

Peningkatan Penetrasi Senyawa Hidrofilik Melalui Formulasi Emulsi Ganda A₁/M/A₂ dengan Mikroemulsi A₁/M sebagai Fasa Dalam

*Tri Suciati, R. R. Sarlita Dwiani, Titi Sudiati

*Kelompok Keilmuan Farmasetika, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesa 10 Bandung 40132*

Abstrak

Senyawa α -arbutin adalah senyawa hidrofilik yang mempunyai aktivitas inhibisi tirosinase. Formula peningkat permeasi α -arbutin pada kulit diperlukan untuk penghantaran senyawa tersebut sebagai antihiperpigmentasi. Penambahan α -arbutin ke dalam emulsi primer air dalam minyak (A₁/M) dilakukan sebelum proses emulsifikasi. Optimasi formula dilakukan untuk menghasilkan mikroemulsi A₁/M yang jernih yang selanjutnya diemulsifikasi menggunakan Croduret 50 SS membentuk emulsi ganda air dalam minyak dalam air (A₁/M/A₂) dan dievaluasi viskositas, pH, kadar, efek inhibisi α -arbutin terhadap tirosinase, dan stabilitas fisiknya dengan cara sentrifugasi dan *freeze thaw* selama 28 hari pada suhu 40°C. Uji permeasi *in vitro* α -arbutin dalam emulsi ganda dan emulsi M/A (pembandingan) dilakukan menggunakan membran kulit ular. Mikroemulsi yang stabil dihasilkan dari komposisi air, Tween 80, gliserin, dan isopropil miristat (IPM) dengan rasio 10:27,5:12,5:50 dan emulsi ganda yang stabil dihasilkan dari 5% Croduret 50 SS. Kadar α -arbutin yang terdifusi dari sediaan emulsi ganda selama 8 jam meningkat secara signifikan dibandingkan difusi dari sediaan M/A yaitu berturut-turut adalah 671,71±26,31 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dan 518,85±17,97 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Kata kunci : emulsi ganda, mikroemulsi, α -arbutin, peningkat permeasi

Abstract

The α -arbutin is hydrophilic substance having tyrosinase inhibitory activity. Therefore, a vehicle that can improve skin permeation of α -arbutin is mandatory in antihyperpigmentation preparation. Incorporation of α -arbutin into the W₁/O microemulsion was done prior to emulsification process. Optimization was conducted to produce a transparent W₁/O microemulsion, which was emulsified further in the form of W₁/O/W₂ double emulsion using Croduret 50 SS. The double emulsion was characterized for its stability during 28 days-storage at 40°C by measuring viscosity, pH, concentration and tyrosinase inhibitory effect of α -arbutin, centrifugation, and freeze thaw. Percutaneous penetration of α -arbutin from the double emulsion and simple O/W emulsion (as comparison) was analyzed *in vitro* using shed snake membrane. A stable W₁/O microemulsion was produced using a mixture of water, Tween 80, glycerine, and IPM (10:27.5:12.5:50) and a stable double emulsion was produced using 5% of Croduret 50 SS. Skin penetration of α -arbutin for 8 hrs from the double emulsion was increased significantly compared to penetration from the O/W emulsion, which were 671.71±26.31 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 518.85±17.97 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively.

Keywords: double emulsion, microemulsion, α -arbutin, permeation enhancer

Pendahuluan

Proses pigmentasi kulit dihasilkan dari pembentukan melanin oleh melanosit (Lin, 2008) yang terjadi secara normal dan merupakan salah satu bentuk perlindungan kulit dari efek radiasi UV. Akan tetapi, adanya pemaparan sinar matahari yang tinggi, peningkatan kadar estrogen dalam tubuh, atau luka, dapat memicu pembentukan melanin berlebihan (hiperpigmentasi) sehingga dapat menimbulkan bercak gelap pada kulit (Baumann, 2009).

