

## Gel Mengandungi Nanozarah Kitosan yang Dimuatkan dengan DsiRNA dan Kurkumin sebagai Pembalut Luka Kencing Manis: Pelepasan Bahan Aktif dan Kesan Kesitotoksikan

(Gel Containing Chitosan Nanoparticles Loaded with DsiRNA and Curcumin as a Diabetic Wound Dressing: The Release of Active Ingredients and Cytotoxic Effects)

FATIN HANANI MOHD FADHIL, NG SHIOW-FERN & HALIZA KATAS\*

*Centre for Drug Delivery Technology, Faculty of Pharmacy, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan, Malaysia*

*Diserahkan: 20 September 2022/Diterima: 14 April 2023*

### ABSTRAK

Baru-baru ini, RNA penghalang kecil substrat-Diser (DsiRNA) telah digabungkan dengan satu agen anti-radang semula jadi iaitu kurkumin (Cur) dalam bentuk nanozarah dan dimuatkan ke dalam gel untuk rawatan luka kencing manis. DsiRNA telah digunakan untuk melenyapkan ekspresi berlebihan gen pembawa prostaglandin (PGT) yang mengganggu respons pembentukan salur darah dan melambatkan penyembuhan luka. Selain sifat fizikokimia, keberkesanan dan keselamatan formulasi ini juga bergantung kepada corak pelepasan bahan aktif. Oleh itu, kajian ini telah menilai corak pelepasan bahan aktif daripada nanozarah dan gel tersebut serta kesan kesitotoksikannya. Dalam kajian ini, kedua-dua bahan aktif ini telah dimasukkan ke dalam nanozarah kitosan (CSNPs) menggunakan kaedah gelasi ion dan kemudiannya dicampur ke dalam pembawa gel Pluronic F-127 (PF-127) pada kepekatan berbeza. CSNPs yang terhasil telah dioptimumkan untuk memperoleh zarah bersaiz kecil ( $301.3 \pm 57.6$  nm) dan cas permukaan yang tinggi ( $+23.7 \pm 0.7$  mV). Kebanyakan zarah adalah berbentuk sfera dengan keberkesanan pemerangkapan yang tinggi untuk Cur ( $86.8 \pm 4.2\%$ ) dan DsiRNA ( $100.9 \pm 52.5\%$ ). Gel yang terhasil pula mempunyai tekstur dan morfologi gel yang baik dan sesuai untuk aplikasi topikal. Kajian pelepasan dadah selama 24 jam secara *in-vitro* menunjukkan jumlah kumulatif pelepasan DsiRNA adalah lebih tinggi berbanding Cur iaitu dalam lingkungan  $23.8$ - $35.4$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Kebolehidupan fibroblas yang didedahkan kepada formulasi ini juga adalah melebihi 80%, menggambarkan sifat tidak toksik CSNPs terhadap sel. Kesimpulannya, formulasi gel yang mengandungi CSNPs ini berpotensi untuk dibangunkan sebagai pembalut luka dan agen penyembuh luka kencing manis.

Kata kunci: Diabetes; luka kronik; semi-pepejal; teknologi asid nukleik

### ABSTRACT

Recently, Dicer-substrate small interfering RNA (DsiRNA) has been incorporated into chitosan nanoparticles (CSNPs) in combination with a natural anti-inflammatory agent called curcumin (Cur) and later the nanoparticles were loaded into gels for treating diabetic wounds. DsiRNA is used to silence the overexpression of prostaglandin transporter gene (PGT) which attenuates blood vessel formation and slows the healing of diabetic wounds. In addition to physicochemical properties, the effectiveness and safety of these formulations depend on the release of active ingredients. Therefore, this study evaluated the release pattern of active ingredients from the nanoparticles and the gels as well as their cytotoxic effects. In this study, both active ingredients were incorporated into the CSNPs via ionic gelation method and loaded into different concentrations of Pluronic F-127 (PF-127) gels. The CSNPs were optimized to produce small-sized particles ( $301.3 \pm 57.6$  nm) and a high surface charge value ( $+23.7 \pm 0.7$  mV). Most particles were spherical in shape with high percent of entrapment efficiency for Cur ( $86.8 \pm 4.2\%$ ) and DsiRNA ( $100.9 \pm 52.5\%$ ), respectively. The resulting gels had shown good texture and morphology that were suitable for topical applications. An *in-vitro* drug release study for 24 h showed that the cumulative amount of DsiRNA released was higher than Cur; in the range of  $23.8$ - $35.4$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . The viability of fibroblasts exposed to the formulations was more than 80%, showing the non-toxic property of CSNPs to cells. In conclusion, gels containing the CSNPs have shown the potential to be developed as wound dressings and healing agents for diabetic wounds.

Keywords: Chronic wound; diabetes; nucleic acid technology; semi-solid

## PENGENALAN

Penemuan kepada interferensi RNA (RNAi) telah meningkatkan keupayaan penggunaan RNA dalam pengawalan ekspresi gen. Akhir-akhir ini, penggunaan RNA penghalang kecil substrat-Diser (DsiRNA) dalam terapi penyembuhan luka kencing manis telah dilaporkan (Nor Azlan et al. 2021). Dalam kajian ini, DsiRNA dengan susunan bes yang khusus telah digunakan sebagai bahan aktif utama melalui peranannya dalam pelenyapan ekspresi gen PGT bagi membantu meningkatkan isyarat Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Peningkatan tahap PGE<sub>2</sub> akan merangsang proses pembentukan saluran darah yang seterusnya mempercepat penyembuhan luka kencing manis. Kurkumin (Cur) daripada kunyit (*Curcuma longa*) juga digunakan dalam kajian ini sebagai bahan aktif kerana potensinya dalam penyembuhan luka melalui ciri-ciri biokimia yang dilaporkan seperti anti-radang, anti-jangkitan dan anti-oksida (Menon & Sudheer 2007). Selain itu, Cur mampu menggalakkan pembentukan semula tisu, penghasilan tisu granulasi dan pemendapan kolagen. Selain itu, Cur dapat meningkatkan penghasilan fibroblas dan kepadatan salur darah serta mempercepat pengecutan luka (Choudary & Shivakumar 2018).

Walau bagaimanapun, tanpa pengangkut, DsiRNA dan Cur mempunyai ketersediaan-bio yang rendah dan memerlukan agen pengangkut yang mampu untuk menstabilkan kedua-dua bahan tersebut dan memaksimumkan penghantaran bahan aktif ke kawasan sasaran seperti nanozarah (NPs) polimer. Antara polimer yang kerap digunakan dalam penyediaan nanozarah ialah kitosan (CS), sejenis biopolimer semula jadi yang mampu untuk mengawal pelepasan bahan aktif, mempunyai ciri lekatan mukosa yang boleh meningkatkan masa lekatan ubat di kawasan penyerapan serta sifat lain seperti tidak toksik dan bioerasi (Agnihotri, Mallikarjuna & Aminabhavi 2004; Kafshgari et al. 2011). Selain itu, ciri kationik CS juga berpotensi dalam sistem penghantaran asid nukleik disebabkan oleh kehadiran kumpulan amino bercas positif yang mengikat dengan berkesan pada sebatian yang bercas negatif seperti DsiRNA. Bagi menyediakan pembalut luka yang lebih berkesan, CSNPs juga memerlukan agen pengangkut yang sesuai bagi memudahkan pelepasan bahan aktif di kawasan luka secara berterusan.

