



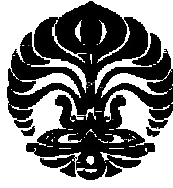
UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH ASAM OLEAT, ETANOL, DAN UREA
TERHADAP PROFIL PENETRASI PERKUTAN
GLUKOSAMIN SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN SEL
DIFUSI FRANZ**

SKRIPSI

**CHRISTINA
0606070592**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
JUNI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH ASAM OLEAT, ETANOL, DAN UREA
TERHADAP PROFIL PENETRASI PERKUTAN
GLUKOSAMIN SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN SEL
DIFUSI FRANZ**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi

**CHRISTINA
0606070592**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
JUNI 2010**

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.



Nama : Christina
NPM : 0606070592
Tanda Tangan : 
Tanggal : 30 Juni 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Christina
NPM : 0606070592
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Pengaruh Asam Oleat, Etanol, dan Urea terhadap
Profil Penetrasi Perkutan Glukosamin secara *In Vitro*
Menggunakan Sel Difusi Franz

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, M.S., Ph.D. (.....) 
Pembimbing II : Dr. Yahdiana Harahap, M.S. (.....) 
Penguji I : Dr. Iskandarsyah, M.S. (.....) 
Penguji II : Dra. Maryati K., M.Si. (.....) 
Penguji III : Dra. Rosmala Dewi, Apt. (.....) 

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 5 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Sang Tri Ratna atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak yang telah penulis terima, kiranya sulit bagi penulis untuk menyelesaikan penulisan ini tepat pada waktunya. Pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati penulis menyampaikan terima kasih yang tulus kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.S. selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Ibu Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, M.S., Ph.D. sebagai Pembimbing I dan Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.S. sebagai Pembimbing II yang selalu sabar membimbing, memberi saran dan mendukung selama penelitian berlangsung sampai tersusunnya skripsi ini.
3. Ibu Dr. Katrin, M.S. selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan perhatian dan bimbingan selama pendidikan di Farmasi FMIPA UI.
4. Ibu Prof. Dr. Atiek Soemiati, M.S. sebagai Koordinator Skripsi dan seluruh Bapak dan Ibu Dosen Farmasi FMIPA UI atas bimbingannya selama ini.
5. Mbak Deva, Pak Imih, Pak Surya, Pak Hadison, Mbak Ami, Mbak Tami, Mbak Rina, dan Bapak/Ibu laboran serta karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI lainnya atas semua bantuan yang diberikan, terutama saat penelitian berlangsung.
6. Pak Zuliar Permana yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.
7. PT Otto Pharmaceutical Industries dan PT. Sandoz Indonesia yang telah bersedia memberikan bantuan bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini.

8. Rekan-rekan peneliti yang dengan baik hati membantu memberikan artikel-artikel ilmiah,
9. Keluargaku tercinta atas semua dukungan, kasih sayang, perhatian, kesabaran, dorongan semangat, doa yang tidak henti-hentinya dan dana yang diberikan untuk penulis.
10. Jonathan Yohanes yang telah banyak membantu penulis baik dalam penelitian maupun dalam penyusunan skripsi ini, memberikan dukungan, dorongan semangat, dan juga menemani penulis melewati saat-saat sulit.
11. Teman-teman baikku, Megawati Salim, Jenni Sartika, Sherly Meilianti, dan Dede Sugiat atas saran, bantuan, dan dukungan yang telah diberikan selama ini.
12. Teman-teman penelitian di KBI Farmasetika, khususnya Nur Hasmawati, Rizky Saputri, Muthia Rachma, Permita Sari, Yosmeita Dame, Erny Sagita, Yessyca Herliansyah, Maria C.B., atas kerja sama dan dukungan selama penelitian berlangsung
13. Teman-teman Farmasi Angkatan 2006 atas dukungan dan kerja sama selama ini.
14. Semua pihak yang telah memberikan bantuan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan dalam dunia farmasi khususnya dan masyarakat pada umumnya.

Penulis

2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Christina
NPM : 0606070592
Program Studi : Sarjana (S1 Reguler)
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Pengaruh Asam Oleat, Etanol, dan Urea Terhadap Profil Penetrasi Perkutan
Glukosamin secara *In Vitro* Menggunakan Sel Difusi Franz

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 30 Juni 2010
Yang menyatakan



(Christina)

ABSTRAK

Nama : Christina
Program Studi : Farmasi
Judul : Pengaruh Asam Oleat, Etanol, dan Urea Terhadap Profil Penetrasi Perkutan Glukosamin secara *In Vitro* Menggunakan Sel Difusi Franz

Glukosamin merupakan terapi farmakologis alternatif untuk osteoarthritis. Konsumsi glukosamin secara peroral memberikan bioavailabilitas yang rendah. Oleh karena itu, dikembangkan rute transdermal sebagai upaya mengatasi masalah tersebut. Senyawa peningkat penetrasi perkutan, yaitu etanol, urea, dan asam oleat, ditambahkan ke dalam masing-masing formula gel glukosamin, dan diuji daya penetrasinya secara *in vitro* dengan sel difusi Franz menggunakan membran abdomen tikus *Rattus norvegicus*. Jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi setelah 8 jam dari sediaan kontrol, formula 1 (etanol 5%), formula 2 (urea 5%), dan formula 3 (asam oleat 5%) secara berturut-turut adalah sebanyak $679,50 \pm 17,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $1005,49 \pm 13,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $234,09 \pm 4,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; dan $43,11 \pm 0,46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Laju penetrasi atau fluks dari sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 secara berturut-turut adalah sebesar $84,94 \pm 2,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{jam}$; $125,69 \pm 1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{jam}$; $29,26 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{jam}$; dan $5,39 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{jam}$. Selain itu juga dilakukan uji stabilitas fisik pada penyimpanan selama 8 minggu di suhu kamar ($28^\circ \pm 2^\circ\text{C}$), suhu tinggi ($40^\circ \pm 2^\circ\text{C}$), dan suhu rendah ($4^\circ \pm 2^\circ\text{C}$) dengan parameter pengamatan organoleptis, pH, dan viskositas. Sediaan gel glukosamin menunjukkan kestabilan pada penyimpanan suhu rendah ($4^\circ \pm 2^\circ\text{C}$).

Kata kunci : glukosamin, gel, senyawa peningkat penetrasi perkutan, asam oleat, etanol, urea, sel difusi Franz.

xvii + 107 hal.; 40 gambar; 23 tabel; lampiran

Daftar Pustaka : 62 (1942-2009)

ABSTRACT

Name : Christina
Program Study : Pharmacy
Title : The Effects of Oleic Acid, Ethanol, and Urea on Percutaneous Penetration Profiles of Glucosamine by In Vitro Test Using Franz Diffusion Cell

Glucosamine is an alternative pharmacologic therapy for osteoarthritis. Oral glucosamine provides low bioavailability. Therefore, transdermal route was developed to overcome the problem. Skin penetration enhancers, i.e. ethanol, urea, and oleic acid, were added to each of topical glucosamine gels, and penetration ability through skin was examined by *in vitro* Franz diffusion cell test using *Rattus norvegicus* rat abdomen skin as membrane diffusion. Cumulative amount of glucosamine penetrated from control, formula 1 (ethanol 5%), formula 2 (urea 5%), and formula 3 (oleic acid 5%) after 8 hours respectively were $679,50 \pm 17,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $1005,49 \pm 13,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $234,09 \pm 4,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; and $43,11 \pm 0,46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Penetration rate or flux of glucosamine from control, formula 1, formula 2, and formula 3 respectively were $84,94 \pm 2,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{hour}$; $125,69 \pm 1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{hour}$; $29,26 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{hour}$; and $5,39 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{hour}$. The physical stability of gels stored for eight weeks at room temperature ($28^\circ \pm 2^\circ\text{C}$), high temperature ($40^\circ \pm 2^\circ\text{C}$), and low temperature ($4^\circ \pm 2^\circ\text{C}$) were observed by its organoleptic, pH, and viscosity properties. The gels remain stable in low temperature ($4^\circ \pm 2^\circ\text{C}$) storage.

Keywords : glucosamine, gel, skin penetration enhancer, oleic acid, ethanol, urea, Franz diffusion cell.

xvii +107 pages; 40 figures; 23 tables; appendixes

Bibliography : 62 (1942-2009)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Kulit	3
2.1.1. Anatomi Kulit	3
2.1.2. Fungsi Kulit	5
2.1.3. Penetrasi Obat Melalui Kulit	6
2.2. Glukosamin HCl	8
2.3. Gel	10
2.4. Senyawa Peningkat Penetrasi Perkutane	12
2.4.1. Asam oleat	14
2.4.2. Etanol	14
2.4.3. Urea	15
2.5. Bahan Tambahan Formulasi	16
2.5.1. HPMC	16
2.5.2. Dinatrium EDTA	17
2.5.3. Propilen Glikol	17
2.5.4. Mentol	18
2.5.5. Metil Paraben	19
2.5.6. Propil Paraben	20
2.6. Uji Penetrasi Perkutane Secara <i>In Vitro</i> Menggunakan Sel Difusi Franz ..	21
2.7. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	23
2.7.1. Eluen	24
2.7.2. Pompa	24
2.7.3. Kolom	24
2.7.4. Detektor	25
2.7.5. Derivatisasi sampel	26

3. METODE PENELITIAN	28
3.1. Lokasi dan Waktu	28
3.2. Bahan	28
3.3. Peralatan.....	28
3.4. Cara Kerja	29
3.4.1. Pembuatan Sediaan Gel Glukosamin.....	29
3.4.2. Evaluasi Sediaan Gel Glukosamin.....	30
3.4.2.1. Uji Organoleptis.....	30
3.4.2.2. Uji Konsistensi.....	30
3.4.2.3. Pengukuran pH.....	31
3.4.2.4. Pengukuran Viskositas Gel.....	31
3.4.3. Uji Stabilitas Fisik Sediaan.....	31
3.4.4. Uji Penetrasi Perkutan Secara <i>In Vitro</i>	32
3.4.4.1. Pembuatan Dapar Fosfat pH 7,4	32
3.4.4.2. Pembuatan Dapar Borat pH 9,3	32
3.4.4.3. Pembuatan Pereaksi o-Ftalaldehid/2-Merkaptoetanol	32
3.4.4.4. Pembuatan Fase Gerak Tetrahidrofuran 0,25%-Asetonitril (83:17).....	33
3.4.4.5. Pengukuran Panjang Gelombang Eksitasi dan Emisi Maksimum Glukosamin dengan Pereaksi o-Ftalaldehid/2- Merkaptoetanol	33
3.4.4.6. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Metanol dan Dapar Borat pH 9,3	33
3.4.4.7. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Dapar Fosfat pH 7,4 dan Dapar Borat pH 9,3.....	34
3.4.4.8. Uji Perolehan Kembali Kadar Glukosamin dalam Sediaan	34
3.4.4.9. Uji Penetrasi Glukosamin	35
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1. Pembuatan Gel Glukosamin	38
4.2. Evaluasi Sediaan Gel Glukosamin	39
4.2.1. Pengamatan Organoleptis	39
4.2.2. Uji Konsistensi	40
4.2.3. Pengukuran pH.....	41
4.2.4. Pengukuran Viskositas Gel.....	41
4.3. Uji Stabilitas Fisik Sediaan Gel Glukosamin.....	42
4.3.1. Penyimpanan pada Suhu Kamar, Suhu Tinggi, dan Suhu Rendah	43
4.3.1. Pengamatan Organoleptis	43
4.3.2. Pengukuran pH.....	44
4.3.3. Pengukuran Viskositas Gel	45
4.3.2. <i>Cycling Test</i>	46
4.4. Uji Penetrasi Perkutan Secara <i>In Vitro</i>	47
4.4.1. Pengukuran Panjang Gelombang Eksitasi dan Emisi Maksimum Glukosamin dengan Pereaksi OPA/2-ME.....	48
4.4.2. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Metanol dan Dapar Borat pH 9,3	48

4.4.3. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Dapar Fosfat pH 7,4 dan Dapar Borat pH 9,3	48
4.4.4. Uji Perolehan Kembali Kadar Glukosamin dalam Sediaan	48
4.4.5. Uji Penetrasi Glukosamin	49
5. KESIMPULAN DAN SARAN	54
5.1. Kesimpulan	54
5.2. Saran	54
DAFTAR ACUAN	55



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Gambar Struktur kulit	5
Gambar 2.2.	Rute penetrasi obat	7
Gambar 2.3.	Struktur kimia D-glukosamin HCl	8
Gambar 2.4.	Bagan produksi glukosamin HCl dari kerangka luar krustasea	9
Gambar 2.5.	Pengaruh glukosamin eksogen terhadap biosintesis glikosaminoglikan	10
Gambar 2.6.	Mekanisme kerja senyawa peningkat penetrasi	13
Gambar 2.7.	Struktur kimia asam oleat	14
Gambar 2.8.	Struktur kimia etanol	14
Gambar 2.9.	Struktur kimia urea	15
Gambar 2.10.	Struktur kimia monomer HPMC	16
Gambar 2.11.	Struktur kimia dinatrium EDTA	17
Gambar 2.12.	Struktur kimia propilen glikol	17
Gambar 2.13.	Struktur kimia mentol	18
Gambar 2.14.	Struktur kimia metil paraben	19
Gambar 2.15.	Struktur kimia propil paraben	20
Gambar 2.16.	Sel difusi Franz	21
Gambar 2.17.	Instrumentasi KCKT	23
Gambar 3.1.	Foto alat: timbangan analitik, oven, viskometer Brookfield, homogenizer, pH meter, penetrometer	62
Gambar 3.2.	Foto rangkaian alat KCKT	63
Gambar 3.3.	Foto sel difusi Franz yang sedang beroperasi	63
Gambar 4.1.	Foto hasil pengamatan organoleptis sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 pada minggu ke-0	64
Gambar 4.2.	Grafik rheologi masing-masing formula diuji pada minggu ke-0	64
Gambar 4.3.	Foto hasil pengamatan organoleptis sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	66
Gambar 4.4.	Foto hasil pengamatan organoleptis sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	67
Gambar 4.5.	Foto hasil pengamatan organoleptis sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	68
Gambar 4.6.	Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH keempat formula pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm$ 2°) selama 8 minggu	69
Gambar 4.7.	Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH keempat formula pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm$ 2°) selama 8 minggu	69

Gambar 4.8.	Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH keempat formula pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	70
Gambar 4.9.	Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	70
Gambar 4.10.	Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	71
Gambar 4.11.	Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	71
Gambar 4.12.	Foto hasil pengamatan organoleptis sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 setelah dilakukan <i>cycling test</i>	72
Gambar 4.13.	Spektrum serapan glukosamin setelah diderivatisasi dengan pereaksi OPA/2-ME	73
Gambar 4.14.	Kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut metanol dan dapar borat pH 9,3	74
Gambar 4.15.	Kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 dan dapar borat pH 9,3	74
Gambar 4.16.	Profil jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari masing-masing formula	75
Gambar 4.17.	Profil laju penetrasi atau fluks glukosamin dari masing-masing formula	75
Gambar 4.18.	Profil persentase jumlah kumulatif glukosamin dari masing-masing formula	76
Gambar 4.19.	Reaksi pembentukan senyawa berfluorosensi antara glukosamin dengan pereaksi OPA/2-ME.....	76
Gambar 4.20.	Reaksi degradasi glukosamin menjadi senyawa furfural.....	77

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Formula sediaan gel glukosamin	29
Tabel 4.1.	Hasil pengamatan organoleptis keempat formula pada minggu ke-0	79
Tabel 4.2.	Hasil pemeriksaan konsistensi keempat formula pada minggu ke-0	79
Tabel 4.3.	Hasil pengukuran viskositas sediaan kontrol pada minggu ke-0	80
Tabel 4.4.	Hasil pengukuran viskositas formula 1 pada minggu ke-0	81
Tabel 4.5.	Hasil pengukuran viskositas formula 2 pada minggu ke-0	82
Tabel 4.6.	Hasil pengukuran viskositas formula 3 pada minggu ke-0	83
Tabel 4.7.	Hasil pengamatan organoleptis keempat formula pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	84
Tabel 4.8.	Hasil pengamatan organoleptis keempat formula pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	85
Tabel 4.9.	Hasil pengamatan organoleptis keempat formula pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	86
Tabel 4.10.	Hasil pengukuran pH keempat formula pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	87
Tabel 4.11.	Hasil pengukuran pH keempat formula pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	87
Tabel 4.12.	Hasil pengukuran pH keempat formula pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu	87
Tabel 4.13.	Hasil pengukuran viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) kamar selama 8 minggu diukur pada kecepatan putaran 2 rpm	88
Tabel 4.14.	Hasil pengukuran viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu diukur pada kecepatan putaran 2 rpm	88
Tabel 4.15.	Hasil pengukuran viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu diukur pada kecepatan putaran 2 rpm	88
Tabel 4.16.	Hasil pengamatan organoleptis, pH, dan viskositas keempat formula setelah dilakukan <i>cycling test</i>	89
Tabel 4.17.	Data kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut metanol dan dapar borat pH 9,3	90
Tabel 4.18.	Data kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 dan dapar borat pH 9,3	90
Tabel 4.19.	Hasil uji perolehan kembali (UPK) glukosamin dari keempat formula	91
Tabel 4.20.	Hasil uji penetrasi glukosamin dalam dapar fosfat pH 7,4 dari masing-masing formula	91
Tabel 4.21.	Hasil perhitungan fluks atau laju penetrasi glukosamin dari masing-masing formula	92

Tabel 4.22. Data persentase jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari masing-masing formula 92



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Contoh perhitungan <i>yield value</i> dari pengukuran konsistensi sediaan formula 3	94
Lampiran 2.	Contoh perhitungan perolehan kembali glukosamin dalam sediaan	95
Lampiran 3.	Contoh perhitungan jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari sediaan kontrol pada menit ke-10	96
Lampiran 4.	Contoh perhitungan jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari sediaan kontrol pada menit ke-30	98
Lampiran 5.	Contoh perhitungan fluks atau laju penetrasi glukosamin dari sediaan kontrol pada menit ke-30	100
Lampiran 6.	Contoh perhitungan persentase jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari sediaan kontrol pada menit ke-300	101
Lampiran 7.	Sertifikat analisis glukosamin HCl	102
Lampiran 8.	Sertifikat analisis standar glukosamin HCl	103
Lampiran 9.	Sertifikat analisis tikus <i>Rattus norvegicus</i>	104
Lampiran 10.	Sertifikat analisis etanol	105
Lampiran 11.	Sertifikat analisis urea	107

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Seiring dengan usia yang semakin bertambah tua, penyakit degeneratif juga semakin rentan menyerang. Salah satu penyakit degeneratif yang umum diderita oleh pasien memasuki usia paruh baya adalah osteoarthritis. Osteoarthritis adalah penyakit degeneratif ditandai dengan jaringan kartilago yang melindungi persendian semakin menipis sehingga memicu rasa nyeri dan membatasi kemampuan gerak pasien (Wells et al., 2009). Umumnya terapi farmakologi osteoarthritis ditujukan untuk mengurangi rasa nyeri. Pasien akan diberikan asetaminofen dan jika terapi tidak memberikan hasil yang baik, maka pasien akan diberikan obat AINS (Anti Inflamasi Non Steroid) atau inhibitor spesifik-COX2 (Hansen & Elliot, 2005). Ketiga obat tersebut memiliki efek samping cukup serius seperti hepatotoksik, tukak lambung, dan kelainan kardiovaskular (Hansen & Elliot, 2005). Oleh karena itu diperlukan terapi farmakologi alternatif yang memiliki efek samping yang lebih ringan dan memberikan efek farmakologis berupa perbaikan jaringan kartilago (Tiraloche et al., 2005). Glukosamin dapat menjadi terapi farmakologis untuk osteoarthritis karena memenuhi kedua kriteria tersebut (Setnikar & Rovatti 2001).

Glukosamin telah banyak digunakan sebagai suplemen dan terapi alternatif untuk pengobatan osteoarthritis. Konsumsi glukosamin secara oral dalam jangka panjang dapat memperlambat perkembangan osteoarthritis (Pavelká et al., 2002; Richy et al., 2003). Pada beberapa penelitian glukosamin menunjukkan efek perbaikan jaringan kartilago dan mengurangi rasa nyeri pada persendian (Pavelká et al., 2002; Richy et al., 2003; Oegema et al., 2002).

Pada umumnya glukosamin dikonsumsi secara oral. Pada pemberian peroral ini, bioavailibilitas glukosamin hanya sekitar 44% dan sekitar 45% mengalami metabolisme lintas pertama hati (Setnikar & Rovatti, 2001). Untuk memperbaiki bioavailibilitas glukosamin dikembangkan rute pemberian alternatif, yaitu rute transdermal. Pemberian secara transdermal mempunyai beberapa keuntungan seperti menghindari masalah yang muncul pada saluran cerna,

meminimalisir metabolisme lintas pertama hati, dan meningkatkan kenyamanan pasien (Walters & Brain, 2002; Thong, Zhai & Maibach, 2007). Sediaan glukosamin untuk rute transdermal yang telah beredar saat ini adalah krim, gel, dan *patch*.

Sediaan gel untuk pemberian secara transdermal mempunyai keuntungan karena gel mengandung air dalam jumlah besar (Srivastava, 2006). Air merupakan salah satu senyawa peningkat penetrasi dengan cara membentuk *pool* air di antara gugus polar lapisan lipid *bilayer* interselular stratum korneum (DA et al., 1996). Adanya *pool* air ini akan membentuk jalur polar yang memfasilitasi permeasi obat menembus lapisan lipid *bilayer*. Selain itu, air dalam jumlah besar juga mempengaruhi pergerakan obat dengan molekul kecil ketika diaplikasikan pada kulit. Obat dengan molekul kecil akan bergerak bebas dalam sediaan gel sehingga meningkat penetrasinya melewati kulit (Srivastava, 2006).

Selain dipengaruhi oleh bentuk sediaan, permeasi obat melintasi kulit juga dapat ditingkatkan dengan penambahan senyawa peningkat penetrasi perkutan (Barry, 2001). Senyawa peningkat penetrasi perkutan meningkatkan permeasi obat melintasi kulit dengan mengganggu atau memodifikasi lapisan stratum korneum (Williams & Barry, 2007). Seringkali sediaan topikal mengandung senyawa peningkat penetrasi perkutan walaupun tujuan utama senyawa tersebut dalam sediaan itu bukanlah peningkat penetrasi perkutan, misalnya surfaktan, etanol, terpen, propilen glikol, asam oleat, urea, dan senyawa lainnya.

Pada penelitian ini glukosamin akan dibuat dalam bentuk sediaan gel yang ditujukan untuk rute transdermal. Untuk meningkatkan penetrasi glukosamin akan ditambahkan beberapa senyawa peningkat penetrasi perkutan, yaitu asam oleat, etanol, dan urea, kemudian ditinjau pengaruhnya terhadap penetrasi glukosamin melintasi kulit.

1.2. Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh penambahan senyawa peningkat penetrasi perkutan, yaitu asam oleat, etanol, dan urea terhadap penetrasi perkutan glukosamin dalam sediaan gel secara *in vitro* menggunakan sel difusi Franz.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

1.3. Kulit

Kulit adalah organ terbesar pada tubuh. Bobot kulit dapat mencapai 10% bobot individu dengan luas permukaan kulit pada orang dewasa mencapai 1,5-1,75 m² (Walters & Roberts, 2002). Kulit memisahkan bagian internal tubuh dengan lingkungan eksternal sehingga peranan kulit sangatlah penting.