Senyawa α -arbutin secara luas digunakan sebagai anti-hiperpigmentasi yang bekerja sebagai inhibitor tirosinase (Couteau, 2000; Draelos, 2006). Namun, sifatnya yang hidrofil menyulitkan arbutin menembus barrier kulit terluar, yaitu stratum korneum yang bersifat lipofil, sedangkan target kerja arbutin adalah lapisan stratum germinativum yang terletak di bagian

paling bawah dari lapisan epidermis yang bersifat hidrofil sehingga dikembangkan bentuk sediaan yang dapat meningkatkan kapasitas penetrasi dari arbutin. Mikroemulsi adalah salah satu bentuk yang dapat digunakan untuk penghantaran obat maupun kosmetik melalui kulit yang memberikan hasil lebih baik dibanding bentuk sediaan lain (Boonme, 2007). Berdasarkan fakta tersebut, maka dikembangkan bentuk sediaan berupa mikroemulsi arbutin air dalam minyak. Akan tetapi, sediaan emulsi air dalam minyak kurang menyenangkan dalam pemakaian karena bersifat lengket dengan adanya minyak pada fasa luar. Oleh karena itu, dilakukan pengembangan bentuk sediaan lebih lanjut berupa emulsi ganda air dalam minyak dalam air dengan fasa dalam berupa mikroemulsi air dalam minyak.

*Penulis yang dapat dihubungi untuk korespondensi
tri.suciati@fa.itb.ac.id

Percobaan

Bahan

Senyawa α -arbutin (PT. Martina Berto Tbk.), isopropil miristat (Brataco), tween 80, gliserin, croduret 50 SS (Brataco), air, metil paraben, propil paraben, dapar fosfat, enzim tirosinase (Sigma), L-tirosin (Sigma), biru metilen, dan membran kulit ular.

Alat

Spektrofotometer ultraviolet-sinar tampak, pengaduk elektrik (IKA-RW20 digital), pH meter (Beckman), *illuminated chamber* (Hotpack model 317322), viskometer (Brookfield Model DV-I+), sentrifuga (Hettich EBA85), termometer, mikroskop cahaya, lemari pendingin, penangas, dan timbangan analitik.

Penentuan Formula Mikroemulsi

Penentuan formula mikroemulsi dilakukan dengan membuat diagram tiga fasa. Optimasi dilakukan untuk menghasilkan mikroemulsi yang bening dan stabil melalui penggunaan berbagai perbandingan jumlah tween 80 dan gliserin, yaitu 1:1; 1,5:1; 2:1; 2,5:1; dan 3:1, serta variasi jumlah total tween 80 dan gliserin, yaitu 20%, 25%, 30%, 35%, dan 40%. Selain itu, optimasi juga dilakukan terhadap jumlah aquadest sebagai fasa dalam dengan lima variasi, yaitu 10%, 11%, 12%, 13%, dan 14%. Formula yang dipilih adalah formula dengan jumlah tween 80 terkecil dan jumlah air terbanyak yang dapat memberikan hasil optimum.

Penentuan Formula Emulsi Ganda

Penentuan formula emulsi ganda dilakukan dengan melakukan optimasi jumlah emulsi primer dan jumlah croduret 50 SS yang digunakan. Empat variasi jumlah croduret 50 SS dibuat (3%, 4%, 5%, dan 6%) dan dipilih formula yang menghasilkan sediaan yang stabil dengan jumlah surfaktan terendah. Sediaan tersebut kemudian dilakukan optimasi terhadap jumlah emulsi primer dengan variasi 45%, 50%, 55%, dan 60% dan dipilih formula dengan jumlah emulsi primer maksimum dan menghasilkan sediaan yang stabil.

Pembuatan Sediaan

Pembuatan sediaan emulsi ganda arbutin dibuat menggunakan formula hasil optimasi dengan cara melarutkan arbutin dalam air dan dicampur dengan gliserin. Isopropil miristat dicampur dengan tween 80. Kedua campuran dipanaskan hingga suhu 60°C, lalu dicampur dan diaduk selama 10 menit pada 100 rpm. Mikroemulsi yang terbentuk digunakan sebagai emulsi primer. Croduret, metil paraben, dan propil paraben dilarutkan dalam air, kemudian campuran tersebut

dicampurkan dengan emulsi primer dan diaduk selama 10 menit pada 500 rpm.

