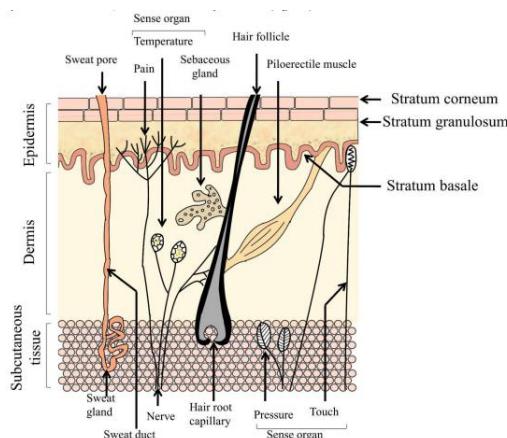


BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Anatomi Dan Fisiologi Kulit

2.1.1 Definisi Kulit

Kulit sebagai organ terbesar yang menutupi hampir 10% dari total massa tubuh dengan luas permukaan 1,8-2 m² pada orang dewasa (Xu and Li, 2019; You *et al.*, 2017). pH pada organ manusia dalam darah dan epitel, organ penghalang berkisar dengan rentan pH 1-8 (Proksch, 2018). Fungsi utama kulit sebagai pembatas antara tubuh dan lingkungan luar yang mampu melindungi terhadap perembesan radiasi ultraviolet (UV), bahan kimia, alergen dan mikroorganisme, juga hilangnya kelembaban dan nutrisi tubuh. Lapisan kulit terdiri dari; epidermis, dermis, dan hypodermis (Gilaberte *et al.*, 2016).



Gambar 2 1 Struktur kulit manusia
(Haque and Talukder, 2018).

Fungsi Kulit yaitu:

- Kulit bertindak sebagai proteksi** pertahanan terhadap lingkungan luar, seperti tekanan mekanis, zat dan agen beracun (Gilaberte *et al.*, 2016; Nafisi and Maibach, 2018)
- Kulit mencegah terjadinya dehidrasi** berlebihan pada kulit. Hal ini karena pengemasan sel yang ketat pada lapisan terluar stratum korneum (Haque and Talukder, 2018)
- Kulit melindungi tubuh dari UV** di lapisan basal epidermis terdapat melanin yang mampu menghilangkan 99,9% dari radiasi UV yang diserap (Gilaberte *et al.*, 2016; Nafisi and Maibach, 2018)
- Kulit melindungi dari infeksi.** Lapisan tipis minyak sebagai lapisan penutup kuli dan kelembaban guna mencegah sebagian besar zat atau mikroorganisme yang tidak diinginkan (seperti bakteri, virus, dan jamur) masuk ke dalam kulit (Nafisi and Maibach, 2018).

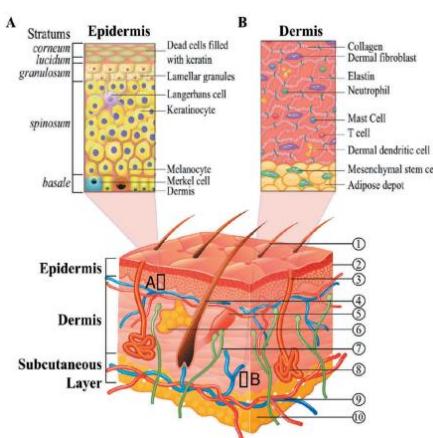
e. Mengontrol suhu tubuh melalui kelenjar keringat dan pembuluh darah di dermis.

Setelah suhu tubuh menurun, pengeluaran uap yang meningkat dengan keluarnya keringat membantu menjaga suhu tubuh (Gilaberte *et al.*, 2016; Nafisi and Maibach, 2018)

2.1.2 Struktur lapisan kulit

a) Epidermis dan Dermis

Epidermis merupakan lapisan terluar dari kulit, lapisan kulit dibagi menjadi beberapa lapisan yaitu; *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum*, dan *stratum germinativum*. Sel-sel stratum korneum (SC) disebut korneosit. Sel-sel ini padat, mati secara fungsional, berinti, dan diisi dengan keratin (Patel *et al.*, 2018). Ketebalan total epidermis berkisar 0,5 mm sampai 1,5 mm. Epidermis membentuk struktur lain seperti kuku, kelenjar keringat, dan unit pilosebaceous (Gilaberte *et al.*, 2016)



Gambar 2. 2 Struktur kulit,
(a) lapisan epidermis dan (b) lapisan dermis (Patel *et al.*, 2018)

Lapisan dermis terdiri dari jaringan ikat padat. Ketebalannya sekitar 2 – 5 mm dan terdiri dari serat kolagen dan gel inter fibrilar glikosaminoglikan, garam & air dan jaringan ikat elastis yang memberikan elastisitas dan fleksibilitas. Dengan adanya struktur ini maka, dermis memberikan sedikit penghalang untuk permeasi sebagian besar obat, tetapi dapat mengurangi perembesan ke jaringan yang lebih dalam dari obat yang sangat lipofilik.

Kolagen merupakan protein fibrilar sebagai zat pengisi kulit yang bertanggung jawab atas stabilitas dan kekuatan jaringan tubuh dengan membuat jaringan pendukung di sepanjang struktur seluler, sehingga membuat kulit menjadi kencang. Produksi kolagen semakin berkurang seiring bertambahnya usia sehingga mengakibatkan kulit

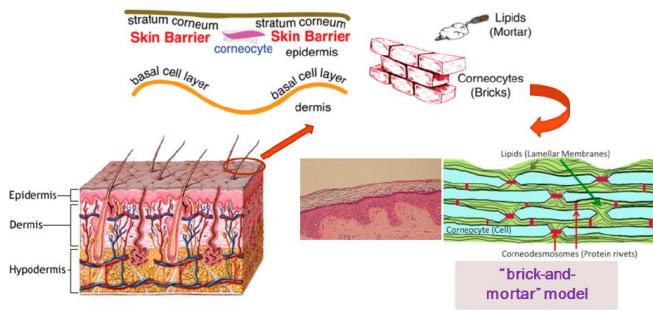
menjadi kering dan berkerut. Kolagen tipe I dan II bertanggung jawab terhadap 75% dari berat kering dermis. Struktur pelengkap lain yang berasal dari dalam dermis, seperti pembuluh darah dan getah bening, ujung saraf, folikel rambut, kelenjar sebaceous, dan kelenjar keringat. Di dalam dermis terdapat jaringan vaskular yang luas yang berfungsi sebagai pengatur suhu tubuh, menyediakan oksigen dan nutrisi untuk menghilangkan racun dan produk limbah dari jaringan, memfasilitasi respon imun dan perbaikan luka (Gilaberte *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2018; Ruela *et al.*, 2016).