1.3.1. Anatomi Kulit

1.3.1.1. Epidermis

i. Stratum korneum (Walters & Roberts, 2002)

Merupakan lapisan epidermis paling luar dan terdiri atas 15-25 lapis sel tanduk. Sel tanduk ini merupakan sel mati yang terdiri atas keratin (70%) dan lipid (20%). Susunan sel tanduk ini sangat rapat dan mempunyai kandungan air yang rendah sehingga dapat mencegah terjadinya kehilangan cairan tubuh. Di antara sel tanduk terdapat cairan interselular yang tersusun atas lapisan lipid *bilayer*. Stratum korneum ini memegang peranan penting dalam permeasi senyawa-senyawa dari lingkungan luar masuk ke dalam tubuh.

ii. Stratum granulosum (Luciano, 1978)

Lapisan ini terdiri atas tiga hingga lima baris sel berbentuk kubus yang mengandung granula-granula keratohialin. Oleh karena itu lapisan sel ini disebut sebagai stratum granulosum.

iii. Stratum lusidum (Luciano, 1978)

Di antara stratum korneum dan granulosum terdapat lapisan tipis stratum lusidum yang terutama ada pada bagian tubuh yang memiliki kulit lebih tebal, seperti pada telapak tangan dan kaki. Pada lapisan lusidum, sel-sel mulai kehilangan nukleus dan organel sel lainnya serta mengalami keratinisasi.

iv. Stratum germinativum (Langley, 1980)

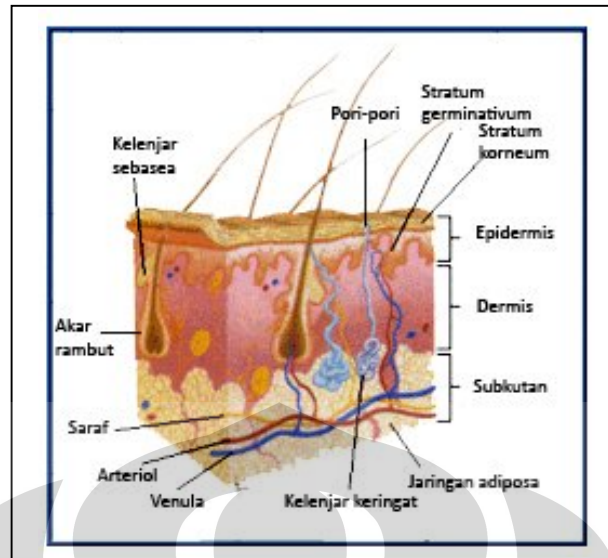
Lapisan terdalam pada epidermis ini tersusun atas sel-sel yang aktif melakukan mitosis. Sel-sel ini akan mendorong naik sel-sel yang telah ada sebelumnya untuk menggantikan sel pada stratum korneum. Selama perjalanan, sel-sel tersebut akan mengalami perubahan morfologi dan kimia hingga akhirnya menjadi sel tanduk. Stratum germinativum ini dapat dibagi menjadi dua, yaitu stratum basale dan stratum spinosum. Stratum basale terletak paling dalam, dekat dengan lapisan dermis, tersusun atas satu baris sel berbentuk silinder dan melanosit (sel pembentuk pigmen melanin yang mengatur warna kulit). Sedangkan stratum spinosum yang berada di atas stratum basale tersusun atas sel-sel yang berbentuk bulat dan mengandung lebih banyak keratin daripada sel di stratum basale.

1.3.1.2. Dermis (Luciano, 1978)

Dermis merupakan jaringan pengikat yang berada di bawah lapisan epidermis. Dermis tersusun atas dua lapisan, yaitu lapisan papilari dan lapisan retikular. Lapisan yang dekat dengan epidermis adalah lapisan papilari yang terdiri atas jaringan kolagen, serat elastin, dan fibroblas. Lapisan dalam adalah lapisan retikular, mempunyai lebih sedikit jaringan fibroblas dan lebih banyak kolagen. Pada lapisan dermis ini terdapat pembuluh darah, ujung saraf, dan adneksa kulit seperti kelenjar sebacea dan kelenjar keringat, serta akar rambut.

1.3.1.3. Subkutan atau hipodermis (Walters & Roberts, 2002)

Merupakan jaringan ikat di bawah kulit yang banyak mengandung sel-sel lemak (kurang lebih 50% dari total lemak tubuh). Salah satu peranan penting lapisan subkutan adalah menghantarkan sistem vaskuler dan neural pada kulit.



[Sumber: Mortada, 2009]

Gambar 2.1. Struktur kulit (telah diolah kembali)

1.3.2. Fungsi Kulit

Kulit merupakan organ yang mempunyai fungsi penting bagi tubuh. Fungsi tersebut antara lain (Luciano, 1978; Langley, 1980; Mitsui, 1997):

i. Fungsi perlindungan

Kulit melindungi tubuh dari berbagai gangguan eksternal, baik fisik, kimiawi, maupun biologis. Gangguan mekanis dapat diminimalisir efeknya pada tubuh oleh jaringan lemak di lapisan subkutan dan radiasi sinar UV diatasi oleh sel melanin yang menyerap sebagian sinar UV tersebut. pH kulit yang bernilai sekitar 5,5 merupakan perlindungan terhadap senyawa kimia yang bersifat toksik. Lapisan epidermis yang tersusun rapat bertujuan untuk mencegah kehilangan cairan tubuh yang berlebih. Selain itu adanya asam lemak tak jenuh dalam komposisi lipid kulit dapat mencegah pertumbuhan bakteri di kulit.

ii. Fungsi pengaturan panas

Pengaturan suhu tubuh oleh kulit dilakukan dengan cara pengeluaran keringat dan vasodilatasi atau vasokonstriksi pada pembuluh darah kapiler kulit. Ketika suhu tubuh meningkat, keringat akan dikeluarkan dan terjadi vasodilatasi pembuluh kapiler kulit. Sebaliknya ketika suhu tubuh menurun, terjadi

vasokonstriksi pembuluh darah kapiler kulit untuk mencegah pelepasan panas berlebih. Selain kedua pengaturan tersebut, rambut-rambut halus di kulit juga memegang peranan dalam pengaturan suhu tubuh.

iii. Fungsi sensori

Ujung-ujung saraf sensori untuk mendeteksi perubahan lingkungan sekitar, seperti panas, dingin, tekanan, dan rabaan tersebar di lapisan dermis dan subkutaneum.

iv. Fungsi absorpsi

Senyawa larut lemak dapat diabsorpsi melalui kulit. Sedangkan senyawa larut air tidak mudah diabsorpsi. Absorpsi ini dapat melalui celah antarsel yang disebut interselular, langsung menembus sel yang disebut transelular, ataupun melalui kelenjar sebum atau akar rambut yang disebut transapendageal. Adanya fungsi absorpsi ini memberikan kesempatan untuk pengembangan rute transdermal.

v. Fungsi ekskresi

Pengeluaran keringat tidak hanya untuk mengatur suhu tubuh, namun juga menjadi cara untuk mengekskresikan senyawa sisa metabolisme tubuh, seperti urea, asam urat, amonia, dan garam.

vi. Fungsi metabolisme

Kulit mempunyai peranan dalam membentuk prekursor vitamin D dengan bantuan sinar matahari.

1.3.3. Penetrasi Obat Melalui Kulit

Obat dapat menembus melewati kulit melalui tiga cara (Roberts, Cross & Pellett, 2002; Jager, Ponc & Bouwstra, 2007), yaitu:

i. Transelular atau intraselular

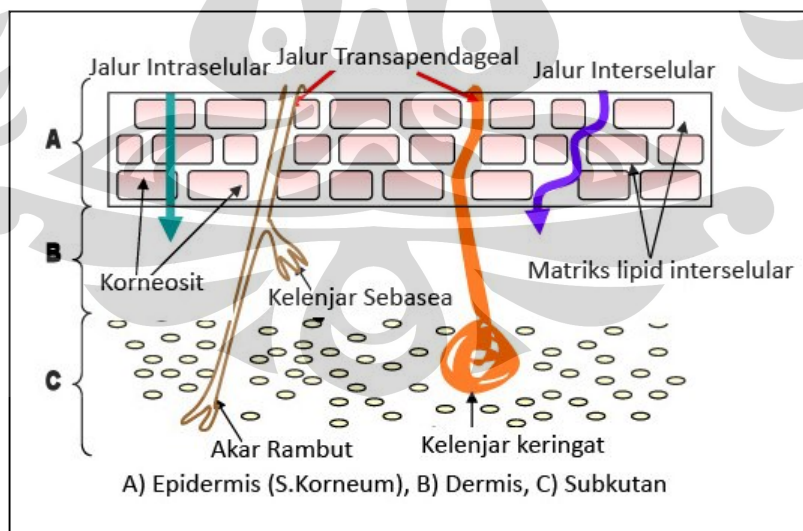
Permeasi obat melalui jalur transelular atau langsung menembus sel hanya terjadi dalam jumlah sangat kecil. Hal ini dipengaruhi oleh sel tanduk yang sulit ditembus.

ii. Paraselular atau interselular

Jalur ini memegang peranan penting dalam permeasi obat karena sebagian besar obat menembus stratum korneum melalui jalur ini. Bagian interseluler atau celah antarsel stratum korneum tersusun atas lipid *bilayer*. Oleh karena itu peningkatan permeasi obat dilakukan dengan memodifikasi atau mempengaruhi lapisan lipid *bilayer* ini.

iii. Transapendageal

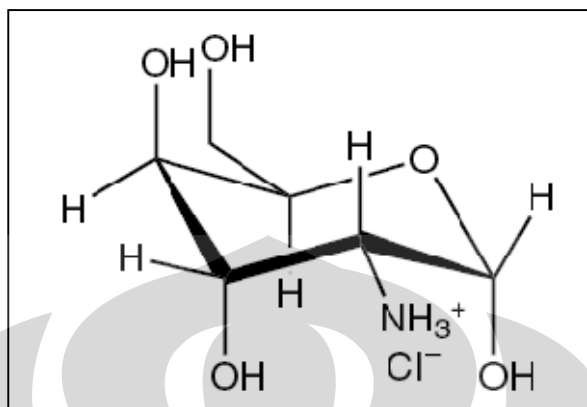
Pada rute transapendageal ini obat berpermeasi melalui kelenjar sebacea, folikel rambut, ataupun kelenjar keringat. Jalur ini kurang memegang peranan penting dalam permeasi obat karena luas permukaan yang kecil (hanya 0,1% dari luas permukaan kulit). Akan tetapi jalur ini dapat menjadi rute alternatif untuk obat dengan target spesifik.



[Sumber: Miljøministeriet, 2010]

Gambar 2.2. Rute penetrasi obat (telah diolah kembali)

1.4. Glukosamin HCl (Oegema et al., 2002; Lockwood, 2007; Kralovec & Barrow, 2008; Technical Resources International, 2002; Schleicher & Weigert, 2000; Gouze et al., 2001; Hresko et al., 1998)



[Sumber: Kravolec & Barrow, 2008]

Gambar 2.3. Struktur kimia D-glukosamin HCl

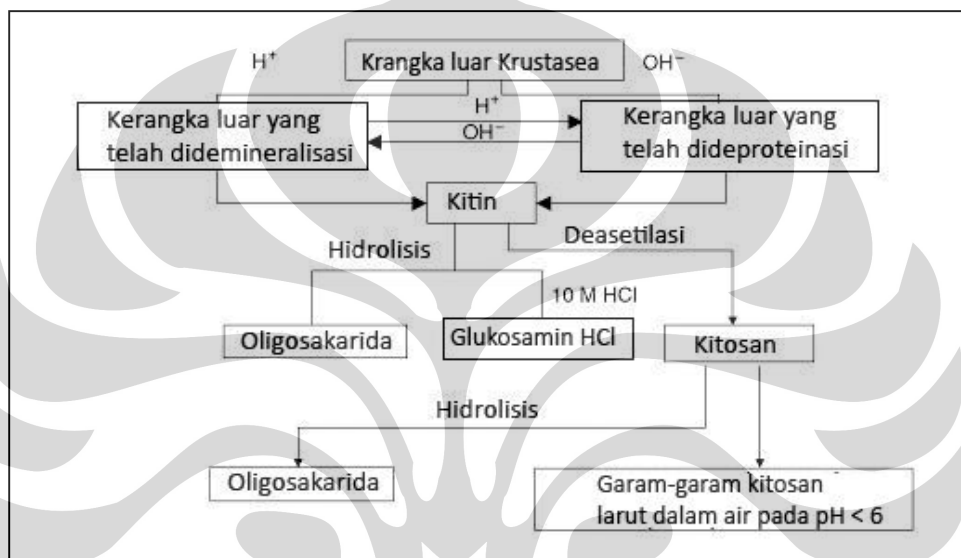
Nama kimia	: 2-Amino-2-deoksi- D-glukopiranosida hidroklorida
Sinonim	: Chitosamin HCl
BM	: 215,63
Kelarutan	: 1:10 dalam air (pada suhu 20 ⁰ C)
Organoleptis	: Serbuk kristalin putih dengan rasa agak manis dan bau tidak spesifik
Penyimpanan	: Di wadah tertutup rapat dan terhindar dari cahaya

Glukosamin mempunyai struktur seperti glukosa yang salah satu gugus hidroksinya disubstitusi oleh gugus amin. Glukosamin diperoleh dari hasil hidrolisis kitin. Kitin sendiri dapat diperoleh dari kerangka luar krustasea ataupun dari hasil fermentasi.

Produksi glukosamin HCl dari kerangka luar krustasea dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu metode asam-basa-asam dan metode basa-asam-asam. Pada metode asam-basa-asam kerangka luar krustasea didemineralisasi dengan asam, umumnya digunakan HCl 2 M, lalu dideproteinasi dengan basa (NaOH 1,5 M) pada suhu 90⁰C. Metode basa-asam-asam merupakan kebalikan dari metode asam-basa-asam. Pada metode ini kerangka luar krustasea deproteinasi terlebih

dahulu dan dilanjutkan dengan demineralisasi. Akan tetapi proses deproteinasi berlangsung lebih efektif jika dilakukan setelah proses demineralisasi.

Setelah proses demineralisasi dan deproteinasi selesai, akan diperoleh kitin. Kitin ini selanjutnya dihidrolisis dengan asam kuat, biasanya digunakan HCl 10 M, dan dihasilkan glukosamin HCl. Selanjutnya glukosamin HCl dikeringkan dan direkristalisasi dengan menggunakan pelarut etanol. Hasil yang diperoleh berupa serbuk kristalin glukosamin HCl.



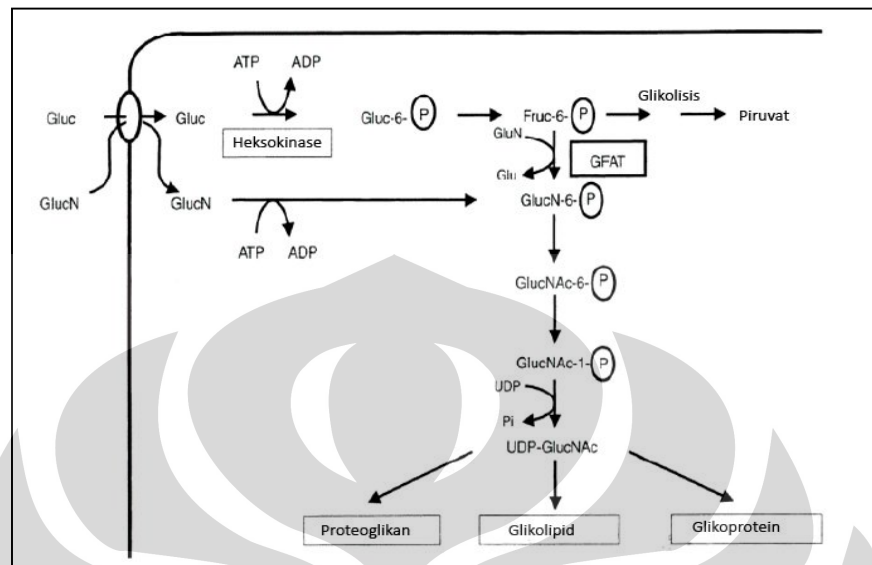
[Sumber: Kravolec & Barrow, 2008]

Gambar 2.4. Bagan produksi glukosamin HCl dari kerangka luar krustasea (telah diolah kembali)

Pada dasarnya tubuh manusia dapat memproduksi sendiri glukosamin sebagai salah satu komponen biosintesis glikosaminoglikan (GAG). GAG ini akan berikatan secara kovalen pada inti protein proteoglikan, salah satu komponen matriks jaringan kartilago, dan menjaga integritas struktur dan fungsi jaringan kartilago. Glukosamin yang diproduksi tubuh berada dalam bentuk glukosamin-6-fosfat dan dihasilkan dari glukosa mengikuti jalur biosintesis heksosamin. Biosintesis glukosamin-6-fosfat ini dibatasi oleh enzim glutamin-fruktosa-6-fosfat-amidotransferase (GFAT) sebagai *rate-limiting enzyme*.

Percobaan secara *in vitro* dalam kultur sederhana kondrosit menunjukkan bahwa asupan glukosamin eksogen dapat meningkatkan biosintesis glikosaminoglikan dengan melewati *rate-limiting step* oleh enzim glutamin-

fruktosa-6-fosfat-amidotransferase (GFAT). Akan tetapi secara *in vivo* mekanisme ini masih belum terbukti.



[Sumber: Schleicher & Weigert, 2000]

Gambar 2.5. Pengaruh glukosamin eksogen terhadap biosintesis glikosaminoglikan (telah diolah kembali)

Mekanisme kerja lain dari glukosamin yang telah diteliti adalah mengurangi degradasi proteoglikan akibat adanya interleukin-1 β (IL-1 β). IL-1 β menghambat galaktosa- β -1,3-glukuronosiltransferase (GlcAT-I), enzim penting untuk biosintesis GAG. Adanya glukosamin eksogen akan menghambat efek IL-1 β terhadap GlcAT-I. Selain itu glukosamin juga dapat mengantagonis produksi mediator inflamasi, seperti prostaglandin E₂ (PGE₂) dan nitrat oksida (NO).

Efek samping glukosamin yang cukup mengganggu adalah menimbulkan resistensi insulin karena biosintesisnya mengikuti jalur heksosamin dan strukturnya mirip dengan glukosa. Selain itu masih belum ada penelitian lebih lanjut mengenai efek samping glukosamin lainnya.

1.5. Gel (Pena, 1990; Zats & Kushla, 1996)

Gel adalah sediaan semisolid transparan ataupun *opaque* yang mempunyai kandungan air atau pelarut lain yang cukup tinggi. Untuk membentuk gel diperlukan *gelling agent*. Ketika didispersikan dalam pelarut yang tepat, *gelling*

agent akan membentuk struktur 3 dimensi. Struktur 3 dimensi ini akan menghambat pergerakan pelarut dengan cara menjerap molekul-molekul pelarut. Struktur 3 dimensi *gelling agent* juga mempengaruhi stabilitas dan viskositas gel.

Struktur 3 dimensi *gelling agent* bervariasi. Beberapa struktur 3 dimensi yang umum adalah:

a. *Random coil*

Struktur ini tidak teratur dan umumnya dibentuk oleh polimer sintesis, seperti resin dan turunan selulosa.

b. *Helix*

Struktur *helix* lebih teratur jika dibandingkan dengan *random coil* dan terbentuk dari ikatan antara dua rantai polimer.

c. *Stack*

Model ini dapat disebut juga dengan model *egg-box* dan dihasilkan dari *cross-linking* antara rantai polimer dengan kation divalen.

d. *House of Cards*

Struktur ini khas untuk partikel pembentuk gel koloidal seperti bentonit dan Veegum.

Sebagian besar gel dalam industri farmasi membentuk struktur 3 dimensi *random coil*.

Pemilihan pelarut yang tepat untuk pembentukan gel sangatlah penting. Pelarut yang memiliki afinitas yang baik dengan *gelling agent* yang digunakan akan memfasilitasi pengembangan gel dan meningkatkan stabilitas gel karena *random coil* yang terbentuk semakin banyak dan memperbesar kemungkinan terjadinya *crosslink* sehingga struktur 3 dimensi yang terbentuk cukup kuat. Sebaliknya, pelarut dengan afinitas yang buruk akan menurunkan jumlah *crosslink* yang terjadi dan membentuk struktur gel yang lemah karena rantai polimer dari *gelling agent* akan berusaha meminimalisir kontak dengan pelarut.

Gel dapat mengalami sineresis, yang dapat diamati dengan adanya pelarut di permukaan atas gel. Sineresis merupakan peristiwa keluarnya pelarut dari

matriks gel akibat kontraksi gel tersebut. Sineresis dapat terjadi karena pengaruh pH, konsentrasi elektrolit, maupun konsentrasi *gelling agent* yang digunakan.

Evaluasi mengenai stabilitas fisik gel merupakan suatu hal yang sangat penting. Parameter yang diamati meliputi pemisahan fase, sineresis, sedimentasi, dan viskositas atau konsistensi. Uji yang dilakukan adalah uji *freeze-thaw cycling* untuk mengetahui apakah terjadi pemisahan fase atau sineresis pada gel, penyimpanan pada berbagai kondisi suhu untuk mengetahui kondisi penyimpanan yang cocok untuk gel tersebut, dan *shipping test* untuk menguji ketahanan gel pada syok mekanis dan variasi suhu ketika gel tersebut didistribusikan ke lokasi lain.

1.6. Senyawa Peningkat Penetrasi Perkulatan

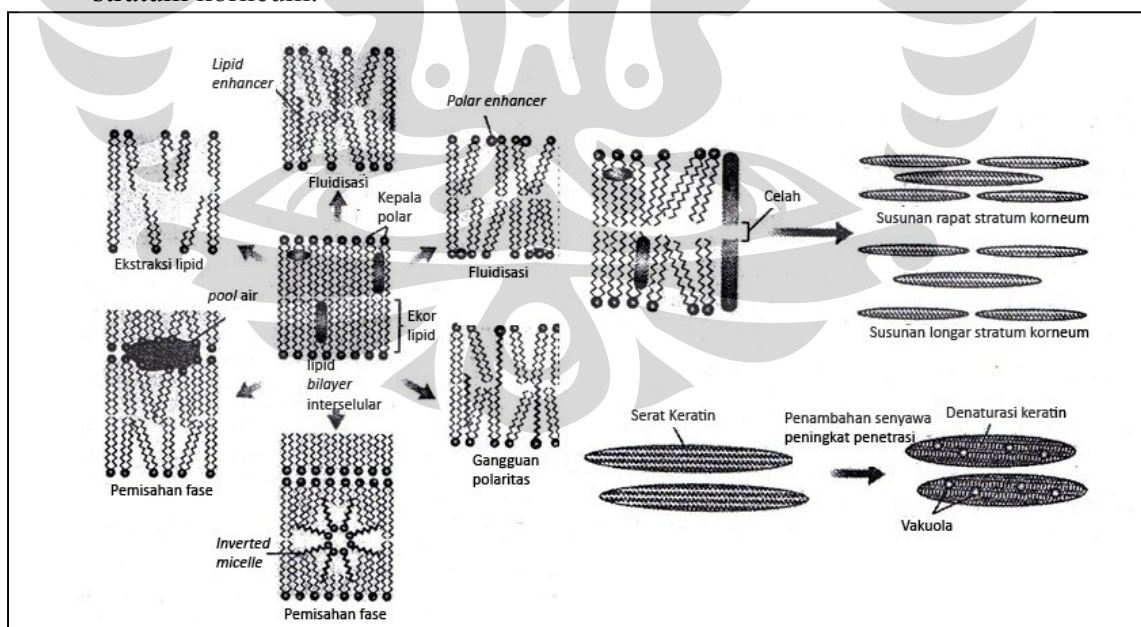
Rute transdermal merupakan salah satu cara penghantaran obat yang menjanjikan. Akan tetapi terdapat beberapa hambatan untuk mencapai hasil terapi yang diinginkan, seperti terbatasnya laju penetrasi obat melintasi stratum korneum (Barry, 1987). Untuk mengatasi masalah ini dikembangkan senyawa peningkat penetrasi perkulatan atau disebut juga *skin penetration enhancer*.

Senyawa peningkat penetrasi perkulatan diharapkan mempunyai sifat-sifat berikut (Williams & Barry, 2007):

- a. Tidak memberikan efek farmakologis pada tubuh, baik secara lokal maupun sistemik
- b. Tidak mengiritasi ataupun menimbulkan reaksi alergi
- c. Bekerja secara reversibel pada kulit
- d. Membantu penetrasi obat melintasi kulit namun tidak memfasilitasi keluarnya senyawa endogen.
- e. Tidak bereaksi dengan obat maupun senyawa lain dalam sediaan

Mekanisme aksi dari beberapa senyawa peningkat penetrasi perkulatan masih belum diketahui. Namun secara umum senyawa peningkat penetrasi perkulatan mempengaruhi stratum korneum dengan cara (Williams & Barry, 2007; Barry, 2001):

- Mempengaruhi lipid interseluler stratum korneum sehingga menurunkan barrier lipid *bilayer* terhadap molekul obat. Pengaruhnya ini dapat berupa fluidisasi, ekstraksi lipid, perubahan polaritas, atau pemisahan fase yang mengakibatkan terbentuknya celah yang memungkinkan senyawa polar menembusnya. Senyawa yang bekerja dengan mempengaruhi lipid adalah azone, terpen, asam oleat, dan DMSO (dimetilsulfoksida).
- Mengubah sifat melarutkan stratum korneum sehingga meningkatkan koefisien partisi obat ataupun bekerja sebagai kosolven jaringan. Contoh senyawa dengan mekanisme aksi ini adalah pirolidon.
- Mempengaruhi keratin intraseluler stratum korneum dengan cara mendenaturasi atau mengubah konformasinya sehingga menyebabkan terjadinya *swelling*, peningkatan hidrasi, dan vakuolisasi.
- Mempengaruhi desmosom, pengikat antar sel tanduk, sehingga terjadi pemisahan stratum korneum.
- Memodifikasi aktivitas termodinamik sediaan. Permeasi cepat pelarut dari sediaan ataupun penguapannya menyebabkan senyawa obat berada pada kondisi aktif secara termodinamik dan mendorong obat untuk menembus stratum korneum.