Evaluasi Sediaan

Uji Stabilitas Fisik dengan Sentrifugasi

Sediaan dimasukkan dalam lima tabung sentrifuga masing-masing sebanyak 2 gram lalu disentrifuga selama 5 jam dengan kecepatan 3750 rpm. Pengamatan dilakukan terhadap adanya pemisahan fasa setiap interval 30 menit.

Uji Stabilitas Fisik *Freeze Thaw*

Sediaan dimasukkan dalam enam vial masing-masing sebanyak 4 gram. Satu vial digunakan sebagai kontrol yang diinkubasi pada suhu ruang, sedangkan kelima lainnya diinkubasi di lemari pendingin pada suhu 4°C selama 48 jam lalu secara langsung dipindahkan ke *climatic chamber* pada suhu 40°C selama 48 jam (satu siklus). Pengamatan dilakukan terhadap adanya pemisahan fasa pada tiap akhir siklus.

Uji Tipe Emulsi

Pengujian dilakukan dengan cara melakukan pewarnaan sediaan menggunakan pewarna larut air metilen biru, lalu diamati dibawah mikroskop.

Uji pH

Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter setiap waktu pengamatan selama 28 hari.

Uji Viskositas

Pengukuran viskositas sediaan dilakukan dengan menggunakan alat viskometer Brookfield setiap waktu pengamatan selama 28 hari.

Uji Kadar α - Arbutin dalam Sediaan

Pengujian kadar α -arbutin dilakukan terhadap sediaan selama 28 hari pada suhu 25°C dan suhu 40°C. Pemisahan fasa minyak dan fasa air pada sediaan dilakukan dengan cara menambahkan etanol. Campuran emulsi ganda-etanol diaduk dengan menggunakan *roller mixer* selama 20 menit dan disentrifuga selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Selanjutnya, fasa air yang mengandung α -arbutin dipisahkan dan diukur kadarnya dengan menggunakan spektrofotometri ultraviolet-sinar tampak pada panjang gelombang 284 nm. Jumlah α -arbutin dalam sediaan diperoleh dari substitusi nilai absorbansi ke dalam persamaan kurva standar.

Uji Aktivitas Inhibisi *In Vitro*

Larutan kontrol (L-tirosin, enzim tirosinase, dan dapar fosfat), larutan koreksi kontrol (L-tirosin dan dapar fosfat), larutan uji (L-tirosin, enzim tirosinase, α -arbutin, dan dapar fosfat), dan larutan koreksi uji (L-tirosin, α -arbutin, dan dapar fosfat) disiapkan dan

masing-masing larutan diinkubasi selama 30 menit lalu diukur absorbansinya (melalui pengukuran DOPA krom) dengan menggunakan spektrofotometri ultraviolet-sinar tampak pada panjang gelombang maksimum pada 477 nm. Aktivitas inhibisi α -arbutin dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A - B - (C - D)}{(A - B)} \times 100\%$$

A = absorbansi larutan kontrol

B = absorbansi larutan koreksi kontrol

C = absorbansi larutan uji

D = absorbansi larutan koreksi uji

Tiap larutan mengandung dapar fosfat 50 mM pH 6,5 yang merupakan kondisi optimum dari enzim tirosinase. Besarnya inhibisi yang diperoleh diplot terhadap konsentrasi α -arbutin dan dicari persamaan regresi linearnya untuk mendapatkan nilai IC_{50} .