Umumnya polimer sintetik atau semula jadi digunakan dan digabungkan dengan bahan aktif pilihan dan dilepaskan secara konsisten atau berkala pada jangka masa panjang atau melalui pelepasan yang dicetuskan oleh keadaan sekitar. Hal ini bertujuan untuk

mencapai terapi yang lebih berkesan dan menghindari penyampaian dos berlebihan. Salah satu cara administrasi penyampaian bahan aktif terkawal adalah melalui aplikasi topikal yang melibatkan administrasi bahan aktif dalam formulasi polimer pada permukaan badan seperti kulit (Johnson & Wang 2015). Administrasi secara topikal adalah lebih selamat dan lebih berkesan bagi penyampaian bahan aktif yang berdos rendah kerana keupayaan kaedah administrasi ini untuk sampai di kawasan sasaran pada kepekatan optimum dan meningkatkan ketersediaan-bio bahan aktif (Kaur et al. 2016). Polimer Pluronik (PF-127) telah menarik minat para pengkaji dalam penghasilan sistem penghantaran dermal dan transdermal bagi menggalakkan dan menambahbaik penembusan dadah melalui kulit (Escobar-Chaves et al. 2006). Kelebihan lain yang dimiliki oleh gel PF-127 termasuk ciri biolekat dan tidak toksik. Oleh yang demikian, gel PF-127 telah digunakan dalam kajian ini bagi menstabilkan CSNPs supaya pelepasan setempat Cur dan DsiRNA di kawasan sasaran dapat dicapai dengan lebih berkesan.

Pelepasan bahan aktif bergantung pada pelbagai faktor termasuk ciri fizikokimia pengangkut, keadaan kulit dan sifat semula jadi pengangkut dadah yang akan menentukan keberkesanan sesuatu agen pengangkut. Selain daripada pelepasan bahan aktif, kesan kesitotoksikan merupakan salah satu penanda penting dalam penilaian biologi sistem penghantaran bahan aktif dan ini boleh dikenal pasti melalui kajian *in-vitro* dengan mengkaji tahap kebolehidupan dan/atau kadar percambahan sel apabila diinkubasi bersama bahan kimia (Aslanturk 2017). Dalam kajian ini, selain pencirian fizikokimia nanozarah kitosan yang dimuatkan dengan DsiRNA dan Cur (Cur/DsiRNA-CSNPs) dijalankan, corak pelepasan dan tahap kesitotoksikan bahan aktif (Cur dan DsiRNA) daripada formulasi gel juga dikaji untuk mengenal pasti kebolehpayaan formulasi gel bagi menghasilkan pelepasan berterusan selama 24 jam serta mengekalkan kebolehidupan sel fibroblas kulit manusia (NHDF). Penemuan ini membolehkan formulasi ini terus dibangunkan sebagai pembalut luka untuk pesakit kencing manis yang dapat mengurangkan komplikasi berkaitan luka jenis kronik ini.

## BAHAN

Kajian ini telah menggunakan CS dengan berat molekul rendah (75-85% darjah deasetilasi), serbuk Cur (94% = kandungan kurkuminoid, 80% = kurkumin) dan natrium tripolifosfat (TPP) (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat) serta PF-127 (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat) untuk menghasilkan gel. Gel *Intrasite* pula diperoleh dari Smith & Nephew (United Kingdom) yang digunakan untuk

dibandingkan dengan formulasi gel yang dibangunkan. Pelarut terdiri daripada asid asetik, natrium hidroksida (NaOH) (Amresco, Amerika Syarikat) dan etanol mutlak (Merck, Amerika Syarikat) dengan gred farmaseutikal. DsiRNA yang mensasarkan gen PGT [5' -rGrArA rGrGrA rArGrU rGrGrC rUrGrA rGrUrU rArUrU rArArU A- 3' (bebenang sense) dan 5' -rUrArU rUrArArUrUrA rCrUrC rArGrC rCrArC rUrUrC rCrUrU rCrUrU- 3' (bebenang antisense)] (Integrated DNA Technologies, Amerika Syarikat) telah digunakan dalam kajian ini. Membran asetat selulosa telah diperolehi daripada Sterlitech Corporation (Washington, Amerika Syarikat). Penimbal fosfat bergaram (PBS) pula telah diperolehi dari Sigma-Aldrich (Amerika Syarikat). Manakala itu, barisan sel kulit fibroblas manusia biasa (nombor katalog; NHDF, C-12302), medium pertumbuhan fibroblas beserta nutrien tambahan khas untuk medium pertumbuhan fibroblas telah diperolehi daripada PromoCell (Jerman). AlamarBlue™ telah dibekalkan oleh Invitrogen (Amerika Syarikat) untuk penentuan kesan kesitotoksikan formulasi.

#### PENYEDIAAN CUR/DSIRNA-CSNPs

Cur yang dimuatkan ke dalam CSNPs (Cur-CSNPs) disediakan menggunakan kaedah gelasi ion seperti yang dilaporkan oleh Chuah et al. (2011) dengan sedikit pengubahsuaian terhadap kaedah tersebut. CS dengan kepekatan 0.3 % (w/v) telah disediakan dengan melarut serbuk CS ke dalam 2% (v/v) asid asetik diikuti dengan penambahan 2M NaOH untuk mencapai pH 5. Larutan Cur berkepekatan 1 mg/mL disediakan dalam larutan etanol mutlak. Manakala 0.1% (w/v) TPP yang dilarutkan dengan air suling digunakan sebagai agen tautan silang untuk menghasilkan CSNPs. Sebanyak 100 µL larutan Cur dicampurkan sedikit demi sedikit ke dalam 3 mL larutan CS yang turut dicampur secara perlahan-lahan dengan 3 mL larutan TPP pada kelajuan 700 rpm. Campuran tersebut kemudiannya diemparkan pada kelajuan 10 000 putaran per minit (rpm) pada suhu 18 °C selama satu jam untuk mendapatkan mendapan Cur-CSNPs. Larutan supernatan dasingkan dan mendapan Cur-CSNPs diserakkan semula ke dalam air suling tidak berion.

Kemudian, DsiRNA dijerapkan ke permukaan Cur-CSNPs untuk menghasilkan DsiRNA/Cur-CSNPs menggunakan teknik inkubasi (Raja et al. 2013) dengan sedikit pengubahsuaian. Sejumlah 500 µL larutan DsiRNA (15 µg/mL) dalam air ultra tulen dicampur sedikit demi sedikit dengan 500 µL ampaiian Cur-CSNPs. Tiub Eppendorf yang mengandungi campuran tersebut

dibalikkan ke atas dan bawah selama 10 saat supaya campuran dapat digaul sama rata. Kemudian, tiub tersebut dibiarkan selama dua jam pada suhu bilik sebelum digunakan untuk analisis seterusnya.

#### PENENTUAN SAIZ ZARAH, INDEKS POLIPENYEBARAN (PDI), CAS PERMUKAAN DAN MORFOLOGI ZARAH

Purata saiz zarah, PDI dan cas permukaan zarah ditentukan dengan menggunakan peralatan Zetasizer ZS-90 (Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom). Tiada sebarang pelarutan dilakukan sebelum pengukuran dilakukan. Setiap sampel dianalisis sebanyak tiga kali pada suhu 25 °C dan data dilaporkan sebagai purata ± sisihan piawai (SD). Pencirian morfologi ke atas Cur-CSNPs dan DsiRNA/Cur-CSNPs dijalankan menggunakan mikroskopi pemancaran elektron (TEM) (Tecna Spirit, FEI, Eindhoven, THE Netherlands).