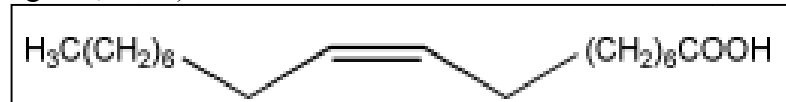


[Sumber: Williams & Barry, 2007]

Gambar 2.6. Mekanisme kerja senyawa peningkat penetrasi perkutan (telah diolah kembali)

Berikut ini akan dijelaskan lebih lanjut mengenai senyawa peningkat penetrasi percutan yang digunakan dalam penelitian ini.

1.6.1. Asam Oleat (Williams & Barry, 2007; Rowe, Sheskey & Owen, 2006; Møllgaard, 1993)



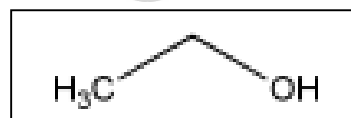
[Sumber: Rowe, Sheskey & Owen, 2006]

Gambar 2.7. Struktur kimia asam oleat

Nama kimia	: Asam-9-oktadekanoat
BM	: 282,47
Kelarutan	: Tidak larut dalam air, larut dalam etanol.
Organoleptis	: Minyak berwarna kuning hingga kecoklatan dengan bau dan rasa khas lemak
Inkompabilitas	: Alumunium, kalsium, logam berat, asam perklorat, dan agen pengoksidasi
Penyimpanan	: Wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya

Asam oleat merupakan senyawa peningkat penetrasi yang bersifat lipofilik. Mekanisme kerja dari asam oleat adalah mengganggu struktur lipid *bilayer* stratum korneum yang tersusun rapi sehingga menyebabkan terjadinya fluidisasi pada lapisan interseluler stratum korneum yang memudahkan obat untuk menembus stratum korneum. Pada konsentrasi tinggi, asam oleat dapat membentuk *pool* pada lapisan lipid bilayer.

1.6.2. Etanol (Williams & Barry, 2007; Rowe, Sheskey & Owen, 2006)



[Sumber: Rowe, Sheskey & Owen, 2006]

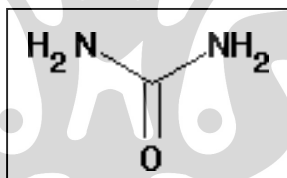
Gambar 2.8. Struktur kimia etanol

BM	: 46,07
Kelarutan	: Larut dalam air

- Organoleptis : Cairan tidak berwarna, jernih, mudah menguap, sedikit berbau, dan menimbulkan rasa panas.
- Inkompabilitas : Senyawa pengoksidasi dan kondisi alkali.
- Penyimpanan : Wadah tertutup rapat di tempat sejuk dan kering.

Etanol banyak digunakan dalam formulasi sediaan farmasi sebagai kosolven. Di sisi lain etanol dapat meningkatkan penetrasi obat menembus stratum korneum. Mekanisme kerjanya dengan mengubah sifat melarutkan stratum korneum hingga koefisien partisi obat ke dalam kulit meningkat. Selain itu etanol meningkatkan aktivitas termodinamik obat karena etanol cepat menembus melewati stratum korneum dan cepat menguap sehingga membuat obat dalam sediaan mencapai kondisi jenuh dan memberikan daya dorong permeasi yang kuat. Ketika digunakan dalam konsentrasi tinggi dan dalam jangka waktu yang panjang, etanol mengubah struktur lipid *bilayer* stratum korneum dengan mengekstraksi lipid.

1.6.3. Urea (Thong, Zhai & Maibach, 2007; *The merck*, 2001)



[Sumber: *The merck*, 2001]

Gambar 2.9. Struktur kimia urea

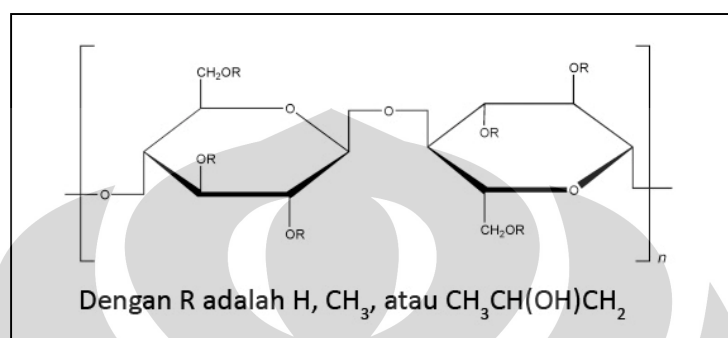
- Nama kimia : Diaminometanal
- BM : 60,06
- Kelarutan : Larut dalam air (1:1)
- Organoleptis : Serbuk kristalin, tidak berwarna atau berwarna putih
- Penyimpanan : Wadah tertutup rapat di tempat sejuk dan kering.

Urea bersifat menghidrasi stratum korneum sehingga meningkatkan kandungan air pada lapisan ini. Air merupakan senyawa peningkat penetrasi alami dengan cara membentuk *pool* air di lapisan lipid *bilayer*. *Pool* air ini bertindak

sebagai jalur polar sehingga obat yang bersifat polar mudah menembus lipid *bilayer* stratum korneum. Di samping itu urea juga bersifat keratolitik.

1.7. Bahan Tambahan Formulasi

1.7.1. HPMC (Rowe, Sheskey & Owen, 2006)



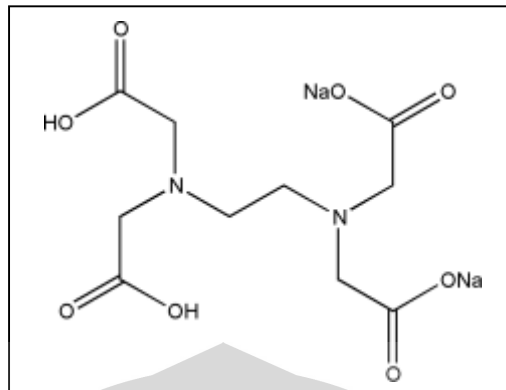
[Sumber: Rowe, Sheskey & Owen, 2006]

Gambar 2.10. Struktur kimia monomer HPMC (telah diolah kembali)

Nama kimia	: Hidroksipropil metil eter selulosa
Sinonim	: Hidroksipropil metil selulosa, methocel, <i>hypromellose</i>
BM	: 10000 – 1500000
Fungsi	: <i>Gelling agent</i>
Organoleptis	: Serbuk granular berwarna putih-krem
pH	: 5,5 – 8,0 (kadar 1%)
Inkompabilitas	: Senyawa pengoksidasi.
Penyimpanan	: Wadah tertutup rapat di tempat sejuk dan kering.

HPMC terdapat dalam beberapa tipe variasi berdasarkan viskositas yang akan dihasilkannya. Tipe yang mempunyai viskositas cukup tinggi adalah Methocel E4M Premium. Untuk menghasilkan gel dengan viskositas tinggi akan lebih baik jika menggunakan tipe tersebut. Pembentukan gel HPMC dilakukan dengan cara mendispersikan HPMC dalam air kemudian dipanaskan hingga suhu 50°C – 90°C dan selanjutnya dilakukan pendinginan. Gel yang terbentuk jernih dan stabil pada jangkauan pH yang cukup luas, yaitu antara pH 3–11. Derivat selulosa ini tahan pada enzim yang dihasilkan oleh mikroba sehingga viskositas gel yang dihasilkan stabil pada penyimpanan jangka panjang.

1.7.2. Dinatrium EDTA (Rowe, Sheskey & Owen, 2006)



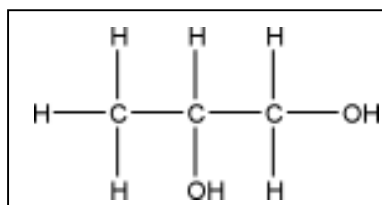
[Sumber: Rowe, Sheskey & Owen, 2006]

Gambar 2.11. Struktur kimia dinatrium EDTA

Nama kimia	: Dinatrium etilendiamintetraasetat dihidrat
Sinonim	: Dinatrium edetat, dinatrium etilendiamintetraasetat
BM	: 372,2
Fungsi	: <i>Chelating agent</i>
Kelarutan	: 1:11 dalam air (20 ⁰ C)
Organoleptis	: Serbuk kristalin putih dengan sedikit rasa asam
pH	: 4,3 - 4,7 (larutan 0,2%)
Inkompabilitas	: Senyawa pengoksidasi kuat dan senyawa alkali kuat
Penyimpanan	: Wadah tertutup rapat di tempat sejuk dan kering.

Dinatrium EDTA diperlukan untuk mengikat logam-logam yang mungkin mengkontaminasi sediaan dan melindungi bahan-bahan yang sensitif dengan adanya logam.

1.7.3. Propilen Glikol (Rowe, Sheskey & Owen, 2006)



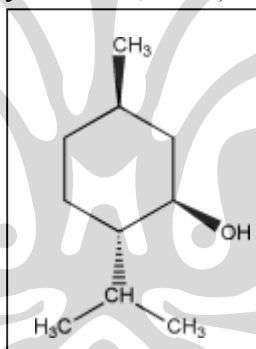
[Sumber: Rowe, Sheskey & Owen, 2006]

Gambar 2.12. Struktur kimia propilen glikol

Nama kimia	: 1,2-Propanediol
BM	: 76,09
Fungsi	: Humektan dan kosolven
Kelarutan	: Larut dalam air
Organoleptis	: Cairan tidak berwarna, jernih, tidak berbau, dan mempunyai rasa manis.
Inkompabilitas	: Senyawa pengoksidasi, seperti KMnO_4 , dan suhu tinggi.
Penyimpanan	: Wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya di tempat sejuk dan kering.

Propilen glikol dapat digunakan sebagai humektan untuk menjaga agar sediaan tidak kehilangan kandungan airnya secara drastis dan juga sebagai kosolven.

1.7.4. Mentol (Rowe, Sheskey & Owen, 2006)



[Sumber: Rowe, Sheskey & Owen, 2006]

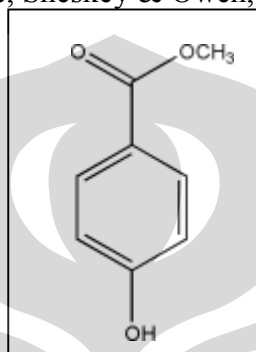
Gambar 2.13. Struktur kimia mentol

Nama kimia	: (1 <i>RS</i> ,2 <i>RS</i> ,5 <i>RS</i>)-(±)-5-Metil-2-(1-metiletil) sikloheksanol
BM	: 156,27
Fungsi	: Pemberi sensasi dingin dan bau
Kelarutan	: Tidak larut dalam air, mudah larut dalam etanol.
Organoleptis	: Serbuk kristalin tidak berwarna dengan rasa dan bau spesifik
Inkompabilitas	: Butilkloral hidrat, kamfor, kloral hidrat, kromium trioksida, β-naftol, fenol, KMnO_4 , pirogalol, resorsin, dan timol.

Penyimpanan : Wadah tertutup rapat dengan suhu penyimpanan di bawah 25⁰C.

Mentol memberikan sensasi dingin dan bau mentol ketika sediaan diaplikasikan pada kulit.

1.7.5. Metil paraben (Rowe, Sheskey & Owen, 2006)



[Sumber: Rowe, Sheskey & Owen, 2006]

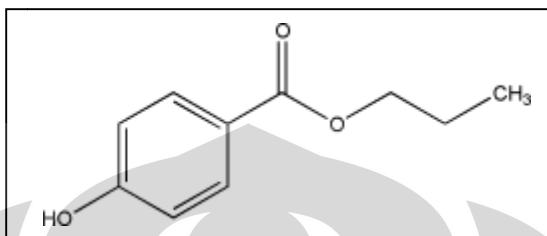
Gambar 2.14. Struktur kimia metil paraben

Nama kimia : Metil-4-hidroksibenzoat
 Sinonim : Nipagin
 BM : 152,15
 Fungsi : Pengawet
 Kelarutan : 1:400 dalam air, 1:2 dalam etanol, 1:5 dalam propilen glikol
 Organoleptis : Kristal tidak berwarna atau serbuk kristalin putih, memberikan rasa panas dan bau tidak spesifik
 Inkompabilitas : Bentonit, magnesium trisilikat, talk, natrium alginat, tragakan, minyak atsiri, sorbitol, dan Tween 80. Terjadi perubahan warna dengan adanya logam besi.
 Penyimpanan : Wadah tertutup rapat di tempat sejuk dan kering.

Metil paraben mempunyai rentang pH efektif yang cukup lebar (4-8) dan juga aktivitas antimikroba dengan spektrum luas. Penggunaannya dapat dikombinasikan dengan paraben lainnya untuk mendapatkan efek yang sinergis, ataupun dengan mengkombinasikannya dengan propilen glikol. Sediaan dengan

metil paraben pada pH 3-6 stabil selama 4 tahun pada suhu ruangan, sedangkan pada pH di bawah 3 ataupun di atas 8 kestabilannya menurun menjadi 60 hari penyimpanan pada suhu ruangan.

1.7.6. Propil paraben (Rowe, Sheskey & Owen, 2006)



[Sumber: Rowe, Sheskey & Owen, 2006]

Gambar 2.15. Struktur kimia propil paraben

Nama kimia	: Propil 4-hidroksibenzoat
Sinonim	: Nipasol
BM	: 180,20
Fungsi	: Pengawet
Kelarutan	: 1:2500 dalam air, 1:5,6 dalam etanol, 1:3,9 dalam propilen glikol
Organoleptis	: Serbuk putih dengan rasa dan bau tidak spesifik
Inkompabilitas	: Aluminium silikat, magnesium trisilikat, <i>yellow iron oxide</i> , dan <i>ultramarine blue</i> dapat menyerap propil paraben. Terjadi perubahan warna dengan adanya logam besi.
Penyimpanan	: Wadah tertutup rapat di tempat sejuk dan kering.

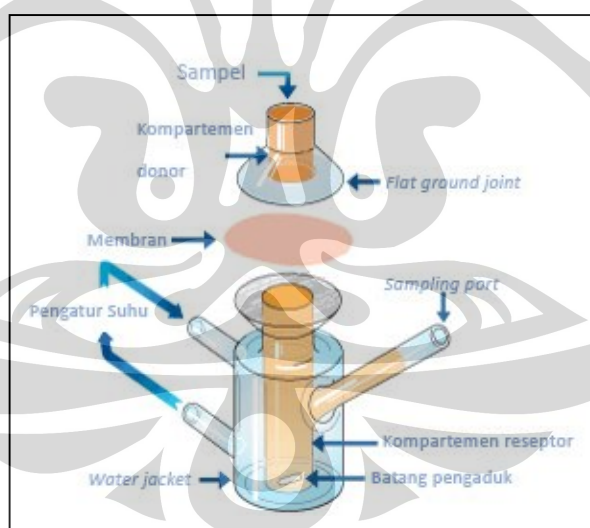
Propil paraben ini mempunyai rentang pH efektif yang cukup lebar (4-8) dan juga aktivitas antimikroba dengan spektrum luas. Propil paraben umumnya dikombinasikan dengan metil paraben untuk mendapatkan efek yang sinergis. Sediaan dengan pengawet propil paraben pada pH 3-6 stabil selama 4 tahun pada suhu ruangan, sedangkan pada pH di bawah 3 ataupun di atas 8 kestabilannya menurun menjadi 60 hari penyimpanan pada suhu ruangan.

1.8. Uji Penetrasi Perkutan Secara *In Vitro* Menggunakan Sel Difusi Franz

(Brain, Walters & Watkinson, 2002; Wester & Maibach, 1990; Tojo, 1987; Shargel, Wu-Pong & Wu, 2004; Roberts & Anissimov, 2005; Thakker & Chern, 2005)

Pengembangan sediaan topikal dan transdermal membutuhkan penelitian tentang daya dan laju penetrasi obat melintasi kulit yang mudah dan hemat, namun dengan hasil yang cukup akurat. Penelitian laju pelepasan obat melalui kulit dapat dilakukan secara *in vitro* dengan berbagai berbagai macam aparatus.

Sel difusi Franz, salah satu aparatus untuk menguji permeasi obat melalui kulit secara *in vitro*, merupakan sistem permeasi tipe vertikal. Perangkat ini terdiri atas kompartemen donor, kompartemen reseptor, tempat pengambilan sampel, dan *water jacket*. Membran kulit diletakkan di antara kompartemen donor dan reseptor serta dijaga letaknya dengan *o-ring*. Pada kompartemen reseptor yang telah diisi dengan larutan penerima terdapat pengaduk magnetik yang diatur pada kecepatan 600 rpm untuk larutan dengan viskositas rendah dan *water jacket* untuk menjaga suhu sistem.



[Sumber: *PermeGear Franz*, 2005]

Gambar 16. Sel difusi Franz (telah diolah kembali)

Sediaan yang akan diuji diaplikasikan pada membran dengan jumlah tertentu. Setelah beberapa waktu diambil sejumlah tertentu cairan dari larutan penerima dan diganti dengan larutan penerima yang baru dengan volume yang sama dengan yang diambil. Sampel ini diambil pada interval waktu tertentu.

Kadar obat yang ada dalam masing-masing sampel dihitung dengan metode analisis yang ada kemudian digunakan untuk perhitungan laju penetrasi obat.

Secara umum laju penetrasi obat melewati kulit mengikuti hukum Ficks I karena pada dasarnya obat melalui kulit dengan cara difusi pasif.

$$J = \frac{DAK}{h}(C_d - C_r) \quad (2.1)$$

di mana:

- J = Fluks atau laju penetrasi obat
- D = Koefisien difusi
- A = Luas area difusi
- K = Koefisien partisi obat
- h = Tebal membran difusi
- C_d = Konsentrasi obat dalam kompartemen donor
- C_r = Konsentrasi obat dalam kompartemen reseptor

Sebagian besar penelitian permeabilitas kulit secara *in vitro* mengasumsikan bahwa konsentrasi obat dalam kompartemen donor dan kondisi *sink* dalam kompartemen reseptor berada dalam kondisi konstan selama penelitian berlangsung. Dalam keadaan demikian, jumlah obat yang terpenetrasi dapat dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$Q = k_p A C_v t \quad (2.2)$$

di mana:

- Q = Jumlah obat yang terpenetrasi
- k_p = Koefisien permeabilitas stratum korneum
- A = Luas area pemberian obat
- C_v = Konsentrasi obat dalam sediaan
- t = Lama pemaparan terhadap obat

Sedangkan laju penetrasi obat atau fluks (J) dapat dihitung dengan menggunakan persamaan:

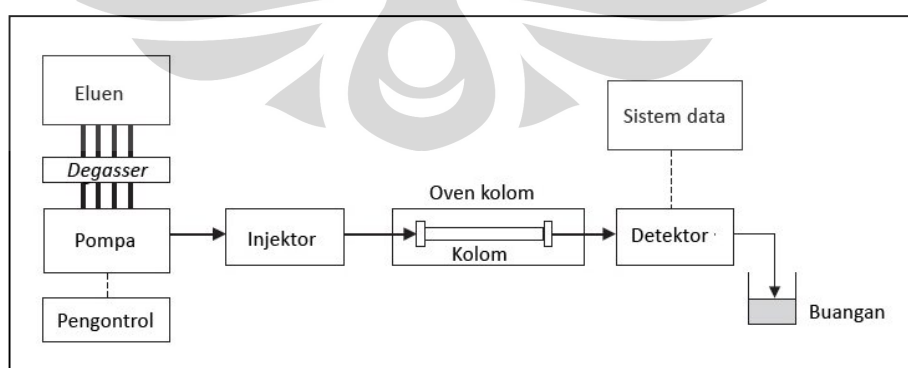
$$J = \frac{Q}{A \times t} = k_p C_v \quad (2.3)$$

Persamaan 2.3 pada dasarnya merupakan bentuk sederhana dari hukum Ficks I. Koefisien permeabilitas stratum korneum atau k_p didapat dari:

$$k_p = \frac{DK}{h} \quad (2.4)$$

1.9. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi atau KCKT merupakan metode analisis non-destruktif yang umum digunakan dalam industri farmasi, baik untuk analisis kuantitatif maupun kualitatif. Kromatografi sendiri adalah teknik pemisahan di mana solut atau zat-zat terlarut terpisahkan berdasarkan perbedaan kecepatan elusi akibat adanya interaksi antara solut dengan fase diam dan fase gerak (Gandjar & Rohman, 2007). Pada kromatografi cair, solut terpisah berdasarkan distribusinya pada fase gerak yang berupa zat cair, disebut sebagai eluen, dan fase diam yang dikemas dalam kolom (Dong, 2006). Untuk mendapatkan hasil analisis yang baik, diperlukan kombinasi antara jenis eluen, jenis kolom, panjang dan diameter kolom, kecepatan aliran eluen, tekanan, suhu kolom, dan detektor yang tepat.



[Sumber: Dong, 2006]

Gambar 2.17. Instrumentasi KCKT (telah diolah kembali)

1.9.1. Eluen

Eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur. Sebelum digunakan sebaiknya dilakukan penghilangan gas pada eluen sebab adanya gas akan berkumpul di komponen KCKT terutama di pompa dan detektor sehingga mengacaukan analisis dan juga disaring melalui membran 0,45 μm , khususnya eluen yang mengandung dapar, garam, atau senyawa kimia yang tidak larut. Pelarut dengan *HPLC grade* tidak perlu disaring. (Gandjar & Rohman, 2007; Harmita, 2006). Elusi dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu fase normal dan fase terbalik (Harmita, 2006). Pada fase normal kolom bersifat polar dan eluen bersifat nonpolar. Eluen yang dapat digunakan adalah pelarut hidrokarbon, pelarut yang terklorinasi, atau jenis alkohol. Sedangkan pada fase terbalik kolom bersifat nonpolar dan eluen bersifat polar. Umumnya eluen yang digunakan adalah buffer, metanol, air, atau asetonitril (Gandjar & Rohman, 2007).

1.9.2. Pompa (Gandjar & Rohman, 2007)

Pompa digunakan untuk menjamin proses penghantaran eluen berlangsung secara tepat, reproduisibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Terdapat dua jenis pompa, yaitu pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran eluen yang konstan. Tipe pompa dengan aliran eluen yang konstan lebih umum digunakan.

1.9.3. Kolom (Harmita, 2006)

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing solut. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam memilih kolom antara lain:

a. Panjang kolom

Umumnya berkisar antara 5 – 100 cm. Kolom yang panjang akan mengakibatkan solut tertahan lebih lama sehingga waktu retensinya akan lebih panjang dan pemisahan menjadi lebih baik. Oleh karena itu untuk mempersingkat waktu analisis dapat digunakan kolom yang pendek.

b. Diameter kolom

Untuk keperluan analisis digunakan kolom dengan diameter dalam 2 – 6 mm.

c. Pengisi kolom (fase diam)

Bahan pengisi kolom dapat berbentuk bulat ataupun tidak teratur. Partikel dengan bentuk bulat mempunyai keuntungan daripada partikel dengan bentuk tidak teratur karena lebih tahan terhadap guncangan mekanis dan tekanan eluen yang tinggi. Ukuran partikel fase diam berpengaruh pada daya pemisahan. Ukuran partikel yang kecil akan menghasilkan pemisahan yang baik. Pemilihan fase diam tergantung pada fase kromatografi yang dipilih. Kromatografi fase normal menggunakan fase diam yang bersifat polar. Untuk itu dapat digunakan silika atau alumina. Sedangkan fase terbalik dengan fase diam yang bersifat nonpolar dapat menggunakan fase diam C-18, C-8, atau lainnya

d. Tekanan kolom

Tekanan kolom timbul akibat hambatan fase diam terhadap eluen. Tekanan yang terlalu tinggi dapat merusak kolom. Untuk itu dapat digunakan fase diam dengan ukuran partikel lebih kecil dan eluen dengan viskositas rendah.

Sampel terkadang mengandung kontaminan-kontaminan yang dapat memperpendek umur kolom. Agar umur kolom lebih panjang dapat digunakan *guard* kolom yang bertindak sebagai filter kimia menahan kontaminan yang dapat merusak ataupun menyumbat kolom. *Guard* kolom diletakkan di antara injektor dan kolom, berisikan fase diam dan diameter dalam yang sama dengan kolom.

