

## Uji Aktivitas Antihialuronidase In Vitro dan Karakteristik Fisik *Nanostructured Lipid Carrier* Ekstrak Rimpang Langkuas laki-laki (*Alpinia zerumbet*)

### (In Vitro Antihyaluronidase Activity and Physical Properties of *Alpinia zerumbet* Rhizome Extract-Loaded Nanostructured Lipid Carrier)

SITI UMRAH NOOR\*, DIAN RATIH LAKSMITAWATI,  
WAHONO SUMARYONO

Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jalan Raya Lenteng Agung Srengseng Sawah,  
Jagakarsa, Kota Jakarta Selatan, 12630, Indonesia

Diterima: 10 Januari 2020, Disetujui: 31 Maret 2020

**Abstrak:** Rimpang langkuas laki-laki (*Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm) mengandung senyawa fenolat, memiliki aktivitas antihialuronidase yang dapat mengurangi kerutan pada kulit. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik fisik serta aktivitas antihialuronidase *nanostructured lipid carrier* (NLC) dari ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* secara in vitro. Serbuk rimpang *Alpinia zerumbet* 4/18 diekstraksi dengan metode maserasi kinetik menggunakan pelarut etanol 70%, dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada tekanan 100 mmHg dan pada suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ . Ekstrak yang dihasilkan dipreparasi ke dalam nanopartikel dengan sistem penghantaran NLC menggunakan polietilen glikol-8 beeswax, isopropil miristat dan akrilil glikosida dengan metode *high speed homogenization-ultrasonication*. NLC ekstrak yang dihasilkan dilakukan karakterisasi meliputi ukuran dan morfologi nanopartikel, indeks polidispersitas, dan potensial zeta, serta ditentukan uji aktivitas antihialuronidase menggunakan metode dari Sigma Aldrich dan Tu&Tawata dengan sedikit modifikasi. Hasil karakterisasi NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* adalah berukuran 171,3 nm; indeks polidispersitas 0,37; dan zeta potensial -26,8 mV dengan bentuk sferis. Hasil uji aktivitas antihialuronidase NLC ekstrak adalah 552,75  $\mu\text{g/mL}$ . Dapat disimpulkan NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* dapat di formulasi ke dalam sediaan topikal yang berpotensi sebagai antihialuronidase dengan kemampuan mengurangi kerutan pada kulit.

**Kata kunci:** Ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet*, NLC, aktivitas antihialuronidase.

**Abstract:** The rhizome of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm) contains phenolic compounds, has antihyaluronidase activity which can reduce wrinkles on the skin. This study aims to determine the physical characteristics and antihyaluronidase activity of the nanostructured lipid carrier (NLC) of the *Alpinia zerumbet* rhizome extract in-vitro. *Alpinia zerumbet* rhizome powder (4/18) was extracted by kinetic maceration method using 70% ethanol solvent, concentrated with a rotary vacuum evaporator at 100 mm Hg at a temperature of  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ . The resulting extract was prepared into NLC nanoparticles using polyethyleneglycol 8-beeswax, isopropyl myristate, and acrylyl glucoside with the high speed homogenization-ultrasonication method. The resulting NLC extracts were characterized by nanoparticle size and morphology, polydispersity index, and zeta potential and antihyaluronidase activity test was determined using the Sigma Aldrich and Tu & Tawata methods with slight modifications. The results of the NLC characterization of *Alpinia zerumbet* rhizome extract size were 171.3 nm; polydispersity index were 0.37; zeta potential were -26.8 mV; and had a spherical shape. The results of the antihyaluronidase activity of *Alpinia zerumbet* rhizome extract loaded NLC was 552.75  $\mu\text{g/mL}$ . It was concluded that the *Alpinia zerumbet* rhizome extract loaded NLC can be formulated into topical preparations which have the potential to be antihyaluronidase with the ability to reduce wrinkles on the skin.