b) Hipodemis

Hipodermis biasa disebut jaringan subkutan, yang sering dianggap sebagai organ endokrin memiliki fungsi utama yaitu, sebagai insulasi panas dan perlindungan terhadap sentuhan/gesekan, menyediakan penyimpanan energi yang dapat tersedia saat dibutuhkan. Pembuluh darah dan saraf terhubung ke kulit melalui hipodermis (Gilaberte *et al.*, 2016; Krug *et al.*, 2005). Hipodermik dibentuk oleh jaringan adiposit, yang tersusun menjadi lobulus, dibatasi oleh jaringan ikat fibrosa. Adiponektik adalah mediator spesifik adiposit subkutan (Gilaberte *et al.*, 2016).

c) Stratum Corneum (SC)

Stratum Corneum (SC) terdiri dari 10 – 20 μm kepadatannya tinggi dan lapisan sel hidrasi rendah. *Stratum Corneum* (SC) memiliki struktur heterogen dan terdiri dari 70% - 80% protein (keratin) dan 20% lipid di dalam selubung sel kornifikasi (Haque and Talukder, 2018; Krug *et al.*, 2005). Susunan *Stratum Corneum* (SC) dianalogikan dengan “*Brick and mortar model*” yaitu “*dinding yang terdiri dari batu bata dan mortar*” dimana korneosit sebagai batu bata, sedangkan lipid intraseluler sebagai mortar (Ruela *et al.*, 2016). Of filaggrin dan jaringan padat makrofibril keratin, merupakan protein yang membantu menjaga kulit tetap terhidrasi dengan mencegah penguapan dan penyerapan air. Matriks lipid antar sel *Stratum Corneum* (SC) sangat penting untuk menjaga fungsi sawar kulit dan mencegah kehilangan air secara transepidermal. Sambungan ketat yang melekat pada dinding lateral keratinosit di *stratum granulosum* telah menghadirkan penghalang fungsional sekunder di kulit (Kahraman *et al.*, 2019).

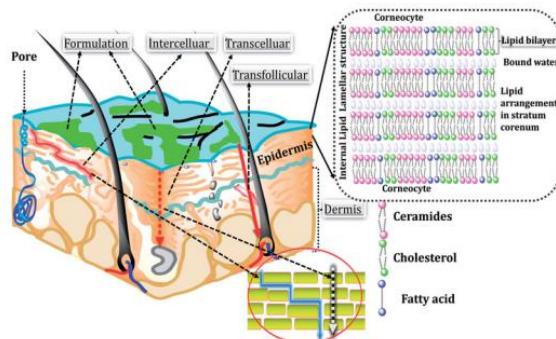


Gambar 2. 3 Struktur Stratum Corneum(SC)

2.1.3 Rute Penetrasi Obat di kulit

Molekul obat akan meresap ke dalam kulit jika memiliki sifat fisikokimia yang menguntungkan, seperti ukurannya < 500 Da, tidak bermuatan, dan cukup lipofilik, dengan log P antara 1 dan 3 (Dragicevic and Maibach, 2016). pH stratum korneum berkisar 4,1–5,8 (Proksch, 2018). pH asam stratum korneum dianggap sebagai penghalang antimikroba yang mencegah kolonisasi. Kemudian, ditemukan bahwa pH mempengaruhi fungsi sawar kulit, sintesis dan agregasi lipid, diferensiasi epidermal dan deskuamasi. Obat terlarut dapat berdifusi melalui kulit melewati dua rute utama: rute transappendageal, transepidermal. Rute transappendageal memungkinkan zat untuk dibawa melalui folikel rambut, melewati kelenjar sebasea dan kelenjar keringat. Rute penetrasi *Stratum Corneum* (SC) berdifusi secara transepidermal. Perjalanan molekul obat melalui keratinosit (seperti sel-sel di epidermis) disebut intraselular, sedangkan pada rute interseluler obat lipofilik dibawa ke korneosit menuju daerah ekstraselular yang kaya matriks lipid (Dragicevic and Maibach, 2016; Haque and Talukder, 2018)

Keuntungan dari pengiriman kulit melewati metabolisme hati, menghindari efek samping terkait dengan pengiriman obat oral yang bekerja pada kulit, penghapusan obat mudah dalam kasus overdosis, pelepasan obat berkelanjutan, dan kepatuhan pasien. Molekul obat harus menempuh jalur sekitar 400 μm untuk melintasi *Stratum Corneum* (SC) sehingga mengurangi laju perembesan obat melalui kulit. Menjadi hidrofilik, saluran mikro ini menciptakan resistensi untuk penetrasi molekul lipofilik (Haque and Talukder, 2018; Patel *et al.*, 2018; Smith and Maibach, 2005). Beberapa penelitian yang dilakukan untuk memungkinkan pengiriman melalui kulit menyebabkan penggunaan metode yang berbeda termasuk dalam peningkatan penetrasi seperti *iontophoresis*, *elektroporasi*, *fonophoresis*, dan *mikroporasi*. Peningkat penetrasi bahan kimia bekerja dengan mengganggu struktur membran kulit (Dragicevic and Maibach, 2016).



Gambar 2. 4 (a) Jalur permeasi obat di kulit (stratum korneum) rute tambahan, (b) rute transelular, dan (c) rute ekstraseluler berlaku. Rute transelular dan inteselular merupakan jalur transepidermal (Chaulagain *et al.*, 2018).

2.2. Permasalahan Kulit

2.2.1 Skin Aging

Penuaan kulit menjadi salah satu permasalahan kulit yang sering terjadi dimana kondisi kulit yang berubah seiring bertambahnya usia seperti; tampak kendur, berkerut, menipis, atau dipenuhi flek hitam. Penurunan produksi kelenjar keringat kulit, diikuti dengan kelembapan dan kekenyalan kulit berkurang akibat daya elastisitas kulit dan berkurangnya kemampuan kulit untuk menahan air, peningkatan proses pigmentasi kulit merupakan tanda penuaan kulit (Petruk *et al.*, 2018).

Ciri-ciri terjadinya penuaan dini (Noormindhawati *et al.*, 2013)

a. Keriput & mengendur

Makin bertambahnya usia jumlah kolagen dan elastin pada kulit akan berkurang. Sehingga berakibat hilangnya elastisitas kulit hingga terbentuknya keriput dan kulit kendur.

b. Age spot

Muncul pada area yang sering terpapar oleh cahaya matahari secara langsung misalnya wajah, lengan dan tangan.

c. Kulit kasar (wrinkle)

Kerusakan kolagen dan elastin terjadi akibat paparan sinar matahari sehingga membuat kulit menjadi kering dan kasar.

d. Pori-pori membesar

Terjadi karena penumpukan sel kulit mati, pori-pori kulit menjadi membesar.