#### KEBERKESANAN PEMERANGKAPAN (EE) CUR DAN DSIRNA

Jumlah peratusan Cur yang terperangkap semasa penyediaan NPs dinilai melalui perbezaan antara jumlah keseluruhan Cur yang dicampur dalam larutan CS pada awal uji kaji dengan jumlah Cur dalam larutan supernatan selepas proses pengemparan dilakukan terhadap ampaiian Cur-CSNPs. Kehadiran Cur dalam larutan supernatan ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Scientific Instruments, Japan) pada gelombang 427 nm (Mofazzal et al. 2014; Varuna & Madhusudhan 2015). Manakala itu, jumlah peratusan DsiRNA yang dijerap ditentukan pada gelombang 260 nm bagi mengukur penyerapan DsiRNA yang tidak dimuat ke dalam NPs dan terkandung dalam larutan supernatan selepas proses pengemparan ( $13,000 \times g$  pada 10 °C selama 30 min) (Raja, Katas & Thum 2015). Kemudian, dengan menggunakan persamaan dari hukum Beer-Lambert, kepekatan DsiRNA yang tidak terperangkap dihitung dengan menggunakan nilai penyerapan DsiRNA yang tidak terperangkap dalam persamaan  $A = \epsilon CL$ ; A ialah penyerapan pada gelombang 260 nm; C ialah kepekatan larutan; L ialah panjang kuvet dan  $\epsilon$  ialah pekali kepupusan molar (nilai  $\epsilon$  untuk DsiRNA ialah  $385101 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). EE ditentukan melalui persamaan berikut:

$$EE (\%) =$$

$$\frac{\text{Cur/DsiRNA dicampur} - \text{Cur/DsiRNA tidak terperangkap (supernatan)}}{\text{Cur/DsiRNA dicampur}}$$

#### PENYEDIAAN GEL PF-127 MENGANDUNGI DsiRNA/CUR-CSNPs

Teknik dingin telah digunakan dalam penyediaan lima kepekatan gel PF-127 berbeza (15, 20, 25, 30 dan 35% w/v). Serbuk PF-127 dicampur dengan air suling yang bersuhu 4 °C dan digaul menggunakan pengadun bermagnet secara perlahan-lahan untuk mengelakkan berlaku gumpalan terhadap serbuk PF-127 selama 4 hingga 6 jam. Kemudian, setelah kesemua serbuk PF-127 melarut, larutan gel tersebut disimpan di dalam peti sejuk bersuhu 4 °C selama semalaman untuk memastikan gel melarut dengan sempurna dan pelepasan gelembung udara yang terhasil semasa proses campuran. Campuran DsiRNA/Cur-CSNPs dibekukan pada suhu -80 °C di dalam peti sejuk beku dan kemudian formulasi tersebut melalui proses liofilisasi selama 48 jam menggunakan alat pengeringan beku (Scanvac Coolsafe Freeze Dryer, Lyngø, Denmark) yang telah melalui pra-pembekuan pada suhu -110 °C. Seterusnya, gel PF-127 dicampurkan dengan liofilisat DsiRNA/Cur-CSNPs dan digaul dengan menggunakan pengacau bermagnet untuk menghasilkan larutan yang sebati selama 4 jam. Formulasi yang terhasil sentiasa disimpan pada suhu 4 °C sebelum sebarang analisis dijalankan untuk memudahkan pengendalian gel tersebut.

#### PENCIRIAN *in-vitro* GEL PF-127 MENGANDUNGI DsiRNA/CUR-CSNPs ANALISIS PROFIL TEKSTUR (TPA)

Tekstur gel adalah penting dalam menentukan kualiti sesuatu gel. Sifat yang dikaji pada formulasi dalam kajian ini ialah kekerasan, jeleketan dan pelekatan menggunakan alat penganalisis tekstur (Brookfield CT-3 Texture Analyzer, Amerika Syarikat) melalui kaedah ujian mampatan. Pada platform penganalisis tekstur, diletakkan bekas berdiameter 60 mm berisi dengan 9 mL gel PF-127 yang mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs. Daya pencetus (0.10 N) disasarkan pada sampel menggunakan prob silinder berdiameter 38 mm. Rod dimampatkan dalam gel sebanyak dua kali (tempoh menunggu antara mampatan pertama dan kedua ialah 15 saat) dengan kedalaman yang telah ditetapkan (2.5 mm) pada kadar 1 mm/s. Analisis yang sama turut dijalankan terhadap gel komersial (gel *Intrasite*) sebagai kawalan. Ujian dilakukan sebanyak tiga kali pada formula yang berlainan.

#### ANALISIS MORFOLOGI

Analisis morfologi ini adalah bertujuan untuk mengkaji

ciri topografi permukaan gel PF-127 yang mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs. Sebelum analisis dijalankan, sampel gel dibekukan pada -80 °C dan kemudiannya diliofilisasi pada suhu -110 °C selama 48 jam menggunakan alat pengering beku (Scanvac Coolsafe Freeze Dryer, Lyngø, Denmark). Sampel disadur dengan iridium dalam penyadur memercik untuk menghasilkan zarah yang lebih halus dan setelah itu diimbas menggunakan mikroskopi elektron imbasan pancaran medan (FESEM) (ZEISS MERLIN™ FESEM dengan kolom GEMINI II, Mikroskop Carl Zeiss, Amerika Syarikat).

#### KAJIAN PELEPASAN BAHAN AKTIF *in vitro*

Pelepasan bahan aktif (DsiRNA dan Cur) daripada gel PF-127 yang mengandungi DsiRNA/Cur telah dikaji menggunakan gelas menegak sel peresapan Franz (PermeGear Inc., Hellertown, Amerika Syarikat) yang berisi padu sebanyak 5.5 mL di bahagian penerima. Membran asetat selulosa dengan liang bersaiz 0.45 µm telah diletakkan di bahagian orifis ruang penderma yang berdiameter 9 mm dan mempunyai ruang peresapan berukuran 0.7854 cm<sup>2</sup>. PBS telah digunakan sebagai medium di bahagian penerima dan sistem ini sentiasa dikekalkan pada suhu 37 °C. Keseragaman medium pula telah dikekalkan dengan sentiasa mengacau larutan medium menggunakan pengadun bermagnet. Formulasi gel (1 g) diletakkan di atas membran di ruang penderma. Ruang penderma dan tempat pengambilan sampel ditutup rapi dengan parafilm. Untuk tempoh masa yang tertentu (15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 dan 24 jam) sejumlah 1 mL sampel dikeluarkan melalui ruang pengambilan sampel dan digantikan dengan sejumlah isi padu PBS yang sama. Jumlah pelepasan bahan aktif (Cur dan DsiRNA) dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Scientific Instruments, Japan) seperti dalam penentuan EE. PBS digunakan sebagai kawalan kosong. Nilai penyerapan setiap bahan aktif ditentukan dan direkod. Bagi kepekatan DsiRNA, ia ditentukan menggunakan hukum Beer's ( $A_{260} = \epsilon CL$ ), manakala kepekatan Cur ditentukan dengan menggunakan lengkungan piawai (pada kepekatan Cur antara 1 hingga 6 µg/mL dengan garisan regresi ( $R^2 = 0.999$ ) selepas menentukan nilai penyerapan pada panjang gelombang,  $\lambda = 427$  nm. Jumlah kumulatif pelepasan Cur dan DsiRNA melalui membran dihitung dan diplot berlawanan dengan masa (jam). Kadar pelepasan bahan aktif daripada formulasi gel ditentukan menggunakan kecerunan graf lengkungan piawai.



KAJIAN KESITOTOKSIKAN SECARA *in vitro*

NHDF telah dikultur pada 37 °C dalam kelembapan 5% CO<sub>2</sub>/95% udara dan medium pertumbuhan fibroblas berserta nutrien tambahan yang dicampur dengan 10% serum fetal lembu dan 1% penisilin/streptomisin. Medium kultur ditukar setiap 2 atau 3 hari. Penilaian kebolehidupan sel yang berinteraksi dengan gel formulasi telah dilakukan melalui ujian kesitotoksikan tidak langsung menggunakan larutan alamarBlue™ (Mohamad et al. 2014). Kaedah tidak langsung telah dilakukan dengan pengkulturan sel NHDF ke dalam plat telaga-96 (1 × 10<sup>4</sup> sel/telaga) dan diinkubasi semalaman. Manakala itu, formulasi gel yang telah disteril diinkubasi ke dalam plat telaga-24 dengan 1 mL medium kultur semalaman pada 37 °C. Setelah itu, 100 µL ekstrak formulasi gel diperoleh dan dipindahkan ke dalam telaga di plat bertelaga-96 yang mengandungi sel (yang telah dibuang medium semasa inkubasi) dan diinkubasi selama 24 jam. Seterusnya, ujian kesitotoksikan dijalankan dengan menguji sel yang didedahkan kepada ekstrak formulasi gel dengan menambah alamarBlue™ dan dibiarkan selama 4 jam. Penyerapan alamarBlue™ dalam medium diukur pada λ = 570 nm dengan menggunakan spektrofotometer mikroplat (Infinite® M200 Pro Nanoquant Tecan, Switzerland). Peratus kebolehidupan sel telah dihitung menggunakan formula berikut:

Kebolehidupan sel (%) =

$$\frac{\text{Penyerapan formulasi gel (570 nm)}}{\text{Penyerapan kawalan (570 nm)}} \times 100$$

## ANALISIS STATISTIK

Data diperoleh direkodkan sebagai purata ± SD. Data tersebut dianalisis dengan ujian varians (ujian ANOVA dua hala, ujian post Bonferroni, ujian-t satu sampel) dengan menggunakan perisian GraphPad Prism Prism (Versi 5, Syarikat GraphPad Software).