Untuk pengujian aktivitas inhibisi, sediaan sebanyak 1 gram diencerkan 10 kali dengan dapar fosfat 50 mM pH 6,5 lalu diaduk dengan *roller mixer* selama 20 menit dan disentrifuga dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit sehingga fasa minyak dan fasa air memisah. Fasa minyak dipisahkan, sedangkan fasa air diambil dan diencerkan 5 kali dengan dapar fosfat 50 mM pH 6,5 dan disentrifuga dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit, kemudian disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Pengukuran aktivitas inhibisi α -arbutin dalam sediaan dilakukan sama seperti pada inhibitor uji α -arbutin.

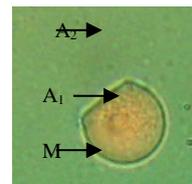
Uji Difusi Membran

Sebanyak 0,5 gram sediaan dioleskan di atas sel difusi yang sudah terdapat membran kulit ular. Sel difusi dan kompartemen reseptor diletakkan dalam *orbital shaker* dengan suhu 37° C dengan kecepatan pengadukan 100 rpm. Dapar fosfat pH 7,4 digunakan sebagai cairan reseptor. Pengambilan sampel sebanyak 3 mL dilakukan pada menit ke- 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, dan 480 disertai penggantian cairan penerima segar dengan volume yang sama. Kadar α -arbutin terdifusi diukur dengan spektrofotometer ultraviolet-sinar tampak pada panjang gelombang 284 nm dan dihitung melalui substitusi nilai absorbansi ke dalam persamaan kurva standar.

Hasil dan Pembahasan

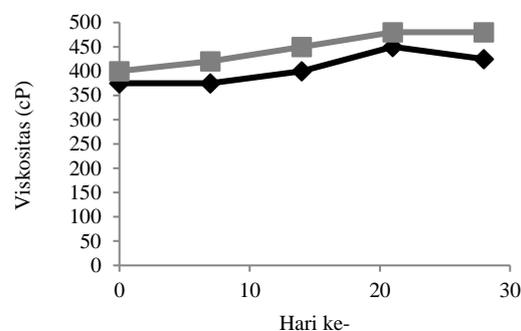
Pada uji stabilitas fisik dengan metode *freeze thaw*, sediaan emulsi ganda α -arbutin diinkubasi pada suhu 4°C selama 48 jam lalu diinkubasi pada suhu 40°C selama 48 jam yang merupakan satu siklus *freeze thaw*. Dari hasil pengamatan, sediaan emulsi ganda α -arbutin tetap stabil setelah melalui 6 siklus *freeze thaw*.

Sediaan emulsi ganda air dalam minyak dalam air dibuktikan melalui hasil pengamatan tipe emulsi menggunakan metode pewarnaan. Dari hasil percobaan teramati globul berwarna biru yang berada di dalam globul yang lebih besar dan tidak berwarna di dalam lingkungan berwarna biru. Hal tersebut dikarenakan pewarna metilen biru yang larut air akan mewarnai fase air baik dalam globul mikroemulsi maupun dalam fasa luar sehingga terlihat bahwa emulsi yang terbentuk adalah emulsi ganda air dalam minyak dalam air (Gambar 1).



Gambar 1. Emulsi ganda α -arbutin hasil optimasi.

Dari hasil pengukuran viskositas selama 28 hari didapatkan hasil viskositas sediaan meningkat seiring dengan lama waktu penyimpanan, baik pada penyimpanan suhu 25°C maupun pada penyimpanan pada suhu 40°C. Berdasarkan perhitungan dengan *t-student* berpasangan ($\alpha = 0,05$) tidak terdapat perbedaan secara bermakna antara viskositas sediaan pada hari ke-0 dan hari ke-28 baik pada suhu 25°C maupun suhu 40°C.

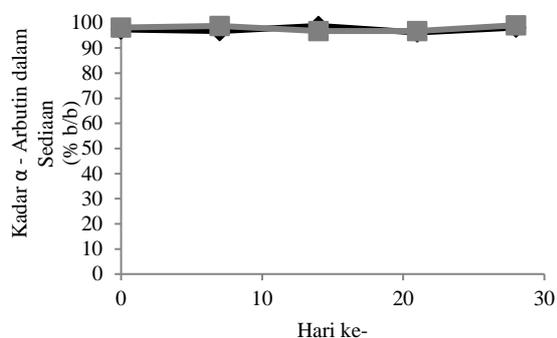


Gambar 2. Kurva viskositas sediaan, (■) pada suhu 25°C, (◆) pada suhu 40°C.

