

Formulasi dan Uji Penetrasi *In-Vitro* Sediaan Topikal Nanoemulsi Genistein dari Tanaman *Sophora japonica* Linn.

(Formulation and In-Vitro Penetration Study of Topical Dosage Form of Nanoemulsion from Genistein of *Sophora japonica* Linn.)

SANDRA AULIA MARDIKASARI*, MAHDI JUFRI¹, JOSHITA DJAJADISASTRA¹

¹Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok, Jawa barat 16424, Indonesia.

Diterima 11 Januari 2016, Disetujui 22 Juli 2016

Abstrak: Tujuan penelitian ini adalah memformulasi genistein menjadi nanoemulsi dan membandingkan penetrasinya dengan produk Gen90 Nano. Dibuat sebanyak 3 jenis formula dengan perbandingan komposisi antara genistein dan lesitin soya menggunakan metode emulsifikasi spontan. Hasilnya formula 3 merupakan formula terpilih yang menghasilkan nanoemulsi berukuran 191,7 nm dengan indeks polidispersitas 0,171 dan potensial zeta -47,5 mV. Uji penetrasi secara *in-vitro* menggunakan sel difusi Franz menunjukkan jumlah kumulatif terpenetrasi dari nanoemulsi genistein sebesar $18,29 \pm 0,16$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dibandingkan dengan produk Gen90 Nano sebesar $24,60 \pm 0,57$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Perbandingan ini dilakukan untuk melihat kualitas penetrasi dari formula nanoemulsi genistein, karena Gen90 Nano merupakan produk paten dari kompleks inklusi hidroksipropil siklodekstrin-genistein.

Kata kunci: Nanoemulsi, genistein, uji penetrasi, sel difusi Franz.

Abstract: The purpose of this study was to prepared genistein in nanoemulsion and compared its penetration with Gen90 Nano. There was 3 types of formula with composition ratio between genistein and soy lecithin using a spontaneous emulsification methods. The results showed that formula 3 was the chosen formula which has 191,7 nm particle size, 0,171 polydispersity index and -47,5 mV zeta potential. In-vitro penetration study using Franz diffusion cell showed that amount cumulative in penetration of genistein nanoemulsion was $18,29 \pm 0,16$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) compared with Gen90 Nano was $24,60 \pm 0,57$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). This comparison was done to see the quality of penetration of genistein nanoemulsion formula, because Gen90 Nano was a patent product consist of Genistein - Hydroxypropyl Cyclodextrin (HPCD) inclusion complex.

Keywords: Nanoemulsion, genistein, penetration study, Franz diffusion cell.

* Penulis korespondensi, Hp. 08111929091
e-mail: san_kyz@yahoo.com

PENDAHULUAN

ISOFLAVON menjadi sangat populer sebagai bahan kosmetik dengan klaim memberi keuntungan pada kulit seperti mencegah oksidasi lipid, stimulasi proliferasi fibroblast, menghambat protein *tyrosine kinase*, mengurangi rusaknya kolagen⁽¹⁾ dan meringankan penyakit fisiologis yang dipengaruhi hormon⁽²⁾. Beberapa studi telah menguji aktivitas genistein, salah satu isoflavon yang cukup melimpah. Genistein merupakan aglikon, bentuk bioaktif dari glikosida genistin⁽³⁾. Genistein lebih baik jika diberikan secara topikal karena genistein diketahui memiliki bioavailabilitas yang rendah setelah pemberian oral karena klirensnya dalam plasma sangat cepat⁽⁴⁾. Tetapi genistein bersifat nonpolar dan memiliki kelarutan yang buruk dalam air. Oleh karena itu diperlukan suatu strategi formulasi untuk menghantarkan genistein agar dapat masuk ke dalam kulit. Saat ini, desain nanoemulsi sebagai pembawa untuk pelepasan topikal dari obat yang buruk kelarutannya telah cukup mendapat perhatian^(5,6,7,8). Sehingga salah satu cara untuk menghantarkan genistein agar dapat berpenetrasi ke dalam kulit adalah dengan memformulasinya menjadi bentuk sediaan nanoemulsi.

Nanoemulsi merupakan dispersi halus minyak dalam air (o/w) dimana obat dengan kelarutan buruk dapat dilarutkan ke dalam inti minyak dan/atau diadsorpsi pada permukaan minyak dalam air (o/w). Nanoemulsi memiliki kestabilan kinetik yang tinggi dikarenakan memiliki ukuran droplet yang jauh lebih kecil sekitar 5–200 nm dibandingkan emulsi konvensional yang memiliki ukuran droplet lebih dari 1000 nm. Karena ukuran droplet yang kecil, nanoemulsi dapat dengan mudah berpenetrasi melewati lapisan kulit dan dapat meningkatkan penetrasi bahan aktif yakni genistein.

Penelitian ini bertujuan untuk memformulasi sediaan nanoemulsi dari genistein, kemudian terhadap sediaan tersebut akan dilakukan uji penetrasi *in vitro* melalui sel difusi Franz dengan pembanding berupa sediaan dari produk Gen90 Nano yang merupakan kompleks inklusi genistein-hidroksipropil siklodekstrin dalam bentuk nano.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Phospholipon 90 G (Fosfatidilkolin kedelai) (Pemberian GMBH Lipoid Jerman), Genistein (Sigma Aldrich, Singapura), *Medium-chain* Triglyceride (Croda, Singapura), propilen glikol, metanol (Merck, Jerman), etanol 96% (Merck, Jerman), asetonitril (Merck, Jerman), aqua demineralisata (Brataco, Indonesia), natrium hidroksida (Merck, Jerman), dan

kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman). Tikus jantan galur Sprague-Dawley (SD) berumur 8 minggu (Badan Penelitian Hewan Ternak, Bogor, Indonesia).