**Keywords:** *Alpinia zerumbet* rhizome extract, NLC, antihyaluronidase activity.

\*Penulis korespondensi

E-mail: siti.umrahnor@univpancasila.ac.id

## PENDAHULUAN

SALAH satu tanda kerusakan atau penuaan kulit ialah hilangnya elastisitas dan fleksibilitas yang menyebabkan timbulnya kerut. Semakin bertambahnya usia, konsentrasi asam hialuronat semakin berkurang sehingga kulit menjadi kendur, pucat, dan kusam<sup>(1)</sup>. Asam hialuronat memberikan pengaruh pada hidrasi maupun molekul pembentuk matriks ekstraselular dan dipengaruhi beberapa senyawa diantaranya hialuronidase yang terdapat pada dermis kulit<sup>(2,3)</sup>. Hialuronidase merupakan mukopolisakarida yang menghidrolisis glikosaminoglikan pada matriks ekstraselular. Ketika asam hialuronat menurun dan aktivitas hialuronidase meningkat, maka kelembaban dan ketegangan kulit berkurang, sehingga dibutuhkan inhibitor hialuronidase yang memiliki efek anti-kerut dan antipenuaan<sup>(4)</sup>.

Polifenol merupakan senyawa yang memiliki efek antioksidan, salah satu senyawanya adalah golongan fenolat<sup>(5)</sup>. Langkuas laki-laki (*Alpinia zerumbet*) merupakan tanaman yang tumbuh di daerah tropis dan subtropis<sup>(6)</sup>. Memiliki kandungan polifenol pada bagian rimpang yaitu *5,6-dyhydrokawain* (DK), *dihydro-5,6-dyhydrokawain* (DDK), dan *12-labdadiene-15*<sup>(7)</sup>. Hasil penelitian Chompoo, dkk, bahwa ekstrak etanol rimpang *Alpinia zerumbet* memiliki kandungan fenolat dan aktivitas antioksidan yang cukup besar<sup>(8)</sup>. Berdasarkan hal tersebut, dilakukan penentuan aktivitas antihialuronidase (IC<sub>50</sub>) in vitro dari nanopartikel ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet*. Aktivitas Antihialuronidase (IC<sub>50</sub>) in vitro dari ekstrak telah ditentukan dan diperoleh sebesar 81,04 µg/mL.

Aplikasi teknologi nanopartikel dalam bidang farmasi mempunyai keunggulan seperti meningkatkan kelarutan dan mengurangi dosis penggunaan. Sifat pembawa bahan nanopartikel mempunyai keuntungan seperti mencegah hidrasi kulit, meningkatkan efek absorpsi, meningkatkan penetrasi bahan aktif dan bersifat lepas terkendali. Nanopartikel ekstrak yang dibuat menggunakan sistem penghantaran *Nanostructured Lipid carrier* (NLC)<sup>(9)</sup>. NLC memiliki keunggulan seperti *loading drug* yang besar, memiliki potensi untuk meningkatkan performa farmasetika dan spektrum aplikasi yang besar (dermal, oral, maupun i.v.), serta memiliki stabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan liposom<sup>(10)</sup>. NLC ekstrak dipreparasi menggunakan lipid padat, lipid cair, emulgator golongan surfaktan dan ekstrak etanol rimpang *Alpinia zerumbet*. NLC ekstrak yang diperoleh dilakukan karakterisasi dan uji aktivitas antihialuronidase.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Rimpang *Alpinia zerumbet* (Bogor), asam hialuronat (Sigma Aldrich H5542, USA), *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma Aldrich A4503), *hyaluronidase from bovine testes, Type I-S*. (Sigma Aldrich H3506), larutan HCl (Merck 109057, Jerman), polietilenglikol-8 beeswax (Gattefosse, Perancis), akrilil glikosida (BASF, Jerman), Na fosfat monobasik (Merck 567545), NaCl (Merck 1064040500), Na asetat (Merck 1062681000), asam asetat (Merck 100063), NaOH (Merck 106498), dan air murni.

**METODE. Pembuatan NLC Ekstrak.** Ekstraksi serbuk rimpang *Alpinia zerumbet* (4/18) dilakukan dengan metoda maserasi kinetika menggunakan etanol 70%, lalu ekstrak cair diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu ± 50 °C, tekanan 100 mmHg, dan kecepatan 70 rpm sampai diperoleh ekstrak kental<sup>(9)</sup>. Pembuatan NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* dilakukan dengan metode *High speed homogenization-ultrasonication* yaitu polietilen glikol-8 beeswax dan isopropil miristat dilebur diatas tangas air pada suhu 60°C, hasil leburan ditambahkan ekstrak rimpang yang sudah dilarutkan dalam propilenglikol. Air murni dan akrilil glikosida dipanaskan pada suhu 60°C. Hasil leburan yang sudah berisi ekstrak rimpang dicampurkan ke dalam campuran air murni dan akrilil glikosida dengan diaduk menggunakan *stirrer* (IKA, RW-20) pada kecepatan 500 rpm. Selanjutnya diaduk kembali menggunakan *ultraturax* (IKA, T25) pada kecepatan 20000 rpm selama 10 menit dan didinginkan pada suhu 2-5°C sambil diaduk menggunakan *ultraturax* dengan kecepatan 5000 rpm. Selanjutnya dilakukan ultrasonikasi menggunakan alat *sonicator* (Qsonica, Q700) pada 50 amplitudo selama 10 menit. Nanopartikel NLC ekstrak yang terbentuk dilakukan karakterisasi<sup>(11)</sup>.

