tersebut berhasil diatasi dan telah banyak penelitian yang membuktikan bahwa makromolekul hidrofilik protein, dapat dihantarkan melalui kulit dengan teknik SOD tersebut dalam sediaan nanoformulasi.

Natrium askorbil fosfat (NAF) merupakan senyawa turunan vitamin C yang hidrofilik dengan nilai log P sangat rendah (10^{-4}) yang menyebabkan batasan permeasi melalui lapisan *stratum corneum* (SC). Diperlukan suatu teknik khusus untuk meningkatkan dispersibilitas NAF dalam minyak sebagai fasilitasi permeasi melewati lapisan SC. Tujuan penelitian ini adalah untuk meningkatkan permeasi NAF melalui tahapan perbaikan dispersibilitas dalam minyak dengan teknik SOD dan selanjutnya dibuat nanoemulsi minyak dalam air (M/A).

Peningkatan dispersibilitas NAF dalam minyak dapat dicapai melalui penggunaan senyawa ampifilik, dalam penelitian ini digunakan lesitin (*soy lecithin*) dan polietilenglikol (PEG) 20000. Senyawa ampifilik dapat membentuk lapisan disekitar zat aktif yang hidrofilik sehingga terpartisi lebih kuat dalam fase minyak. Partisi yang tinggi dalam fase minyak akan memudahkan zat aktif untuk melintasi lapisan SC yang cenderung lipofil. Pembentukan SOD diawali tahapan pencampuran zat aktif dengan senyawa ampifilik, dan koliofilisasi.

Telah dilakukan dua teknik yang berbeda dalam pembentukan SOD, yaitu kelompok I dibentuk melalui sistem larutan/dispersi NAF-lesitin dan NAF-PEG 20000 dalam air. Kelompok II dibentuk dengan diawali pembentukan emulsi A/M antaran NAF-VCO dan lesitin, dan divariasikan dengan penambahan Tween 80. Tahap selanjutnya masing-masing kelompok tersebut dikeringkan dengan metode *freeze drying* untuk menghilangkan air dari campuran. Hasil liofilisat I berupa serbuk putih (NAF-PEG 20000) dan karamel (NAF-lesitin), sementara liofilisat II berupa cairan berminyak.

Karakterisasi kedua kelompok liofilisat kemudian ditentukan meliputi jumlah NAF yang terpartisi dalam fase minyak dari kedua sistem SOD yang terbentuk. Hasil liofilisat I diperoleh

jumlah NAF dengan lesitin terpartisi dalam fase minyak sebesar 56,21%, lebih tinggi dibanding partisi NAF yang dicampurkan PEG 20000 yaitu sebesar 15,11%. Hasil partisi NAF dalam liofilisat II dari empat formula yang dibentuk, partisi dipengaruhi penambahan Tween 80 dan rasio lesitin-NAF dalam emulsi. Liofilisat dengan penambahan Tween 80 terpartisi dalam minyak adalah 37,22% dan 29,04%, lebih rendah dibanding liofilisat tanpa penambahan Tween 80 yaitu 66,85% dan 47,51%. Sebagai pembanding juga ditentukan partisi NAF yang dibuat larutan tanpa sistem SOD dengan senyawa amfifilik, dan hasilnya kurang dari 1% NAF yang terpartisi dalam minyak dan hampir 99% berada dalam fase air. Hal ini mengindikasikan bahwa lesitin dan PEG 20000 dapat berkontribusi dalam meningkatkan partisi NAF dalam fase minyak.

Analisa liofilisat dengan *Fourier Transmission Infra Red* (FTIR) dilakukan untuk melihat interaksi NAF dengan senyawa amfifilik. Hasil spektrum menunjukkan interaksi antara NAF dengan lesitin dan PEG 20000 tidak membentuk senyawa baru, namun diduga terbentuk pasangan ion antara gugus fosfat NAF yang bermuatan negatif dengan muatan positif gugus kolin dari lesitin. Interaksi ini membuat muatan elektrostatis pada permukaan NAF-lesitin. Morfologi liofilisat juga diamati dengan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) dan secara keseluruhan dalam liofilisat terlihat adanya lapisan lesitin pada permukaan NAF.