HASIL KAJIAN DAN PERBINCANGAN  
CIRI FIZIKAL DsiRNA/CUR-CSNPs

Secara umumnya, Cur-CSNPs terhasil secara spontan menggunakan kaedah gelasi ion. Kaedah ini melibatkan tautan silang ion antara kumpulan fosfat polianionik TPP dengan kumpulan amina polikationik yang terdapat pada struktur CS (Debnath, Kumar & Babu 2011). Selepas proses pengoptimuman, Cur-CSNPs yang terhasil mempunyai saiz zarah yang kecil dan bercaj permukaan positif seperti ditunjukkan dalam Jadual 1. Selepas proses pengempapan untuk membasuh dan mengumpul

nanozarah yang terhasil, didapati nanozarah ini menjadi lebih besar (273.7 ± 56.5 nm) dan dengan permukaan caj permukaan yang lebih tinggi (+25.9 ± 3.3 mV), masing-masing akibat pembentukan gumpalan dan penyingkiran bahan yang tidak berinteraksi terutamanya Cur.

Selepas penjerapan DsiRNA, saiz zarah CSNPs meningkat kepada 301.3 ± 57.6 nm, menunjukkan kejayaan penjerapan DsiRNA ke atas permukaan zarah. Selain itu, nilai caj permukaannya hanya menurun sedikit kepada +23.7 ± 0.7 mV dan perbezaan ini didapati tidak signifikan secara statistik disebabkan jumlah DsiRNA yang ditambah adalah tidak mencukupi untuk merubah caj permukaan keseluruhan nanozarah ini. Kedua-dua bahan aktif telah berjaya dimuatkan ke dalam/ke atas CSNPs dengan peratus EE masing-masing sejumlah 86.8 % ± 4.2 dan 100.9% ± 52.5 untuk Cur dan DsiRNA dan rata-rata zarah ini adalah berbentuk sfera (Jadual 1 (Imbasan TEM)). Keputusan esei elektroforesis gel juga menunjukkan bahawa DsiRNA didapati terikat secara kuat pada CSNPs (tiada migrasi jalur DsiRNA kelihatan selepas proses elektroforesis dijalankan) seperti yang ditunjukkan pada Jadual 1 (Pergerakan elektroforetik DsiRNA daripada Cur-CSNPs).

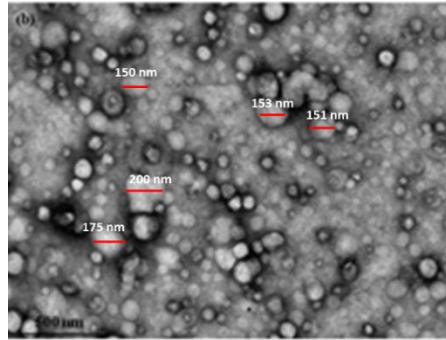
CIRI FIZIKAL GEL PLURONIK MENGANDUNGI DsiRNA/  
CUR-CSNPs

Pembangunan dos topikal memerlukan ciri formulasi yang mudah dialih keluar daripada bekas, mudah diratakan, mempunyai lekatan, kelikatan dan administrasi yang baik serta mudah dikendalikan oleh pesakit. TPA merupakan satu analisis yang sangat penting dan digunakan untuk mengkaji sifat tekstur pelbagai jenis formulasi semi-pepejal bagi memperoleh data berkaitan struktur fizikal sesuatu gel apabila didedahkan terhadap pelbagai keadaan persekitaran dan fisiologi. Dalam kajian ini, parameter mekanikal seperti pelekatan, jeleketan dan kekerasan formulasi PF-127 telah dikaji dan direkodkan seperti dalam Rajah 1.

Pelekatan adalah penting untuk mengenal pasti kerja yang diperlukan bagi memisahkan formulasi daripada permukaan prob silinder yang mana semakin tinggi nilai pelekatan formulasi semakin kuat pelekatan formulasi pada permukaan sasaran. Keadaan ini adalah lebih diutamakan kerana ia menandakan masa penetapan yang lebih lama di kawasan aplikasi (Gratieri et al. 2010). Jeleketan formulasi turut dikaji dengan mengukur kesan sifat struktur formulasi apabila dikenakan tekanan ricih yang berulang. Manakala kekerasan pula ialah kerja yang diperlukan untuk formulasi berubah bentuk dan informasi ini penting untuk mengetahui kebolegunaan formulasi di kawasan sasaran (Gandra et al. 2013).

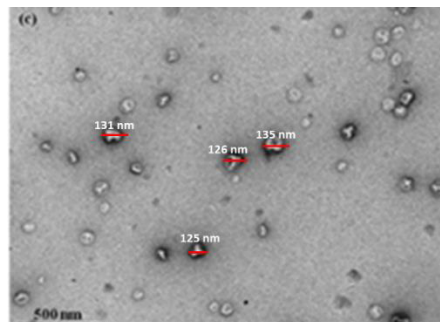
JADUAL 1. Ciri fizikal DsiRNA/Cur-CSNPs, n=3

Sebelum penyerapan DsiRNA				
Purata saiz zarah (nm) ± SD	PDI ± SD	Cas permukaan zarah (mV) ± SD	Kecekapan pemerangkapan, %	
			Cur	DsiRNA
210.9 ± 79.6	0.4 ± 0.1	+12.3 ± 1.0	86.8 ± 4.2	-

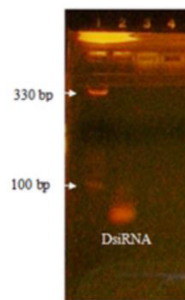


Imbasan Cur-CSNPs menggunakan TEM pada tahap pembesaran 10 kx

Selepas penyerapan DsiRNA				
301.3 ± 57.6	0.4 ± 0.1	+23.7 ± 0.7	86.8 ± 4.2	100.9 ± 52.5