**Karakterisasi NLC Ekstrak<sup>(12)</sup>. Ukuran Nanopartikel dan Indeks Polidispersitas.** Ukuran nanopartikel dan indeks polidispersitas diukur berdasarkan distribusi populasi nanopartikel. Dilakukan dengan cara sejumlah NLC ekstrak dimasukan ke dalam wadah, dilakukan pengenceran dan dianalisis menggunakan *Particle size analyzer zetasizer* (Malvern).

**Zeta Potensial.** Aliquot (fraksi) kecil (100µL) dari NLC ekstrak didispersikan pada 50,0 mL aquadest dan diukur dengan menggunakan *Particle size analyzer Zetasizer* (Malvern).

**Morfologi Nanopartikel.** Morfologi NLC ekstrak dilakukan dengan menggunakan *Transmission Electron Microscopy* (JEOL JEM 1400). Sampel NLC ekstrak diencerkan dengan perbandingan 1:10.

Kemudian sampel diteteskan ke atas *Cu substrated grid* dan dibiarkan sampai kering. Selanjutnya ditetesi dengan larutan uranyl asetat 2%, didiamkan sampai kering dan dianalisa dengan menggunakan TEM pada 100KV dengan berbagai perbesaran.

**Aktivitas Antihialuronidase NLC Ekstrak. Pembuatan Reagen Uji Aktivitas Antihialuronidase. Dapar Fosfat (300mM pH 5,35 pada suhu 37°C).** Sebanyak 36 mg/mL Na fosfat monobasik dilarutkan dalam air murni kemudian diatur pH 5,35 dengan 1 N NaOH dan 1 N HCl.

**Larutan Asam Hialuronat (0.3% w/v).** Larutkan 0,3 mg/mL asam hialuronat dalam dapar fosfat. Panaskan larutan pada suhu 90-95°C menggunakan *magnetic stirrer* hingga larutan tercampur semua selama 15-30 menit. Pastikan larutan tidak mendidih. Setelah larutan mendingin, atur pH 5,35 dengan 1 N NaOH dan 1 N HCl.

**Enzyme Diluent.** 20 mM natrium fosfat, 77mM natrium klorida, dan 0,01% (w/v) *bovine serum albumin* pH 7 pada 37°C. Larutkan 2,4 mg/mL natrium fosfat monobasik, mengandung 4,5 mg/mL natrium klorida dan 0,1 mg/mL BSA dalam air murni. Atur pH 7, pada suhu 37°C dengan 1 N NaOH dan 1 N HCl.

**Larutan Asam Albumin.** 24 mM natrium asetat, 79 mM asam asetat, dan 0,1% (w/v) BSA (pH 3,75, 25°C). larutkan 3.27 mg/mL natrium asetat dalam air murni, mengandung 4,5 µL/mL asam asetat dan 1 mg/mL BSA, atur pH 3,75 dengan 5 N HCl.

**Hialuronidase.** Larutkan 0,02 mg enzim hialuronidase dalam 1 mL *enzyme diluent*.

**Cara Uji Aktivitas Antihialuronidase NLC Ekstrak.** Penghambatan aktivitas enzim hialuronidase diukur berdasarkan metode yang telah dijabarkan oleh Sigma Aldrich dan Tu & Tawata (2015) dengan sedikit modifikasi<sup>(13)</sup>. Campuran larutan yang terdiri dari 25 µL sampel (0,78 – 50 µg/mL), 3 µL enzim *hyaluronidase from bovine testes type I-S* (0,02 mg/mL, Sigma H3506), dan 12 µL dapar fosfat (300 mM, pH5,35, Sigma 0751) diinkubasi menggunakan alat inkubator ESCO pada suhu 37°C selama 10 menit. Selain itu disiapkan juga untuk kontrol yang hanya berisi 3 µL enzim dan 37 µL dapar fosfat serta blangko yang hanya berisi 15 µL dapar fosfat dan 25 µL sampel. Selanjutnya tiap sumur *96 well-microtiter plate* dari campuran larutan tersebut ditambahkan sebanyak 10 µL substrat asam hialuronat dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 45 menit. Larutan berupa *acidic albumin* ditambahkan sebanyak 100 µL ke dalam larutan tersebut dan diamkan di suhu ruang selama 10 menit. Absorbansi diukur menggunakan panjang gelombang 600 nm menggunakan alat ELISA reader (Multiskan Go Reader Thermo Fisher Scientific TM Multiscan, N12391)