Pada hasil pengukuran pH selama 28 hari tidak terjadi kenaikan atau penurunan pH. pH sediaan cenderung sama dari tiap-tiap interval waktu pengukuran baik pada sediaan yang disimpan di suhu 25°C maupun suhu 40°C. Berdasarkan perhitungan dengan *t-student* berpasangan ($\alpha = 0,05$) maka tidak terdapat perbedaan secara bermakna antara pH sediaan pada hari ke-0 dan hari ke-28 baik pada suhu 25°C maupun suhu 40°C.

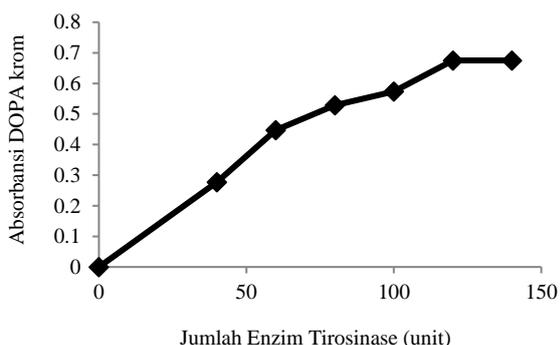
Berdasarkan hasil pengukuran kadar α -arbutin dalam sediaan selama 28 hari pada suhu 25°C dan suhu 40°C, rata-rata kadar α -arbutin dalam sediaan relatif sama dan mendekati 100%. Setelah dilakukan perhitungan

dengan *t-student* berpasangan ($\alpha = 0,05$) maka tidak terdapat perbedaan secara bermakna antara kadar α -arbutin di dalam sediaan pada hari ke-0 dan hari ke-28 baik pada suhu 25°C maupun suhu 40°C.



Gambar 3. Kurva kadar α -arbutin dalam sediaan, (■) pada suhu 25°C dan (◆) pada suhu 40°C.

Sediaan emulsi ganda α -arbutin diuji aktifitas inhibisinya terhadap enzim tirosinase dengan L-tirosin sebagai substrat secara *in vitro*. Enzim tirosinase akan mengkatalisis reaksi enzimatik yang menghasilkan melanin. Melanin merupakan pigmen yang memberikan warna pada kulit. Produksi melanin dalam melanosom dimulai dengan hidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA menggunakan enzim tirosinase, kemudian L-DOPA dioksidasi menjadi DOPA kuinon. DOPA kuinon kemudian akan mengalami reaksi non-enzimatik membentuk DOPA krom yang selanjutnya akan dibentuk menjadi melanin (Lin, 2008). Pembentukan DOPA krom diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer ultraviolet-sinar tampak pada panjang gelombang maksimum 477 nm.

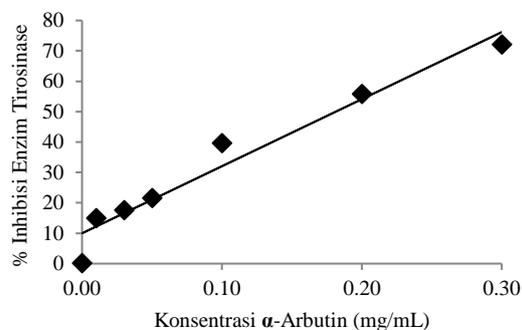


Gambar 4. Kurva absorbansi DOPA krom hasil reaksi enzimatik L-tirosin dengan enzim tirosinase.