Imbasan DsiRNA/Cur-CSNPs menggunakan TEM pada tahap pembesaran 10 kx



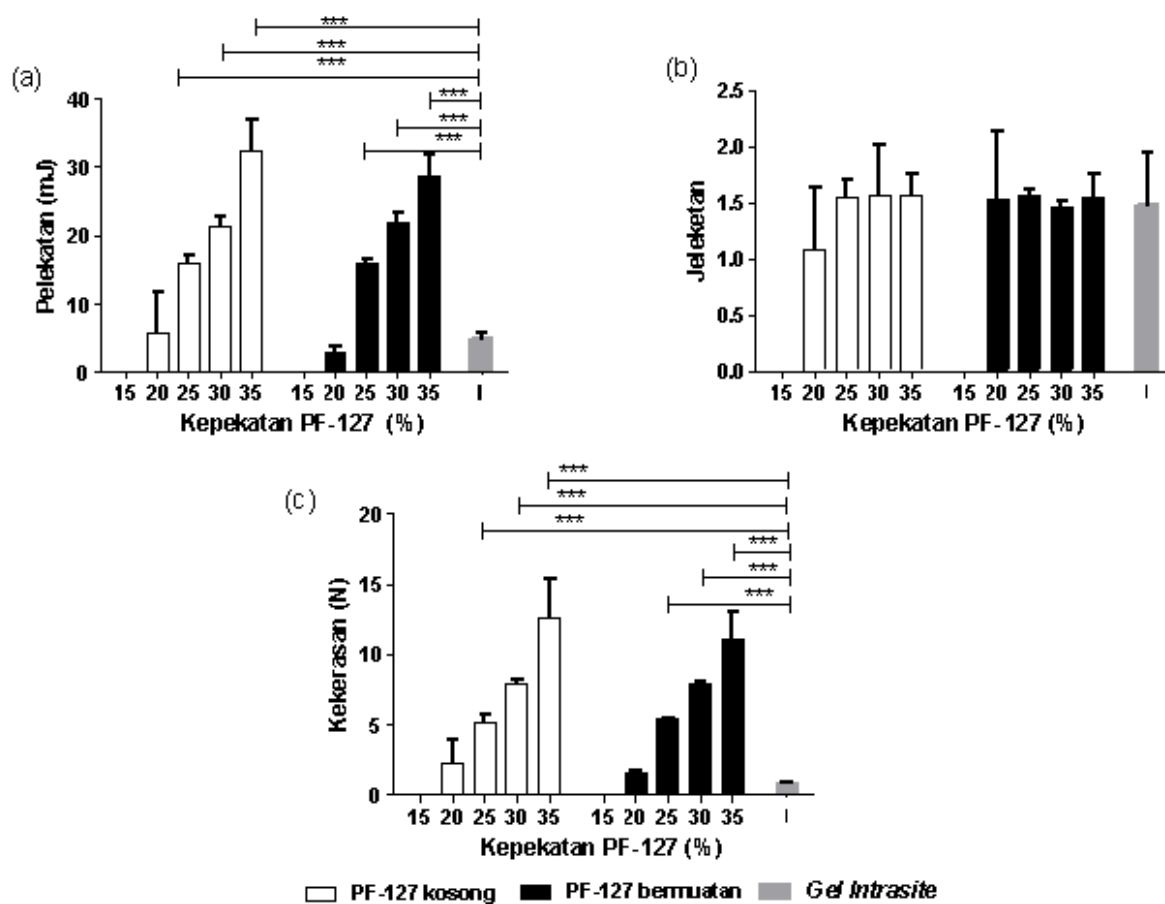
- Legend:
1. DNA ladder (10 bp)
  2. DsiRNA (15 µg/mL)
  3. Cur-CSNPs
  4. DsiRNA/Cur-CSNPs

Pergerakan elektroforetik DsiRNA daripada Cur-CSNPs

Sifat fizikal pelbagai kepekatan formulasi PF-127 (dari 15 hingga 35 % w/v) sama ada mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs atau kosong telah dikaji untuk menentukan kesesuaiannya bagi aplikasi topikal. Rajah 1(a) menunjukkan bahawa semakin meningkat kepekatan PF-127, semakin meningkat nilai pelekatan formulasi PF-127 yang mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs dan corak yang sama juga dapat dilihat untuk formulasi PF-127 yang kosong ( $p < 0.0001$ ). Nilai paling minimum ditunjukkan oleh formulasi PF-127 berkepekatan 20 % w/v yang mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs ( $2.8 \pm 1.0$  mJ). Namun begitu, nilai pelekatan formulasi PF-127 ini adalah tidak berbeza secara signifikan dengan gel *Intrasite* iaitu  $4.90 \pm 0.78$  mJ. Ciri

pelekatan yang dikehendaki haruslah mempunyai nilai yang tinggi supaya formulasi ini berupaya untuk melekat dengan lebih kuat pada permukaan tisu dan seterusnya meningkatkan masa pengekalan formulasi di kawasan aplikasi (Gratieri et al. 2010).

Manakala ciri pelekatan yang tinggi ditunjukkan oleh formulasi PF-127 yang dihasilkan pada kepekatan 25, 30 dan 35% w/v dan yang mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs dan masing-masing mempunyai nilai pelekatan setinggi  $16.1 \pm 0.5$ ,  $21.9 \pm 1.6$  dan  $28.8 \pm 3.1$  mJ. Nilai pelekatan formulasi tersebut turut berbeza secara signifikan berbanding gel *Intrasite* ( $p < 0.0001$ ). Dalam kajian ini, formulasi dengan nilai pelekatan yang tinggi adalah lebih baik kerana ia menyediakan



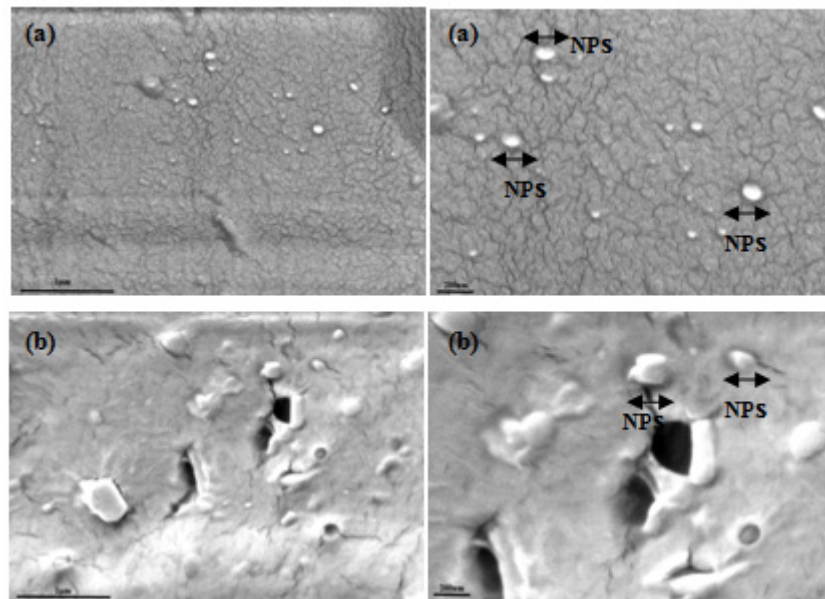
RAJAH 1. Analisis profil tekstur formulasi PF-127 berkepekatan dari 15 hingga 35% w/v sama ada yang kosong atau mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs serta gel *Intrasite* bagi mengkaji parameter (a) pelekatan (b) jejelekatan (c) kekerasan, (n=3)

cukup pelembapan pada luka di kulit yang membantu penyembuhan yang lebih cepat (Akash & Rehman 2015). Nilai pelekatan juga tidak berubah apabila formulasi PF-127 dimuatkan dengan DsiRNA/Cur-CSNPs ( $p=0.8583$ ). Rajah 1(b) menunjukkan jeleketan formulasi PF-127 yang bermuatan dan kosong pada kepekatan yang berbeza. Tiada perubahan jeleketan yang signifikan ditunjukkan oleh kedua-dua jenis formulasi ( $p=0.4901$ ), begitu juga apabila dibandingkan dengan nilai kejelekitan gel *Intrasite* iaitu  $1.5 \pm 0.5$  ( $p>0.05$ ). Keputusan juga menunjukkan kepekatan PF-127 yang berbeza tidak mempengaruhi nilai kepekatan formulasi ( $p=0.5696$ ).

Manakala Rajah 1(c) merujuk kepada kekerasan formulasi yang meningkat dengan signifikan seiring dengan meningkatnya kepekatan PF-127 disebabkan oleh kelikatan dan jumlah polimer yang bertambah ( $p<0.0001$ ). Hal ini pernah dilaporkan sebelum ini dalam kajian yang dijalankan oleh Bologlu et al. (2011). Walau bagaimanapun, penambahan DsiRNA/Cur-CSNPs dalam formulasi PF-127 tidak menunjukkan sebarang perubahan yang signifikan. Formulasi yang menunjukkan nilai kekerasan yang minimum ialah PF-127 berkepekatan 20% w/v yang mengandungi DsiRNA/Cur-CSNP iaitu  $1.6 \pm 0.1$  N. Nilai ini juga tidak berbeza secara signifikan berbanding nilai kekerasan gel *Intrasite* ( $0.9 \pm 0.1$  N).