1.9.4. Detektor

Suatu detektor yang ideal seharusnya memiliki karakteristik sebagai berikut (Gandjar & Rohman, 2007):

- a. Mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduisibel
- b. Mempunyai sensitifitas yang tinggi

- c. Stabil dalam pengoperasian
- d. Sinyal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas
- e. Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak

Detektor yang sering digunakan pada KCKT adalah detektor spektrofotometri UV-Vis, detektor fluoresensi, detektor indeks bias, dan detektor elektrokimia (Gandjar & Rohman, 2007).

Untuk mengidentifikasi glukosamin digunakan KCKT detektor fluoresensi dengan derivatisasi prekolom (Purwadi, 2007). Fluoresensi terjadi ketika suatu molekul menyerap sinar UV atau visibel lalu mengemisikannya pada panjang gelombang yang lebih besar (Gandjar & Rohman, 2007). Spektrum fluoresensi yang didapat dari detektor ini merupakan hasil dari intensitas cahaya emisi dengan panjang gelombang eksitasi (Asshauer & Ullner, 1986). Detektor fluoresensi mempunyai sensitivitas yang lebih tinggi, limit deteksi yang lebih rendah, lebih selektif karena hanya senyawa yang dapat berfluoresensi saja yang akan terdeteksi, dan hanya sedikit dipengaruhi oleh fluktuasi laju alir eluen, suhu, dan tekanan kolom (Gandjar & Rohman, 2007; Dong, 2006; Asshauer & Ullner, 1986).

Kelemahan metode ini ada pada rentang linearitasnya yang sempit karena mekanisme fluoresensi antar senyawa berbeda-beda, adanya kemungkinan *quenching* (peredaman fluoresensi), dan absorpsi oleh senyawa itu sendiri maupun oleh senyawa lain yang ada dalam sampel (Gandjar & Rohman, 2007; Asshauer & Ullner, 1986). Penggunaan eluen yang bersifat sangat polar, buffer, dan ion-ion halida harus dihindari untuk meminimalisir kemungkinan terjadinya peredaman fluoresensi atau *quenching* (Gandjar & Rohman, 2007). Selain itu pH eluen juga harus diperhatikan karena terkait dengan efisiensi fluoresensi (Gandjar & Rohman, 2007).

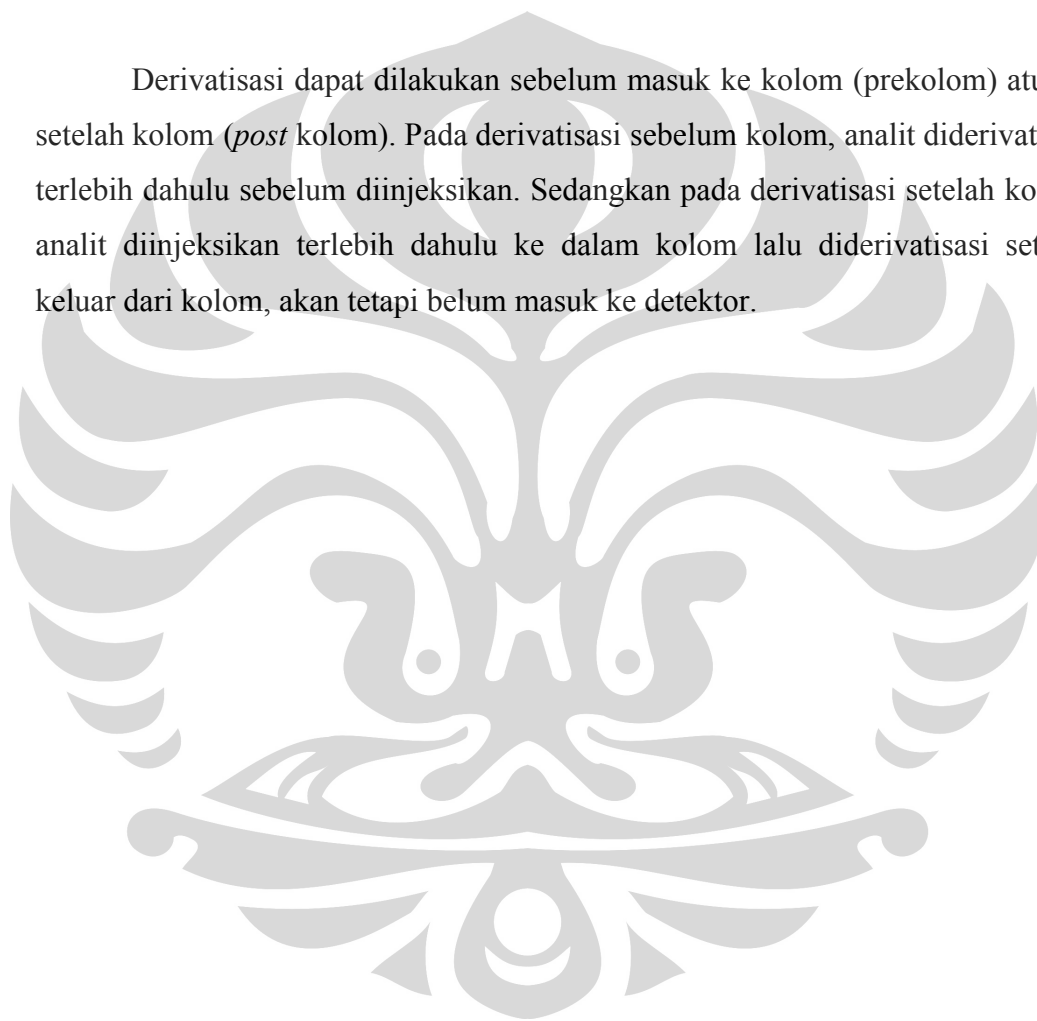
1.9.5. Derivatisasi sampel (Gandjar & Rohman, 2007)

Suatu sampel yang tidak terdeteksi dengan detektor UV-Vis atau detektor fluoresensi dapat ditambahkan gugus tertentu atau dengan kata lain dilakukan

reaksi derivatisasi agar dapat dideteksi dengan detektor yang digunakan. Reaksi derivatisasi mempunyai syarat-syarat, antara lain:

- a. Proses derivatisasi harus cepat dan menghasilkan produk sebesar mungkin (100%).
- b. Produk hasil derivatisasi harus stabil selama proses derivatisasi dan deteksi
- c. Sisa pereaksi untuk derivatisasi harus tidak mengganggu pemisahan kromatografi

Derivatisasi dapat dilakukan sebelum masuk ke kolom (prekolom) ataupun setelah kolom (*post* kolom). Pada derivatisasi sebelum kolom, analit diderivatisasi terlebih dahulu sebelum diinjeksikan. Sedangkan pada derivatisasi setelah kolom, analit diinjeksikan terlebih dahulu ke dalam kolom lalu diderivatisasi setelah keluar dari kolom, akan tetapi belum masuk ke detektor.



BAB 3

METODE PENELITIAN

1.10. Lokasi dan Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari – Mei 2010. Pembuatan dan evaluasi gel, serta uji penetrasi glukosamin secara *in vitro* menggunakan sel difusi Franz dilakukan di Laboratorium Penelitian Farmasetika Departemen Farmasi, FMIPA UI. Analisis kuantitatif glukosamin dilakukan di Laboratorium Bioavailabilitas-Bioekivalensi Departemen Farmasi, FMIPA UI.

1.11. Bahan

Glukosamin HCl (diberikan oleh PT Otto Pharmaceutical Industries, Indonesia), standar glukosamin HCl (Sigma Aldrich, Singapura), asam oleat (Brataco, Indonesia), etanol 96% (Merck, Jerman), urea (Merck, Jerman), HPMC tipe Methocel E4M Premium (diberikan oleh PT Sandoz Indonesia, Indonesia), dinatrium EDTA (Merck, Jerman), propilen glikol (Brataco, Indonesia), mentol (Brataco, Indonesia), metil paraben (Brataco, Indonesia), propil paraben (Brataco, Indonesia), aquades (Brataco, Indonesia), aquabides (Ikapharmindo, Indonesia), metanol (Merck, Jerman), tetrahidrofuran (Merck, Jerman), asetonitril (Merck, Jerman), o-ftalaldehid (Sigma Aldrich, Singapura), 2-merkapttoetanol (Merck, Jerman), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), asam borat (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Merck, Jerman), dietil eter (Merck, Jerman), filter eluen.

Kulit tikus betina *Rattus norvegicus* usia 2 – 3 bulan dengan berat \pm 150 gram (Institut Pertanian Bogor, Indonesia).

1.12. Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah sel difusi Franz dengan luas area difusi 1,89 cm² dan volume kompartemen 12,7 ml (Bengkel gelas ITB, Indonesia), perangkat KCKT detektor fluoresensi (Shimadzu, Jepang), spektrofluorometer F-2000 (Hitachi, Jepang), homogenizer (Multimix, Malaysia), vortex (Barnstead, USA), pH-meter tipe 510 (Eutech Instrument, Singapura), viskometer model HAT

dengan spindle tipe HA (Brookfield, USA), penetrometer (Herzoo, Jerman), termostat (Polyscience, USA), pengaduk magnetik (Corning, USA), oven (Mommert, Jerman), pipet mikro (Socorex, Swiss), timbangan analitik (Adam, USA), pompa vakum (Gast, USA), kolom C18 Symmetry Shield (Waters, USA), syringe, kamera digital, dan peralatan gelas yang biasa digunakan.

1.13. Cara Kerja

1.13.1. Pembuatan Sediaan Gel Glukosamin (Rowe, Sheskey & Owen, 2006)

Tabel 3.1. Formula sediaan gel glukosamin

Bahan	Kontrol	Formula I	Formula II	Formula III
Glukosamin HCl	1,2%	1,2%	1,2%	1,2%
HPMC tipe Methocel E4M Premium	4%	4%	4%	4%
Etanol	-	5%	-	-
Urea	-	-	5%	-
Asam Oleat	-	-	-	5%
Mentol	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Propilen glikol	5%	5%	5%	5%
Dinatrium EDTA	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Metil paraben	0,18%	0,18%	0,18%	0,18%
Propil paraben	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%
Aquadest	ad 100%	ad 100%	ad 100%	ad 100%

Aquades dipanaskan hingga suhu 80°C, lalu dinatrium EDTA dilarutkan dalam aquades tersebut. HPMC ditaburkan sedikit demi sedikit pada larutan tersebut sambil dihomogenkan dengan homogenizer pada kecepatan 300 rpm hingga mulai terbentuk basis gel. Gambar alat homogenizer dapat dilihat pada gambar 3.1. Basis gel tersebut tetap diaduk pada kecepatan 300 rpm hingga dingin. Selama proses pendinginan ini viskositas gel akan meningkat. Glukosamin HCl yang sudah dilarutkan dalam aquades (1 gram dalam 10 ml) ditambahkan ke dalam basis gel dan diaduk hingga homogen. Senyawa-senyawa peningkat

penetrasi ditambahkan ke dalam basis gel dengan cara berikut ini. Urea dan etanol dilarutkan terlebih dahulu dalam aquades lalu dicampur dengan propilen glikol, sedangkan asam oleat dilarutkan bersama dengan propilen glikol. Metil paraben, propil paraben, dan mentol yang telah ditimbang, dilarutkan dalam propilen glikol lalu dimasukkan ke gel dan dilanjutkan proses homogenisasi. Gel yang dihasilkan disimpan pada wadah tertutup rapat.

1.13.2. Evaluasi Sediaan Gel Glukosamin

1.13.2.1. Uji Organoleptis (Iswanda, 2009)

Sediaan diamati terjadinya sineresis atau tidak, kejernihan, bau serta perubahan warna.

1.13.2.2. Uji Konsistensi (Iswanda, 2009; Nuraini, 2008)

Sediaan yang akan dievaluasi dimasukkan ke dalam wadah khusus dan diletakkan pada meja penetrometer. Peralatan diatur hingga ujung kerucut menyentuh bayang permukaan sediaan yang dapat diperjelas dengan menghidupkan lampu. Batang pendorong dilepas dengan menekan tombol *start*. Angka penetrasi dibaca lima detik setelah kerucut menembus sediaan. Gambar alat dapat dilihat pada gambar 3.1. Dari pengukuran konsistensi dengan penetrometer akan diperoleh *yield value* yang dihitung dengan persamaan:

$$So = \frac{k_1 \cdot m \cdot g}{p^n} \quad (3.1)$$

Keterangan:

So = *Yield value* (dyne/cm²)

m = Massa kerucut

g = Gravitasi (cm/df²)

p = Dalamnya penetrasi (cm)

n = Konstanta, yaitu 2

k₁ = $1/\pi \cos^2 \alpha \cos \alpha$

α = Sudut kerucut terhadap bidang datar, yaitu 37⁰

1.13.2.3. Pengukuran pH (Iswanda, 2009; *Farmakope Indonesia*, 1995)

Universitas Indonesia

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Gambar alat dapat dilihat pada gambar 3.1. Mula-mula elektroda dikalibrasi dengan dapar standar pH 4 dan 7. Setelah itu elektroda dicelupkan ke dalam sediaan. Catat nilai pH yang muncul di layar. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang.

1.13.2.4. Pengukuran Viskositas Gel (Nur Aini, 2009)

Pengukuran viskositas dilakukan dengan viskometer Brookfield spindel tipe HA. Gambar alat dapat dilihat pada gambar 3.1. Sediaan gel dimasukkan ke *beaker glass* 500 ml. Spindel yang sesuai diturunkan hingga batas spindel tercelup ke dalam gel. Kemudian motor dinyalakan dan spindel dibiarkan berputar. Angka *dial reading* yang ditunjukkan oleh jarum merah dicatat. Pengamatan dilakukan pada spindel yang sama dengan mengubah kecepatan motor dari rpm 0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10; 20; 50 dan 100 rpm kemudian sebaliknya dari 100; 50; 20; 10; 5; 2,5; 2; 1; dan 0,5 rpm. Angka *dial reading* dikalikan dengan faktor yang dilihat pada tabel yang terdapat pada brosur alat untuk mendapatkan nilai viskositas.

1.13.3. Uji Stabilitas Fisik Sediaan (Iswanda, 2009; *Guidance*, 2003; Niazi, 2004)

i. Penyimpanan pada Suhu Kamar

Stabilitas sediaan meliputi organoleptis, pH, dan viskositas dievaluasi pada suhu kamar $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ selama 8 minggu dengan pengamatan selama 2 minggu sekali.

ii. Penyimpanan pada Suhu Tinggi

Stabilitas sediaan meliputi organoleptis, pH, dan viskositas dievaluasi pada suhu antara $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ selama 8 minggu dengan pengamatan selama 2 minggu sekali.

iii. Penyimpanan pada Suhu Rendah

Stabilitas sediaan meliputi organoleptis, pH, dan viskositas dievaluasi pada suhu antara $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ selama 8 minggu dengan pengamatan selama 2 minggu sekali.

iv. *Cycling Test*

Sediaan disimpan pada suhu $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ selama 24 jam kemudian dikeluarkan dan ditempatkan di suhu $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ selama 24 jam. Perlakuan ini adalah satu siklus. Percobaan diulang sebanyak 6 siklus. Stabilitas sediaan dievaluasi selama percobaan.

1.13.4. Uji Penetrasi Perkutane secara *In Vitro*

1.13.4.1. Pembuatan Dapar Fosfat pH 7,4 (*United States, 2007*)

Kalium dihidrogen fosfat ditimbang sebanyak 27,22 gram lalu dilarutkan dalam aquades bebas karbondioksida hingga 1000 ml. 50 ml larutan tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam labu ukur 200 ml lalu ditambahkan 39,1 ml natrium hidroksida 0,2 M dan dicukupkan volumenya dengan aquades bebas karbondioksida. pH dapar dicek pada nilai 7,4.

1.13.4.2. Pembuatan Dapar Borat pH 9,3 (*Purwadi, 2007*)

Asam borat ditimbang sebanyak 2,47 gram lalu ditambahkan larutan natrium hidroksida jenuh hingga pH 9,3 kemudian diencerkan dengan aquades hingga volume 100 ml.

1.13.4.3. Pembuatan Pereaksi o-Ftalaldehid/2-Merkaptoetanol (OPA/2-ME) (*Purwadi, 2007*)

Ditimbang 27 mg o-ftalaldehid kemudian ditambahkan 500 μl etanol dan 20 μl 2-merkaptoetanol, dikocok dengan vorteks, lalu diencerkan dengan dapar borat pH 9,3 sampai volume 5 ml. Larutan disimpan 24 jam dalam lemari pembeku sebelum digunakan.

1.13.4.4. Pembuatan Fase Gerak Tetrahidrofurane 0,25%-Asetonitril (83:17)

1,25 ml tetrahydrofuran dilarutkan dalam 500,0 ml aquabides. Larutan disaring dengan filter. Setelah itu ditambahkan 102 ml asetonitril *HPLC grade* dalam larutan tersebut. Eluen ini dihomogenkan selama 5 menit dengan pengaduk magnetik kecepatan 300 rpm.

1.13.4.5. Pengukuran Panjang Gelombang Eksitasi dan Emisi Maksimum Glukosamin dengan Pereaksi o-Ftalaldehid/2-Merkaptoetanol (Purwadi, 2007)

Panjang gelombang eksitasi: larutan glukosamin 10 µg/ml dalam air dipipet 50,0 µl ke dalam tabung reaksi, ditambah 50,0 µl pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptoetanol. Campuran dibiarkan bereaksi selama 2 menit, selanjutnya ditambah fase gerak yaitu tetrahydrofuran 0,25%-asetonitril (83:17) sampai 2 ml. Larutan dimasukkan ke dalam kuvet dan dilakukan pengukuran spektrum eksitasi pada 200-500 nm pada spektrofлуorometer dengan blanko aquades. Dari spektrum yang diperoleh kemudian ditentukan panjang gelombang eksitasi untuk analisis.

Panjang gelombang emisi: larutan glukosamin 10 µg/ml dalam air dipipet 10,0 µl ke dalam tabung reaksi, ditambah 10,0 µl pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptoetanol. Campuran dibiarkan bereaksi selama 2 menit, selanjutnya ditambahkan fase gerak sampai volume 2 ml. Larutan dimasukkan ke dalam kuvet spektrofлуorometer dan dilakukan pengukuran spektrum emisi pada 350-600 nm dengan blanko aquades, menggunakan panjang gelombang eksitasi hasil penentuan sebelumnya. Dari spektrum yang diperoleh kemudian ditentukan panjang gelombang emisi untuk analisis.

1.13.4.6. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Metanol dan Dapar Borat pH 9,3 (Purwadi, 2007; Iswanda, 2009)

Standar glukosamin HCl ditimbang sebanyak $\pm 12,0$ mg lalu dilarutkan dalam metanol hingga 100,0 ml. Akan didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm dihitung terhadap glukosamin base. Larutan 100 ppm ini digunakan sebagai larutan induk. Dari larutan induk ini dipipet masing-masing 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; dan 250,0 µl kemudian diencerkan dengan dapar borat pH 9,3 dalam labu ukur 10,0 ml sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 0,5; 1; 1,5; 2; dan

2,5 ppm dihitung terhadap glukosamin base. Masing-masing larutan standar tersebut dipipet 50,0 μ l dan direaksikan dengan 50,0 μ l pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptotanol. Setelah itu larutan uji tersebut dianalisis dengan KCKT detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi dan emisi terpilih dengan laju alir eluen 1,0 ml/menit kemudian dihitung persamaan regresi linearnya.

1.13.4.7. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Dapar Fosfat pH 7,4 dan Dapar Borat pH 9,3 (Purwadi, 2007; Iswanda, 2009)

Standar glukosamin HCl ditimbang sebanyak \pm 15,0 mg lalu dilarutkan dalam dapar fosfat pH 7,4 dalam labu ukur hingga 25,0 ml. Akan didapatkan larutan dengan konsentrasi 500 ppm dihitung terhadap glukosamin base. Larutan ini dipipet 500,0; 160,0; 120,0; 80,0; dan 40,0 μ l lalu diencerkan dengan dapar borat pH 9,3 hingga volume 5,0 ml. Larutan ini masing-masing mempunyai konsentrasi 50, 16, 12, 8, dan 4 ppm dihitung terhadap glukosamin base. Dari larutan 50 ppm, dipipet 100,0; 70,0; dan 40,0 μ l kemudian diencerkan dengan dapar borat pH 9,3 dalam labu ukur 5,0 ml sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 1; 0,7; dan 0,4 ppm dihitung terhadap glukosamin base. Seri konsentrasi larutan standar yang digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi adalah 16; 12; 8; 4; 1; 0,7; dan 0,4 ppm. Masing-masing larutan standar tersebut dipipet 50,0 μ l dan direaksikan dengan 50,0 μ l pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptotanol. Setelah itu larutan uji tersebut dianalisis dengan KCKT detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi dan emisi terpilih dengan laju alir eluen 1,0 ml/menit kemudian dihitung persamaan regresi linearnya.

1.13.4.8. Uji Perolehan Kembali Kadar Glukosamin dalam Sediaan (Purwadi, 2007; Iswanda, 2009; Sukmawati, 2007)

Sediaan gel glukosamin ditimbang secara seksama sebanyak \pm 1,0 gram kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 25,0 ml. Larutan tersebut kemudian dipipet sebanyak 125,0 μ l, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan dapar borat pH 9,3. Larutan sampel tersebut dipipet 50,0 μ l dan direaksikan dengan 50,0 μ l pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptotanol. Setelah itu larutan uji tersebut dianalisis dengan KCKT detektor

fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi dan emisi terpilih dengan laju alir eluen 1,0 ml/menit kemudian dihitung kadarnya menggunakan persamaan kurva kalibrasi glukosamin dalam metanol dan dapar borat pH 9,3. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali.

1.13.4.9. Uji Penetrasi Glukosamin (Purwadi, 2007; Iswanda, 2009; Tekko, 2006)

Membran yang digunakan adalah membran abdomen kulit tikus betina *Rattus norvegicus* usia 2 – 3 bulan dengan berat \pm 150 gram. Pertama-tama tikus dibius dengan eter hingga mati kemudian bulu tikus dicukur dengan hati-hati lalu kulit tikus disayat pada bagian perut dengan ketebalan $0,6 \pm 0,1$ mm. Kemudian kulit tikus direndam dalam dapar fosfat pH 7,4 selama 30 menit dan setelah itu dapat langsung digunakan. Uji penetrasi dilakukan menggunakan sel difusi Franz dengan luas area difusi $1,89 \text{ cm}^2$ dan volume kompartemen 12,7 ml. Kompartemen reseptor diisi dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 dan dijaga suhunya sekitar $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ serta diaduk dengan pengaduk magnetik kecepatan 500 rpm. Kulit abdomen tikus kemudian diletakkan di antara kompartemen donor dengan kompartemen reseptor dengan posisi stratum korneum menghadap ke atas. Sampel 1 gram diaplikasikan pada permukaan kulit. Kemudian pada menit ke-10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 diambil sampel sebanyak 0,5 ml dari kompartemen reseptor menggunakan *syringe* dan segera digantikan dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 sejumlah volume yang sama. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan dapar borat pH 9,3. Jika konsentrasi sampel tidak berada dalam rentang kurva kalibrasi, dapat dilakukan pengenceran lagi. Dari larutan tersebut dipipet 200,0 μl dan dimasukkan ke labu ukur 5,0 ml lalu dicukupkan volumenya dengan dapar borat pH 9,3. Larutan sampel tersebut dipipet 50,0 μl dan direaksikan dengan 50,0 μl pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptotanol. Setelah itu larutan uji tersebut dianalisis dengan KCKT detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi dan emisi terpilih dengan laju alir eluen 1,0 ml/menit kemudian dihitung kadarnya menggunakan persamaan kurva kalibrasi glukosamin dalam dapar fosfat pH 7,4 dan dapar borat pH 9,3. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali.

Jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi per luas area difusi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dihitung dengan rumus:

$$\boxed{= \frac{\cdot \Sigma \cdot}{\cdot}} \quad (3.2)$$

Keterangan:

- = Jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi per luas area difusi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
- = Konsentrasi glukosamin ($\mu\text{g}/\text{ml}$) pada *sampling* menit ke-n
- = Volume sel difusi Franz (12,7 ml)
- Σ = Jumlah konsentrasi glukosamin ($\mu\text{g}/\text{ml}$) pada *sampling* pertama (menit ke-10) hingga sebelum menit ke-n
- = Volume *sampling* (0,5 ml)
- = Luas area membran (1,89 cm^2)

Kemudian dilakukan perhitungan fluks obat (kecepatan penetrasi tiap satuan waktu)

$$\boxed{J = \frac{Q}{t}} \quad (3.3)$$

Keterangan:

- J = Fluks ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$)
- Q = Jumlah kumulatif glukosamin yang melalui membran ($\mu\text{g cm}^{-2}$)
- t = Waktu (jam)

Selanjutnya dibuat grafik jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi (μg) per luas area difusi (cm^2) terhadap waktu (jam) dan grafik fluks ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$) terhadap waktu (jam).