Alat. Timbangan analitik (Accu-Lab), hotplate (IKA, Jerman), homogenizer (Omni-Multimix Inc., Malaysia), pH meter tipe-510 (Eutech Instrument, Singapura), oven (Memmert, Jerman), viskometer Brookfield (Brookfield, USA), pengaduk magnetik (Boeco MSH-300, Jerman), mikroskop optik (Nikon model Eclipse E 200, Jepang), *particle size analyzer* (Malven Zetasizer), pipet mikro (Socorex), sel difusi Franz (Mitra, Indonesia), alat kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu, Jepang) yang dilengkapi detektor UV-Vis (SPD-20A UV-Vis) dan *autosampler*, kolom C18 (250mm x 4,6mm, 5µm) fase terbalik (Waters Sunfire), lemari pendingin suhu 4–8 °C (Biomedical Labtech Deep Freezer), termometer, penyaring eluen dan sampel (Whatman), mikrosentrifugator (Spectrafuge 16M), *freezer* suhu -20 °C (Biomedical Labtech Deep Freezer), dan alat-alat gelas

METODE. Formulasi Nanoemulsi Genistein.

Untuk optimasi formula nanoemulsi genistein akan dibuat sebanyak 3 formula dengan perbedaan perbandingan komposisi antara Genistein dan Lesitin soya. Perbedaan komposisi nanoemulsi pada Formula 1 (F1), Formula 2 (F2) dan Formula 3 (F3) yaitu 0,1:1,5 untuk F1, 0,1:2 untuk F2 dan 0,1:2,5 untuk F3.

Pembuatan Nanoemulsi-Genistein. Nanoemulsi yang mengandung genistein dibuat dengan metode emulsifikasi spontan. Metode ini dilakukan dengan cara mencampurkan fase organik yang mengandung komponen minyak ke dalam fase air. Fase air terdiri atas campuran air dan propilen glikol yang sudah dihomogenkan terlebih dahulu sedangkan fase organik terdiri atas genistein yang dilarutkan dalam MCT kemudian ditambahkan lesitin soya. Setelah masing-masing fase sudah homogen, fase organik dimasukkan ke dalam fase air lalu dihomogenkan menggunakan homogenizer dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.

Karakterisasi Nanoemulsi Genistein.

Pengukuran pH dan viskositas. Pengukuran pH dapat dilakukan menggunakan pH-meter pada suhu ruang. Untuk pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer Brookfield. Cara pengujian yaitu sediaan dimasukkan ke dalam wadah berupa beaker glass 250 mL, spindel yang sesuai diturunkan hingga batas spindel tercelup ke dalam sediaan, kemudian motor dan spindel dinyalakan. Angka viskositas yang ditunjukkan oleh jarum merah dicatat, kemudian dikalikan dengan faktor koreksi pada tabel yang terdapat pada brosur alat. Nilai viskositas diperoleh dengan mengubah rpm dari 0,5; 2; 5; 10 dan 20 rpm. Selanjutnya dilakukan kebalikannya

dari 20; 10; 5; 2; dan 0,5 rpm. Nilai viskositas dihitung pada pengukuran menggunakan 1 jenis spindel dan pada kecepatan tertentu. Sifat alir dapat diperoleh dengan membuat kurva antara *shearing stress* (F/A) terhadap *rate of shear* (dv/dr).

Pengukuran Bobot Jenis. Bobot jenis diukur menggunakan piknometer. Pada suhu ruang, piknometer bersih dan kering ditimbang (A g). Selanjutnya, piknometer diisi dengan air dan ditimbang (A1 g). Air dikeluarkan dari piknometer dan piknometer dibersihkan. Nanoemulsi diisikan ke dalam piknometer dan ditimbang (A2 g). Bobot jenis nanoemulsi diukur dengan persamaan di bawah ini :

$$\text{Bobot jenis} = \frac{A2-A}{A1-A} \times 1 \text{ g/ml}$$

Pemeriksaan Tipe Nanoemulsi. Pemeriksaan tipe nanoemulsi dilakukan dengan menaburkan zat warna larut air yaitu biru metilen pada permukaan nanoemulsi di atas kaca objek dan diamati di bawah mikroskop optik. Jika nanoemulsi merupakan tipe minyak dalam air maka zat warna biru metilen akan melarut di dalamnya dan berdifusi merata ke seluruh bagian dari air. Jika nanoemulsi merupakan tipe air dalam minyak maka partikel-partikel zat warna biru metilen akan bergerombol pada permukaannya

Distribusi Ukuran Globul. Ukuran globul nanoemulsi diukur dengan menggunakan alat Zetasizer Nano S (Malvern). Sampel nanoemulsi sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 100 g ultra *pure water* di dalam *beaker glass* atau labu ukur. Sejumlah 10 mL larutan tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam kuvet. Kuvet yang digunakan harus bersih dari busa dan lemak. Jika terdapat lemak, kuvet dibersihkan dengan toluene atau pelarut lain yang dapat melarutkan lemak. Kuvet yang telah diisi sampel dimasukkan ke dalam *sample holder*. Alat dinyalakan dan dipilih menu *particle size*. Alat akan mengukur sampel selama 15 menit. Setelah 15 menit, alat akan menghasilkan ukuran globul dan kurva distribusi. Kuvet harus dibersihkan kembali dan bebas lemak.