Selain itu, formulasi PF-127 berkepekatan 25, 30 dan 35% w/v yang mengandungi DsiRNA/Cur-CSNP menunjukkan perbezaan nilai kekerasan yang signifikan dengan gel *Intrasite* ( $p<0.0001$  bagi formulasi 25%, 30%, 35% w/v) dengan nilai kekerasan masing-masing ialah  $5.4 \pm 0.1$  N,  $7.9 \pm 0.2$  N dan  $11.1 \pm 1.9$  N. Oleh kerana keseluruhan nilai kekerasan formulasi adalah lebih tinggi daripada gel *Intrasite* dan menunjukkan nilai yang signifikan (bagi PF-127 bermuatan dengan kepekatan 25, 30 dan 35% w/v), pilihan formulasi yang paling optimum adalah berdasarkan pada formulasi yang mempunyai nilai yang rendah. Hal ini kerana nilai kekerasan sesuatu formulasi sepatutnya adalah rendah untuk memudahkan formulasi tersebut dikeluarkan daripada bekas dan diratakan pada permukaan yang diingini (Bologlu et al. 2011).

Berkaitan dengan morfologi, formulasi gel yang dihasilkan daripada 20 dan 25% w/v PF-127 dan mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs telah dipilih untuk analisis morfologi berdasarkan ciri mekanikalnya yang sesuai bagi aplikasi topikal iaitu tidak terlampau keras dan liat. Morfologi formulasi ini telah diperhatikan menggunakan FESEM seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2. Permukaan kedua-dua gel adalah kasar dan tidak rata. Selain itu, dapat dilihat terdapat DsiRNA/Cur-CSNPs yang bersaiz dalam lingkungan 80-250 nm dan berbentuk sfera pada magnifikasi 25 dan 50 kX.



RAJAH 2. Imej formulasi gel PF-127 berkepekatan 20% w/v (a) dan 25% w/v (b) di bawah FESEM, magnifikasi 25 kX (rajaah kiri) dan 50 kX (rajaah kanan)

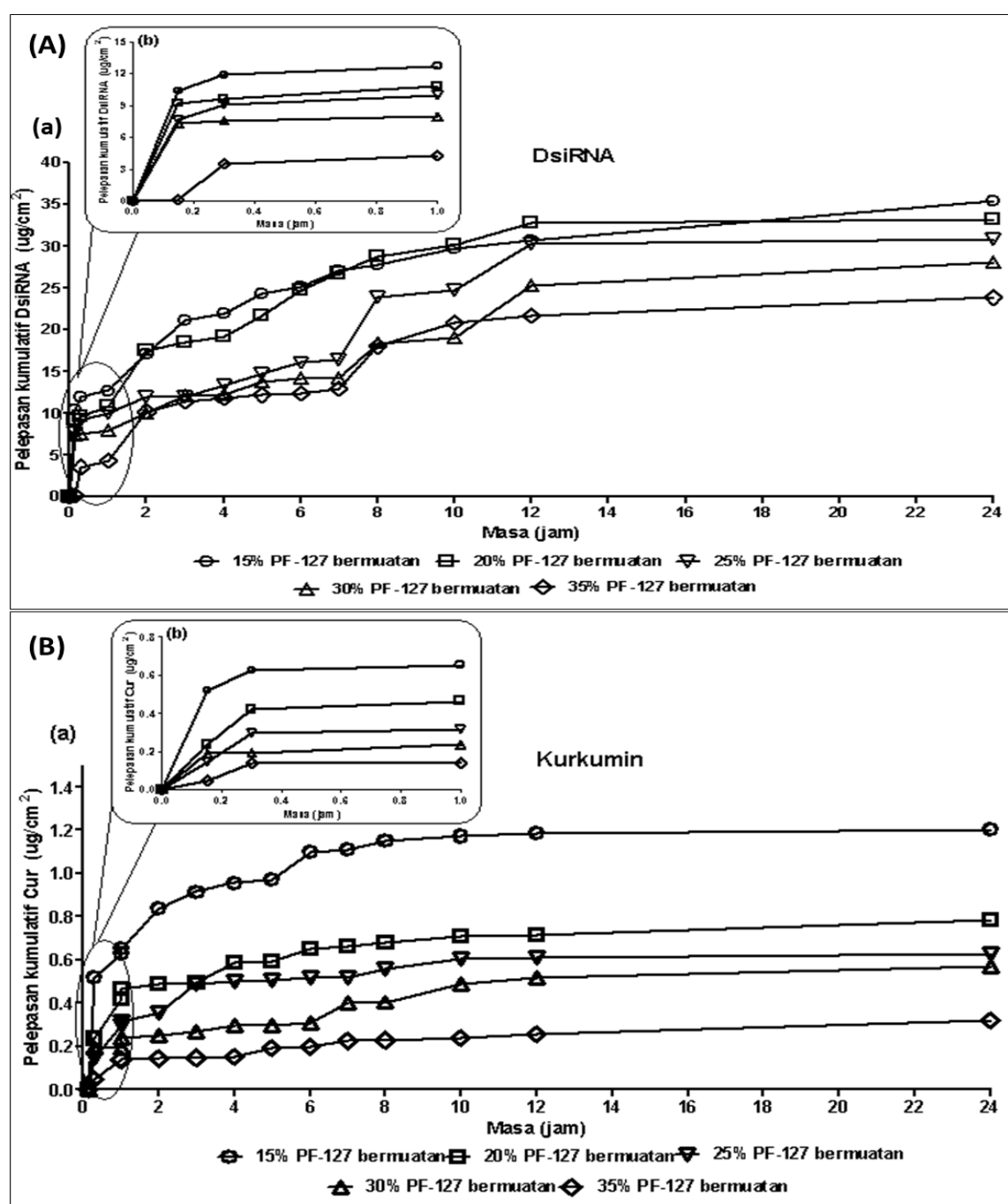


PELEPASAN BAHAN AKTIF *in vitro*

Kajian hubung kait antara kepekatan PF-127 dalam menghasilkan gel dan kadar pelepasan bahan aktif telah dijalankan untuk melihat peratusan kumulatif pelepasan DsiRNA dan Cur selama 24 jam. Lima kepekatan gel yang berbeza iaitu 15, 20, 25, 30 dan 35 % (w/v) telah dikaji dengan menggunakan sel peresapan Franz untuk mengkaji kesan kepekatan gel PF-127 yang berlainan dalam mempengaruhi pelepasan bahan aktif. Hal ini bagi melihat hubung kait kelikatan gel dengan kadar pelepasan bahan aktif kerana setiap kepekatan

gel mempunyai kelikatan yang berbeza dan hasil pelepasan bahan aktif juga menunjukkan keputusan yang berbeza. Kepekatan bahan aktif dan suhu kajian (37 °C) telah dikekalkan malar sepanjang uji kaji dijalankan.

Hasil kajian menunjukkan pelepasan kedua-dua bahan aktif berlaku dalam dua fasa; fasa pelepasan letusan (berlaku pada 15 minit pertama bagi DsiRNA dan 30 minit pertama bagi Cur) (rujuk pada Rajah 3(A)-3(b) dan 3(B)-3(b)) dan diikuti dengan fasa pelepasan secara perlahan. Hal ini menyediakan keadaan yang berpotensi untuk penghantaran secara topikal dengan pelepasan



RAJAH 3. Profil pelepasan kumulatif DsiRNA (A) dan Cur (B) daripada lima kepekatan berbeza gel PF-127 yang dimuatkan dengan Cur/DsiRNA-CSNPs dalam tempoh (a) 24 jam dan (b) 1 jam pertama

awal memberi kesan anti-keradangan yang diperlukan untuk mengurangkan rasa sakit atau ketidakselesaan di kawasan sasaran, disusuli dengan pelepasan berterusan yang menggalakkan penyembuhan secara berkala (Huang & Brazel 2001). Berdasarkan Rajah 3(A) dan 3(B), pelepasan letusan menurun secara konsisten apabila kepekatan gel ditingkatkan. Hal ini berkemungkinan berlaku disebabkan oleh penurunan liang mikrosfera apabila kepekatan polimer gel meningkat (Wang 2010).