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

1.14. Pembuatan Gel Glukosamin

Basis yang digunakan untuk zat aktif glukosamin adalah basis gel dengan HPMC sebagai *gelling agent*. Pemilihan gel sebagai basis bagi glukosamin didasari atas pertimbangan bahwa glukosamin merupakan zat polar sehingga untuk memaksimalkan daya penetrasinya melewati kulit sebaiknya berada dalam sediaan yang berbasis air (Sinko, 2006). HPMC sebagai *gelling agent* dipilih karena mempunyai kompatibilitas yang baik dengan glukosamin, memberikan viskositas yang lebih baik pada konsentrasi rendah, dan stabilitas yang cukup baik.

Dalam sediaan ini digunakan bahan-bahan tambahan formulasi lain untuk mendapatkan hasil yang lebih baik. Logam dapat mengkatalisis terjadinya penurunan stabilitas gel. Untuk menghindari hal ini digunakan dinatrium EDTA sebagai *chelating agent*. Metil paraben dan propil paraben digunakan sebagai pengawet pada konsentrasi yang memberikan aktivitas antimikroba yang optimal. Basis gel memerlukan pengawet karena mengandung air dalam jumlah tinggi yang merupakan medium pertumbuhan mikroba. Pertumbuhan mikroba tersebut dapat merusak stabilitas gel (Rowe, Sheskey & Owen, 2006). Propilen glikol digunakan sebagai humektan dan juga sebagai kosolven untuk melarutkan metil paraben dan propil paraben. Pada formula 3 propilen glikol juga digunakan sebagai kosolven untuk melarutkan asam oleat. Untuk menutupi bau basis gel HPMC ini digunakan mentol. Selain itu mentol juga memberikan sensasi dingin ketika sediaan diaplikasikan pada kulit.

Pembentukan gel dari HPMC dilakukan dengan memanaskan aquades yang digunakan hingga tercapai suhu *gelling point*, yaitu $80^{\circ} - 90^{\circ}\text{C}$. Setelah itu HPMC didispersikan dalam aquades tersebut dan diaduk hingga dingin. Basis gel akan terbentuk seiring dengan pendinginan. Pengadukan dilakukan pada kecepatan rendah, yaitu 300 rpm, untuk meminimalisir terperangkapnya gelembung udara digunakan kecepatan pengadukan yang rendah. Glukosamin

HCl di larutkan terlebih dahulu dalam aquades dengan perbandingan 1 gram dalam 10 ml kemudian dicampurkan ke dalam basis gel. Penambahan senyawa peningkat penetrasi dilakukan pada langkah terakhir karena salah satu senyawa peningkat penetrasi, yaitu etanol bersifat mudah menguap sehingga dapat mengurangi kadarnya jika ditambahkan pada tahap awal pembuatan. Masing-masing senyawa peningkat penetrasi tersebut dicampurkan dalam propilen glikol lalu ditambahkan ke dalam basis gel dan dihomogenkan. Pada kenyataannya urea dan etanol dapat dilarutkan dalam aquades dan langsung dicampurkan ke dalam basis gel. Akan tetapi untuk memberikan perlakuan yang sama seperti pada asam oleat, maka urea dan etanol yang telah dilarutkan dalam aquades dicampurkan terlebih dahulu dengan propilen glikol kemudian dimasukkan ke dalam basis gel. Gel yang terbentuk disimpan dalam wadah tertutup rapat.

1.15. Evaluasi Sediaan Gel Glukosamin

Keempat formula dievaluasi segera setelah selesai dibuat. Hasil evaluasi pada minggu ke-0 ini akan digunakan sebagai perbandingan terhadap perubahan yang terjadi pada keempat formula tersebut setelah disimpan pada kondisi suhu yang berbeda-beda.

Hasil evaluasi sediaan pada minggu ke-0 meliputi:

1.15.1. Pengamatan Organoleptis

Sediaan kontrol, formula 1, dan formula 2 menghasilkan gel berwarna putih akibat banyaknya gelembung udara yang terperangkap dalam gel, berbau mentol, dan tidak terjadi sineresis. Sediaan formula 3 berupa gel berwarna putih susu, berbau khas asam oleat, dan tidak terjadi sineresis. Foto pengamatan organoleptis pada minggu ke-0 dapat dilihat pada gambar 4.1. Data pengamatan organoleptis keempat formula dapat dilihat pada tabel 4.1.

Pengamatan fisik terhadap sediaan kontrol, formula 1, dan formula 3 menunjukkan gel yang tidak bening atau transparan. Hal ini disebabkan oleh terperangkapnya gelembung udara dalam jumlah yang cukup banyak akibat pengadukan saat pembuatan. Formula 3 tidak terlihat adanya gelembung udara

karena tertutupi oleh warnanya yang putih. Warna putih pada formula 3 muncul karena adanya asam oleat yang merupakan fase minyak bercampur dengan basis gel yang merupakan fase air. Adanya asam oleat dalam formula 3 juga menjadikan formula tersebut mempunyai bau yang berbeda dari formula lainnya. Aroma mentol yang seharusnya muncul tertutupi oleh bau khas asam oleat. Pengamatan organoleptis yang dilakukan selanjutnya adalah mengamati terjadinya sineresis dan kejernihan yang dapat dilihat lebih lengkap pada tabel 4.1. Keempat formula tidak mengalami sineresis, artinya HPMC sebagai *gelling agent* mampu menahan penjerapan air, dan gel yang terbentuk tidak jernih.

1.15.2. Uji Konsistensi

Sediaan yang baik memiliki nilai *yield value* di antara 100 – 1000 dyne/cm² (Zats & Kushla, 1996). Semakin rendah nilai *yield value*, semakin mudah sediaan menyebar. Sebaliknya semakin tinggi nilai *yield value*, semakin sulit sediaan tersebar ketika diaplikasikan pada kulit.

Hasil evaluasi konsistensi sediaan kontrol menunjukkan angka kedalaman penetrasi sebesar $415 \frac{1}{10}$ mm dan *yield value* sebesar 2143,44 dyne/cm² yang menunjukkan bahwa sediaan kontrol tidak mudah tersebar. Formula 1 mempunyai angka kedalaman penetrasi sebesar $382 \frac{1}{10}$ mm dan *yield value* sebesar 2227,35 dyne/cm² yang menunjukkan bahwa sediaan ini tidak mudah tersebar. Untuk formula 2 diperoleh angka kedalaman penetrasi sebesar $368 \frac{1}{10}$ mm dan *yield value* sebesar 2309,01 dyne/cm², menunjukkan bahwa sediaan formula 2 tidak mudah tersebar. Formula 3 mempunyai angka kedalaman penetrasi sebesar $370 \frac{1}{10}$ mm dan *yield value* sebesar 2457,06 dyne/cm² yang menunjukkan bahwa sediaan ini tidak mudah tersebar. Tabel pemeriksaan konsistensi keempat formula dapat dilihat pada tabel 4.2. Contoh perhitungan *yield value* dapat dilihat pada lampiran 1.

Hasil evaluasi konsistensi keempat formula pada minggu ke-0 menunjukkan bahwa keempat formula tersebut tidak mudah menyebar di kulit

dengan nilai *yield value* berada di sekitar 2000 dyne/cm². Sediaan kontrol memiliki nilai *yield value* yang paling rendah di antara formula lainnya, artinya sediaan kontrol memiliki sifat yang lebih mudah tersebar dibandingkan dengan ketiga formula lain. Formula 3 memiliki nilai *yield value* yang paling tinggi sehingga dapat disimpulkan bahwa formula 3 paling tidak mudah tersebar.

1.15.3. Pengukuran pH

pH sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 secara berturut-turut adalah 4,30; 4,39; 4,54; dan 4,15.

pH sediaan kontrol, formula 1, dan formula 3 tidak masuk dalam rentang pH kulit, yaitu antara 4,5 – 6,5. Ketiganya mempunyai pH sedikit di bawah 4,5. Sedangkan formula 2 mempunyai pH yang masuk dalam rentang pH kulit, yaitu 4,54. Kondisi pH keempat formula tersebut yang rendah dipengaruhi oleh glukosamin HCl yang bersifat asam dengan nilai pH 4 dalam larutan. Adapun perbedaan nilai pH keempat formula dipengaruhi oleh penambahan senyawa peningkat penetrasi. Formula 2 yang mempunyai pH paling tinggi mengandung urea yang bersifat netral dengan pH 7,2 dalam larutan 10% urea (*The merck*, 2001). Akan tetapi larutan urea ini terhidrolisis menjadi amonia dan gas karbondioksida (Warner, 1941). Amonia inilah yang bersifat alkali dan menyebabkan kenaikan pH sediaan formula 2. Formula 3 dengan pH yang paling rendah di antara keempat sediaan tersebut mengandung asam oleat yang bersifat asam dengan pH 4,4 (Rowe, Sheskey & Owen, 2006).

1.15.4. Pengukuran Viskositas Gel

Hasil pengukuran viskositas sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 diukur pada kecepatan putaran 2 rpm secara berturut-turut adalah 150000; 10000; 120000; dan 160000 cps. Data hasil pengukuran viskositas dapat dilihat pada tabel 4.3 – 4.6 dan grafik rheologinya dapat dilihat pada gambar 4.2.

Berdasarkan grafik rheologinya dapat disimpulkan bahwa keempat sediaan mempunyai sifat aliran pseudoplastis, di mana viskositas keempat formula tersebut tidak mempunyai nilai yang absolut, dan bersifat nontiksotropik (Sinko,

2006; Harwood, Luber & Sunberry, 1996). Sifat rheologi keempat formula ini selain dipengaruhi oleh *gelling agent* HPMC juga dipengaruhi oleh adanya senyawa lain (Bhargava & Nicolai, 1996).

Penambahan senyawa peningkat penetrasi mempengaruhi viskositas masing-masing formula. Etanol pada formula 1 menurunkan viskositas gel karena terjadi pengenceran. Urea menurunkan viskositas gel formula 2 karena adanya amonia sebagai hasil degradasi yang mempunyai pH alkali, yaitu sekitar 11,6. Nilai pH alkali tersebut menyebabkan sedikit hidrolisis pada struktur HPMC (Bhargava & Nicolai, 1996). Akan tetapi sebaliknya, asam oleat meningkatkan viskositas gel formula 3 karena terbentuk globul-globul asam oleat dalam gel sehingga gel bersifat seperti emulsi. HPMC akan bertindak sebagai koloid protektif yang mencegah pengabungan globul-globul tersebut (Rowe, Sheskey & Owen, 2006).

1.16. Uji Stabilitas Fisik Sediaan Gel Glukosamin

Pengujian stabilitas fisik dilakukan pada tiga suhu penyimpanan yang berbeda, yaitu suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$), suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$), dan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$). Pengujian ini dimaksudkan untuk melihat stabilitas fisik keempat sediaan selama penyimpanan pada kondisi suhu yang berbeda. Pada kondisi penyimpanan suhu kamar sampel disimpan di Laboratorium Farmasetika Farmasi UI. Untuk penyimpanan suhu tinggi sampel disimpan di oven yang telah diatur suhunya. Sedangkan pada penyimpanan suhu rendah sampel disimpan dalam lemari pendingin yang telah diatur suhunya. Sampel disimpan selama 8 minggu di tiga kondisi penyimpanan yang berbeda ini dan dilakukan pengamatan setiap 2 minggu. Pengamatan yang dilakukan meliputi organoleptis, pH, dan viskositas.

Selain penyimpanan sampel di tiga kondisi suhu yang berbeda, sampel juga diuji *cycling test*. Pengamatan dilakukan setelah 6 siklus dan meliputi organoleptis, pH, dan viskositas.

4.3.1. Penyimpanan pada Suhu Kamar, Suhu Tinggi, dan Suhu Rendah

4.3.1.1. Pengamatan Organoleptis

Keempat formula stabil secara organoleptis pada penyimpanan suhu kamar dan suhu rendah. Sedangkan pada penyimpanan suhu tinggi terlihat bahwa keempat formula tidak stabil. Data hasil pengamatan organoleptis keempat formula pada penyimpanan suhu kamar, suhu tinggi, dan suhu rendah yang meliputi warna, bau, kejernihan, terjadinya sineresis dan adanya gelembung udara, dapat dilihat pada tabel 4.7 – 4.9. Foto hasil pengamatan organoleptis keempat formula selama 8 minggu pada masing-masing kondisi penyimpanan dapat dilihat pada gambar 4.3 – 4.5.

Organoleptis keempat formula pada penyimpanan suhu kamar dan suhu rendah tidak menunjukkan perubahan yang signifikan. Perubahan yang terlihat hanyalah warna sediaan kontrol, formula 1, dan formula 2 dari warna putih menjadi bening karena hilangnya gelembung udara yang terperangkap dalam gel. Selama penyimpanan 8 minggu di suhu kamar dan suhu rendah tidak terjadi sineresis pada keempat formula. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa keempat formula stabil secara organoleptis pada penyimpanan suhu kamar dan suhu rendah.

Ketiga formula gel glukosamin, yaitu sediaan kontrol, formula 1, dan formula 2, dalam penelitian ini menunjukkan kondisi yang tidak stabil secara organoleptis pada penyimpanan suhu tinggi karena terjadi perubahan warna yang signifikan. Seiring dengan lamanya waktu penyimpanan timbul warna kuning pada ketiga formula gel tersebut. Ketidakstabilan paling jelas terlihat pada formula 2. Gel formula 2 mulai menunjukkan warna kuning pada minggu ke-2 dan warna kuning tersebut semakin tinggi intensitasnya ketika diamati pada minggu ke-4, 6, dan 8. Sediaan kontrol menunjukkan warna kuning yang mulai terbentuk di minggu ke-4 dan intensitas warnanya tidak setinggi formula 2. Pengamatan warna sediaan kontrol di minggu ke-4, 6, dan 8 memperlihatkan intensitas warna kuning yang tidak terlalu bertambah. Formula 3 tidak menunjukkan adanya warna kuning. Dalam hal ini terdapat dua kemungkinan,

yaitu terbentuk warna kuning tetapi tertutupi oleh warna putih susu sediaan formula 3 atau memang tidak terbentuk warna kuning.

Warna kuning yang muncul pada sediaan gel glukosamin ini disebabkan oleh terdegradasinya glukosamin. Larutan glukosamin dalam air pada pH di bawah 8,0 akan terdegradasi menjadi senyawa furfural (Chi-Kuen, 1998). Senyawa furfural ini berwarna kuning dan berubah warna menjadi coklat jika terekspos udara dan cahaya (*The merck*, 2001). Pada formula 2 adanya amonia yang berasal dari degradasi urea mempercepat reaksi degradasi glukosamin (Chi-Kuen, 1998) sehingga warna kuning yang muncul intensitasnya lebih kuat dibandingkan dengan formula lainnya.

Selain perubahan warna, sediaan kontrol dan formula 1 yang disimpan pada suhu tinggi mempunyai bau mentol yang semakin menghilang. Hal ini terjadi karena mentol tersublimasi pada suhu di atas 25⁰C (Rowe, Sheskey & Owen, 2006).

Meskipun terjadi perubahan warna yang drastis dan bau mentol semakin menghilang, namun dapat diamati bahwa pada suhu tinggi ini keempat gel tidak mengalami sineresis yang menunjukkan bahwa HPMC sebagai *gelling agent* mampu menahan penjerapan air dalam sediaan. Dari hasil pengamatan organoleptis selama penyimpanan pada suhu tinggi dapat disimpulkan bahwa gel glukosamin tidak stabil jika disimpan pada suhu tinggi.

4.3.1.2. Pengukuran pH

Pengukuran pH selama 8 minggu pada penyimpanan suhu rendah menunjukkan hasil yang cukup stabil. Akan tetapi pada penyimpanan suhu kamar dan suhu tinggi pH keempat formula menunjukkan nilai yang berubah secara signifikan. Data hasil pengukuran pH selama 8 minggu pada masing-masing kondisi penyimpanan dapat dilihat pada tabel 4.10 – 4.12. Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH pada ketiga kondisi penyimpanan dapat dilihat pada gambar 4.6 – 4.8.

Glukosamin mempunyai stabilitas yang paling baik pada pH 5,0 (Kanwischer et al., 2005). Pada evaluasi awal keempat formula sediaan gel

glukosamin ini tidak memberikan kondisi pH yang baik untuk glukosamin. Oleh karena itu pengamatan pH selama penyimpanan di tiga kondisi suhu yang berbeda memperlihatkan pH yang tidak tetap.

Setelah penyimpanan selama 8 minggu dengan kondisi suhu kamar, pH sediaan kontrol, formula 1, dan formula 3 cenderung turun menjadi semakin asam. Akan tetapi formula 2 sebaliknya menjadi lebih alkali. Hal tersebut disebabkan oleh terurainya urea menjadi amonia yang mempunyai sifat lebih alkali dari pada urea (*The merck*, 2001) sehingga pH formula 2 semakin tinggi selama penyimpanan.

Kenaikan temperatur mengakibatkan reaksi penguraian urea menjadi amonia semakin cepat dan amonia yang terbentuk semakin banyak sehingga pengaruh pH alkali amonia semakin nyata dalam gel formula 2 yang disimpan di suhu tinggi. Pada gambar 4.7 terlihat bahwa kenaikan pH formula 2 semakin tajam dan pada minggu pengamatan ke-8 pH formula 2 ini mencapai 6,54. Sama seperti pola yang ditunjukkan pada penyimpanan suhu kamar, sediaan kontrol, formula 1, dan formula 2 juga mengalami penurunan pH pada penyimpanan di suhu tinggi. Penurunan pH di ketiga formula ini tidak sedrastis seperti kenaikan pH pada formula 2 dan pada minggu ke-4 pH ketiga formula sudah cukup stabil. Akan tetapi pH menurun hingga nilai sekitar 3,50, yang artinya sediaan gel tersebut bersifat asam dan tidak baik untuk pemakaian topikal karena dapat menyebabkan iritasi kulit.

Hasil pengukuran pH keempat formula selama 8 minggu penyimpanan pada suhu rendah menunjukkan perubahan yang tidak terlalu besar untuk formula 2 dan formula 3. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa keempat formula gel glukosamin cukup stabil dalam penyimpanan suhu rendah.

4.3.1.3. Pengukuran Viskositas Gel

Setelah penyimpanan selama 8 minggu pada ketiga kondisi penyimpanan, keempat formula tidak menunjukkan viskositas yang stabil. Data hasil pengukuran viskositas dapat dilihat pada tabel 4.13 – 4.15. Grafik hubungan antara lama

penyimpanan dengan viskositas gel pada masing-masing kondisi penyimpanan dapat dilihat pada gambar 4.9 – 4.11.

Hasil evaluasi viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu kamar menunjukkan nilai yang terus menurun yang menunjukkan bahwa keempat formula tersebut semakin menjadi encer seiring dengan waktu penyimpanan yang lama. Penurunan viskositas gel ini terjadi karena temperatur suhu kamar yang cukup tinggi dan juga karena terjadi hidrolisis pada HPMC akibat pH rendah (Bhargava & Nicolai, 1996). Viskositas berbanding terbalik dengan temperatur (Sinko, 2006). Semakin tinggi temperatur, viskositas akan menurun dan sediaan menjadi encer. Penurunan viskositas keempat formula pada penyimpanan dapat dilihat pada gambar 4.10 dan tabel 4.14. Ketika temperatur menurun, viskositas akan naik dan sediaan menjadi lebih kental. Viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu rendah dapat dilihat pada gambar 4.11 dan tabel 4.15.

4.3.2. *Cycling Test*

Hasil pengamatan *cycling test* keempat formula, meliputi organoleptis, pH, dan viskositas dapat dilihat pada tabel 4.16. Foto hasil pengamatan organoleptis formula dapat dilihat pada gambar 4.12.

Cycling test dilakukan untuk mengetahui kemampuan *gelling agent* yang digunakan dalam menjaga penyerapan air dalam matriks (Zats & Kushla, 1996). Jika *gelling agent* kurang baik, akan terjadi sineresis atau terperasnya air keluar dari dalam matriks. Uji ini dilakukan dengan menyimpan masing-masing formula dalam suhu $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ selama 24 jam lalu dipindahkan ke penyimpanan suhu $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ dalam oven selama 24 jam. Perlakuan tersebut disebut 1 siklus dan untuk memperjelas perubahan yang terjadi masing-masing formula dikondisikan sebanyak 6 siklus. Keempat formula tidak mengalami sineresis setelah uji ini dilakukan yang menunjukkan bahwa *gelling agent* HPMC stabil dan mampu mempertahankan penyerapan air dalam matriks.

1.17. Uji Penetrasi Perkutane secara *In Vitro*

Penetapan kadar glukosamin dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair kerja tinggi (KCKT). Kolom yang digunakan adalah C-18 dengan fase gerak THF 0,25%-asetonitril (83:17). Detektor yang digunakan adalah detektor fluoresensi. Sebelum diinjeksi sampel glukosamin diderivatisasi terlebih dahulu (derivatisasi prakolom) dengan pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptotanol (OPA/2-ME) dan dibiarkan bereaksi selama 2 menit agar didapatkan derivat yang maksimum. Derivatisasi ini dilakukan untuk mendapatkan derivat glukosamin yang dapat berfluoresensi. Gambar reaksi derivatisasi glukosamin dengan pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptotanol dapat dilihat ada gambar 4.19

Pengukuran luas puncak derivat glukosamin dilakukan pada panjang gelombang eksitasi maksimum 336 nm dan panjang gelombang emisi maksimum 451 nm. Nilai kedua panjang gelombang tersebut sedikit bergeser dari data yang dicantumkan pada literatur, yaitu 335 dan 445 nm (Purwadi, 2007). Pergeseran tersebut dapat dipengaruhi oleh perbedaan spektrofotometer yang digunakan, maupun bahan-bahan lainnya seperti pereaksi dan fase gerak yang digunakan.

Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai komposisi yang berbeda dengan literatur acuan. Perbedaan komposisi ini didasari atas perbedaan sampel. Literatur acuan memeriksa glukosamin dalam plasma, maka dari itu waktu retensi glukosamin berada di 12,2 menit agar tidak terganggu dengan komponen plasma. Akan tetapi peneliti memeriksa glukosamin dalam larutan dapar fosfat dan dalam sediaan gel saja sehingga waktu retensi glukosamin di 6,2 menit tidak terganggu oleh komponen apapun. Dengan demikian perubahan komposisi fase gerak ini akan menghemat waktu dan bahan-bahan yang digunakan sehingga penelitian akan lebih efisien.

Analisis dilakukan terhadap glukosamin dalam bentuk base, bukan dalam bentuk garam HCl. Oleh karena itu glukosamin HCl yang digunakan harus diubah terlebih dahulu menjadi glukosamin base dengan menyesuaikan pH larutan menggunakan dapar borat pH 9,3. pKa glukosamin HCl pada suhu 37⁰C adalah 6,91 (Lockwood, 2007).

1.17.1. Pengukuran Panjang Gelombang Eksitasi dan Emisi Maksimum Glukosamin dengan Pereaksi OPA/2-ME

Glukosamin setelah diderivatisasi dengan pereaksi OPA/2-ME memberikan panjang gelombang eksitasi maksimum pada 336 nm dan panjang gelombang emisi maksimum pada 451 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang eksitasi dan emisi maksimum dapat dilihat pada gambar 4.13.

1.17.2. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Metanol dan Dapar Borat pH 9,3

Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada tabel 4.17 dan grafiknya dapat dilihat pada gambar 4.14. Persamaan regresi yang diperoleh yaitu:

$$y = 100070,40 + 3976876x \text{ dengan } r = 0,998514$$

1.17.3. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Dapar Fosfat pH 7,4 dan Dapar Borat pH 9,3

Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada tabel 4.18 dan grafiknya dapat dilihat pada gambar 4.15. Persamaan regresi yang diperoleh yaitu:

$$y = 359645,6574 + 5472743,537x \text{ dengan } r = 0,99945$$

1.17.4. Uji Perolehan Kembali Kadar Glukosamin dalam Sediaan

Kadar perolehan kembali rata-rata glukosamin adalah 92,4453% untuk sediaan kontrol; 105,4161% untuk formula 1; 79,3613% untuk formula 2; dan 97,9428% untuk formula 3. Data uji perolehan kembali glukosamin dapat dilihat pada tabel 4.19. Contoh perhitungan perolehan kembali glukosamin dalam sediaan dapat dilihat pada lampiran 2.