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses penuaan terdiri atas dua bagian :

1) Faktor intrinsik

Penuaan kulit juga banyak dipengaruhi oleh faktor eksogen. Pada lapisan epidermis terjadi perubahan morfologi atau struktur kulit, sedangkan pada perubahan biokimiawi terjadi pada lapisan dermis. Sel kulit seperti keratinosit, fibroblas dan melanosit seiring bertambahnya usia mengalami penurunan jumlah populasi. Produksi kolagen di lapisan dermis dapat dipengaruhi karena proliferasi sel fibroblas kulit yang melambat. Peningkatan aktivitas enzim matriks *metalloproteinase* pada sel-sel fibroblas seiring dengan pertambahan usia yang menyebabkan peningkatan degradasi kolagen di lapisan dermis. Produksi radikal bebas mempengaruhi proses penuaan, terutama *reactive oxygen species* (ROS), efektivitas sistem penangkal radikal bebas, dan perbaikan tubuh. Ujung cuping hidung menjadi turun, cuping telinga memanjang, kelopak mata turun, bibir atas menjadi hilang, serta bibir bawah semakin tampak nyata disebabkan karena adanya gaya gravitasi (Noormindhawati *et al.*, 2013)

2) Faktor ekstrinsik

Proses penuaan terjadi akibat berbagai faktor dari luar tubuh yang menginduksi terjadinya penuaan kulit. Faktor utaman yang menyebabkan photoaging sehingga proses penuaan lebih cepat akibat paparan sinar matahari yang berlebihan. Efek fotobiologik UVA dan UVB mampu menimbulkan radikal bebas akan merusak struktur kulit (Noormindhawati *et al.*, 2013)

2.2.2 Antioksidan

Antioksidan merupakan sistem pertahanan utama dalam menangkal radikal bebas dan menghambat oksidasi pada sel agar terhindar dari kerusakan pada tingkat seluler (Ahmed *et al.*, 2020). Antioksidan berperan dalam menetralkan radikal bebas, senyawa radikal bebas pada jaringan teroksidasi guna menstabilkan atom atau molekul radikal bebas, sehingga terhindar dari serangan radikal bebas pada sel jaringan kulit. Antioksidan memainkan peran utama dalam pencegahan dan terapi UV-penuaan kulit yang diinduksi dan ditambahkan ke formulasi untuk perlindungan terhadap paparan matahari. Produk-produk anti-aging mengandung antioksidan untuk melindungi kulit dari pengaruh radikal bebas (Ahmed *et al.*, 2020). Sehingga, tubuh mengembangkan mekanisme perlindungan untuk mencegah pembentukan radikal bebas dan peroksidasi lipid maupun memperbaiki kerusakan yang terjadi, termasuk pada kulit. Maka diberikanlah sistem perlindungan berupa senyawa yang berkhasiat sebagai antioksidan seperti Vitamin E.

2.3. Nanoteknologi

Nanoteknologi merupakan ilmu dan teknologi yang digunakan untuk mengembangkan atau memanipulasi partikel dalam kisaran ukuran 10 - 1000 nm. Nanopartikel lipid terdiri dari matriks lipofilik padat dalam molekul aktif mana yang dapat digabungkan (Kovačević *et al.*, 2020) ukuran partikel tergolong kecil yang membuat nanopartikel memiliki sifat yang berbeda jika dibandingkan dengan materi lainnya. Nanoteknologi digunakan sebagai sistem penghantar obat ke dalam kulit dengan keunggulan seperti memiliki kelarutan yang tinggi, pelepasan bahan aktif terkontrol, mengurangi iritasi kulit, perlindungan dari degradasi dll. Formula nano memiliki keefektifan lebih baik dibandingkan formula yang tersedia saat ini karena memiliki ukuran partikel nano, parameter ini dapat menentukan kemanjuran dan lokasi pengiriman obat yang ditargetkan.

Pengaplikasian nanopartikel pada kulit mampu meningkatkan hidrasi kulit dengan dua mekanisme pembentukan oklusi film pada permukaan *Stratum Corneum* (SC) yang mencegah penguapan, menghindari kehilangan air pada transepidermal memperkuat lapisan film lipid dengan melekatnya nanopartikel pada *Stratum Corneum* (SC) (Garcês *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2017). Rute transappendageal telah diselidiki secara luas untuk pengiriman pembawa nanocarrier yang lebih besar dari 20 nm tetapi kurang dari 200 nm dapat menembus jauh ke dalam folikel rambut melalui lubang rambut (Garcês *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2017; Smith and Maibach, 2005).

2.4. Solid Lipid Nanoparticles (SLN)

Solid Lipid Nanoparticles (SLN) dikembangkan pertama kali pada tahun 1990-an. SLN memiliki ukuran partikel yang kecil, semakin kecil ukuran dari partikel maka akan semakin stabil dalam memberikan respon terhadap target dan mampu mengenkapsulasi sejumlah besar obat. Dalam 2 dekade terakhir ini *solid lipid nanoparticles* (SLN) mencuri banyak perhatian dari para peneliti karena penggunaan bahan aktif untuk kosmetik dan sediaan farmasi dalam pengaplikasian senyawa aktif untuk kulit memiliki keuntungan lebih baik dibandingkan dengan formulasi konvensional. *Solid Lipid Nano Particles* (SLN) terdiri dari bahan biokompatibel atau matriks lipid padat (pada suhu kamar) dengan titik leleh 40°C. SLN memiliki banyak keuntungan penggunaan toksisitas, pembawa pengiriman topikal, kapasitas pemuatan yang lebih tinggi, termasuk pelepasan terkontrol, biodegradasi lipid, efek hidrasi kulit besar, inkorporasi obat hidrofilik dan (Gu *et al.*, 2018; Jafar *et al.*, 2019; Souto *et al.*, 2020). Menurut penelitian alba & Banga (2014), ketidakstabilan *lipid carrier* akibat terjadinya kavitali sehingga menyebabkan *loading capacity* dari bahan aktif berkurang merupakan salah satu kelemahan yang dimiliki SLN.

2.5. Nanostructured Lipid Carrier (NLC)

Pada teknologi generasi kedua yaitu *nanostructured lipid carrier* (NLC) partikel yang diproduksi terdiri dari campuran lipid padat dan cair (minyak). Berbeda dari SLN, Campuran ini juga akan menjadi padat pada suhu tubuh karena terjadi pengurangan titik leleh lipid padat namun tetap solid pada suhu kamar dan suhu tubuh (Gupta *et al.*, 2020). Ukuran partikel NLC pada 10-1000 nm mengandung pengemulsi yang tersebar dalam fase air (Tamjidi *et al.*, 2013). NLC merupakan pembawa obat bioaktif yang berasal dari komponen lipid tidak beracun dan biodegradable, kehadiran NLC memberikan keuntungan tertentu dibandingkan dengan dispersi koloid lainnya (Amer *et al.*, 2018; Tamjidi *et al.*, 2013). Ukuran partikelnya yang kecil mampu meningkatkan kelarutan obat, meningkatkan laju pelepasan obat, meningkatkan penyerapan obat dan memiliki toksisitas yang rendah. Pengecilan ukuran partikel merupakan sistem pengiriman obat yang lebih baik dibandingkan dengan sediaan konvensional, peningkatan stabilitas kelarutan yang lebih tinggi, memperbesar luas permukaan, pelepasan bahan aktif yang terkontrol, perlindungan dari degradasi, mengurangi iritasi dan peningkatan penetrasi obat ke dalam kulit.