Morfologi Sediaan. Morfologi sediaan diukur menggunakan *Transmission Electron Microscopy* (TEM). Preparasi sampel dilakukan dengan cara mencampurkan sampel dengan satu droplet dari 2% (b/v) larutan uranil asetat. Lalu diaduk sampai homogen kemudian diteteskan diatas *cooper grid*, ditunggu hingga kering kemudian dianalisis dengan TEM.

Uji Stabilitas Fisik Nanoemulsi Genistein. Uji stabilitas fisik nanoemulsi genistein dilakukan pada tiga suhu berbeda. Yang pertama uji stabilitas pada suhu tinggi meliputi bau, warna dan pH dievaluasi pada suhu 40 °C±2 °C selama 12 minggu dengan

pengamatan setiap 2 minggu sekali. Kedua, uji stabilitas pada suhu kamar yang meliputi bau, warna, dan pH dievaluasi pada suhu (28±2 °C) selama 12 minggu dan dengan pengamatan setiap 2 minggu sekali. Dan yang ketiga adalah uji stabilitas pada suhu rendah meliputi bau, warna dan pH dievaluasi pada suhu 4-8 °C selama 12 minggu dengan pengamatan setiap 2 minggu sekali. Untuk uji stabilitas dengan metode *Cycling test*, dilakukan dengan menyimpan sediaan pada suhu 4 °C selama 24 jam lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu 40 °C selama 24 jam. Perlakuan ini adalah satu siklus. Percobaan diulang sebanyak 6 siklus. Kondisi fisik sediaan dibandingkan selama percobaan dengan sediaan sebelumnya, apakah terjadi sineresis atau kristalisasi.

Uji penetrasi *In Vitro*. Untuk uji penetrasi secara *In Vitro*, pelarut yang digunakan adalah larutan dapar fosfat. Pembuatan larutan dapar fosfat menggunakan Kalium dihidrogen fosfat 0,2 M sebanyak 50,0 mL dimasukkan ke dalam labu tentukur 200,0 mL lalu ditambahkan 39,1 mL natrium hidroksida 0,2 N dan dicukupkan volumenya dengan air destilasi bebas karbondioksida, kemudian pH dapar dicek pada nilai 7,4⁽⁹⁾.

Kemudian dilakukan penyiapan kulit tikus sebagai membran difusi. Membran yang digunakan adalah membran abdomen kulit tikus jantan usia 8 minggu dengan berat ±200-250 g. Tikus dikorbkan dengan cara dianestesi menggunakan injeksi intraperitoneal uretan dosis berlebih lalu bulu tikus pada bagian abdominal dicukur hati-hati menggunakan pisau cukur. Kemudian kulit tikus pada bagian perut disayat dan lemak-lemak pada bagian subkutan yang menempel dihilangkan secara hati-hati dan hasil sayatan tersebut direndam dalam medium yang akan digunakan selama 30 menit kemudian disimpan dalam suhu 4 °C. Kulit dapat digunakan pada rentang waktu 24 jam.

Uji penetrasi *in vitro* ini dilakukan dengan mengikuti dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Silva *et al.* dengan sedikit modifikasi. Permeabilitas perkutan dari genistein ditentukan dengan menggunakan sel difusi Franz, dimana luas permukaan difusi adalah 1,77 cm² dan volume kompartemen reseptor adalah 13,0 mL. Kulit abdomen tikus diletakkan diantara kompartemen donor dan kompartemen reseptor dengan sisi dermal berhubungan langsung dengan medium reseptor. Kulit kemudian dihidrasi dengan dapar fosfat (pH 7,4) selama 12 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu, dapar fosfat dimasukkan dalam kompartemen reseptor. Larutan dalam *water bath* dijaga pada suhu yang dikontrol yakni (37 ± 1,0 °C). Jumlah sampel setara 1 mg genistein diaplikasikan pada kompartemen donor. Kemudian sampel diambil sebanyak 0,5 mL pada

interval waktu tertentu (menit ke-15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 dan 480) dari kompartemen reseptor dengan menggunakan pipet mikro kemudian larutan kompartemen segera ditambahkan sejumlah volume yang sama dengan volume yang diambil. Larutan yang sudah diambil kemudian dimasukkan ke dalam tabung sampel lalu dianalisis menggunakan KCKT.

Penetapan Kadar Genistein dalam Nanoemulsi⁽¹⁰⁾. Pembuatan Kurva Kalibrasi. Ditimbang seksama 5 mg genistein baku kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur hingga 10,0 mL, maka diperoleh larutan 500 ppm. Dari larutan tersebut dipipet 1,0 mL dan diencerkan dengan metanol dalam labu ukur hingga volume 50,0 mL, maka diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan induk (100 ppm) dipipet dan diencerkan dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; dan 15,0 ppm. Sebelum pengukuran, larutan disentrifugasi selama 1 menit pada 5.000 rpm dan disaring dengan filter membran 0,45 µm kemudian diambil masing-masing 30,00 µL dan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT dengan kolom C18, menggunakan fase gerak isokratis metanol : 2% asam asetat dengan kecepatan 1,0 mL/min dan detektor UV pada panjang gelombang 270 nm.

Penetapan Kadar Genistein dalam Sampel Kompartemen Reseptor. Sampel 0,5 mL yang diambil dari kompartemen reseptor pada tiap-tiap jam pengambilan dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan dicukupkan volumenya dengan metanol hingga 5,0 mL. Larutan disentrifugasi selama 1 menit pada 5.000 rpm dan disaring dengan filter membran 0,45 µm kemudian diambil 30,00 µL dan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT dengan kolom C18, menggunakan fase gerak isokratis metanol : 2% asam asetat dengan kecepatan 1,0 mL/min dan detektor UV pada panjang gelombang 270 nm.