Hasil perolehan kembali glukosamin dari dalam sediaan tidak memenuhi batas spesifikasi uji perolehan kembali yang dinyatakan dalam spesifikasi periksa, yaitu sebesar 95 – 105% (*United States*, 2007). Kadar glukosamin dalam sediaan kontrol berada sedikit di bawah batas 95% karena glukosamin berada dalam pH sediaan yang kurang stabil sehingga cepat terdegradasi dan dalam formula 2 jauh di bawah batas karena degradasi glukosamin berlangsung lebih cepat dengan

adanya amonia hasil degradasi urea. Adapun kadar glukosamin dalam formula 1 melebihi batas 105% diduga karena kesalahan dalam teknis pengerjaan. Hanya formula 3 saja yang memiliki kadar glukosamin yang masuk dalam batas spesifikasi.

1.17.5. Uji Penetrasi Glukosamin

Jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi melalui kulit tikus setelah 8 jam pada sediaan kontrol sebesar $679,50 \pm 17,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; formula 1 sebesar $1005,49 \pm 13,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; formula 2 sebesar $234,09 \pm 4,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; dan formula 3 sebesar $43,11 \pm 0,46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Persentase jumlah kumulatif yang terpenetrasi setelah 8 jam pada sediaan kontrol adalah $12,40 \pm 0,32\%$; formula 1 sebesar $16,52 \pm 0,23\%$, formula 2 sebesar $5,50 \pm 0,11\%$; dan formula 3 sebesar $0,72 \pm 0,01\%$. Fluks atau laju penetrasi glukosamin menembus membran kulit tikus setelah 8 jam sebesar $84,94 \pm 2,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ pada sediaan kontrol; $125,69 \pm 1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ pada formula 1; $29,26 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ pada formula 2; dan $5,39 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ pada formula 3. Jumlah kumulatif hasil uji penetrasi glukosamin dapat dilihat pada tabel 4.20 dan laju penetrasi glukosamin dapat dilihat pada tabel 4.21. Persentase jumlah kumulatif glukosamin dapat dilihat pada tabel 4.22. Profil jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dapat dilihat pada gambar 4.16. Laju penetrasi glukosamin pada masing-masing formula dapat dilihat pada gambar 4.17. Profil persentase jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dapat dilihat pada gambar 4.18. Contoh perhitungan jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dapat dilihat pada lampiran 3 dan 4. Contoh perhitungan fluks atau laju penetrasi dapat dilihat pada lampiran 5. Contoh perhitungan persentase jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dapat dilihat pada lampiran 6.

Untuk membandingkan pengaruh asam oleat, etanol, dan urea terhadap laju penetrasi glukosamin dilakukan uji penetrasi perkutan secara *in vitro* menggunakan sel difusi Franz.

Membran yang digunakan adalah kulit bagian abdomen tikus *Rattus norvegicus* yang telah dicukur bulunya. Kulit tikus mempunyai variabilitas yang berbeda dengan kulit manusia. Oleh karena itu sebaiknya digunakan kulit manusia

agar hasil yang didapatkan lebih baik. Akan tetapi kulit manusia sulit didapat dan penggunaannya harus memenuhi kode etik penelitian sehingga digunakan kulit tikus yang lebih mudah didapat dan permeabilitasnya mendekati permeabilitas kulit manusia. Koefisien permeabilitas terhadap air pada kulit manusia sebesar $92,97 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{jam}$. Sedangkan koefisien permeabilitas kulit tikus yang telah dicukur sebesar $103,08 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{jam}$ (Walters, 2002).

Kulit tikus yang akan digunakan dicukur terlebih dahulu untuk menghilangkan bulunya yang dapat mengganggu penetrasi glukosamin melewati membran (Walters, 2002). Pencukuran harus dilakukan dengan hati-hati agar tidak melukai atau merusak membran. Lapisan lemak subkutan tidak dihilangkan karena dalam penelitian ini ingin dilihat kemampuan glukosamin menembus lapisan kulit hingga mencapai pembuluh darah (Walters, 2002). Kulit digunakan dalam keadaan segar tanpa disimpan di lemari pendingin terlebih dahulu dan dihidrasi dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 yang merupakan cairan penerima di kompartemen reseptor selama 30 menit.

Setelah dihidrasi, kulit dipasang secara hati-hati dalam sel difusi Franz, dijepit dengan *o-ring* dan diusahakan agar tidak ada udara yang terperangkap di antara membran dengan cairan penerima. Udara yang terperangkap ini dapat menghambat penetrasi glukosamin karena menghalangi kontak antara membran dengan cairan penerima (Walters, 2002).

Sistem difusi ini diatur pada temperatur tubuh, yaitu $37^0 \pm 0,5^0 \text{ C}$, dengan mengalirkan air sebagai *water jacket* di sekeliling kompartemen reseptor. Gambar sel difusi Franz dapat dilihat pada gambar 17. Suhu harus tetap dijaga karena perubahan suhu dapat mengakibatkan perubahan laju difusi glukosamin menembus membran (Sinko, 2006). Kompartemen reseptor diaduk dengan pengaduk magnetik (*magnetic stirrer*) pada kecepatan 500 rpm untuk menjaga agar cairan kompartemen reseptor tetap homogen. Jika cairan kompartemen reseptor tidak homogen tidak akan tercapai *steady state* dan laju penetrasi yang didapatkan buruk. Pada literatur disebutkan bahwa kompartemen reseptor harus diaduk pada kecepatan 600 rpm (Tojo, 1987). Namun peneliti menemui kesulitan ketika memakai kecepatan 600 rpm, yaitu terbentuknya gelembung gas di antara

membran dengan cairan kompartemen reseptor. Oleh karena itu peneliti mengurangi kecepatan putaran pengaduk menjadi 500 rpm.

Sampel gel ditimbang sebanyak $\pm 1,0$ gram dan dimasukkan ke dalam kompartemen donor. Ketika memasukkan sampel gel ini diusahakan agar gel tidak menempel pada dinding kompartemen donor karena akan mengurangi jumlah gel yang diuji. Kompartemen donor merupakan suatu sistem terbuka yang langsung berhubungan dengan udara luar.

Sampling dilakukan pada 11 titik, yaitu menit ke-10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, dan 480 sebanyak 0,5 ml. Setiap kali sampel diambil harus cepat digantikan dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 yang baru untuk menjaga agar volume difusi tetap konstan. Masing-masing sampel tersebut diencerkan dalam labu ukur 5,0 ml dengan dapar borat pH 9,3. Jika puncak kromatogram glukosamin melebihi batas deteksi detektor fluoresensi dilakukan pengenceran lagi sebesar 10 kali dengan pelarut dapar borat pH 9,3.

Hasil penetrasi glukosamin dari sediaan formula 1 setelah 8 jam menunjukkan hasil yang paling banyak dengan jumlah kumulatif glukosamin per luas area difusi sebesar $1005,49 \pm 13,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Akan tetapi nilai ini menurun jika dibandingkan dengan jam ke-7 sebesar $1060,62 \pm 12,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Begitu juga dengan formula 2 yang memperlihatkan jumlah kumulatif maksimal pada jam ke-5 sebesar $502,64 \pm 18,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dan setelah itu jumlah kumulatifnya terus menurun hingga $234,09 \pm 4,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pada jam ke-8. Formula 3 juga memberikan jumlah kumulatif maksimal pada jam ke-5 sebesar $212,76 \pm 3,52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dan setelah itu menurun menjadi $43,11 \pm 0,46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pada jam ke-8. Hanya sediaan kontrol saja yang memperlihatkan jumlah kumulatif yang terus menaik pada akhir pengamatan pada jam ke-8 sebesar $679,50 \pm 17,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Penurunan jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi pada formula 1, 2, dan 3 dapat terjadi karena glukosamin yang berada dalam kompartemen reseptor sudah terdegradasi menjadi furfural. Senyawa furfural tidak memiliki gugus amin primer sehingga tidak terdeteksi dengan metode analisis kuantitatif yang digunakan. Pada metode analisis kuantitatif yang digunakan dalam penelitian ini, gugus amin dari glukosamin akan berikatan dengan pereaksi o-

ftalaldehid/2-merkapttoetanol (OPA/2-ME) menghasilkan senyawa yang dapat berfluorosensi (Purwadi, 2007; Lee & Drescher, 1979). Hilangnya gugus amin primer akibat degradasi glukosamin menjadi senyawa furfural menyebabkan hasil degradasi glukosamin ini tidak terdeteksi lagi dan akibatnya terjadi penurunan jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi. Gambar degradasi glukosamin menjadi senyawa furfural dapat dilihat pada gambar 4.20.

Secara keseluruhan sediaan gel glukosamin dalam penelitian ini memberikan laju penetrasi yang baik. Penelitian laju penetrasi glukosamin dari sediaan larutan oleh Kanwischer et al. (2005) menunjukkan hasil sebesar $13,27 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$. Formulasi glukosamin dalam sediaan gel kontrol meningkatkan laju penetrasi glukosamin sebesar 7 kali jika dibandingkan dengan glukosamin dalam bentuk larutan pada penelitian Kanwischer et al. (2005) dan penambahan senyawa peningkat penetrasi berupa etanol dan urea meningkatkan laju penetrasi glukosamin 2-3 kali laju penetrasi sediaan kontrol. Penambahan peningkat penetrasi yang bersifat lipofilik, yaitu asam oleat, justru menurunkan laju penetrasi glukosamin.

Formula 1 mengandung etanol sebanyak 5% sebagai senyawa peningkat penetrasi memberikan laju penetrasi yang paling tinggi. Laju penetrasi tertinggi dicapai pada saat menit ke-30 sebesar $260,24 \pm 2,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$. Laju penetrasi tertinggi tercapai secara cepat merupakan suatu keuntungan bagi sediaan gel ini karena dikhawatirkan sediaan topikal mudah tercuci sehingga penetrasi tidak berlangsung maksimal. Setelah mencapai nilai yang maksimal pada menit ke-30 ini laju penetrasi glukosamin terus menurun. Dalam penelitian ini etanol merupakan senyawa peningkat penetrasi yang baik untuk glukosamin. Glukosamin merupakan senyawa yang sangat hidrofilik sehingga sulit untuk menembus barier lipid *bilayer* stratum korneum (Kanwischer et al., 2005). Mekanisme kerja etanol sebagai peningkat penetrasi yang mengubah sifat melarutkan stratum korneum membuat glukosamin lebih banyak terlarut ke dalam stratum korneum sehingga penetrasinya meningkat. Selain itu etanol juga meningkatkan daya dorong glukosamin dari kompartemen donor karena cepat menguap sehingga meningkatkan gradien konsentrasi antara kompartemen donor dan kompartemen reseptor.

Senyawa peningkat penetrasi yang digunakan pada formula 2 adalah urea. Penggunaan urea sebagai peningkat penetrasi cukup efektif karena laju penetrasi glukosamin meningkat dengan fluks tertinggi tercapai pada menit ke-30 sebesar $180,56 \pm 3,24 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$. Mekanisme kerja urea dalam meningkatkan penetrasi glukosamin berbeda dengan etanol, yaitu dengan menghidrasi stratum korneum sehingga kandungan air dalam stratum korneum akan meningkat dan terbentuk *pool* air sebagai jalur polar menembus lapisan lipid *bilayer* stratum korneum. Seperti yang sudah disebutkan sebelumnya, glukosamin merupakan senyawa hidrofilik atau bersifat polar. Dengan adanya jalur polar tersebut glukosamin akan dengan mudah menembus lapisan lipid *bilayer* stratum korneum.

Penggunaan asam oleat sebagai senyawa peningkat penetrasi pada formula 3 tidak meningkatkan laju penetrasi glukosamin melewati stratum korneum. Sebaliknya adanya asam oleat sebagai fase minyak justru menurunkan penetrasi glukosamin jika dibandingkan dengan kontrol. Laju penetrasi tertinggi formula 3 hanya sebesar $46,94 \pm 1,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ pada menit ke-30. Asam oleat dapat meningkatkan penetrasi obat dengan cara mengganggu susunan lapisan lipid *bilayer* stratum korneum sehingga dapat meningkatkan penetrasi senyawa lipofilik maupun hidrofilik (Touitou & Barry, 2007). Akan tetapi pada penelitian ini adanya asam oleat menurunkan kelarutan glukosamin dalam stratum korneum sehingga efek peningkatan penetrasi tidak terjadi dan justru sebaliknya glukosamin dihambat penetrasinya.

Hal lain yang dapat diamati adalah hubungan antara viskositas dengan laju penetrasi. Pada penelitian ini terlihat bahwa formula 1 yang memiliki viskositas paling kecil memberikan laju penetrasi yang paling tinggi. Seiring dengan peningkatan viskositas pada formula 2, sediaan kontrol, dan formula 3, penetrasi glukosamin menjadi semakin kecil. Dapat dikaitkan bahwa laju penetrasi berbanding terbalik dengan nilai viskositas (Dragicevic-Curic et. al., 2009; Asasutjarit, Sirivat & Vayumhasuwan, 2005). Glukosamin terperangkap dalam struktur 3 dimensi gel. Oleh karena itu struktur 3 dimensi gel yang lebih longgar, ditandai dengan viskositas yang lebih rendah, menyebabkan molekul glukosamin lebih bebas bergerak sehingga penetrasi glukosamin menembus kulit lebih mudah (Dragicevic-Curic et. al., 2009).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

1.18. Kesimpulan

Berdasarkan uji penetrasi *in vitro* dengan sel difusi Franz menggunakan membran abdomen tikus *Rattus norvegicus* diperoleh hasil jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi setelah 8 jam dari formula 1 (etanol) sebesar $1005,49 \pm 13,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($16,52 \pm 0,23\%$) dengan laju penetrasi sebesar $125,69 \pm 1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$; formula 2 (urea) sebesar $234,09 \pm 4,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($5,50 \pm 0,11\%$) dengan laju penetrasi $29,26 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$; dan formula 3 (asam oleat) sebesar $212,76 \pm 3,52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($0,72 \pm 0,01\%$) dengan laju penetrasi $5,39 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$.

Berdasarkan hasil uji stabilitas fisik, keempat gel glukosamin stabil pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu pengamatan.

1.19. Saran

- a. Perlu ditambahkan dapar pada sediaan gel maupun pada cairan kompartemen reseptor uji penetrasi *in vitro* agar glukosamin berada dalam pH stabilitasnya.
- b. Perlu dilakukan uji penetrasi *in vitro* glukosamin dengan menggunakan membran kadaver manusia agar didapatkan hasil yang lebih mendekati uji *in vivo*.
- c. Perlu dilakukan uji stabilitas kimia glukosamin dan stabilitas mikrobiologi karena uji stabilitas fisik hanya merupakan uji pendahuluan saja.

DAFTAR ACUAN

- A-sasutjarit, R., Sirivat, A., & Vayumhasuwan P. (2005). Viscoelastic properties of carbopol 940 gels and their relationships to piroxicam diffusion coefficients in gel bases. *Pharm. Res.*, 22, 12, 2134-2140.
- Asshauer, J. & Ullner, H. (1986). Quantitative analysis in HPLC. In H. Engelhardt (Ed.). *Practice of high performance liquid chromatography: Applications, equipment, and quantitative analysis* (pp. 66-110). Berlin: Springer-Verlag.
- Barry, B. W. (1987). Mode of action of penetration enhancers in human skin. In James M. Anderson & Sung Wan Kim (Ed). *Advances in drug delivery systems*, 3 (pp. 85-97). Amsterdam: Elsevier.
- Barry, B. W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 14, 101-114.
- Bhargava, H. N. & Nicolai, D. W. (1996). In H. A. Lieberman, M. M. Rieger & G. S. Banker (Ed.). *Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems* (pp.286). (2nd ed.) Vol. 2. New York: Marcel Dekker.
- Brain, K. R., Walters, K. A., & Watkinson, A. C.. (2002). Methods for studying percutaneous absorption. In Kenneth A. Walters (Ed.). *Dermatological and transdermal formulations*. Marcel Dekker, New York.
- Chi-Kuen Shu. (1998). Degradation Products formed from glucosamine in water. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1129-1131.
- DA, Van Hal, et al. (1996). Structure of fully hydrated human stratum corneum: A freeze-fracture electron microscopy study. *J. Invest. Dermatol*, 106, 1, 89-95. Januari 12, 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8592088.html>
- Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for practicing scientists*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Dragicevic-Curic, N, et. al. (2009). Temoporfin-loaded liposomal gels: Viscoelastic properties and *in vitro* skin penetration. *Int. J. Pharm.*, 373, 77-84.
- Farmakope Indonesia* (Ed ke-4). (1995). Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Gandjar, I. G. & Rohman, A.. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

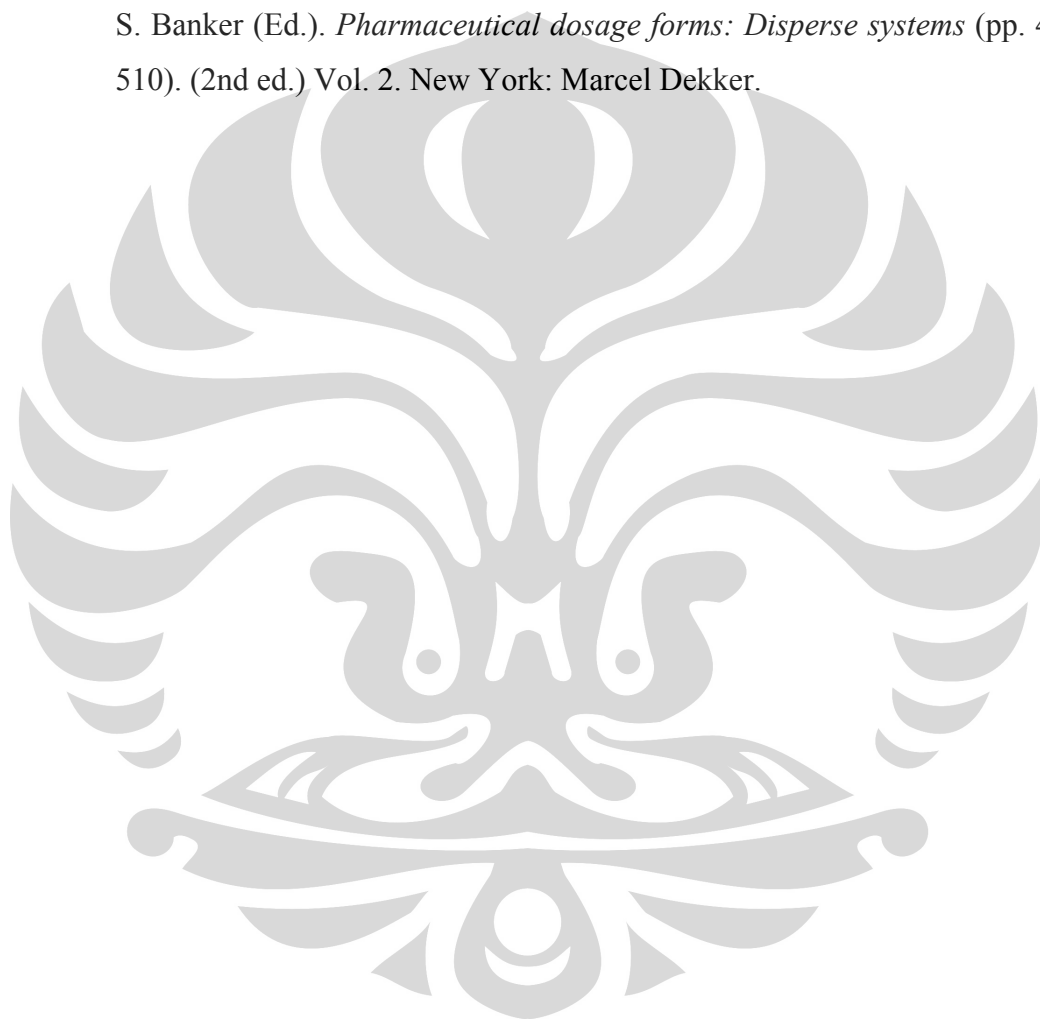
- Gouze, Jean-Noel, et al. (2001). Interleukin-1 β down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis: Influence of glucosamine on interleukin-1 β -mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum.*, 44, 2, 351-360.
- Hansen, K. E., & Elliot, M. E. (2005). Osteoarthritis. In Joseph T. DiPiro, et al. (Ed.). *Pharmacotherapy : A pathophysiologic approach* (6th ed.) (pp. 1685-1703). United States of America: McGraw-Hill.
- Harmita. (2006). *Analisis fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Harwood, R. J., Luber J. R. & Sunberry E. W. (1996). Antacids and clay products. In H. A. Lieberman, M. M. Rieger & G. S. Banker (Ed.). *Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems* (pp.214). (2nd ed.) Vol. 2. New York: Marcel Dekker.
- Hresko, R. C., et al. (1998). Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is caused by depletion of intracellular ATP. *J. Biol. Chem*, 273, 32, 20658-20668.
- ICH. (2003). *Guidance for industry: Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products*.
- Iswanda, R. (2009). *Penetapan daya penetrasi secara in vitro dan uji stabilitas fisik sediaan krim, salep, dan gel yang mengandung kurkumin dari kunyit (Curcuma longa L.)*. Skripsi Sarjana Farmasi. FMIPA UI, Depok.
- Jager, M. W. de, Ponec, M., & Bouwstra, J. A.. (2007). The lipid organization in stratum corneum and model systems based on ceramides. In Elka Touitou & Brian W. Barry (Ed.). *Enhancement in drug delivery*. CRC Press, United States of America.
- Kanwischer, M., et. al. (2005). Evaluation of the physicochemical stability and skin permeation of glucosamine sulfate. *Drug Dev. Ind. Pharm*, 1, 91-97.
- Kralovec, J. A. & Barrow, C. J.. (2008). Glucosamine production and health benefit. In Colin J. Barrow & Fereidoon Shahidi (Ed.). *Marine nutraceuticals and functional foods* (pp. 197-227). Boca Raton: CRC Press.
- Langley, L. L. (1980). *Dynamic anatomy and physiology*. United States of America: McGraw-Hill.

- Lockwood, B. (2007). *Nutraceuticals 2nd ed.* Pharmaceutical Press Cornwall: 19-20.
- Luciano, D. S. (1978). *Human function and structure.* United States of America: McGraw-Hill.
- Miljøministeriet. (n.d.) Skin penetration. Januari 21, 2010. http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2009/978-87-7052-980-8/html/kap06_eng.htm
- Mitsui, T. (Ed.). (1997). *New Cosmetic Science.* Elsevier, Amsterdam: 19-21.
- Mortada, I. (2009). *The effect of non-enteral routes on the bioavailability of drugs part 2.* Online posting 2009. Januari 21, 2010. <http://mortada8.maktoobblog.com/1536913/the-effect-of-non-enteral-routes-on-the-bioavailability-of-drugs-part-2/>
- Møllgaard, B. (1993). Synergistic effects in percutaneous enhancement. In Kenneth A. Walters & Jonathan Hadgraft (Ed.). *Pharmaceutical skin penetration enhancement* (pp. 231-235). New York: Marcel Dekker.
- Nur Aini. (2009). *Pemanfaatan lidah buaya (Aloe vera L) dan uji stabilitas fisik formula gel lidah buaya sebagai gel tabir surya.* Skripsi Sarjana Farmasi. Depok: FMIPA UI.
- Nuraini, N. (2008). *Perbandingan profil penetrasi aminofilin dari bentuk sediaan krim, gel, dan salep menggunakan sel difusi Franz dengan membran kulit tikus dan membran buatan.* Skripsi Sarjana Farmasi. FMIPA UI, Depok.
- Niazi, S. K. (2004). *Handbook of pharmaceutical manufacturing formulations: Semisolid products.* Vol. 4. United States Of America: CRC Press.
- Oegema, Theodore R., et al. (2002). Effect of oral glucosamine on cartilage and meniscus in normal and chymopapain-injected knees of young rabbits. *Arthritis Rheum.*, 46, 9, 2495-2503.
- Pavelká, K., et al. (2002). Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: A 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch Intern Med*, 162, 2113-2123.
- Pena, L. E. (1990). Gel dosage forms: Theory, formulation, and processing. In David W. Osborne & Anton H. Amann (Ed.). *Topical drug delivery formulations* (pp. 381-388). New York: Marcel Dekker.