Solid lipid nanoparticles (SLN) dan *nanostructure lipid carriers* (NLC) ini sebagai sistem alternatif penghantaran obat untuk liposom, emulsi, dan nanopartikel polimer yang banyak diteliti (Gupta *et al.*, 2020; Khosa *et al.*, 2018; Tamjidi *et al.*, 2013). NLC memiliki retensi obat yang lebih tinggi di lapisan atas kulit dibandingkan dengan formulasi berbasis emulsi. NLC distabilkan dalam dispersi air menggunakan surfaktan (Müller *et al.*, 2017). Minyak yang terkandung mampu menghindari rekristalisasi lipid padat selama penyimpanan, dan meningkatkan kapasitas muatan pada senyawa lipofilik. Sebaliknya, penggunaan campuran lipid dengan struktur (ukuran) molekul yang sangat berbeda akan mendistorsi pembentukan kristal yang sempurna (Zielińska *et al.*, 2020).

2.5.1 Type Nanostructured Lipid Carrier (NLC)

a. Imperfect types

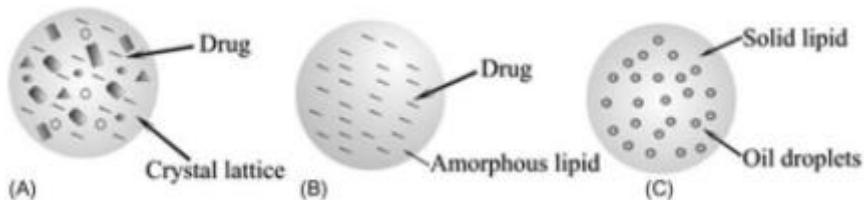
Tipe Kristal tidak sempurna yang terbentuk dari pencampuran antara lipid padat dan lipid cair yang secara kimia berbeda. Terdiri dari matriks lipid yang memiliki banyak rongga dan ketidak sempurnaan sehingga membentuk celah antar rantai asam lemak yang mampu mengakomodasi molekul obat. Hal ini mampu meningkatkan kandungan bahan aktif yang terjebak pada matriks. Karena panjang rantai yang berbeda dari campuran *mono-di-* dan *triasilglicerol* dan asam lemak, tidak dapat membentuk struktur yang sangat teratur pada matriks NLC sehingga membentuk ruang yang cukup untuk molekul obat.(Shah, 2017)

b. Amorphous types

Amorphous type memiliki kelarutan obat lebih besar dalam lipid cair daripada lipid padat sehingga, jumlah lipid cair yang digunakan lebih besar seperti *hydroxyoctacosanylhydroxystearate* atau *isopropyl myristate*. Campuran yang dihasilkan setelah pendinginan partikel padat dari struktur lipid amorf, menghindari terjadinya kristalisasi, dan dapat meminimalkan drug explosion selama penyimpanan, karena matriks tetap dipertahankan dalam bentuk alfa-polimorfik.(Shah, 2017)

c. Multiple types

Multiple type merupakan model berganda yaitu campuran dari lipid cair yang lebih banyak dari lipid padat dan membentuk nanokompartemen. Lipofilitas yang tinggi mampu meningkatkan kapasitas muatan obat. Terbentuk dari tipe emulsi w/o/w dispersitas minyak dalam lemak dalam air.(Shah, 2017)



Gambar 2. 5 type *Nanostructured Lipid Carried* (NLC) a). Imperfect type,
b). Amorphous type, c).Multiple types (M.R Shah, M Imran, 2017).

2.5.2 Kelebihan *Nanostructured Lipid Carrier* (NLC)

Menurut shah *et al.*,(2017) NLC memiliki beberapa kelebihan antara lain;

a. Meningkatkan *Loading Capacity* obat.

Obat yang dibuat NLC lebih banyak larut dalam matriks lipid cair dibandingkan dengan lipid padat, oleh karena itu terjadi peningkatan kelarutan obat-obatan dibandingkan dalam system SLN. Mengingat secara umum obat lebih banyak larut dengan baik dalam lipid cair (minyak) daripada lipid padat (lemak). Selain itu, penambahan lipid cair pada system NLC mampu meningkatkan *entrapment efficiency* obat. Hal ini terjadi karena lipid cair mengganggu lipid padat sehingga menyebabkan kerusakan kristal pada lipid padat. Adanya kerusakan Kristal lipid padat menyebabkan struktur yang awalnya teratur menjadi tidak teratur, namun ketidakaturan pada struktur Kristal tersebut memberikan dampak baik pada pemuatan obat sehingga *loading capacity* dan *entrapment efficiency* obat menjadi meningkat lebih besar.

b. Modulasi profil pelepasan obat.

NLC menunjukkan pelepasan obat bifasik, yaitu pelepasan obat awal yang diikuti pelepasan obat berkelanjutan pada tingkat yang konstan. Tahap awal pada lipid cair yang didalamnya terkandung obat mengalami ledakan atau pelepasan obat secara tiba-tiba kemudian diikuti pelepasan berkelanjutan dengan laju yang konstan dari inti lipid padat. Dalam formula NLC lipid padat berfungsi sebagai pengatur pelepasan obat, oleh karena itu pola pelepasan obatnya dapat diperbaiki dan dimodulasi dengan cara mengatur jumlah kandungan lipid cair dan lipid padat.

c. Stabilitas jangka panjang selama penyimpanan.

Fakta dari NLC bahwa kristalisasi lipid menyebabkan terjadinya kavitasi obat di dalamnya. Formulasi NLC terdiri dari campuran lipid padat dan lipid cair, sehingga partikel akan memadat setelah dilakukan pendinginan namun tidak mengkristal. Lipid cair yang terdapat pada lipid padat dalam NLC juga mencegah masalah stabilitas jangka panjang yang timbul dari sebuah fenomena polimorfisme. Lipid cair berperan dalam pencegahan kristalisasi. Terjadinya kristalisasi diakibatkan karena keadaan supersaturasi dan lipid cair diduga menyebabkan kondisi substansi dari lipid padat, sehingga mengurangi kristalisasi.

d. Mengurangi penggunaan surfaktan.