Kadar Kumulatif. Kadar kumulatif genistein yang diperoleh dibuat grafik antara jumlah genistein per satuan waktu terhadap waktu pengambilan sampel. Kemudian dapat dihitung jumlah kumulatif genistein yang terpenetrasi per satuan luas permukaan membran dengan rumus berikut :

$$Q = \{C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i S\} / A$$

Keterangan:

Q = Jumlah kumulatif genistein per satuan luas permukaan membran (µg/cm²)

C_n = Konsentrasi genistein (µg/mL) pada tiap pengambilan sampel

V = Volume sel difusi Franz (µL)

V_s = Volume sampel (µL)

$\sum_{i=1}^{n-1} C_i$ = Jumlah konsentrasi genistein (µg/mL) tiap sampel mulai dari 1 sampai dengan n-1
S = Volume sampel, yaitu 0,5 mL
A = luas permukaan membran, yaitu 1,77 cm²

Fluks dihitung dari kemiringan grafik pada kondisi *steady state* atau dilakukan perhitungan fluks berdasarkan Hukum Fick's.

$$J = \frac{M}{S.t}$$

Keterangan:

J = Fluks pada kondisi tunak (µg cm⁻² jam⁻¹)

S = Luas area difusi (cm²)

M = Jumlah kumulatif genistein yang terpenetrasi (µg)

t = Waktu (jam)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang diperoleh saat karakterisasi ketiga formula sediaan nanoemulsi genistein, untuk pengukuran pH memberikan hasil yang bervariasi. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh variasi komposisi lesitin soya yang digunakan. Tingkat keasaman (pH) diukur dengan pH meter. Sediaan topikal sebaiknya berada dalam kisaran pH kulit, yaitu antara 4,5 – 6,5. Nilai pH tidak boleh terlalu asam karena dapat mengiritasi kulit dan juga tidak boleh terlalu basa karena dapat menyebabkan kulit bersisik, hal ini disebabkan adanya kerusakan mantel pada lapisan stratum korneum kulit. Nilai pH dari ketiga formula dapat dilihat dalam Tabel 1.

Tabel 1. Pengukuran pH tiap formula saat minggu ke-0

Formula	pH
F1	6,27
F2	6,13
F3	6,09

Nilai viskositas dari ketiga formula sediaan nanoemulsi genistein diukur menggunakan Viskometer Brookfield. Viskositas dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah faktor pencampuran atau pengadukan saat proses pembuatan sediaan, pemilihan zat pengental dan surfaktan. Dari ketiga formula menghasilkan viskositas yang bervariasi walaupun perbedaannya tidak terlalu besar. Hasil pengukuran viskositas dari ketiga formula nanoemulsi genistein setelah selesai dibuat dapat dilihat dalam Tabel 2.

Pada pengukuran bobot jenis menggunakan piknometer, ketiga formula menunjukkan hasil yang bervariasi. Formula 3 memiliki bobot jenis yang paling besar dibandingkan formula 1 dan formula 2. Hal ini

Tabel 2. Pengukuran viskositas tiap formula saat minggu ke-0.

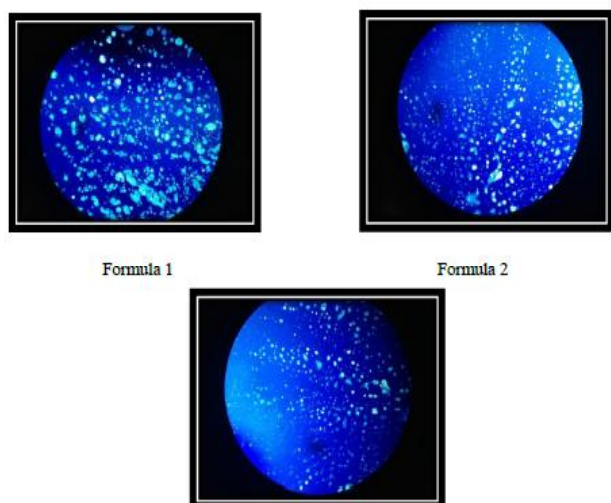
Formula	pH
F1	62,0 cps
F2	56,3 cps
F3	43,3 cps

Tabel 3. Hasil pengukuran bobot jenis.

Formula	Bobot jenis (g/ml)
F1	0,9999
F2	1,0003
F3	1,0008

kemungkinan disebabkan karena komposisi surfaktan (Lesitin) dalam formula 3 lebih banyak daripada formula 1 dan formula 2. Hasil pengukuran bobot jenis dari ketiga formula dapat dilihat pada Tabel 3.

Pada pemeriksaan tipe nanoemulsi dilakukan dengan menaburkan zat warna larut air metilen biru pada tiap formula lalu dilihat dibawah mikroskop optik. Setelah diamati, metilen biru tersebut terdispersi merata ke dalam sediaan, yakni ke seluruh bagian air. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga sediaan memiliki tipe nanoemulsi minyak dalam air (m/a). Hasil tersebut sesuai dengan yang diinginkan, karena metode yang digunakan juga sesuai untuk pembentukan tipe nanoemulsi m/a. Untuk sediaan topikal nanoemulsi tipe m/a mudah dihilangkan dari kulit jika telah digunakan. Terbentuknya tipe nanoemulsi m/a disebabkan sebagian besar komponen yang terdapat dalam formula bersifat hidrofilik atau polar sehingga walaupun terdapat komponen yang bersifat hidrofob, tipe nanoemulsi dari ketiga formula adalah nanoemulsi minyak dalam air. Hasil pemeriksaan tipe nanoemulsi dari ketiga formula dapat dilihat pada Gambar 1.