Tahapan selanjutnya adalah menginkorporasikan liofilisat dalam sediaan nanoemulsi (NE) tipe minyak dalam air (M/A). Dibuat dua NE berdasarkan kelompok liofilisat. Terhadap NE I ditambahkan gliserin yang ditujukan untuk meningkatkan dispersibilitas liofilisat dalam fase minyak, karena liofilisat berupa padatan sehingga tidak mudah terdispersi dalam fase minyak. Liofilisat II diinkorporasikan tanpa penambahan gliserin dalam NE II. Penambahan gliserin dalam NE I berpengaruh signifikan terhadap kemampuan difusi NAF karena terjadi peningkatan kelarutan NAF dalam minyak. Secara fisik, NE I lebih jernih dibandingkan NE II yang diduga juga karena pengaruh gliserin tersebut.

Pengamatan morfologi NE melalui TEM menunjukkan bahwa lesitin dalam sistem NE berada pada permukaan zat aktif NAF antara minyak-air. Uji stabilitas secara fisik dengan mengukur diameter globul, indeks polidispersitas (IP) dan muatan potensial pada suhu kamar (± 25 °C) dan penyimpanan dalam *climatic chamber* (± 40 °C/RH 75%). Ukuran diameter globul NE I pada suhu kamar ± 100 -200 nm dengan nilai IP 0,2-0,4. Diameter globul NE II berkisar ± 150 -170 nm dengan nilai IP 0,2-0,5. Tidak terdapat perbedaan bermakna dari diameter globul pada suhu kamar maupun indeks polidispersitas ($P > 0,05$). Penyimpanan dalam *climatic chamber* menyebabkan peningkatan ukuran diameter globul karena pengaruh suhu yang memicu terjadinya mobilitas globul dan semua nilai berbeda bermakna ($P < 0,05$) dan nilai IP 0,1-0,4 (tidak berbeda signifikan dengan $P > 0,05$).

Penentuan kadar zat aktif ditentukan dengan metode analisis yang telah divalidasi sebelumnya menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Kadar menurun signifikan dalam kedua sediaan nanoemulsi pada penyimpanan suhu kamar dengan nilai $P < 0,05$. Kadar NAP dalam NE II mengalami penurunan yang sistematis mulai selama 60 hari yaitu sebesar ± 58 -68%.

Studi penetrasi dilakukan melalui uji difusi *in vitro* menggunakan sel difusi Franz dengan membran Spangler dan membran kulit ular jenis *Phyton Reticulus*. Hasil difusi NAF dalam NE I yang ditambahkan gliserin sebesar 10% meningkatkan difusi NAF hingga mencapai ± 80 % pada jam ke-6. Difusi NAF dalam NE II mencapai ± 50 % hingga jam ke-8 dan secara keseluruhan berbeda signifikan ($P < 0,05$). Hasil difusi pada NE II membuktikan sistem SOD dapat meningkatkan difusi NAF ± 20 % lebih tinggi dibanding NAF tanpa ditetuk SOD. Hasil

ini mendukung hipotesa bahwa lesitin dapat memperbaiki dispersibilitas NAP dalam minyak sehingga lebih mudah berpenetrasi ke dalam lapisan SC. Internalisasi sediaan terhadap sel fibroblast melalui pewarnaan fuorokrom *nile-red* membuktikan kemampuan sediaan dalam sistem NE dengan basis minyak, setelah melintasi lapisan SC dapat menembus dinding sel namun tidak masuk ke dalam inti sel.

Pengujian aktivitas antikerut dilakukan terhadap subjek manusia dengan menggunakan dua sediaan yang dibuat SOD yaitu NE II (NE F3) dan NE tanpa SOD (NE NAF II). Terjadi penurunan nilai kerutan pada subjek setelah 28 hari penggunaan sediaan, namun tidak berbeda bermakna ($P > 0,05$). Hasil pengujian lebih lanjut tidak ada perbedaan bermakna antara kedua sediaan tersebut terhadap penurunan nilai kerutan ($P = 0,676$).