- PermeGear franz cell.* (2005). Desember 22, 2009.
<http://www.permegear.com/franz.htm>
- Purwadi. (2007). *Pengembangan metode kromatografi cair kinerja tinggi untuk analisis glukosamin dalam plasma darah*. Tesis Magister Farmasi. Bandung: Sekolah Farmasi ITB.
- Richy, F., et al. (2003). Structural and symptomatic effect efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: A comprehensive meta-analysis. *Arch Intern Med*, 163, 1514-1522.
- Roberts, M. S., Cross, S. E., & Pellett, M. A.. (2002). Skin transport. In Kenneth A. Walters (Ed.). *Dermatological and transdermal formulations*. Marcel Dekker, New York.
- Roberts, M. S. & Anissimov, Y. G.. (2005). Mathematical models in percutaneous absorption. In Robert L. Bronaugh & Howard I. Maibach (Ed.). *Percutaneous absorption: Drugs-cosmetics-mechanisms-methodology* (4th ed) (pp. 1-5). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Rowe, R.C., Sheskey, P., & Owen, S.C. (Ed.). (2006) *Handbook of pharmaceutical excipients* (5th ed.). London: Pharmaceutical Press.
- Schleicher, E. D. & Weigert, C. (2000). Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.*, 58, 77, 13-18.
- Setnikar, I. & Rovatti, L.C. (2001). Absorption, distribution, metabolism, and excretion of glucosamine sulfate: A review. *Arzneimittelforschung.*, 51, 9, 699-725. Januari 5, 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/11642003.html>
- Shargel, L., Wu-Pong, S. & Wu, A. B. C. (2004). *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics* (5th ed).
- Sinko, P. J. (2006). *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences: Physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences* (5th ed.) United states of America: Lippincott Williams & Wilkins.
- Srivastava, P. (2006). Excipients for semisolid formulations. In Ashok Katdare & Mahesh V. Chaubal (Ed.). *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery systems* (pp. 204-208). New York: Informa Healthcare.

- Sukmawati, A. (2007). *Penetrasi perkutan kompleks inklusi meloksikam dengan β -siklodekstrin dalam sediaan gel*. Tesis Magister Farmasi. Bandung: Sekolah Farmasi ITB.
- Technical Resources International. (2002). Glucosamine. *Summary of data for chemical selection*. 12-16, 18.
- Tekko, I. A., Bonner, M. C. & Williams, A. C. (2006). An optimized reverse-phase high performance liquid chromatography method for evaluating percutaneous absorption of glucosamine hydrochloride. *J. Pharm. Biomed Anal.*, 41, 385-392.
- Thakker, K. D. & Chern, W. H. (Mei 2003). Development and validation of in vitro release tests for semisolid dosage forms – Case study. *Dissolution Technologies*, 10-15.
- The merck index* (13th ed). (2001). New Jersey: Merck.
- Thong, H.-Y., H. Zhai, & Maibach, H. I. (2007). Percutaneous penetration enhancers: An overview. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 20, 272-282.
- Tiralocche, G., et al. (2005). Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 52, 4, 1118-1128.
- Tojo, K. (1987). Design and calibration of in vitro permeation apparatus. In Yie W. Chien (Ed.). *Transdermal controlled systemic medications* (pp. 127-158). New York: Marcel Dekker.
- United states pharmacopoeia 30 – National formulary 25*. (2006). USA: the United States Pharmacopeial Convention.
- Walters, K. A., & Roberts, Michael S. (2002). The structure and function of skin. In Kenneth A. Walters (Ed.). *Dermatological and transdermal formulations*. New York: Marcel Dekker.
- Walters, K. A., & Brain, Keith R. (2002). Dermatological formulation and transdermal systems. In Kenneth A. Walters (Ed.). *Dermatological and transdermal formulations*. Marcel Dekker, New York.
- Warner, R. C. (1942). *The kinetics of the hydrolysis of urea and of arginine*. *J. Biol. Chem.*, 142, 705-723. Mei 15, 2010. www.jbc.org
- Wells, B. G., et al. (Ed.). (2009). *Pharmacotherapy handbook* (7th ed.). New York: McGraw-Hill.

- Wester, R. C. & Maibach, H. I. (1990). In vitro testing of topical pharmaceutical formulations. In David W. Osborne & Anton H. Amann (Ed.). *Topical drug delivery formulations* (pp. 213-220). New York: Marcel Dekker.
- Williams, A. C., & Barry, B. W. (2007). Chemical permeation enhancement. In Elka Touitou & Brian W. Barry (Ed.). *Enhancement in drug delivery* (pp 233-248). United States of America: CRC Press.
- Zats, J. L. & Kushla, G. P. (1996). Gels. In H. A. Lieberman, M. M. Rieger & G. S. Banker (Ed.). *Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems* (pp. 495-510). (2nd ed.) Vol. 2. New York: Marcel Dekker.







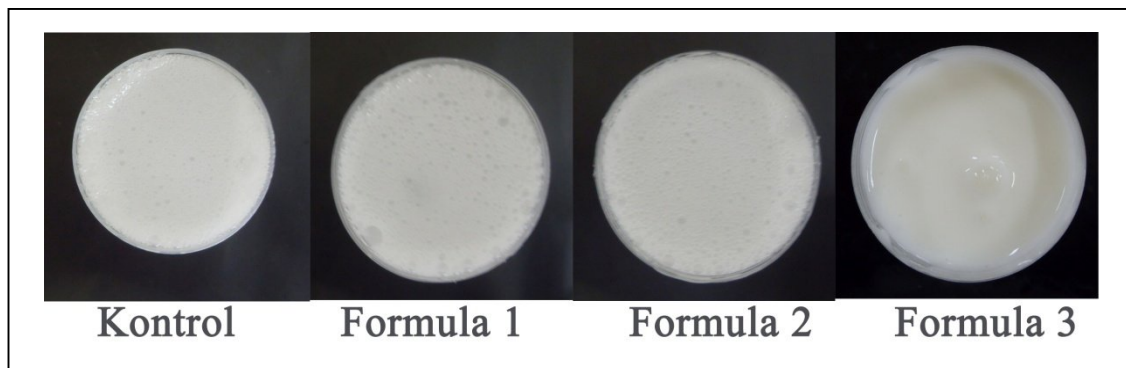
Gambar 3.1. Foto alat: (a) timbangan analitik, (b) oven, (c) viskometer Brookfield, (d) homogenizer, (e) pH meter, (f) penetrometer



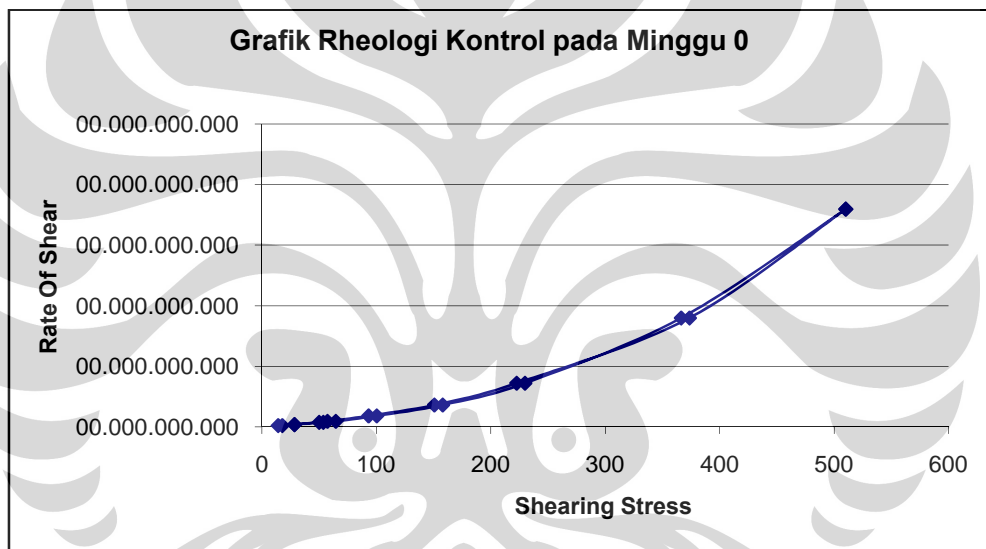
Gambar 3.2. Foto rangkaian alat KCKT



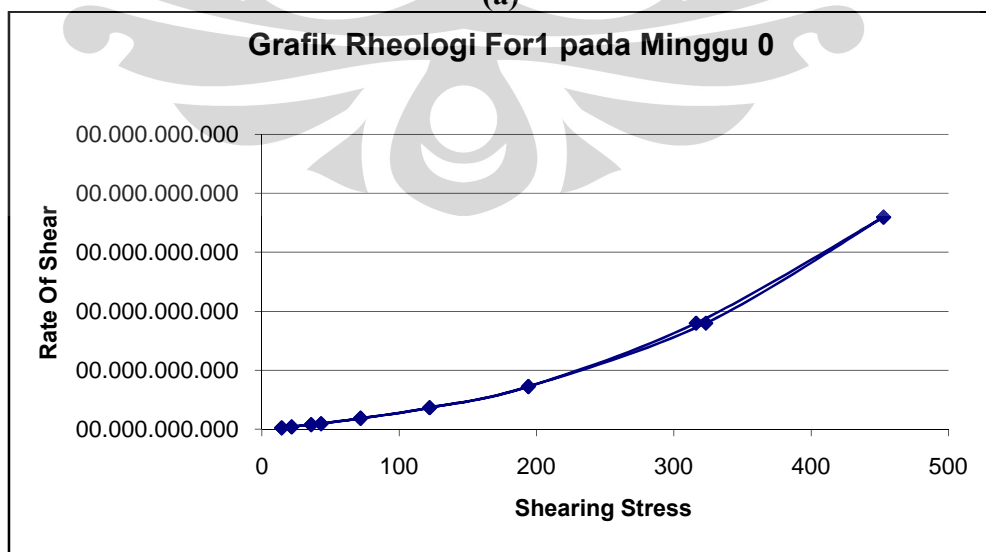
Gambar 3.3. Foto sel difusi Franz yang sedang beroperasi



Gambar 4.1. Foto hasil pengamatan organoleptis sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 pada minggu ke-0

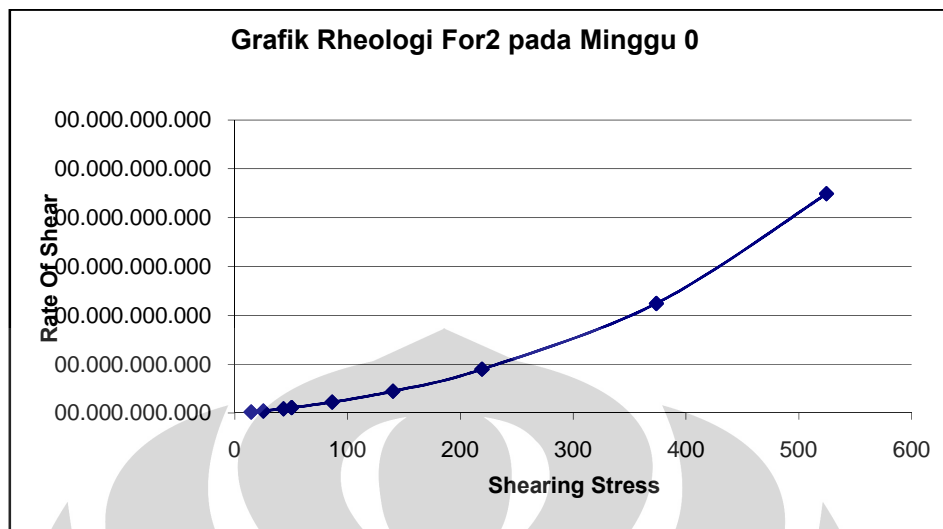


(a)

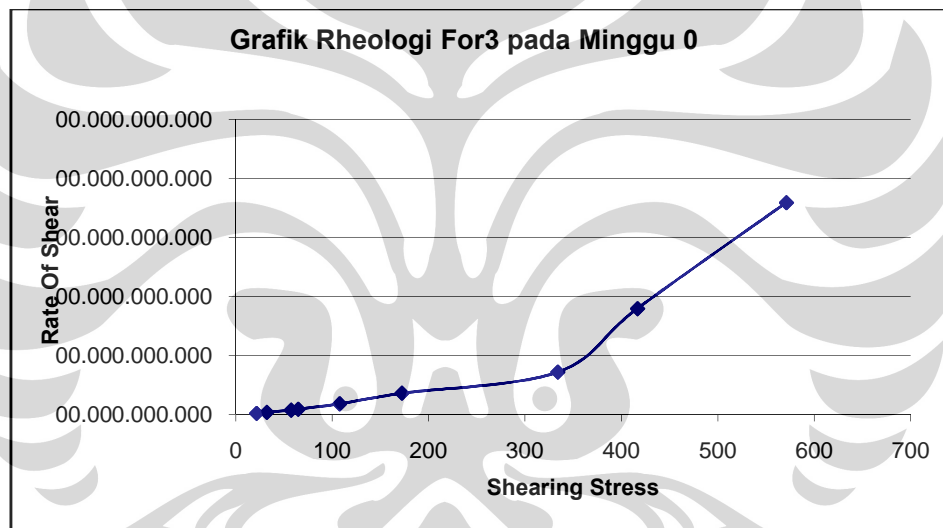


(b)

(lanjutan)

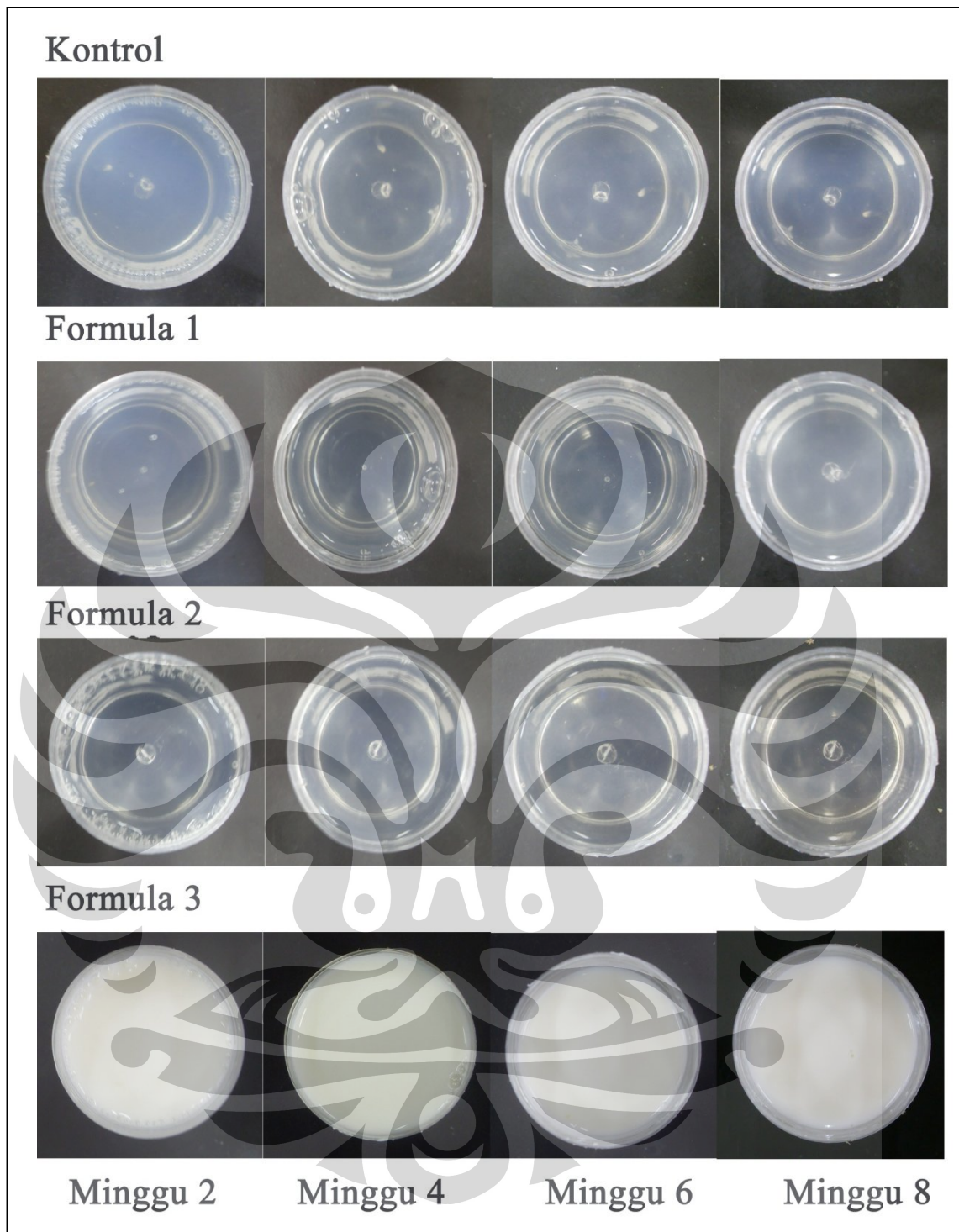


(c)

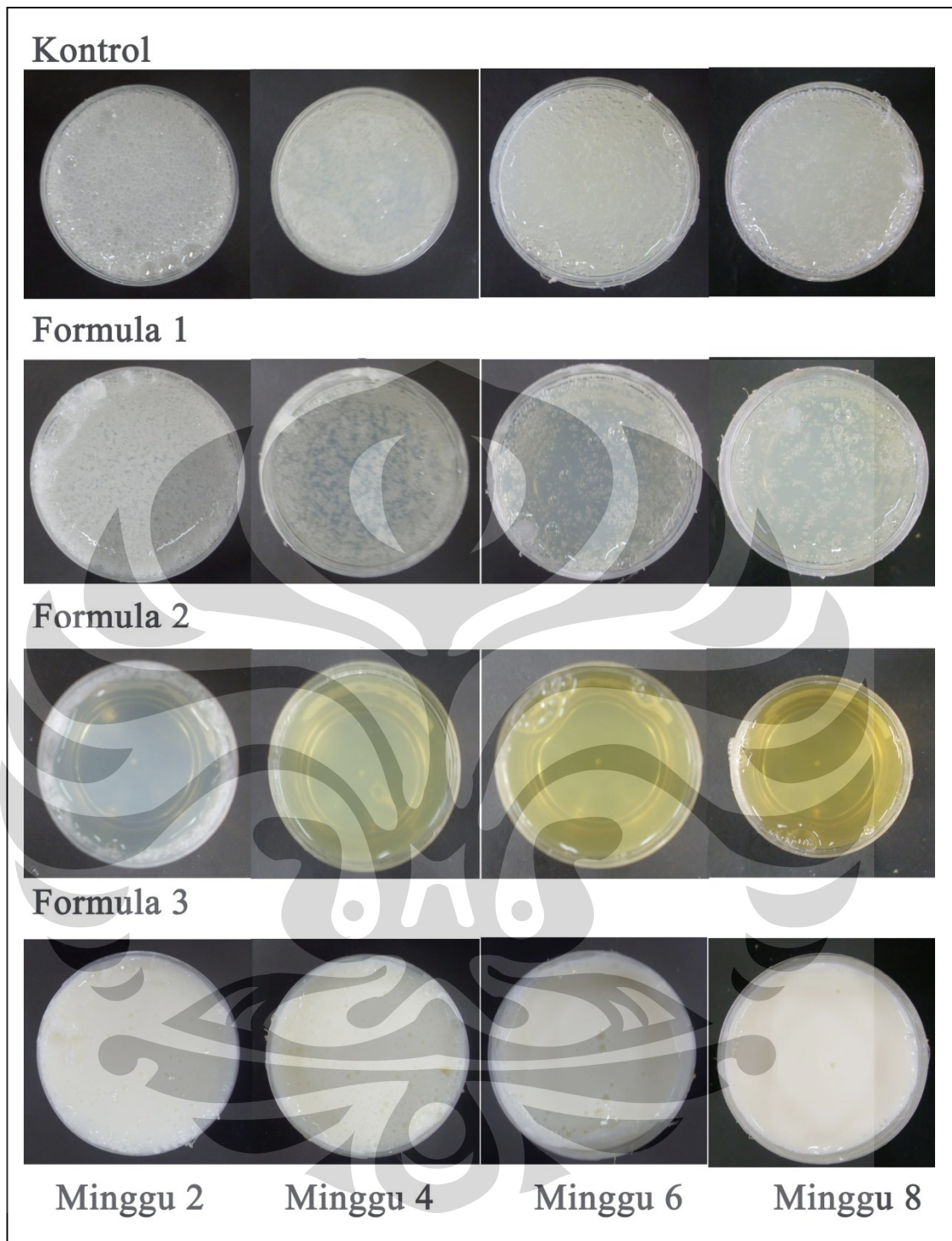


(d)

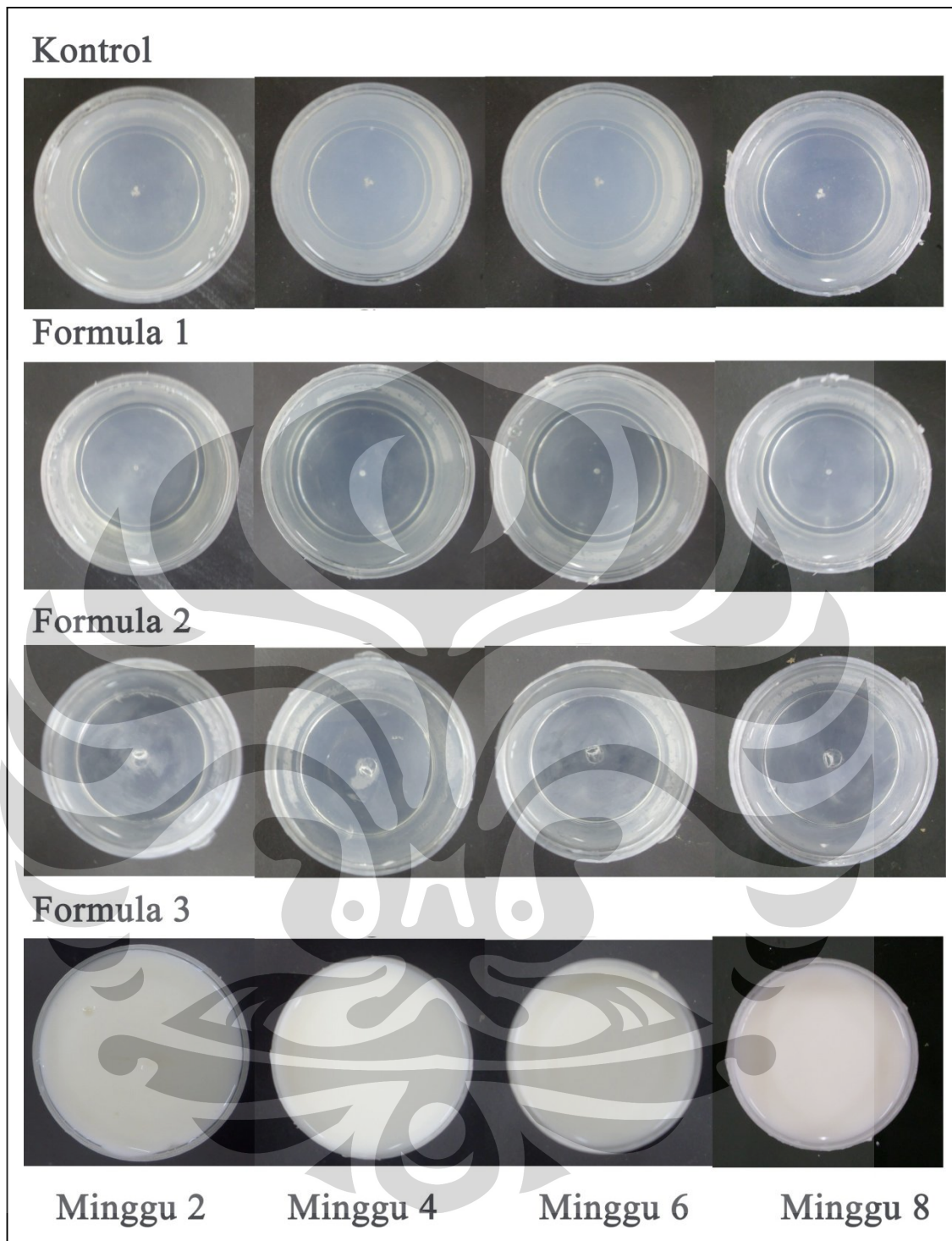
Gambar 4.2. Grafik rheologi masing-masing formula diuji pada minggu ke-0: (a) kontrol, (b) formula 1, (c) formula 2, (d) formula 3