**Gambar 1. Pemeriksaan Tipe Nanoemulsi**

Untuk pengukuran distribusi ukuran partikel masing-masing formula dilakukan menggunakan alat *Zetasizer Nano* dari Malvern. Distribusi ukuran partikel dinyatakan dalam indeks polidispersitas. Rentang indeks polidispersitas berada diantara 0 sampai dengan 1 nilai indeks polidispersitas mendekati 0 menunjukkan dispersi yang homogen. Sedangkan indeks polidispersitas dengan nilai lebih dari 0,5 menunjukkan heterogenitas yang tinggi⁽¹¹⁾. Pengukuran distribusi ukuran partikel dilakukan 2 hari setelah sediaan dibuat dan hasilnya menunjukkan bahwa tiap formula memiliki ukuran partikel yang bervariasi. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Indeks Polidispersitas, Distribusi ukuran partikel dan Potensial Zeta

Formula	Indeks polidispersitas	Distribusi ukuran partikel (<i>Z-average</i>)	Potensial Zeta
F1	0,615	312,9 nm	-26,0
F2	0,546	263,4 nm	-28,3
F3	0,171	191,7 nm	-47,5

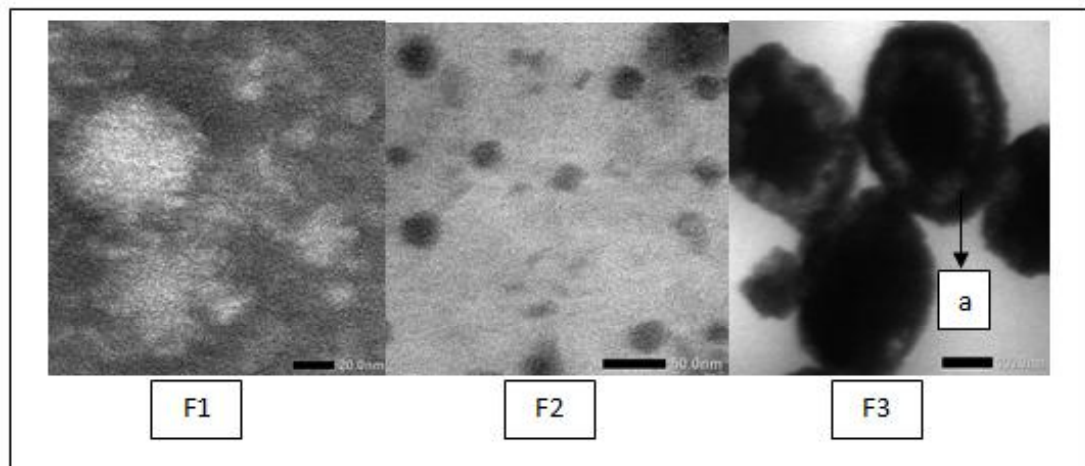
Dari ketiga formula, seluruhnya sudah menunjukkan hasil dalam rentang ukuran nano partikel tetapi untuk indeks polidispersitasnya hanya formula 3 yang nilainya dibawah 0,5. Formula 1 menghasilkan ukuran partikel sebesar 312,9 nm dengan indeks polidispersitas 0,615, formula 2 menghasilkan ukuran partikel sebesar 263,4 nm dengan indeks polidispersitas 0,543 dan formula 3 menghasilkan ukuran partikel sebesar 191,7 nm dengan indeks polidispersitas 0,171. Dari hasil tersebut terlihat bahwa formula 3 memiliki ukuran partikel yang lebih kecil dan lebih homogen distribusi partikelnya dibandingkan formula 1 dan 2. Jika dihubungkan dengan besarnya konsentrasi lesitin dalam tiap formula maka dapat disimpulkan bahwa terjadi penurunan ukuran partikel dengan meningkatnya konsentrasi lesitin yang digunakan. Hal ini mungkin terjadi karena konsentrasi lesitin yang lebih besar dalam formula 3 dapat menjaga partikel dari aglomerasi sehingga ukuran partikelnya lebih kecil dan lebih homogen dari formula 1 dan 2.

Selain ukuran partikel, potensial zeta merupakan salah satu karakteristik nanoemulsi yang penting. Alasan utama melakukan pengujian potensial zeta adalah untuk memprediksi kestabilan larutan koloid. Interaksi antara partikel memegang peranan penting dalam kestabilan larutan koloid. Potensial zeta adalah nilai yang menunjukkan gaya tolak-menolak antara partikel-partikel. Sistem larutan koloid distabilkan oleh adanya gaya tolak-menolak elektrostatis. Semakin besar gaya tolak-menolak antar partikel, akan menyebabkan partikel sulit berdekatan untuk membentuk agregat. Partikel dengan potensial zeta lebih positif dari +30mV atau lebih negatif dari -30mV

dianggap stabil⁽¹²⁾.

Pada hasil pengukuran potensial zeta, nanoemulsi formula 1 memiliki nilai potensial zeta sebesar -26 mV, formula 2 sebesar -28,3 mV dan formula 3 sebesar -47,5 mV. Nilai tersebut menunjukkan bahwa formula 3 memiliki nilai potensial zeta yang lebih besar dan lebih negatif dari -30 mV sehingga formula 3 dianggap lebih stabil. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh konsentrasi lesitin dalam formula 3 yang lebih besar dari formula 1 dan 2 sehingga mempengaruhi besarnya muatan elektrostatis yang ada di permukaan partikel.