Peratusan pelepasan kumulatif Cur dan DsiRNA daripada gel yang berbeza kepekatan telah diplot seperti dalam Rajah 3(A) dan 3(B). Pelepasan bahan aktif yang minimum telah ditunjukkan oleh kepekatan gel PF-127 yang paling tinggi iaitu 35% w/v (pelepasan kumulatif untuk DsiRNA dan Cur masing-masing pada  $23.8 \pm 27.7$  dan  $0.3 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) manakala pelepasan maksimum berlaku daripada gel PF-127 berkepekatan 15% w/v (pelepasan kumulatif untuk DsiRNA dan Cur masing-masing pada  $35.4 \pm 7.4$  and  $1.2 \pm 1.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Umumnya, gel yang mempunyai kepekatan polimer yang tinggi menyebabkan penurunan pelepasan kedua-dua bahan aktif. Penurunan yang signifikan bagi Cur ( $p < 0.05$ ) dilaporkan namun tiada penurunan signifikan bagi DsiRNA ( $p > 0.05$ ). Penemuan ini bertepatan dengan beberapa kajian terdahulu (Gilbert et al. 1986; Katas et al. 2016; Yeo & Park 2004) yang telah menghuraikan bahawa polimer dengan kepekatan yang tinggi mempunyai banyak misel dalam struktur gelnya. Hal ini menghasilkan interaksi sterik antara rantaian polimer yang seterusnya menyebabkan halangan terhadap pelepasan bahan aktif.

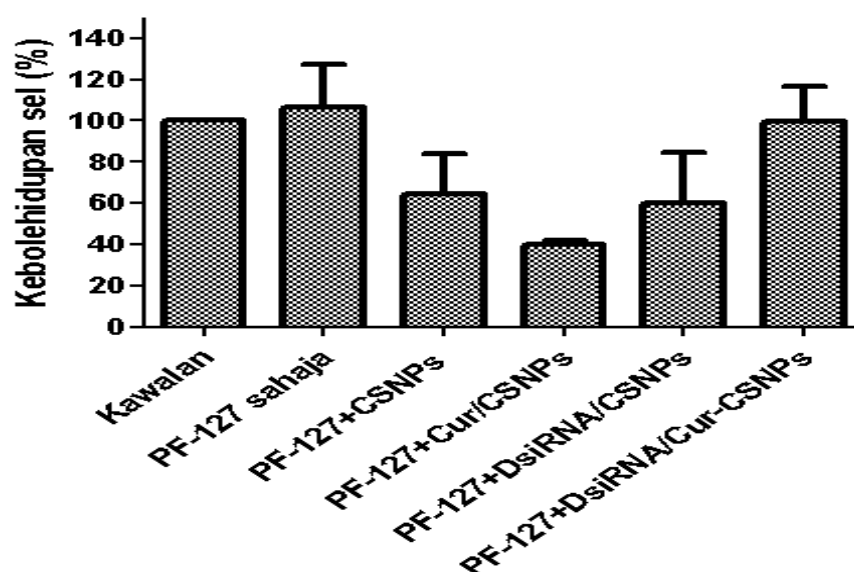
Selain itu, penurunan pelepasan bahan aktif juga berpunca daripada kelikatan tekstur gel yang berkepekatan tinggi (Miyazaki et al. 1984; Tanwar & Jain 2012) yang mana jika kelikatan-mikro gel meningkat, ketumpatan gel akan turut meningkat dan seterusnya menjadi penghalang terhadap pelepasan dan penembusan bahan aktif daripada formulasi gel. Keadaan ini menepati teori peresapan molekul Lauffer's bagi gel yang menghuraikan bahawa pekali peresapan bahan larutan adalah berkadar songsang dengan geseran isi padu yang diperlukan oleh agen pembentukan gel (Nesalin et al. 2017). Manakala Cur menunjukkan corak pelepasan lebih rendah dan perlahan (dalam lingkungan  $0.3\text{-}1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) berbanding DsiRNA (dalam lingkungan  $23.8\text{-}35.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Merujuk pada kajian terdahulu (Gilbert et al. 1986), keadaan ini berkaitan dengan ciri lipofilik Cur. Bahan aktif yang lebih bersifat lipofilik seperti Cur akan mengelak laluan akueus dalam gel dan

lebih cenderung untuk berada di dalam misel (di ruang hidrofobik dalam gel), selain itu, pemerangkapan Cur di bahagian dalam NPs turut menyumbang kepada pelepasan yang lebih perlahan berbanding DsiRNA. Manakala DsiRNA lebih banyak dilepaskan daripada formulasi gel kerana penjerapan DsiRNA hanya pada permukaan NPs dan bukan berlaku di dalam gel kerana ia bersifat kurang lipofilik dan lebih cenderung memenuhi laluan akueus dalam gel (Katas et al. 2016; Raja et al. 2013).

#### KESAN KESITOTOKSIKAN PF-127 GEL BERMUATAN TERHADAP SEL FIBROBLAS

Keserasian-bio formulasi gel telah dikaji dengan mengukur ketoksikan gel terhadap NHDF yang dilakukan melalui kaedah secara tidak langsung. Kesan kesitotoksikan secara tidak langsung bagi formulasi yang terdiri daripada gel PF-127 sahaja dan gel PF-127 yang mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs, Cur-CSNPs, DsiRNA-CSNPs dan CSNPs telah dikaji dengan menginkubasi ekstrak gel tersebut ke atas NHDF. Berdasarkan Rajah 4, gel PF-127 mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs menunjukkan peratus kebolehidupan sel paling tinggi iaitu  $124.96 \pm 45.31\%$  berbanding lima formulasi gel PF-127 yang lain. Ini berkemungkinan disebabkan oleh nilai caj permukaannya yang lebih rendah dan keadaan ini kurang memberi kesan kepada pertumbuhan sel.

Manakala, keputusan peratusan kebolehidupan sel NHDF yang dirawat dengan ekstrak gel PF-127 mengandungi DsiRNA-CSNPs dan CSNPs sahaja turut menunjukkan kebolehidupan sel iaitu masing-masing ialah  $104.5 \pm 79.2\%$  dan  $109.9 \pm 80.2\%$ . Sifat ekstrak yang tidak sitotoksik ditentukan oleh kebolehidupan sel yang melebihi 80% (Chin, Ng & Ng 2018; Raja et al. 2013). Walau bagaimanapun, kehadiran Cur mungkin mengganggu bacaan penyerapan menggunakan spektrometer dan menyumbang kepada sisihan piawai yang tinggi untuk nilai peratus kebolehidupan sel (Garg et al. 2018). Ini menunjukkan NHDF yang dirawat dengan ekstrak gel PF-127 yang mengandungi CSNPs sahaja, DsiRNA-CSNPs dan DsiRNA/Cur-CSNPs tidak menunjukkan sebarang perencatan pertumbuhan. Kumpulan ini juga tidak menunjukkan perbezaan signifikan berbanding dengan kumpulan kawalan. Namun begitu, ekstrak bagi gel PF-127 yang mengandungi Cur/CSNPs dilihat telah merencat pertumbuhan sel kerana peratusan kebolehidupan sel yang sangat rendah menandakan terdapat kesan kesitotoksikan apabila sel didedahkan selama 24 jam.