Keunikan NLC ini dapat menstabilkan dengan menggunakan konsentrasi surfaktan yang sedikit dengan peningkatan entrapment efficiency dan profil pelepasan obat yang diinginkan. Kestabilan NLC dalam penjerapan obat bersifat lipofilik yang membutuhkan konsentrasi surfaktan dengan kisaran sedikit antara 0,5% - 1% saja. Penerimaan surfaktan untuk emulsi lipid dan formulasi lain sangat rendah sebagai perbandingannya. Oleh sebab itu, penggunaan NLC lebih disukai dibandingkan emulsi lipid dimana konsentrasi yang lebih tinggi dan kisaran sempit pemilihan surfaktan merupakan masalah yang diperhatikan.

2.5.3 Formula Umum *Nanostructured Lipid Carrier (NLC)*

Nanostructured Lipid Carrier (NLC) sebagai sistem pembawa partikel nano yang berasal dari nanoemulsi O/W berupa campuran lipid padat dan cair dan dalam fase air dengan surfaktan. Formulasi yang umumnya digunakan dalam perbandingan 70:30 sampai dengan perbandingan 99,9:0,1 dengan konsentrasi surfaktan sebanyak 0,5% (b/b) hingga 5% (b/b). (Shah, 2017).

1. Lipid padat dan lipid cair

Keberhasilan dalam produksi NLC didasarkan dalam pemilihan lipid padat dan lipid cair yang tepat dengan karakteristik fisik dan kimia yang sesuai. Kestabilan NLC dihasilkan berdasarkan studi kompatibilitas antara lipid dan obat-obatan. Hal ini terjadi akibat terbentuknya pemisahan fasa pada beberapa kombinasi lipid, maka dipilih kombinasi yang tidak menyebabkan terjadinya pemisahan sampai 24 jam setelah pencampuran untuk mendapatkan formula NLC yang stabil. Adapun persyaratan yang perlu dilakukan guna pemilihan dalam pencampuran lipid agar memperoleh hasil yang sesuai (Tamjidi *et al.*, 2013).

- a. Kelarutan senyawa aktif dalam matriks lipid sangat penting, sebelum mencoba memasukkan molekul tersebut ke dalam pembawa nano lipid karena ini selalu mempengaruhi loading capacity obat, efisiensi enkapsulasi, dan kegunaan NLC selanjutnya. Kelarutan obat dalam berbagai lipid cair, surfaktan, co-surfaktan, pelarut atau campurannya merupakan faktor utama dalam mempengaruhi kapasitas pemuatan obat.
- b. Fase lipid harus stabil terhadap degradasi kimia seperti oksidasi dan lipolisis.
- c. Lipid harus bersifat biodegradable dan mampu menghasilkan partikel dalam skala nanomerik
- d. Lipid harus memiliki profil toksikologi yang dapat diterima dan tidak boleh menyebabkan terbentuknya residu beracun selama preparasi NLC.

2. Surfaktan

Surfaktan merupakan senyawa yang memiliki kemampuan untuk mengurangi tegangan permukaan antar muka pada cairan dan padatan yang memungkinkan dua fase yang tidak bisa menyatu dapat menyatu dengan baik (Suhail *et al.*, 2019). Menurut shah (2017), surfaktan digunakan dalam formulasi NLC bertujuan untuk mendispersikan fase immiscible kedalam fase lain selama proses pembuatan. Beberapa jenis surfaktan yang sering digunakan dalam pembentukan system NLC antara lain poloxamer, polisorbat, lecitin dan asam empedu. Surfaktan mampu mencegah terjadinya agregasi partikel NLC dengan cara pembentukan lapisan pada lapisan pada permukaan NLC sehingga partikel stabil dalam jangka panjang. Penambahan surfaktan juga mampu memperkecil ukuran partikel.

Hal ini dikenal sebagai teori tegangan permukaan yang menyatakan bahwa penambahan surfaktan mampu menurunkan dan menghilangkan tegangan permukaan yang terjadi pada batasan dari kedua zat cair sehingga dapat bercampur. Sehingga luas permukaan tetesan lipid menjadi meningkat dan ukuran partikel menjadi lebih kecil. Jenis dan konsentrasi surfaktan mampu mempengaruhi profil kinetika pelepasan dan entrapment efficiency. Kaitannya dengan hal ini surfaktan mengurangi tegangan antar muka sampai konsentrasi spesifik hingga mampu meningkatkan nilai zeta potensial sehingga mampu mencegah terjadinya aglomerasi partikel. Oleh karena itu, selama pembuatan formulasi NLC parameter yang terpenting adalah pemilihan surfaktan dan konsentrasinya yang menjamin pelepasan obat lebih efektif dan ukuran partikel yang terkontrol (Shah *et al.*, 2017; Suhail *et al.*, 2019).

Table 2. 1 Lipid dan Surfaktan yang biasa digunakan dalam NLC Shah et al., 2017

Komponen	Nama Bahan
Lipid Padat	Glyceryl palmitostearate
	Glyceryl dibehenate
	Cetyl palmitate
	Stearic acid
	Tripalmitin
	Tristearin
Lipid Cair	Medium chain triglycerides
	Caprylic/capric triglycerides
	Vitamin E
	Paraffin oil
	2-Octyl dodecanol
	Oleic acid
	Squalene
	Isopropyl myristate
Surfaktan	Lauroyl polyoxylglycerides
	Polyoxyl castril oil
	Polyoxiethylene stearate
	Macrogol-15-hydroxystearate
	Poloxamers
	Polysorbates

2.6. Metode pembuatan Nanostructured Lipid Carrier (NLC)

1. High Pressure Homogenization (HPH)

Homogenisasi tekanan tinggi merupakan metode utama yang digunakan untuk produksi SLN dan NLC, dengan tekanan (100-2000 bar) untuk mendorong lipid cair melalui celah sempit. Umumnya konsentrasi lipid yang digunakan berkisar 5-10% dengan suhu peleburan 5-10 °C diatas fase lipid dengan titik lebur tertinggi. Campuran fase lipid dan obat dilarutkan dalam larutan surfaktan dengan menggunakan kecepatan

pengadukan tinggi pada suhu yang sama. HPH dapat berupa HPH panas dan HPH dingin. HPH panas dilakukan diatas titik leleh lipid, fase lipid dengan fase air dibuat secara terpisah.

Kemudian hasil emulsi panas dihomogenisasi dengan instrument *High Pressure Homogenization* (HPH) pada suhu yang sama, tabung ultrasonik intensitas tinggi atau microfluidizer untuk menghasilkan nanoemulsi panas. HPH menghasilkan partikel yang lebih kecil dengan indeks polidispersitas yang lebih rendah biasanya di bawah 0,2. Kelemahan metode ini antara lain (Souto *et al.*, 2020; Tamjidi *et al.*, 2013)

- a. Suhu pemanasan yang tinggi mendorong degradasi senyawa aktif yang labil.
- b. Kebanyakan dari surfaktan memiliki titik awan yang rendah; sehingga, tinggi suhu dapat mengurangi kemampuan pengemulsian dan menyebabkan ketidakstabilan NLC.
- c. Selama homogenisasi, partisi obat hidrofilik ke fase air menghasilkan efisiensi jebakan yang rendah.