Mikroskop transmisi elektron (*Transmission Electron Microscope*) digunakan untuk menguji morfologi nanoemulsi dan konfirmasi ukuran partikel yang dihasilkan dari pengukuran distribusi ukuran partikel⁽¹¹⁾. Hasil morfologi nanoemulsi dari ketiga formula dengan perbesaran yang sama menunjukkan morfologi sediaan untuk formula 3 berbentuk sferis sedangkan formula 1 dan 2 belum cukup sferis. Hasil ini dapat dilihat pada Gambar 2



Gambar 2. Morfologi sediaan nanoemulsi genistein (ket : Perbesaran gambar sebesar 40.000 kali ; Formula 1 ; F2 = Formula 2 ; F3 = Formula 3, a = morfologi partikel nanoemulsi bentuk sferis).

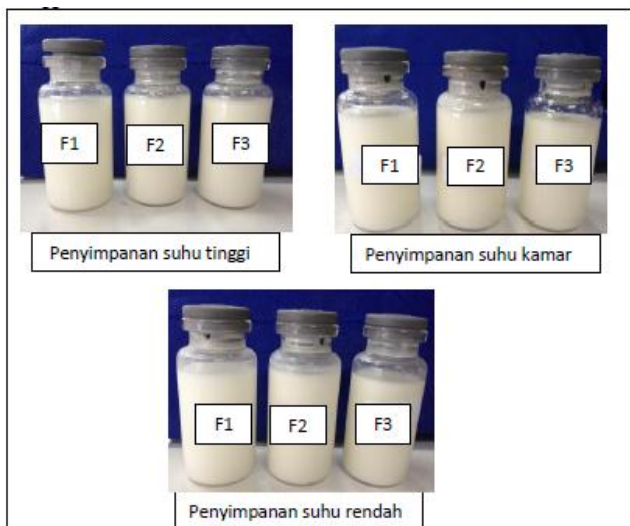
Uji Stabilitas Fisik Nanoemulsi Genistein. Hasil pengamatan organoleptis dari ketiga formula selama dilakukan penyimpanan pada suhu rendah, suhu kamar dan suhu tinggi menunjukkan warna yang tetap seperti awal sediaan dibuat yaitu putih susu, dengan bau khas lesitin soya. Sedangkan untuk homogenitasnya terlihat formula 1 dan 2 mengalami perubahan pada penampilan fisik yakni mulai menunjukkan lapisan minyak yang berada pada bagian atas sediaan untuk penyimpanan pada suhu kamar (28 ± 2 °C) dan suhu tinggi (40 ± 2 °C) saat pengamatan minggu ke-8, sedangkan formula 3 sudah menunjukkan lapisan minyak pada suhu tinggi saat pengamatan minggu ke-6. Hasil dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4. Hal ini kemungkinan dikarenakan oleh konsentrasi lesitin yang lebih banyak sehingga saat disimpan pada suhu kamar dan suhu tinggi, lesitin yang ada dalam

formula 3 mulai teroksidasi dan terpisah membentuk lapisan minyak. Adapun untuk penyimpanan suhu rendah (4 ± 2 °C) ketiga formula stabil tetap homogen sampai minggu ke-12. Hal ini dapat dijadikan acuan untuk suhu penyimpanan nanoemulsi tersebut sebaiknya berada di suhu rendah (4 ± 2 °C).

Untuk hasil pengukuran pH selama masa penyimpanan pada tiga kondisi suhu yang berbeda, ketiga formula mengalami perubahan pH yang fluktuatif. Namun dari perubahan tersebut, ketiganya masih menunjukkan kestabilan pH untuk aplikasi melalui kulit. pH untuk sediaan kulit berkisar antara 4,5 – 6,5. Dari ketiga formula terlihat bahwa untuk penyimpanan di suhu rendah (4 ± 2 °C), suhu kamar (28 ± 2 °C) dan suhu tinggi (40 ± 2 °C), formula 3 menunjukkan perubahan pH yang cukup stabil. Berbeda dengan formula 1 dan formula 2 yang cenderung naik turun. Hasil dapat dilihat pada Gambar 5.

Pengukuran viskositas dilakukan pada minggu ke-0 dan ke-12 untuk ketiga formula sediaan yang disimpan pada suhu kamar dengan viskometer Brookfield menggunakan spindel 1. Saat minggu ke-0 awal sediaan dibuat, viskositasnya berturut-turut adalah untuk formula 1 sebesar 62 cps, formula 2 sebesar 56,3 cps dan formula 3 sebesar 43,3 cps. Setelah penyimpanan selama 12 minggu, terjadi penurunan viskositas menjadi 58,9 cps untuk formula 1, kemudian 44,4 cps untuk formula 2 dan 38,1 cps untuk formula 3. Terjadinya penurunan viskositas setelah penyimpanan 12 minggu menandakan adanya penurunan tegangan permukaan dari sediaan, hal ini dapat mengakibatkan penurunan stabilitas dari sediaan tersebut. Profil perubahan viskositas dapat dilihat pada Gambar 6.

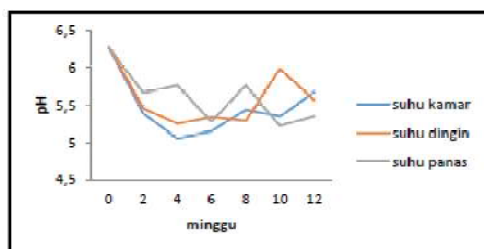
Selain penyimpanan pada tiga kondisi suhu yang



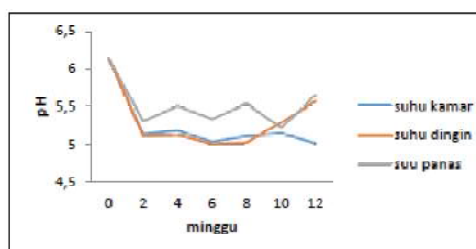
Gambar 3. Hasil Uji Stabilitas pada minggu ke-6.