RAJAH 4. Peratus kebolehidupan NHDF selepas diinkubasi secara tidak langsung dengan ekstrak diperolehi daripada formulasi gel selama 24 jam (kumpulan sel=3)

#### KESIMPULAN

Dalam kajian ini, DsiRNA/Cur-CSNPs dengan sifat fizikal yang diinginkan telah berjaya dihasilkan melalui kaedah yang mudah. Kajian corak pelepasan dadah oleh gel yang berlainan kepekatan menunjukkan pelepasan kumulatif DsiRNA dan Cur dipengaruhi oleh kepekatan PF-127 yang digunakan. Formulasi gel yang berkepekatan PF-127 paling tinggi iaitu pada kepekatan 35% (w/v) mempunyai pelepasan kumulatif bagi DsiRNA dan Cur yang paling rendah. Ini kerana rintangan yang tinggi disebabkan oleh kepadatan misel dalam matriks gel. Manakala pelepasan paling tinggi berlaku untuk gel PF-127 berkepekatan rendah. Selain itu, perlepasan kumulatif Cur adalah lebih rendah berbanding DsiRNA disebabkan oleh interaksi hidrofobik dan hidrofilik bahan aktif dalam matriks gel. Selanjutnya, ekstrak PF-127 gel mengandungi DsiRNA/Cur-CSNPs terhadap NHDF telah menunjukkan kebolehidupan sel paling tinggi, menunjukkan tiada kesan toksik terhadap sel. Penemuan ini membolehkan kajian seterusnya dilakukan terhadap formulasi ini untuk dibangunkan sebagai pembalut luka kencing manis yang lebih berkesan.

#### PENGHARGAAN

Penghargaan perlu diberikan kepada pemberi dana iaitu Kementerian Pengajian Tinggi, Malaysia melalui geran *Prototype Development Research Grant Scheme* (PRGS) (PRGS/1/2020/STG05/UKM/02/3).

#### RUJUKAN

- Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N. & Aminabhavi, T.M. 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 100: 5-28.
- Akash, M.S.H. & Rehman, K. 2015. Recent progress in biomedical applications of pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. *Journal of Controlled Release* 209: 120-138.
- Aslanturk, O.S. 2017. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. In *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, edited by Larramendy, M.L. & Soloneski, S. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/books/6310>
- Baloglu, E., Karavana, S.Y., Senyigit, Z.A. & Guneri, T. 2011. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. *Pharmaceutical Development and Technology* 16(6): 627-636.
- Choudary, V. & Shivakumar, H.G. 2018. A review on curcumin: Wound healing properties and biomarkers of wound healing. *International Research Journal of Pharmacy* 9(9): 1-5.
- Chin, C.Y., Ng, P.Y. & Ng, S.F. 2018. *Moringa oleifera* standardised aqueous leaf extract-loaded hydrocolloid film dressing: *in vivo* dermal safety and wound healing evaluation in STZ/HFD diabetic rat model. *Drug Delivery and Translational Research* 9(2): 453-468.
- Chuah, L.H., Billa, N., Roberts, C.J., Burley, J.C. & Manickam, S. 2011. Curcumin-containing chitosan nanoparticles as a potential mucoadhesive delivery system to the colon. *Pharmaceutical Development and Technology* 18(3): 591-599.

- Debnath, S., Kumar, R.S. & Babu, M.N. 2011. Iontropic gelation - A novel method to prepare chitosan nanoparticles. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 4(4): 492-495.
- Escobar-Chávez, J.J., López-Cervantes, M., Naïk, A., Kalia, Y.N., Quintanar-Guerrero, D. & Ganem-Quintanar, A. 2006. Applications of thermoreversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 9(3): 339-358.
- Gandra, S.C.R., Nguyen, S., Nazzal, S., Alayoubi, A., Jung, R. & Nesamony, J. 2013. Thermoresponsive fluconazole gels for topical delivery: Rheological and mechanical properties, *in vitro* drug release and anti-fungal efficacy. *Pharmaceutical Development and Technology* 20(1): 41-49.
- Garg, S., Huifu, H., Kaul, S.C. & Wadhwa, R. 2018. Integration of conventional cell viability assays for reliable and reproducible read-outs: Experimental evidence. *BMC Research Notes* 11: 403.
- Gilbert, J.C., Hadgraft, J., Bye, A. & Brookes, L.G. 1986. Drug release from pluronic F-127 gels. *International Journal of Pharmaceutics* 32: 223-228.
- Gratieri, T., Gelfuso, G.M., Rocha, E.M., Sarmiento, V.H., Freitas, O.D. & Lopez, R.F.V. 2010. A poloxamer/chitosan *in situ* forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75: 186-193.
- Huang, X. & Brazel, C.S. 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 73: 121-136.
- Johnson, N.R. & Wang, Y. 2015. Drug delivery systems for wound healing. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 16(7): 621-629.
- Kafshgari, M.H., Khorram, M., Khadost, M. & Khavari, S. 2011. Reinforcement of chitosan nanoparticles obtained by an ionic cross-linking process. *Iranian Polymer Journal* 20(5): 445-456.
- Katas, H., Chai, Y.W., Siddique, M.I., Hussain, Z. & Fadhil, F.H.M. 2016. Thermoresponsive curcumin/DsiRNA nanoparticle gels for the treatment of diabetic wounds: Synthesis and drug release. *Therapeutic Delivery* 3: 137-150.
- Kaur, J., Kaur, J., Jaiswal, S. & Gupta, G.D. 2016. Recent advances in topical drug delivery system. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* 6(7): 6353-6369.
- Menon, V.P. & Sudheer, A.R. 2007. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 595: 105-125.
- Miyazaki, S., Takeuchi, S., Yokouchi, C. & Takada, M. 1984. Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical administration of anticancer agents. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 32(10): 4205-4208.
- Mofazzal, J.M.A., Al-Musawi, S., Pirestani, M., Ramandi, M.F., Ahmadi, K., Rajayi, H., Mohammad Hassan, Z., Kamali, M. & Mirnejad, R. 2014. Curcumin-loaded chitosan tripolyphosphate nanoparticles as a safe, natural and effective antibiotic inhibits the infection of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* *in vivo*. *Iranian Journal of Biotechnology* 12(3): 1-8.
- Mohamad, N., Mohd Amin, M.C.I., Pandey, M., Ahmad, N. & Rajab, N.F. 2014. Bacterial cellulose/acrylic acid hydrogel synthesized via electronbeam irradiation: Accelerated burn wound healing in an animal model. *Carbohydrate Polymers* 114: 312-320.
- Nesalin, J.A.J., Pavithra, T., Pallavi, A., Umesh, B.L. & Mani, T.T. 2017. Formulation and evaluation of curcumin loaded topical gel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical* 1(2): 79-84.
- Nor Azlan, A.Y.H., Katas, H., Zin, N.M. & Fauzi, M.B. 2021. Dual action gels containing DsiRNA loaded gold nanoparticles: Augmenting diabetic wound healing by promoting angiogenesis and inhibiting infection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 619: 78-90.
- Raja, M.A.G., Katas, H. & Thum, J.W. 2015. Stability, intracellular delivery, and release of sirna from chitosan nanoparticles using different cross-linkers. *PLoS ONE* 10(6): 1-19.
- Raja, M.A.G., Katas, H., Hamid, Z.A. & Razali, N.A. 2013. Physicochemical properties and *in vitro* cytotoxicity studies of chitosan as a potential carrier for dicer-substrate siRNA. *Journal of Nanomaterials* 2013: Article ID. 653892.
- Tanwar, Y.S. & Jain, A.K. 2012. Formulation and evaluation of topical diclofenac sodium gel using different gelling agent. *Asian Journal of Pharmaceutical Research & Health Care* 4(1): 1-6.
- Varuna, K.J.B. & Madhusudhan, B. 2015. Synthesis, characterization and hemocompatibility evaluation of curcumin encapsulated chitosan nanoparticles for oral delivery. *International Journal of Advanced Research* 3(4): 604-611.
- Wang, Z. 2010. Effects of the process parameters on the initial burst release of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bovine serum albumin by the double-emulsion solvent evaporation/extraction method. *Journal of Applied Polymer Science* 115: 2599-2608.
- Yeo, Y. & Park, K. 2004. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Archives of Pharmacal Research* 27(1): 1-12.

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: haliza.katas@ukm.edu.my