Sebelum dilakukan uji aktifitas inhibisi terhadap enzim tirosinase, terlebih dulu dilakukan optimasi jumlah enzim tirosinase yang dapat memberikan absorbansi optimum. Hal ini memberikan arti bahwa DOPA krom yang dihasilkan dari reaksi enzimatik antara enzim tirosinase dan L-tirosin mencapai jumlah maksimum. Larutan L-tirosin konsentrasi 1 mM dipipet sebanyak 1

mL dan dimasukkan ke dalam vial-vial, lalu ditambahkan enzim tirosinase dengan berbagai konsentrasi yaitu 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 unit dengan volume total larutan uji adalah 3 mL. Larutan uji selanjutnya diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit. Setelah 30 menit larutan uji disimpan dalam lemari es untuk menghentikan reaksi enzimatik dan diukur absorbansinya. Dari hasil optimasi diketahui bahwa larutan uji dengan enzim tirosinase sebanyak 120 unit memberikan absorbansi maksimum (Gambar 4) sehingga jumlah enzim yang digunakan pada uji selanjutnya adalah 120 unit untuk 1 mL substrat L-tirosin 1 mM.

Larutan α -arbutin dengan berbagai konsentrasi, yaitu 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; dan 0,3 mg/mL diuji aktivitas inhibisinya terhadap enzim tirosinase untuk mengetahui nilai IC_{50} . Tiap vial yang berisi α -arbutin dalam berbagai konsentrasi ditambahkan 1 mL substrat L-tirosin 1 mM, kemudian ditambahkan enzim tirosinase sebanyak 120 unit dengan total volume larutan uji 3 mL. Larutan uji diinkubasi pada suhu 25°C selama 25 menit dan selanjutnya disimpan pada lemari es untuk menghentikan reaksi enzimatik, lalu diukur absorbansinya. Dari hasil uji, nilai IC_{50} α -arbutin adalah sebesar 0,18 mg/mL. Pada penelitian lain nilai IC_{50} α -arbutin yang diperoleh adalah sebesar 0,13 mg/mL (Funayama, 1995). Perbedaan tersebut dapat disebabkan karena sumber bahan yang digunakan berbeda.

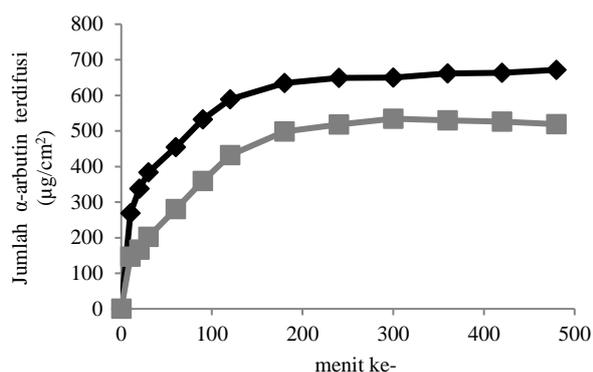


Gambar 5. Kurva aktivitas inhibisi α -arbutin terhadap enzim tirosinase dengan persamaan $y = 220,64x + 9,98$; $r^2 = 0,9524$.

Dari hasil uji aktivitas inhibisi sediaan emulsi ganda α -arbutin didapat nilai inhibisi pada awal pembuatan dan selama penyimpanan 28 hari berturut-turut sebesar $55,26 \pm 0,42\%$ dan $53,78 \pm 0,63\%$. Berdasarkan perhitungan dengan *t-student* berpasangan ($\alpha = 0,05$) maka tidak terdapat perbedaan secara bermakna selama penyimpanan 28 hari. Selain itu, aktivitas inhibisi sediaan awal pembuatan dan setelah penyimpanan selama 28 hari tidak berbeda secara bermakna dengan α -arbutin yang tidak diformulasi, yaitu sebesar $55,58 \pm 0,37\%$.

Pada uji difusi digunakan membran kulit ular *Phyton reticulates* (sanca batik) bagian dorsal karena memberikan hasil dengan kadar zat terdifusi paling besar. Kulit ular bukan merupakan jaringan hidup, sehingga dapat disimpan untuk waktu yang lama pada suhu ruangan dan tidak memiliki perbedaan permeabilitas dengan kulit ular yang masih segar Kulit ular banyak digunakan sebagai model uji difusi membran secara *in vitro* karena menyerupai struktur kulit manusia (Haigh, 1998).