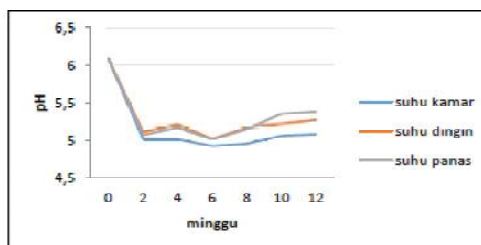
Gambar 4. Hasil Uji Stabilitas pada minggu ke-8.



Formula 1



Formula 2



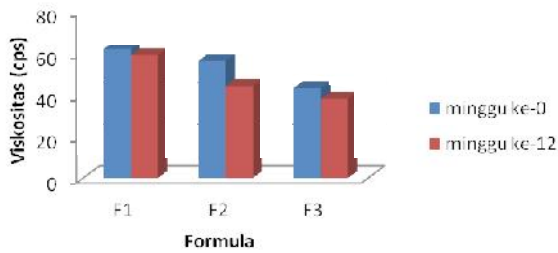
Formula 3

Gambar 5. Profil pH Nanoemulsi genistein pada berbagai suhu.

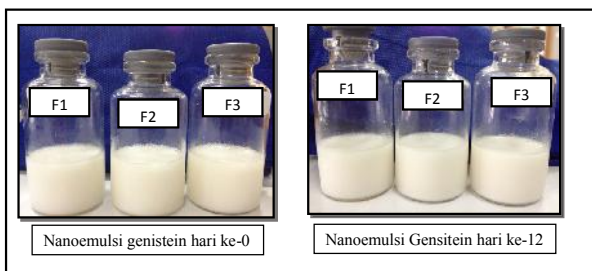
berbeda, pada ketiga formula juga dilakukan uji *cycling test*. Ketiga formula disimpan pada suhu 4 °C selama 24 jam lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu 40 °C selama 24 jam. Pengujian ini dilakukan dengan membandingkan kondisi fisik ketiga formula saat sebelum dan setelah dilakukan pengujian. Hasil yang diperoleh adalah ketiga formula tidak menunjukkan adanya pemisahan fase maupun pengkristalan. Ketiga formula stabil selama 12 hari pengujian *cycling test*. Hasil dapat dilihat pada Gambar 7.

Penelitian uji penetrasi ini telah mendapatkan surat keterangan lolos kaji etik (ethical approval) Nomor 814/UN2.F1/ETIK/2015 dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo.

Uji penetrasi dilakukan secara *in vitro* menggunakan sel difusi Franz. Pengujian dilakukan untuk mengetahui jumlah genistein yang dapat berpenetrasi ke dalam kulit selama kurun waktu 8 jam. Membran yang digunakan pada penelitian ini adalah membran dari kulit abdomen tikus putih betina galur *Sprague-Dawley* yang berumur 2-3 bulan dengan berat 150-200 g dengan luas membran 1,77 cm². Alasan digunakan kulit tikus sebagai membran adalah kulit tikus lebih mudah didapatkan dibandingkan kulit manusia dan memiliki permeabilitas yang mirip dengan manusia walaupun tetap lebih besar dibandingkan manusia. Koefisien permeabilitas kulit manusia sebesar 92,27 cm/jam x 10⁵, sedangkan kulit tikus yang sudah dicukur bulunya memiliki koefisien



Gambar 6. Profil perubahan viskositas setelah penyimpanan 12 minggu.



Gambar 7. Hasil stabilitas cycling test.

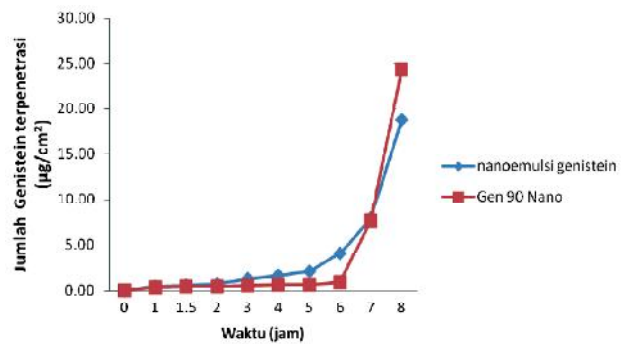
permeabilitas sebesar $103,08 \text{ cm/jam} \times 10^5$.

Tahapan pertama mengambil kulit tikus adalah tikus dibius kemudian rambut tikus di permukaan abdomen dibersihkan sampai tidak ada sisa-sisa lemak pada kulit tersebut. Kulit tikus tidak boleh robek atau lubang sedikitpun karena akan mempengaruhi hasil penetrasi. Kulit tersebut kemudian dihidrasi dalam dapar fosfat pH 7,4 dengan tujuan untuk mengembalikan kulit ke kondisi semula sebelum disimpan dalam lemari pendingin. Medium reseptor yang digunakan untuk uji penetrasi ini adalah dapar fosfat pH 7,4 karena larutan ini menggambarkan cairan fisiologis tubuh. Suhu yang digunakan selama proses difusi adalah 37°C . Suhu ini mirip dengan suhu tubuh normal manusia. Suhu harus dijaga konstan karena perubahan suhu akan mempengaruhi penetrasi zat aktif dari sediaan tersebut.