**Persentase Aktivitas antihialuronidase NLC Ekstrak.** Aktivitas antihialuronidase NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* ditentukan dengan mengukur absorbansi menggunakan ELISA reader dengan metode determinasi turbidimetrik (persen (%) transmiter pada panjang gelombang 600 nm, *light path* 1 cm). Metode ini digunakan dengan cara mengukur absorbansi dari fragmen asam hialuronat yang terbentuk akibat penguraian asam hialuronat oleh hialuronidase. Dari absorbansi pengukuran ini dapat dihitung persentase aktivitas penghambatan hialuronidase dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Aktivitas antihialuronidase} = \frac{C - S}{C} \times 100\%$$

C = Absorbansi aktivitas enzim hialuronidase tanpa sampel

S = Absorbansi aktivitas enzim hialuronidase dengan penambahan sampel yang diuji

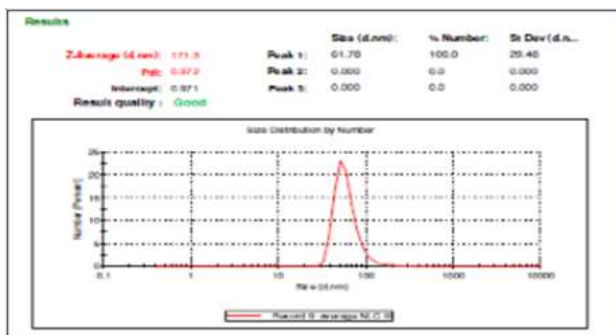
IC<sub>50</sub> dihitung dengan menggunakan absorbansi persamaan regresi linier, konsentrasi sampel (dalam logaritma) sebagai sumbu x dan persen inhibisi sebagai sumbu y. Dari persamaan  $y = a + bx$  dapat dihitung nilai IC<sub>50</sub>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Karakterisasi NLC Ekstrak. Ukuran Nanopartikel dan Indeks Polidispersitas NLC Ekstrak.** Pada Tabel 1 dan Gambar 1, ukuran nanopartikel NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* adalah 171,3 nm. Dihasilkan ukuran nanopartikel yang kecil karena pada pembuatan NLC ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode *High speed homogenization-ultrasonication*. Gaya pengadukan yang besar dan gelombang yang tinggi dapat memecah partikel menjadi lebih kecil. Nanopartikel dengan ukuran sub-mikron memberikan *uptake intraseluler* yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan mikropartikel dan memiliki rentang availabilitas yang besar dalam target biologis sehingga relatif lebih mudah terdistribusi. Dengan ukuran NLC ekstrak yang kecil diharapkan pelepasan zat aktif ke dalam kulit lebih cepat dan terdistribusi merata ke dalam jaringan intraseluler. Indeks polidispersitas (*polydispersity index*, PDI)

**Tabel 1. Ukuran nanopartikel, PDI, dan zeta potensial NLC.**

Bahan	Ukuran nanopartikel (nm)	Indeks polidispersitas	Zeta potensial (mV)
NLC ekstrak	171,3	0,37	-26,8



Gambar 1. Ukuran nanopartikel dan PDI NLC ekstrak.

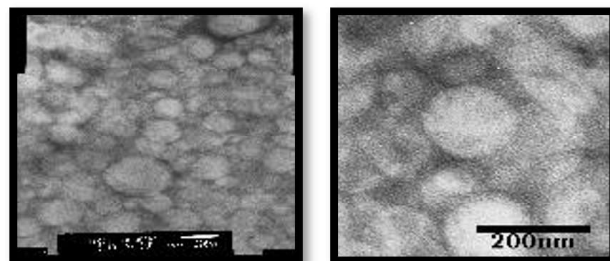


Gambar 2. Zeta potensial NLC ekstrak.

yang dihasilkan adalah 0,37. PDI menunjukkan keseragaman ukuran nanopartikel. PDI NLC ekstrak mendekati nol yang artinya ukuran nanopartikel yang dihasilkan adalah seragam.