Sedangkan untuk HPH dingin, lipid yang meleleh didinginkan sedangkan lipid padat di tumbuk hingga terbentuk mikripartikel lipid. Mikropartikel didispersikan dalam larutan pengemulsi dingin kemudian dihomogenisasi untuk menghasilkan nanopartikel lipid halus. Homogenisasi dingin mengurangi degradasi termal senyawa bioaktif. jebakan obat ditingkatkan dan laju pendinginan yang tinggi mendukung distribusi obat yang seragam dalam matriks lipid(Souto *et al.*, 2020; Tamjidi *et al.*, 2013)

2. Ultrasonikasi (Sonicator Probe)

Dalam formulasi NLC perlu dilakukan dengan metode ultrasonikasi. Dalam hal ini emulsi diperoleh dari dispersi fase lipid (lipid padat dan lipid cair) ke dalam fasa air yang mengandung surfaktan pada suhu yang sama, dengan kecepatan tinggi, dan didinginkan pada suhu kamar hingga terbentuk NLC. Metode sonikasi memanfaatkan getaran mekanik hasil gelombang ultrasonik yang menyebabkan kavitasi. Dalam proses sonikasi akan timbul gelembung uap yang dapat pecah dengan keras pada ukuran kritis tertentu. Pecahnya gelembung uap ini menimbulkan energi yang sangat tinggi sehingga dapat membuat partikel berukuran mikro pecah menjadi bentuk nano. Dalam berlangsungnya proses sonikasi, suspensi akan menjadi panas karena tingginya energi yang dihasilkan gelombang ultrasonik, sehingga dapat menyebabkan penguapan medium sampel atau degradasi dari komponen sampel sehingga proses

pengecilan ukuran partikel menjadi tidak efektif. Sehingga digunakanlah mode pulsed (interval on-off) saat menggunakan sonikator (Souto *et al.*, 2020).

2.7. Karakteristik NLC

Menurut Tamjidi *et al.*, (2015) dan Shah dkk (2017), karakterisasi NLC antara lain;

1. Ukuran partikel

Ukuran partikel NLC umumnya ditentukan oleh foton spektroskopi korelasi (PCS) menggunakan Zetasizer. Ukuran partikel dan distribusinya merupakan karakteristik penting yang mempengaruhi stabilitas, kelarutan, laju pelepasan dan kinerja biologis NLC berkisar 1000 nm. Namun, untuk pengiriman spesifik lokasi, kisaran 10-500 nm lebih disukai terutama untuk gangguan sistem saraf pusat dan agen kemoterapi. Secara umum, rasio surfaktan / lipid yang tinggi menghasilkan partikel yang lebih kecil dan peningkatan ukuran partikel diamati dengan konsentrasi surfaktan yang rendah. Konsentrasi obat yang lebih tinggi menyebabkan ukuran partikel yang lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi rendah. Kehadiran partikel yang lebih besar dari 3 m dalam formulasi NLC dapat dikecualikan oleh DLS. MALS mengukur intensitas cahaya yang tersebar di berbagai sudut secara bersamaan. Intensitas cahaya yang tersebar di setiap sudut memberikan informasi yang dapat digunakan untuk menghitung massa partikel dan ukuran nanopartikel (Khosa *et al.*, 2018). Ukuran partikel pada Sampel diencerkan dengan air deionisasi yang disaring dalam polistirena kuvet kemudian diamati pada sudut tetap 90° pada 25±0,1 C (Tanjidi *et al.*, 2013).

2. Zeta potensial

Potensi zeta adalah teknik untuk menentukan muatan permukaan nanopartikel dalam larutan (koloid), untuk memahami keadaan permukaan NLC dan memprediksi stabilitas jangka panjang. Dalam instrumen komersial, unit ZP terintegrasi dengan instrumen DLS untuk mengukur muatan partikel dan ukuran partikel menggunakan instrumen yang sama. Zeta potensial bisa ditentukan dalam sel kapiler yang terlipat dengan laser Anemometri Doppler menggunakan zeta sizer Malvern yang biasa disebut sebagai Doppler-Electrophoretic 10 Penganalisis Hamburan Cahaya (Tanjidi *et al.*, 2013). Nilai zeta potensial dari partikel biasanya berkisar antara +100mV hingga -100mV. Nanopartikel dengan nilai Potensi zeta lebih dari +25mV atau kurang dari -25 mV biasanya memiliki tingkat stabilitas yang tinggi. Dispersi dengan nilai zeta potensial rendah pada akhirnya akan beragregat karena adanya interaksi Van Der Waal antar partikel.

3. Entrapment efficiency (EE%)

Penentuan efisiensi pemuatan obat untuk NLC merupakan karakteristik penting yang mempengaruhi profil pelepasan obat. Molekul obat terdistribusi secara homogen dalam cairan dalam inti atau cangkang partikulat. Obat bersifat hidrofilik terletak di fase air dan antarmuka. Kapasitas pemuatan obat yang tinggi tergantung pada kelarutan obat yang efisien dalam fase lipid harus lebih tinggi dari yang disyaratkan. Kehadiran lipid cair dalam formula NLC akan mempengaruhi konformasi lipid padat sehingga terjadi ketidaksempurnaan sehingga mampu membuat banyak ruang untuk penyerapan bahan aktif.

$$\% \text{EE} = \frac{\text{total zat aktif} - \text{zat aktif bebas}}{\text{total zat aktif}} \times 100\%$$

Persentase enkapsulasi disasarkan pada pemisahan fase internal dan fase eksternal yang dapat dilakukan dengan memisahkan campuran yang terdispersi, baik dengan ultrafiltrasi, sentrifugasi, ataupun filtrasi gel. Pencampuran lipid cair pada lipid padat mengakibatkan adanya gangguan struktur kristalin sehingga menghasilkan matriks tidak sempurna dalam kisinya yang dapat menyediakan lebih banyak ruang untuk menampung obat-obatan. (Shah *et al.*, 2017)

4. Polydispersity Index (PDI)

NLC bersifat polidispersi, pengukuran indeks polidispersitas (PDI) merupakan hal penting untuk memahami dalam distribusi ukuran NLC. Semakin rendah nilai PDI, maka semakin banyak monodispersi dari dispersi nanopartikel. Sebagian besar peneliti puas dengan nilai PDI sebesar 0,3 sebagai nilai optimum. PDI juga akan diukur dengan PCS (Wang *et al.*, 2017).