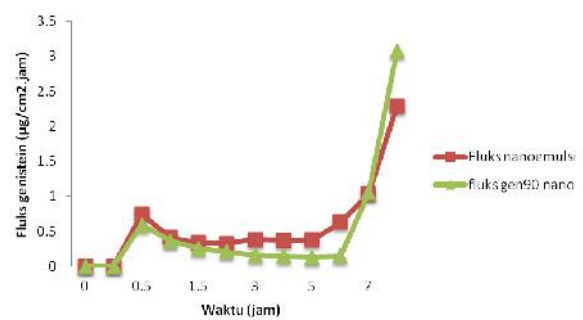
Penetrasi genistein melalui membran kulit tikus selama 8 jam dari sediaan Nanoemulsi Genistein dan Gen90 Nano berturut-turut ialah $18,29 \pm 0,16 \text{ (}\mu\text{g/cm}^2\text{)}$ dan $24,60 \pm 0,58 \text{ (}\mu\text{g/cm}^2\text{)}$. Dari hasil tersebut, terlihat bahwa genistein dalam sediaan Gen90 Nano memiliki jumlah penetrasi kumulatif yang lebih besar dibandingkan Nanoemulsi genistein. Hal ini kemungkinan disebabkan karena Gen90 Nano merupakan produk paten yang teknologi pembuatannya lebih baik dibanding nanoemulsi genistein dalam skala laboratorium, selain itu sediaan Gen90 nano merupakan kompleks inklusi dengan hidroksipropil siklodekstrin (HPCD). Siklodekstrin memiliki bentuk toroidal dengan dimensi rongga bagian dalam bersifat hidrofobik dan bagian luar

bersifat hidrofilik sehingga dapat membentuk kompleks yang kokoh dengan obat di bagian dalam rongganya sehingga pelepasan obatnya dapat diatur sedemikian rupa⁽¹³⁾. Siklodekstrin mempunyai berbagai macam ukuran cincin yang membentuk kompleks dengan obat untuk meningkatkan kelarutannya dan/atau stabilitasnya. Sebagai tambahan mengenai ukuran cincin, siklodekstrin telah dimodifikasi pada gugus gula hidroksil dengan gugus non polar dan polar seperti dimetil, hidroksialkil atau glukosida. Derajat substitusi dapat juga mempengaruhi ukuran dan bentuk cincin yang menyebabkan kompleks dengan obat⁽¹³⁾.

Sedangkan untuk fluks genistein dalam nanoemulsi genistein sebesar $2,28 \pm 0,02 \text{ (}\mu\text{g/cm}^2\text{.jam)}$, dalam Gen90 Nano sebesar $3,07 \pm 0,05 \text{ (}\mu\text{g/cm}^2\text{.jam)}$. Hal ini menunjukkan kecepatan pelepasan obat dari Gen90 Nano juga lebih besar daripada kecepatan pelepasan



Gambar 8. Jumlah kumulatif penetrasi selama 8 jam Genistein dalam Nanoemulsi Genistein dan gen90Nano



Gambar 9. Fluks genistein dari sediaan nanoemulsi genistein dan sediaan Gen90 Nano

obat dari nanoemulsi.

Jumlah kumulatif dan fluks genistein yang terpenetrasi pada masing-masing sediaan dapat dilihat dalam Gambar 8 dan 9.

SIMPULAN

Formulasi nanoemulsi genistein dengan perbandingan komposisi antara lesitin dan genistein sebesar 2,5 : 0,1 dapat menghasilkan sediaan nanoemulsi yang stabil

selama 12 minggu pada penyimpanan suhu rendah dan mampu berpenetrasi secara in-vitro melalui sel difusi Franz. Adanya kemampuan penetrasi dari Nanoemulsi Genistein ini membuktikan bahwa genistein yang diformulasi menjadi sediaan topikal nanoemulsi berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan baku sediaan kosmetik.

DAFTAR PUSTAKA

- Schmid D, Zulli F. Topically applied soy isoflavones increase skin thickness. *Cosmet Toilet*. 2002. 118 (9):71-4.
- Hiipakka RA, Zhang HZ, Dai W, Dai Q, Liao S. Structure-activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 2002. 63:1165-76.
- Daruhazi AE, Kiss T, Vecsernye M, Szente L, Szoke E, Lemberkovics E. Investigation of transport of genistein, daidzein and their inclusion complexes prepared with different cyclodextrins on Caco-2 cell line. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013. 84:112-6.
- Si Hy, Li DP, Wang TM. Improving the antitumor effect of genistein with a biocompatible superparamagnet drug delivery system. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010. 10:2325-31.
- Piemi MPY, Korner D, Benita S, Marty JP. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *J Control Release*. 1999. 58:177-87.
- Marti-Mestres G, Ramos J, Maillols H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of "in vitro" and "in vivo" skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. *J Pharm Biomed Anal*. 2000. 24: 155-65.
- Alves MP, Pohlmann AR, Guterres SS. Semisolid topical formulation containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion development and rheological characterization. *Pharmazie*. 2005. 60: 900-4.
- Fasolo D, Schwingel L, Holzschuh M, Bassani V, Teixeira H. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. *J Pharm Biomed Ana*. 2007. 44: 1174-77.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan. 2005.
- Silva APC, Koester LS, Mayorga P, Bassani VL, Teixeira H. Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. *Pharmazie*. 2007. 62: 732-4.
- Avadi MR, Assal MMS, Nasser M, Saideh A, Fatemeh A, Rassoul D, Morteza, R. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biologi and Medicine*. 2010. 6:58-63.
- Malvern. *DLS Measurement principles. Zeta Potential Theory*. 2011. Chapter 13:1-4.
- Anwar, E. *Eksipien dalam sediaan farmasi, karakterisasi dan aplikasi*. PT. Dian Rakyat. Jakarta. 2012.