**Zeta Potensial NLC Ekstrak.** Pada Tabel 1 dan Gambar 2, dihasilkan zeta potensial NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* -26,8 mV. Zeta potensial yang dihasilkan merupakan ukuran *repulsive force* diantara partikel. Zeta potensial menentukan sistem koloid dari nanopartikel yang distabilkan oleh gaya elektrostatis. Nilai zeta potensial lebih besar dari -30 mV hingga +30 mV umumnya dianggap memiliki gaya tolak yang cukup untuk mencapai stabilitas koloid fisik yang lebih baik. Setiap partikel akan saling tolak menolak satu sama lain sehingga tidak terjadi kecenderungan beragregasi. Menurut teori DLVO, stabilitas koloid dari partikel-partikel dalam emulsi bergantung pada gaya tolak menolak (gaya lapisan rangkap elektrik) untuk melawan gaya tarik-menarik (gaya Van der Waals) yang dapat menyebabkan agregasi *irreversible*. Diharapkan sistem koloid dalam NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* terdispersi merata dan stabil<sup>(14)</sup>.

**Morfologi Nanopartikel NLC Ekstrak.** *Transmission Electron Microscopy* merupakan teknik untuk menentukan bentuk dan morfologi dari nanopartikel lipid. Hasil analisis morfologi NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* dengan menggunakan alat *Transmission Electron Microscopy* JEOL JEM 1400 (Gambar 3), menunjukkan bahwa



Gambar 3. Morfologi NLC ekstrak pada perbesaran 40.000x.

globul nanopartikel NLC ekstrak memiliki ukuran dibawah 200 nm dengan bentuk sferis. Pada gambar terlihat bahwa nanopartikel NLC ekstrak berbentuk padat, terdistribusi merata, dan cukup seragam, sesuai dengan hasil PDI (0,37<1) yang rendah.

**Aktivitas Antihialuronidase NLC Ekstrak.** Pengukuran absorbansi asam hialuronat pada panjang gelombang 600 nm. Konsentrasi NLC ekstrak yang dilakukan adalah: a). *Working solution*: 12000; 8000; 4000; 2000; 1000; 500; 250 ( $\mu\text{g/mL}$ ). b). *Final concentration*: 800,00; 533,33; 266,67; 133,33; 66,67; 33,33; 16,67 ( $\mu\text{g/mL}$ ). Hasil analisis data uji aktivitas antihialuronidase dapat dilihat pada Tabel 2.

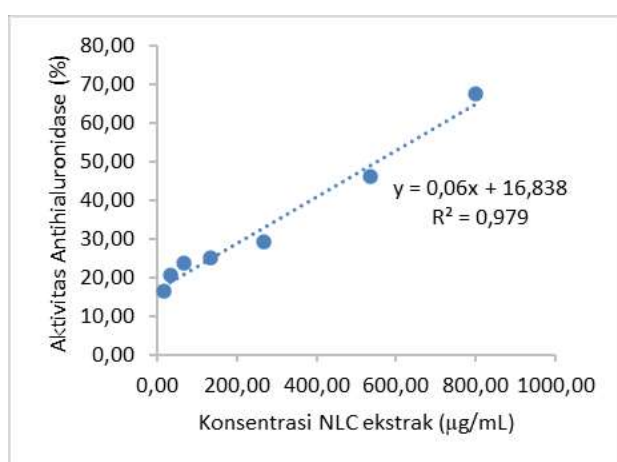
Aktivitas antihialuronidase NLC ekstrak memberikan hasil  $\text{IC}_{50}$  sebesar 552,75  $\mu\text{g/mL}$  (Tabel 2 dan Gambar 4). Hialuronidase merupakan enzim yang dapat mendegradasi asam hialuronat, menyebabkan timbulnya kerutan pada kulit karena kandungan air menjadi berkurang. Inhibisi hialuronidase merupakan salah satu cara untuk dapat mencegah timbulnya kerutan pada kulit, karena dapat menghambat degradasi air. Pengujian secara *in vitro* dilakukan dengan mengukur fragmen asam hialuronat yang merupakan hasil yang terbentuk akibat penguraian asam hialuronat oleh hialuronidase. Setelah ditambahkan larutan asam albumin, sampel yang mengandung fragmen-fragmen kecil asam hialuronat akan semakin keruh yang dapat diukur serapannya secara kolorimetri menggunakan *ELISA reader*.