5. Fourier Transform Infra-Red (FTIR)

FTIR merupakan uji yang dilakukan guna mengetahui ada atau tidaknya interaksi molekul dalam masing-masing bahan pada NLC, yang memberikan informasi berupa gugus dan ikatan kimia yang terdapat pada senyawa organik sebagai sarana identifikasi kualitatif. Puncak absorpsi muncul karena adanya perbedaan frekuensi vibrasi dari tiap jenis atom pada senyawa. FTIR juga berguna dalam mengecek kompatibilitas dari eksipien. Jika dalam campuran suatu bahan terindikasi terbentuknya puncak baru maka telah terjadi interaksi kimia dalam campuran (inkompatibel). Sinyal interferogram yang dihitung dengan menggunakan Fourier guna menghasilkan puncak yang dapat dianalisis pada spectrum bilangan gelombang (Tofani *et al.*, 2016).

6. *Transmission Electron Microscopy (TEM)*

Mikroskopi elektron adalah alat yang sangat diperlukan untuk mengamati dan menganalisis karakteristik fisik sampel kecil yang tidak terlihat di bawah penglihatan. Dalam TEM, elektron yang dipercepat pada tegangan tinggi (100-300 kV) diiradiasi ke sampel. Elektron yang ditransmisikan dari sampel dan sebagian elektron yang tersebar digunakan untuk membuat gambar. TEM terdiri dari tiga sistem: (1) sistem emisi untuk menarik elektron dari sumber cahaya (biasanya W atau LaB₆) dan mempercepatnya, (2) sistem pencitraan untuk memperbesar gambar sampel dan menempelkan kontras yang tinggi padanya, dan (3) sistem kamera untuk merekam gambar. Baik sistem emisi dan pencitraan termasuk beberapa lensa elektromagnetik. Pembesaran gambar ditentukan dengan memvariasikan arus listrik lensa dalam sistem pencitraan (Masahiko Abe *et al*, 2019).

7. *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*

Kalorimetri pemindaian diferential digunakan untuk menentukan kristalinitas dan polimorfisme bahan obat, dan nanopartikel obat oleh pengukuran gelas dan titik lebur pada masing-masing entalpies. Kira-kira 10 mg lipid, obat dan NLC terlioofilisasi ditempatkan di lubang jarum panci aluminium bagian bawah tertutup dan dipanaskan. Kurva kalorimetrik pemindaian diferential dengan suhu 20-80°C, dengan konstanta laju pemanasan linier 5 °C/menit pada nitrogen kering ultrahigh murni. Dilakukan pengulangan analisis sebanyak 3 kali dan nilai dinyatakan sebagai mean dari tiga determinasi. Entalpies dihitung dengan menggunakan mettler perangkat lunak bintang.

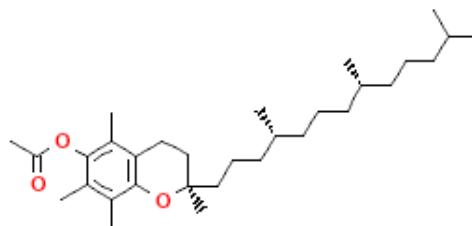
2.8 Vitamin E Asetat

Tokoferol mampu mencegah oksidasi asam lemak. Radikal bebas menyerang asam lemak dengan penambahan atom oksigen pada rantai karbon. Setelah terjadi oksidasi asam lemak membentuk radikal bebas lebih banyak yang memulai reaksi dari oksidasi. Antioksidan merupakan senyawa yang menunda autoksidasi dengan menghambat pembentukan radikal bebas atau dengan mengganggu penyebaran radikal bebas. Tokoferol merupakan antioksidan yang menyumbangkan atom hidrogen fenolik ke radikal bebas sehingga mengubah menjadi bentuk yang stabil dan non reaktif.

2.9 Monografi

1. Vitamin E Asetat (α -Tocopherol)

Nama dan identitas



Gambar 2. 6 Struktur Kimia α -Tocopherol (Rowe *et al*, 2009)

α -Tocopherol merupakan kelompok antioksidan fenolik lipofilik, dan merupakan pelarut yang sangat baik untuk melarutkan obat yang sukar larut. Molekul struktur berbentuk *tokoferol beta, gamma dan delta* yang terdiri dari cincin chromanol terhubung ke rantai samping karbon panjang. Strukturnya bervariasi dengan jumlah dan posisi dari kelompok metil pada cincin (Rowe, 2009). Vitamin E asetat [*dl-alpha tocopheryl acetate*] yang digunakan memiliki range konsentrasi antara 1%-5,4% yang dinyatakan aman untuk penggunaan topikal. (Mitchell Bebel Stargrove *et al.*, 2007).

Mengandung tidak kurang dari 96,0% dan tidak lebih dari 102,0%. karakteristik Votamin E Asetat praktis tidak berbau dan berasa untuk bentuk alfa tokoferol dan alfa tokoferol asetat berupa minyak kental jernih, warna kuning atau kehijauan, tidak stabil terhadap udara dan cahaya. Bentuk ester stabil terhadap udara dan cahaya. Vitamin E Asetat memiliki sifat kelarutan yaitu larut dalam etanol , sangat mudah larut dalam kloroform, tidak larut dalam air, sukar larut dalam larutan alkali, larut dalam etanol, eter dan aseton serta dapat larut dalam minyak nabati.

IUPAC Name	: (2R)-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydrochromen 6-ol
Bentuk	: Cair
Warna	: Putih/jernih - kuning
Rumus molekul	: C ₂₉ H ₅₀ O ₂
Pemerian	: tokoferol tidak berbau atau sedikit berbau, tidak berasa atau sedikit berasa. Alfa tokoferol cairan seperti minyak, kuning, jernih, tidak berwarna atau coklat kekuningan. α -Tocopherol merupakan bentuk vitamin E paling aktif. Bentuk sintetik vitamin E memiliki aktivitas biologis 50 % daripada α -tocopherol yang terdapat di alam. α -Tocopherol asam suksinat berupa serbuk

bewarna putih, d-isomer melebur pada suhu 75° dan bentuk dl-melebur pada suhu 70° . Golongan α - tidak stabil terhadap cahaya dan udara. Sedangkan bentuk ester stabil terhadap cahaya dan udara. Golongan α -Tocopherol dan esternya tidak stabil terhadap suasana alkalis.

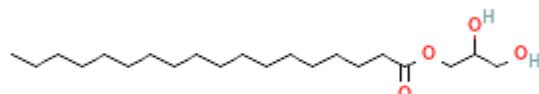
Kelarutan : praktis tidak larut air, mudah larut dalam aseton, etanol, eter, dan minyak nabati. Sangat mudah larut dalam kloroform. Bentuk vitamin E lain tidak larut air, larut dalam etanol, dapat bercampur dengan aseton dengan minyak nabati dan dengan kloroform.

Wadah & penyimpanan : dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya matahari. Bentuk *d*-atau *dl*-*alfa* tokoferol dilindungi dengan menggunakan gas inert.

Inkompatibilitas : Tokoferol tidak cocok dengan peroksida dan ion logam, terutama besi, tembaga, dan perak. Tokoferol dapat diserap menjadi plastic.