Kata kunci: Natrium askorbil fosfat, *solid-in-oil dispersion*, lesitin, liofilisat, partisi, nanoemulsi, penetrasi.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF TRANSCUTAN DELIVERY OF SODIUM ASCORBYL PHOSPHATE NANOEMULSION WITH SOLID-IN-OIL DISPERSION

By

Fith Khaira Nursal

NIM : 30713010

(Doctoral Program in Pharmacy)

The delivery system of active substance through the skin transcutaneously or transdermally is limited by the size, molecular weight and also molecular affinity of the skin layer composed of lipid components. Theoretically, hydrophilic molecules experience permeation resistance into the skin layer and it is needed specific technique in its delivery. Through the solid-in-oil dispersion (SOD) these obstacles were successfully overcome and many studies have been proven that hydrophilic protein macromolecules could be delivered through the skin using the SOD technique in nanoformulation preparations.

Sodium ascorbyl phosphate (SAP) is a vitamin C derivative compound that is hydrophilic with the low permeability ($\log P_{ow}$ at 10^{-4}), thus inhibiting the permeation in the stratum corneum (SC) layer. The purpose of this study is to increase the permeation of SAP through increasing dispersibility in oil with the SOD technique by combining it with amphiphilic compounds. In this study lecithin (soy lecithin) and polyethylene glycol (PEG) 20000 were used. Amphiphilic compounds will form a layer around the active substance which is hydrophilic so that it is partitioned stronger in the oil phase.

The formation of SOD began by mixing the active substances with amphiphilic compounds, and lyophilization. Two different techniques have been carried out, group I was formed through a system of solution/dispersion of SAP-lecithin and SAP-PEG 20000 within water. Group II was formed by beginning with the formation water in oil (W/O) emulsions between SAP-VCO and lecithin, and varied with the addition of Tween 80. Each group was dried through freeze drying to remove water from the mixture so that SOD was formed and called lyophilizate. The results of lyophilizate I were white powder (SAP-PEG 20000) and semisolid form like a caramel (SAP-lecithin), while lyophilizate II was an oily liquid.

Lyophilizate analysis with Fourier Transmission Infra Red (FTIR) was carried out to see the interaction of SAP with amphiphilic compounds. The spectrum showed that the interaction of SAP with lecithin and PEG 20000 did not form new compounds, but formed an electrostatic charge from ion pairs between negatively charged phosphate groups on SAP molecule with positively charged choline groups from lecithin. This interaction makes the surface on SAP-lecithin. The morphology of lyophilizate through Transmission Electron Microscopy (TEM) indicates the presence a layer of lecithin on the surface of SAP, overall.

The next step was to incorporate lyophilizate within oil in water (O/W) nanoemulsion, was made based on the lyophilizate group. Glycerin was added to NE I to increase the dispersibility of lyophilizate in the oil phase, and lyophilizate II was incorporated without the addition of

glycerin in NE II. The addition of glycerin in NE I had a significant effect on SAP diffusion ability because glycerin increased the solubility of SAP in oil (VCO). Physically, NE I was clearer than NE II because of the addition of glycerin.

Morphological observations of preparations through TEM showed that lecithin was on the surface of the active substance SAP between oil-water. Measurement of globule diameter, polydispersity index (PDI) and potential zeta were carried out at room temperature (± 25 °C) and storage in a climatic chamber (± 40 °C / RH 75%). The average globule's diameter among formula of NE I at room temperature was ± 100 -200 nm with the PDI value 0.2-0.4. The average globule's diameter among several formulas in NE II was in ranges from ± 150 -170 nm with the PDI value 0.2-0.5. There was no significant difference between average globule's diameter and polydispersity index at room temperature ($P > 0.05$). Storage in the climatic chamber causes an increase in the diameter of the globule triggered by the influence of temperature so that globule mobility occurs, thus forming a coalescent with globule diameter mean values significantly different ($P < 0.05$) and PDI values 0.1-0.4 (not significantly different from $P > 0.05$).

Determination of the active substance was determined by a previously validated analytical method using high performance liquid chromatography (HPLC). The NAF levels in the sample decreased significantly during room temperature storage with a P value < 0.05 .