## SIMPULAN

NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* dalam pelarut etanol 70% memiliki aktivitas antihialuronidase dengan  $\text{IC}_{50}$  sebesar 552,75  $\mu\text{g/mL}$ . NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* memenuhi karakterisasi nanopartikel dengan ukuran partikel 171,3 nm, indeks polidispersitas 0,37, dan potensial zeta -26,8 mV dengan morfologi nanopartikel adalah sferis. NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* dapat di formulasi ke dalam sediaan topikal, berpotensi sebagai antihialuronidase dengan kemampuan mengurangi kerutan pada kulit.

**Tabel 2. Analisis data aktivitas antihialuronidase NLC ekstrak.**

Sampel	Konsentrasi akhir ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas antihialuronidase (%)			Rata-rata	SD	RSD	IC <sub>50</sub> rata-rata	R <sup>2</sup>
		1	2	3					
NLC ekstrak	800,00	65,00	69,38	68,13	67,50	2,25	3,34	552,75	0,98
	533,33	46,56	45,63	45,94	46,04	0,48	1,04		
	266,67	30,00	27,50	30,63	29,38	1,65	5,63		
	133,33	24,38	23,44	27,81	25,21	2,30	9,14		
	66,67	23,44	24,69	23,13	23,75	0,83	3,48		
	33,33	22,50	20,31	19,06	20,63	1,74	8,44		
	16,67	15,94	18,13	15,00	16,35	1,60	9,81		

**Gambar 4. Grafik efek berbagai konsentrasi NLC ekstrak terhadap penghambatan hialuronidase.**

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh dana penelitian Hibah Internal Universitas Pancasila.

### DAFTAR PUSTAKA

- Farage, MA, Miller, KW, Maiba, HI. Textbook of Aging Skin. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer; 2017. p. 331, 1055
- Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. From Basel, Switzerland. Journal Dermato Endocrinology. 2012; 4(3):253-8.
- Lee A, Grummer SE, Kriegel D, Marmur E. Hyaluronidase. Dermatologic Surg. 2010;36:1071-7.
- Kumud, M, Sanju, N. In-vitro evaluation of antioxidant, anti-elastase, anti-collagenase, anti-hyaluronidase activities of Safranal and determination of its sun protection factor in skin photoaging. Bioorg Chem. 2017;77:159-67. doi:https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.12.030
- Elzaawely AA, Xuan TD, Tawata S. Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. leaves exposed to copper sulphate. Environ Exp Bot. 2007; 59(3):347-53.
- Lim TK. *Alpinia zerumbet*. Edible medicinal and non-medicinal plants. Springer International Publishing; 2016, p. 196-213
- Murakami S, Li W, Matsuura M, Satou T, et al. Composition and seasonal variation of essential oil in *Alpinia zerumbet* from Okinawa Island. Nat Med; 2009; 204-8.
- Chompoo J, Upadhyay A, Fukuta M, Tawata S. Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. BMC Complement Altern Med. 2012; 12(1):106.
- Azwanida, NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Med Aromat Plants. 2015;4(3). doi:https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196
- Lacerda, SP, Cerize, NNP, Re, MI. Preparation and characterization of carnauba wax nanostructured lipid carriers containing benzophenone-3. International Journal of Cosmetic Science. 2011; 33:112-21. doi:https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00626
- Lason, E, Sikora, E, Ogonowski, J. Influence of proses parameters on properties of NLC formulation. Acta Biochimica Polonica (ABP), 2013;60(4):773-7. doi:https://doi.org/10.18388/abp.2013\_2056
- Chaudary, H, Jadhav, K, Kadam, VJ. Formulation and evaluation of nanostructured lipid carriers containing glipizide. World Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. 2016;5(4):1424-37. doi:https://doi.org/10.20959/wjpps20164-6398
- Tu PTB, Tawata S. Antioxidant, antiaging, and antimelanogenic properties of the essential oils from two varieties of *Alpinia zerumbet*. MDPI Journal. 2015; 20(9):16723-40
- Joseph, E., & Singhvi, G. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy. 2019;91-116. doi:https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816505-8.00007-2