2. Glyceryl Monostearate (Geleol®)

Nama dan identitas



Gambar 2. 7 struktur kimia Glyceryl Monostearate (Geleol®) (Rowe *et al.*, 2009)

IUPAC Name : 2,3-dihydroxypropyl octadecanoate

Bentuk : serpihan

Warna : putih

Rumus molekul : C₂₁H₄₂O₄

Pemerian : berbentuk serbuk padat dan berwarna putih hampir kekuningan

Kelarutan : larut dalam etanol panas, eter, kloroform, aseton panas dan minyak mineral.

Stabilitas : Larut dalam etanol panas, eter, kloroform, aseton panas, minyak mineral, dan minyak tetap. Praktis tidak larut dalam air, tetapi mungkin didispersikan dalam air dengan bantuan sedikit sabun atau surfaktan lainnya.

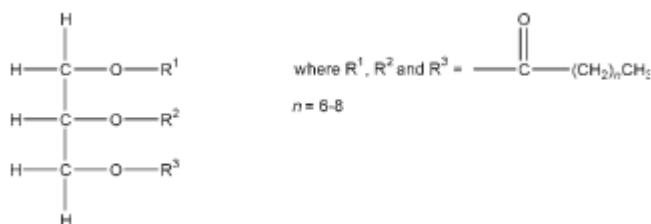
Inkompatibilitas : Nilai self-emulsifying dari gliseril monostearat tidak kompatibel dengan sub asam.

Penyimpanan : Simpan dalam wadah tertutup

Monostearin digunakan dalam formulasi nanopartikel lipid sebagai lipid padat. Senyawa ini memiliki kisi kristal less ordered sehingga dapat menghasilkan enkapsulasi obat yang tinggi. Susunan subsel krital monostearin terdiri dari beberapa susunan subsel yang berbeda yaitu hexagonal, orthorhombic dan trisiklik, dengan demikian senyawa ini terdiri dari lebih dari satu polimorf (Rowe, 2009)

3. Medium-chain Triglycerides (Myritol[®])

Nama dan identitas

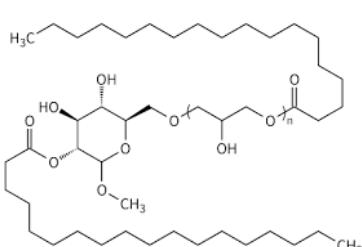


Gambar 2. 8 struktur kimia Medium-chain Triglycerides (Myritol[®])
(Rowe *et al.*, 2009).

Myritol atau Medium-Chain Triglycerides penggunaanya dalam formulasi oral, myritol digunakan sebagai dasar untuk persiapan emulsi oral, mikroemulsi, sistem selfemulsifying, larutan, atau suspensi obat yang tidak stabil atau tidak larut. Dalam kosmetik dan sediaan farmasi topikal, rantai menengah trigliserida digunakan sebagai komponen salep, krim, dan emulsi cair. Secara terapeutik, trigliserida rantai menengah telah digunakan sebagai: agen nutrisi. Formulasi yang mencakup sifat penyebaran yang lebih baik pada kulit; tidak ada impedansi pernapasan kulit; sifat penetrasi yang baik; sifat emolien dan kosmetik yang baik; tidak ada film yang terlihat di kulit permukaan; kompatibilitas yang baik; sifat pelarut yang baik; dan bagus stabilitas terhadap oksidasi (Rowe, 2009).

4. Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate (Tego-care[®])

Nama dan identitas



Gambar 2. 9 Struktur kimia Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate (Tegocare[®])

IUPAC Name	: <i>[(2R,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-[2-hydroxy-3-[2-hydroxy-3-(2-hydroxy-3-octadecanoyloxypropoxy)propoxy] propoxy]oxan-2-yl]methyl octadecanoate</i>
Bentuk	: pellet
Warna	: kuning cerah
Rumus molekul	: C51H98O14

Tegocare® yang memiliki nama kimia *Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate* atau disebut juga Glyceril Stearate berupa pellet yang berwarna kuning cerah dalam bentuk emulsi stabil dari pH 4,5 hingga 8,5. Tegoare memiliki nilai HLB 12 dan termasuk golongan surfaktan nonionik yang cocok digunakan pada pembuatan emulsi tipe minyak dalam air sering digunakan pada produk perawatan kulit. Sifat pengaplikasiannya juga dapat disesuaikan dengan memvariasikan jumlah fase minyak. Zat dengan sifat tertentu, seperti filter UV, ekstrak tumbuhan, turunan protein dan pelembab. Emulsi dengan pemanasan tinggi sangat cocok untuk dibuat formulasi. TEGO®Care 450 dapat membentuk emulsi stabil pada semua jenis lipid yang digunakan untuk produk perawatan kulit, termasuk minyak polar. Dapat dikatakan bahwa terdapat kemungkinan untuk menyesuaikan sifat aplikasi emulsi dengan pilihan minyak: semakin baik sifat penyebaran dan semakin rendah viskositas minyak, semakin "ringan" emulsi yang dihasilkan. TEGO®Care 450 memberikan sifat pelembab sekaligus meningkatkan status hidrasi kulit (Rowe, 2009).

2.10 Design Expert

Optimasi merupakan metode pendekatan atau desain eksperimental untuk memudahkan dalam penyusunan dan interpretasi data secara matematis. Pendekatan ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi terbaik dari suatu produk atau karakteristik dibawah kondisi tertentu. *Simplex lattice design* adalah metode optimasi yang digunakan untuk menentukan formula optimum suatu campuran bahan dengan proporsi jumlah total suatu bahan yang harus 1 (100%). Kegunaan metode *Simplex lattice design* antara lain sebagai penentuan formula, mengoptimalkan variabel formulasi, dan mengetahui jumlah *run*, menjaga konsnetrasi total tetap konstan.

Dalam optimasi formula NLC variabel tetap yang digunakan antara lain lipid cair dan zat aktif serta variabel bebas yang digunakan lipid padat dengan surfaktan. Metode ini akan mengoptimasi sesuai data variabel dan data pengukuran respon yang dimasukkan. Keluaran dari tahap optimasi adalah rekomendasi beberapa formula baru yang optimal menurut

program. Optimasi dilakukan dengan menentukan batasan (goal) kriteria respon yang dikehendaki dengan range yang memungkinkan untuk dicapai. Formula yang paling optimal adalah formula dengan nilai desirability maksimum. Nilai desirability merupakan nilai fungsi untuk tujuan optimasi yang menunjukkan kemampuan program untuk memenuhi keinginan berdasarkan kriteria yang ditetapkan pada produk akhir. Nilai desirability yang semakin mendekati nilai 1,0 menunjukkan kemampuan program untuk menghasilkan produk yang dikehendaki semakin sempurna (Aminu *et al.*, 2018).