Dari hasil uji difusi, jumlah α -arbutin yang dapat terdifusi setelah 8 jam dari sediaan emulsi ganda adalah sebesar $671,71 \pm 26,31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ atau $55,79 \pm 2,19\%$. Sedangkan jumlah α -arbutin yang terdifusi dari sediaan emulsi M/A adalah sebesar $518,85 \pm 17,97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ atau $43,1 \pm 1,49\%$. Jumlah α -arbutin yang terdifusi dari sediaan emulsi ganda $A_1/M/A_2$ lebih banyak dibandingkan dengan sediaan emulsi M/A. Hal ini menunjukkan pada sediaan emulsi ganda, senyawa α -arbutin berada dalam fasa air pada emulsi primer A_1/M , sehingga penetrasi dapat terbantu dengan adanya minyak pada fasa luar emulsi primer. Globul emulsi primer dengan fasa luar berupa minyak dapat menembus membran kulit ular yang bersifat lipofil yang merupakan representasi dari stratum korneum, sehingga α -arbutin yang berada dalam globul dan terlindungi fasa minyak dapat terpenetrasi. Pada sediaan M/A, α -arbutin berada pada fasa luar karena larut dalam air. Sehingga pada proses difusi melalui membran kulit ular yang bersifat lipofil, senyawa α -arbutin akan tertahan dan menurunkan tingkat penetrasi.



Gambar 7. Kurva difusi α -arbutin melalui membran kulit ular, (■) sediaan emulsi ganda A/M/A, (◆) sediaan emulsi M/A.

Kesimpulan

Sediaan emulsi ganda α -arbutin stabil berdasarkan hasil evaluasi viskositas, pH, kadar dalam sediaan, sentrifugasi, dan *freeze thaw*, serta memiliki aktifitas inhibisi sebesar $55,26 \pm 0,42\%$ pada awal pembuatan dan $53,78 \pm 0,63\%$ pada sediaan yang telah disimpan selama 28 hari. Berdasarkan uji difusi secara *in vitro*

menggunakan membran kulit ular, kadar α -arbutin dalam sediaan sediaan yang terdifusi selama 8 jam adalah $671,71 \pm 26,31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ atau $55,79 \pm 2,19\%$, yang signifikan lebih besar dibandingkan dengan sediaan M/A (pembanding), yaitu $518,85 \pm 17,97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ atau $43,1 \pm 1,49\%$.

Daftar Pustaka

- Baumann, L., 2009, *Cosmetic Dermatology: Principle and Practice*, 2nd ed., The McGraw-Hill Companies, New York, 1-8, 98-106.
- Boonme, Prapaporn, 2007, Application of Microemulsions in Cosmetics, *Journal of Cosmetic Dermatology*, 6, 223–228.
- Couteau, C. and Laurence J. M., 2000, Photostability Determination of Arbutin, a Vegetable Whitening Agent, *Il Farmaco*, 55, 410–413.
- Draeos, Z. D. and Lauren A. T., 2006, *Cosmetic Formulation of Skin Care Product*, Taylor & Francis, New York, 205-215.
- Funayama M., Arakawa H., Yamamoto R., Nishino T., Shin T., Murao S., 1995, *Effects of Alpha- and Beta-arbutin on Activity of Tyrosinases from Mushroom and Mouse Melanoma*, Technical Research Laboratory, Jepang, 143-144.
- Haigh, J. M., E. Beyssac and J.-M. Aiache, 1998, *In vitro* Permeation of Progesterone from a Gel Through The Shed Skin of Three Different Snakes Species, *IJPT* 170, 151-156.
- Lin, Jen-Wen, Hsui-Mei Chiang, Yi-Chun Lin and Kuo-Ching Wen, 2008, Natural Products with Skin – Whitening Effects, *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(2), 1-1