Penetration studies were done through in vitro diffusion tests with Franz diffusion cells using Spangler membranes and snake skin membrane using *Python Reticulus* sheed snake skin. The results of diffusion of SAP within NE I with the addition of glycerin increased the diffusion of SAP between formulations reached out $\pm 80\%$ at 6th hour. SAP diffusion within NE II among formulas was attained $\pm 50\%$ until the 8th hour and overall had significantly differences ($P < 0.05$). Diffusion result of NE II demonstrated that the SOD system could increase SAP diffusion $\pm 20\%$ higher than SAP without SOD. The internalization study of sample for fibroblast cells through fuorochrome nile-red staining proved the ability of NE sample with an oil base, after crossing the SC layer it can accumulate in the cytoplasm and permeated to dermis layer.

The anti-wrinkle activity test on human subjects used two formula, namely the NE F3 formula which was made SAP with SOD and formula NE SAP II was made without the treatment of SOD. The decrease in wrinkle values in the subjects occurred after 28 days of uses, but did not differ significantly ($P > 0.05$). Further experiments, showed no significant difference between the two samples in decreasing wrinkle value ($P = 0.676$).

Key words: Sodium ascorbyl phosphate, solid-in-oil dispersion, lecithin, lyophilizate, partition, nanoemulsion, penetration.

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	i
ABSTRACT	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	ix
PEDOMAN PENGGUNAAN DISERTASI.....	xi
HALAMAN PERUNTUKAN.....	xiii
KATA PENGANTAR.....	xv
DAFTAR ISI.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI.....	xxi
DAFTAR TABEL.....	xxiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xv
Bab I Pendahuluan.....	1
I.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
I.2 Maksud, Tujuan, Lingkup dan Batasan Permasalahan	5
I.3 Perumusan Masalah.....	6
I.4 Cara Pendekatan dan Metodologi Penelitian yang Digunakan..	6
I.5 Asumsi.....	7
I.6 Hipotesis Penelitian.....	8
I.7 Kebaruan Penelitian.....	8
Bab II Tinjauan Pustaka.....	9
II.1 Sistem Penghantaran Sediaan pada Kulit	9
II.2 Penuaan Dini dan Sediaan Anti Kerut	16
II.3 Sistem Penghantaran Nanoformulasi pada Kulit	19
II.4 Natrium Askorbil Fosfat	25
II.5 Lesitin	27
II.6 Sistem <i>solid-in-oil dispersion</i> (SOD).....	29
Bab III Metodologi Penelitian	33
III.1 Bahan dan Alat	33
III.2 Pembentukan Liofilisat dengan Metode SOD dan Karakterisasi.....	34
III.3 Inkorporasi Liofilisat NAF dalam Nanoemulsi dan Karakterisasi Sediaan.....	38
III.4 Pengembangan dan Validasi Metode Analisis NAF.....	39
III.5 Uji Stabilita Nanoemulsi NAF	43
III.6 Studi Penetrasi Nanoemulsi Secara <i>in vitro</i>	44

III.7	Internalisasi Kualitatif Nanoemulsi Terhadap Sel Fibroblas.	45
III.8	Uji Keamanan Sediaan	45
III.9	Uji Aktivitas Antikerut Sediaan secara <i>in vivo</i>	48
Bab IV	Hasil dan Pembahasan	53
IV.1	Hasil Pembentukan Liofilisat NAF dengan Metode <i>solid-in-oil-dispersion</i> dan Karakterisasi Liofilisat.....	53
IV.2	Inkorporasi Liofilisat dalam Nanoemulsi dan Karakterisasi Sediaan	65
IV.3	Hasil Pengembangan Metode Analisis dan Validasi	79
IV.4	Hasil Uji Stabilita Sediaan Nanoemulsi	84
IV.5	Hasil Studi Penetrasi Sediaan Secara <i>in vitro</i>	96
IV.6	Hasil Internalisasi Kualitatif Sediaan Terhadap Sel Fibroblast	101
IV.7	Hasil Uji Keamanan dan Iritasi Sediaan	104
IV.8	Hasil Uji Aktivitas Antikerut Sediaan Secara <i>in vivo</i>	106
Bab V	Kesimpulan dan Alur Penelitian Lebih Lanjut.....	113
DAFTAR PUSTAKA	115
LAMPIRAN	125