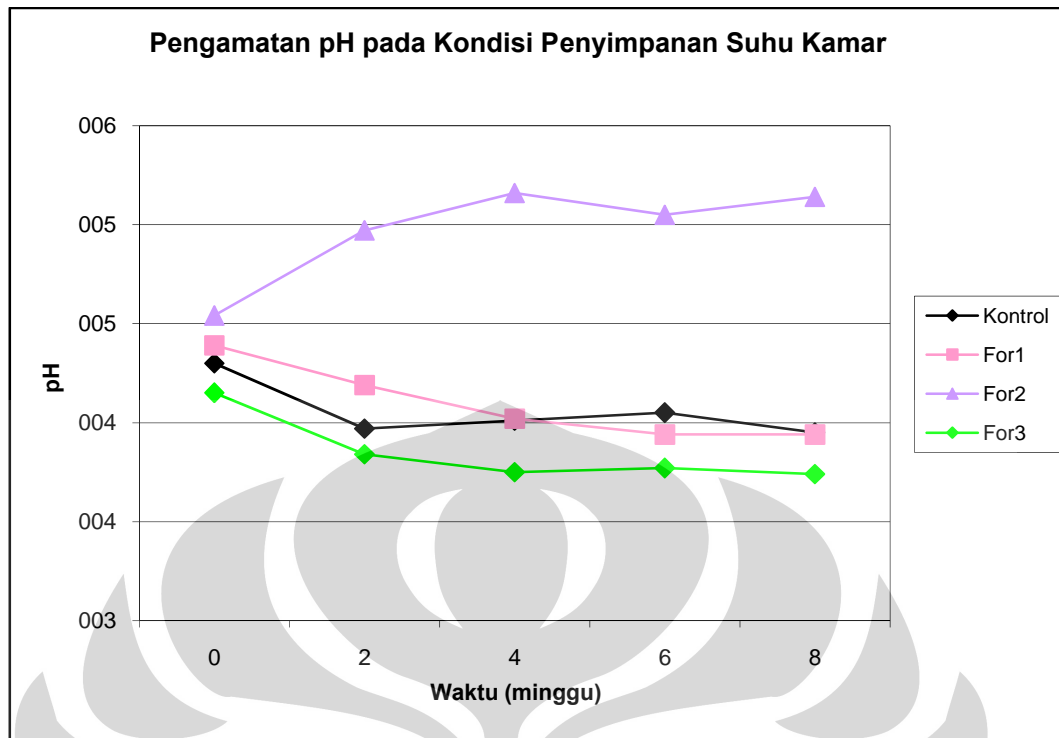
Gambar 4.3. Foto hasil pengamatan organoleptis sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu



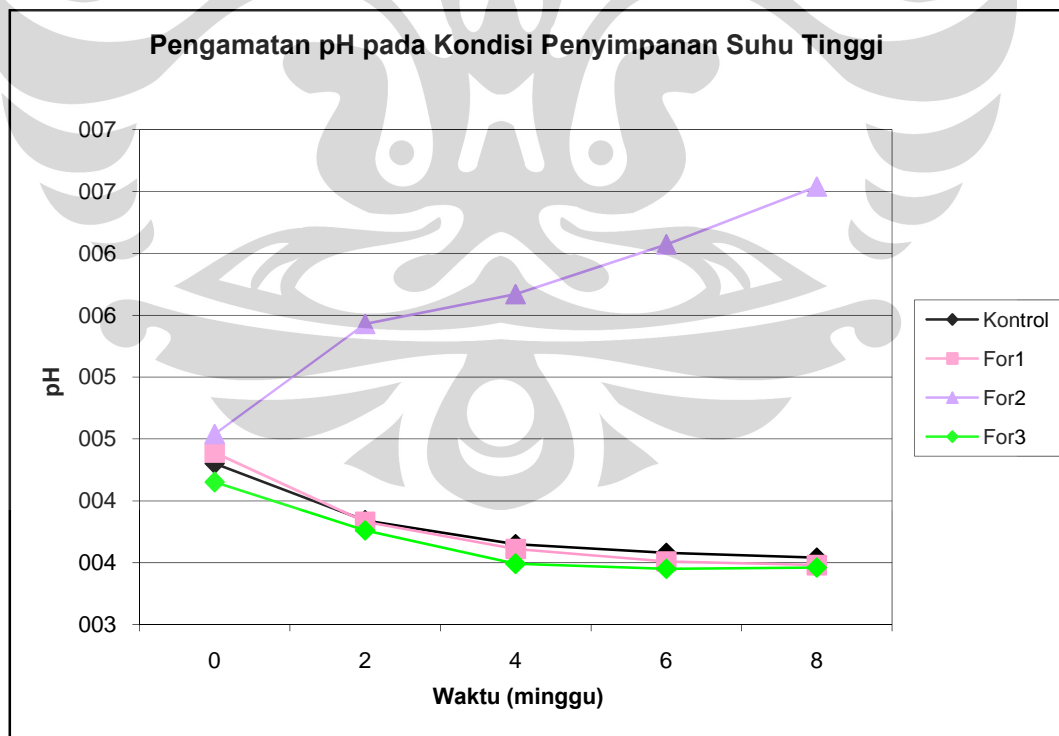
Gambar 4.4. Foto hasil pengamatan organoleptis sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu



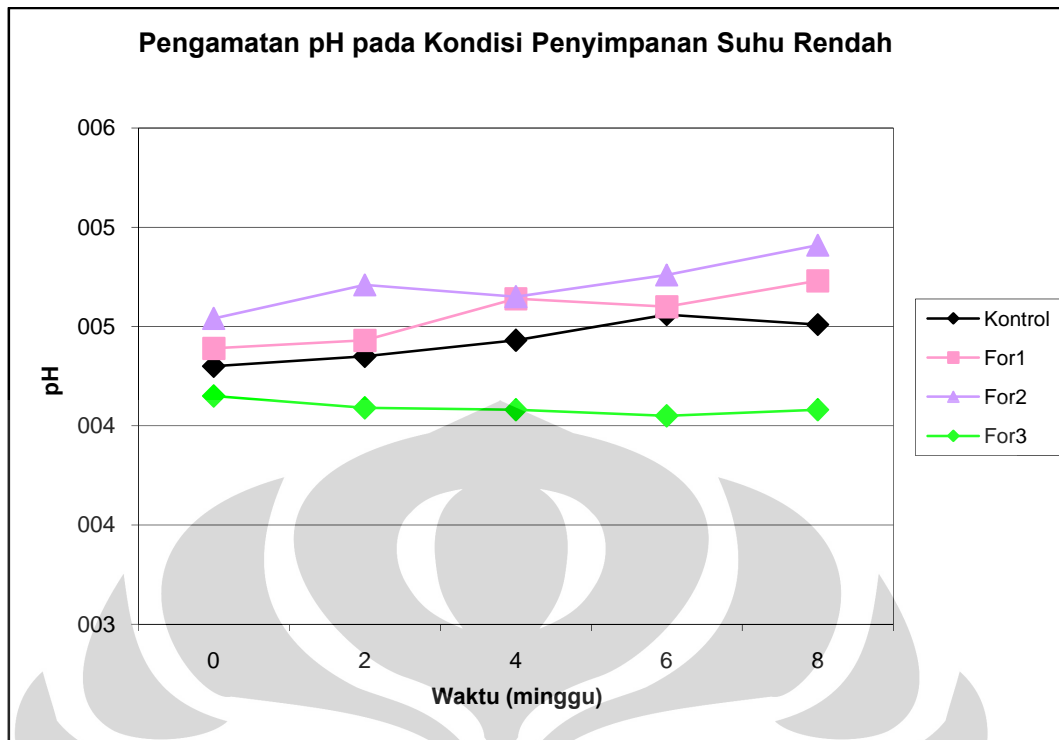
Gambar 4.5. Foto hasil pengamatan organoleptis sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu



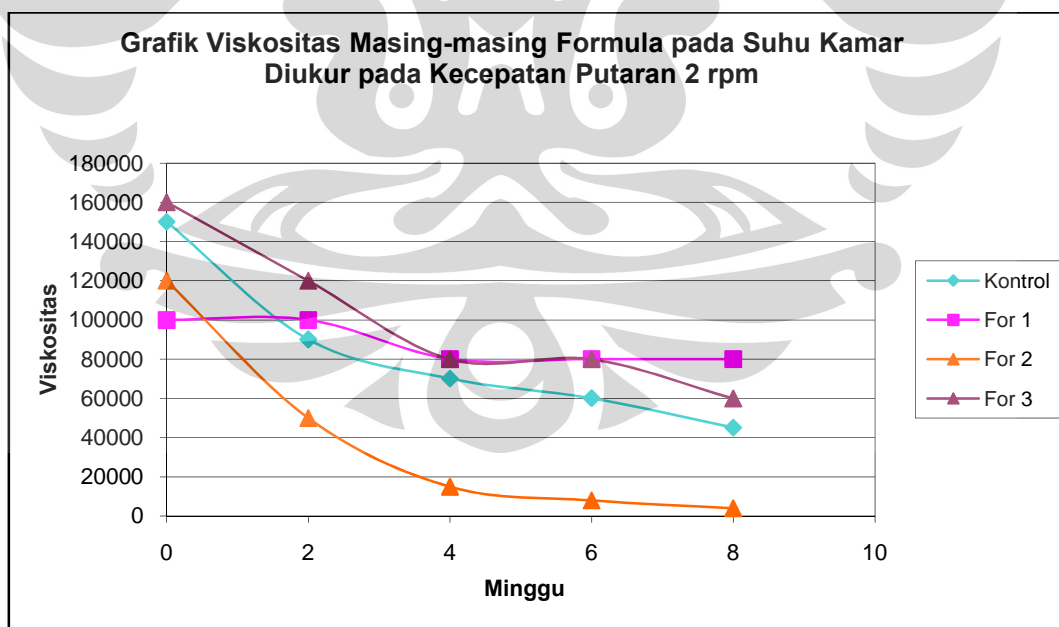
Gambar 4.6. Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH keempat formula pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu



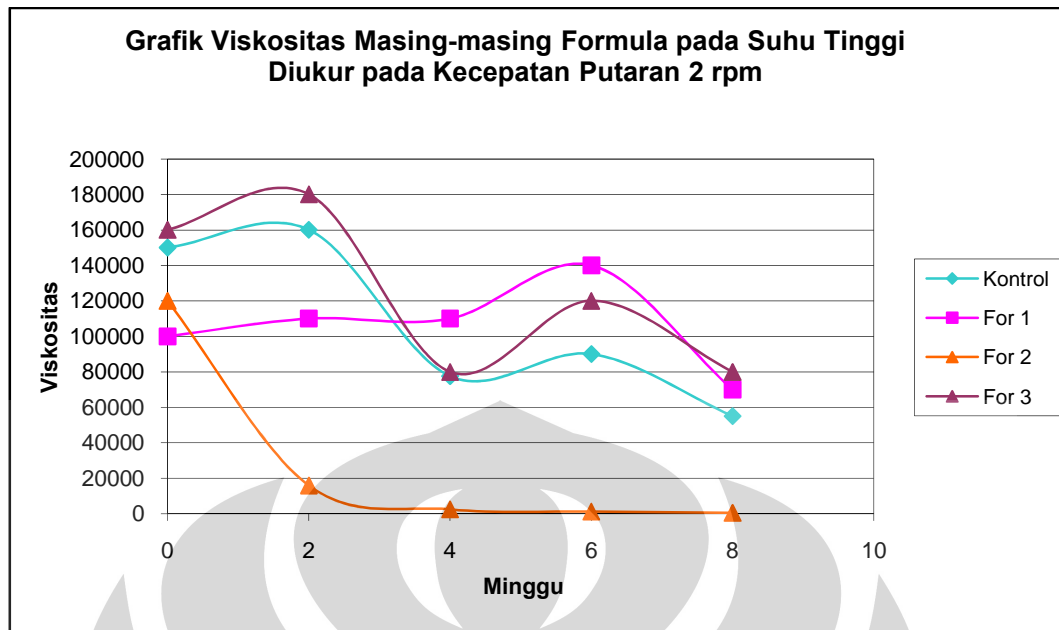
Gambar 4.7. Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH keempat formula pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu



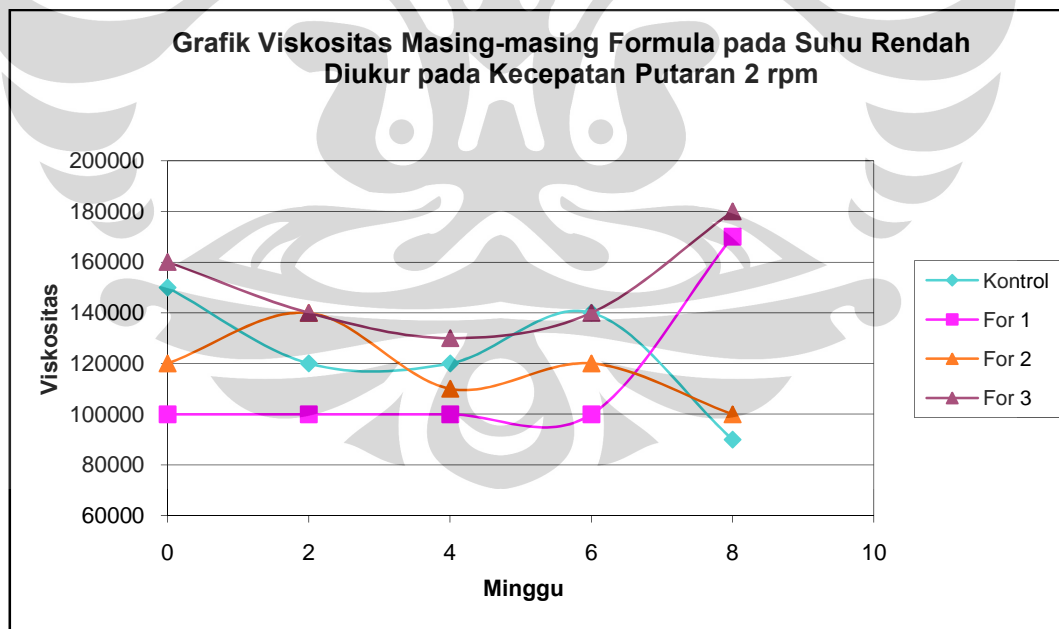
Gambar 4.8. Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH keempat formula pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu



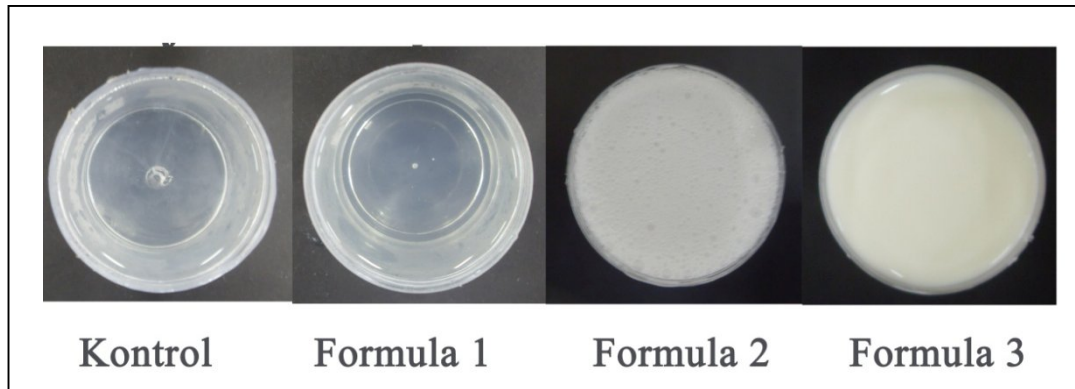
Gambar 4.9. Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu



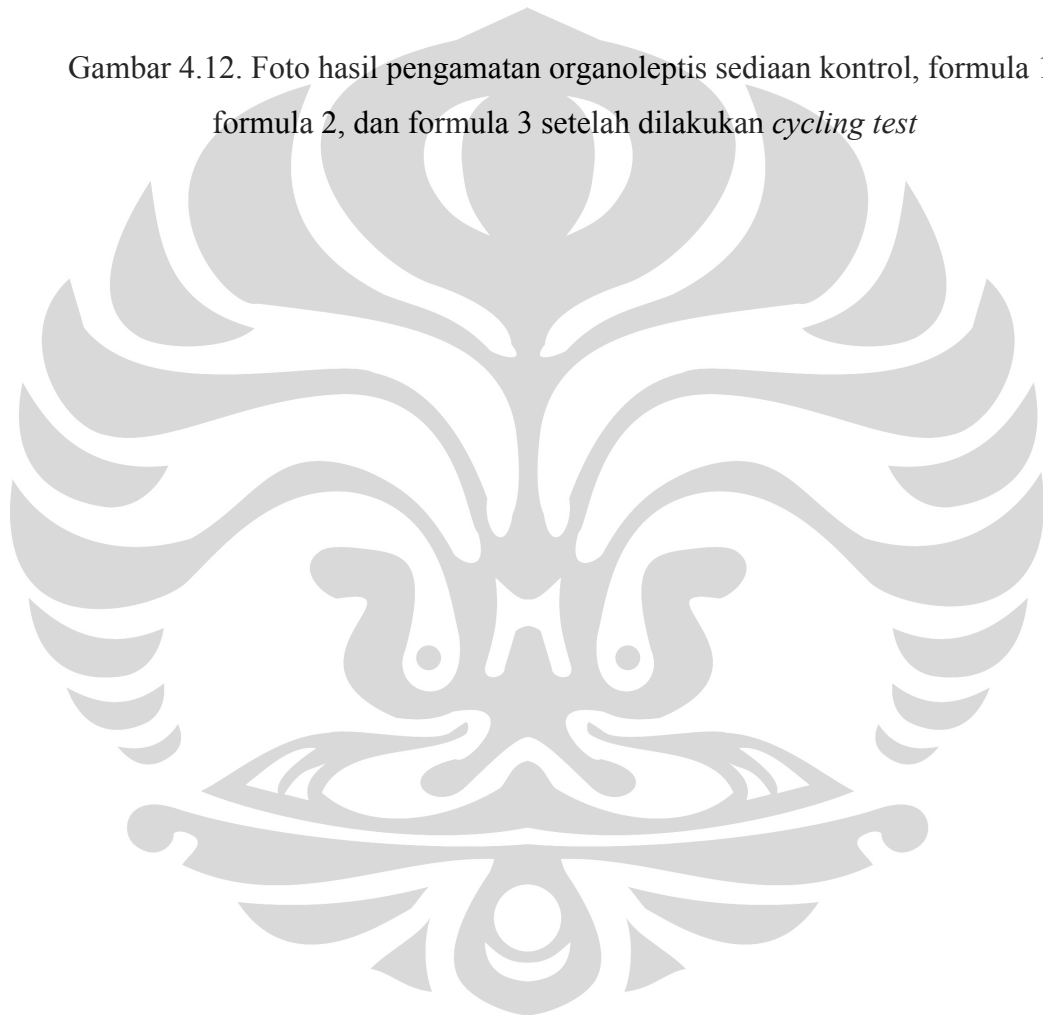
Gambar 4.10. Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu

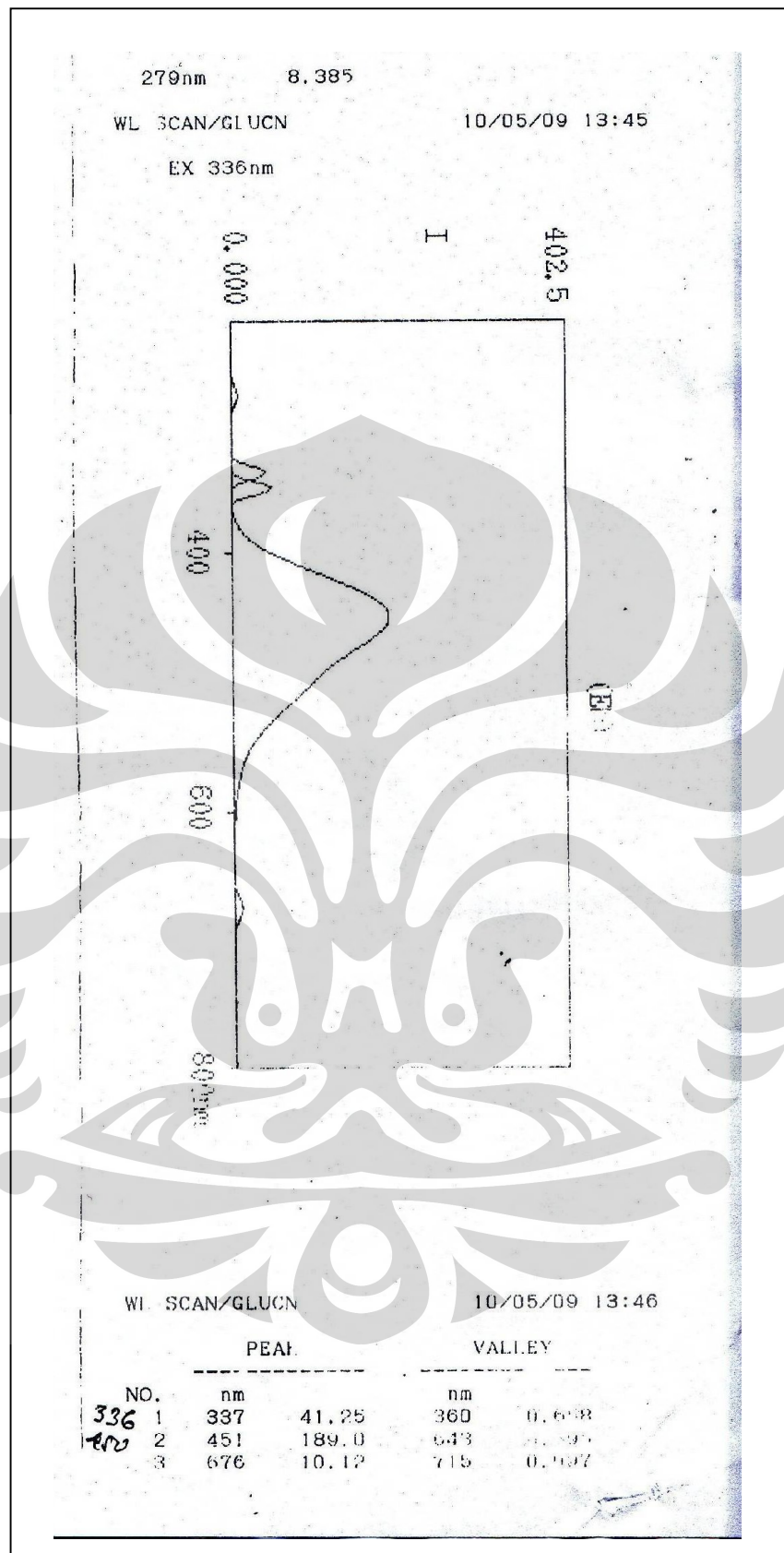


Gambar 4.11. Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu

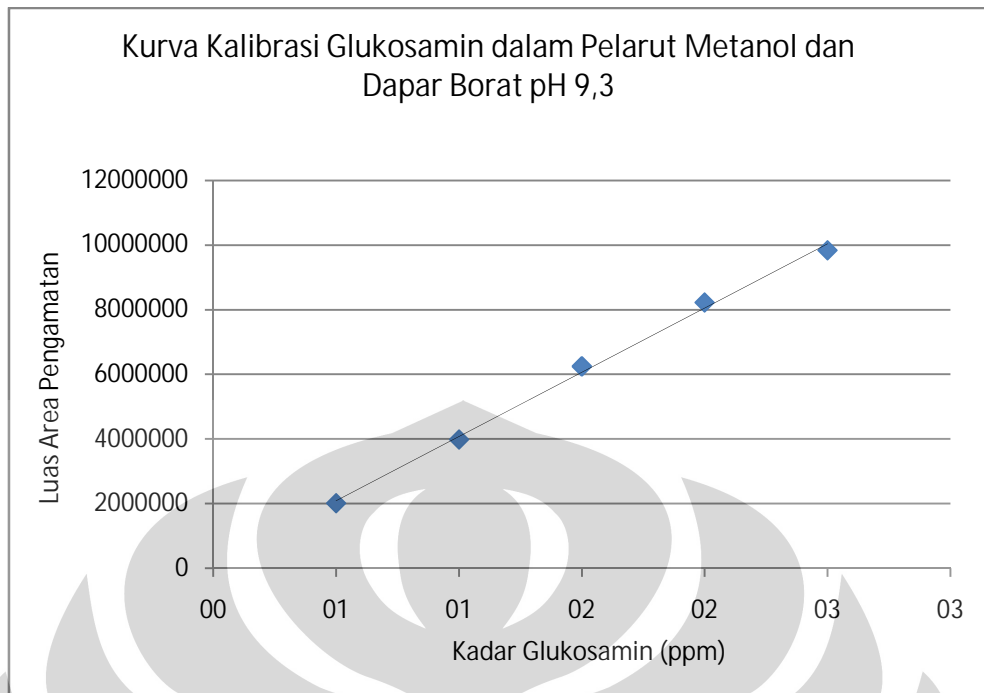


Gambar 4.12. Foto hasil pengamatan organoleptis sediaan kontrol, formula 1, formula 2, dan formula 3 setelah dilakukan *cycling test*



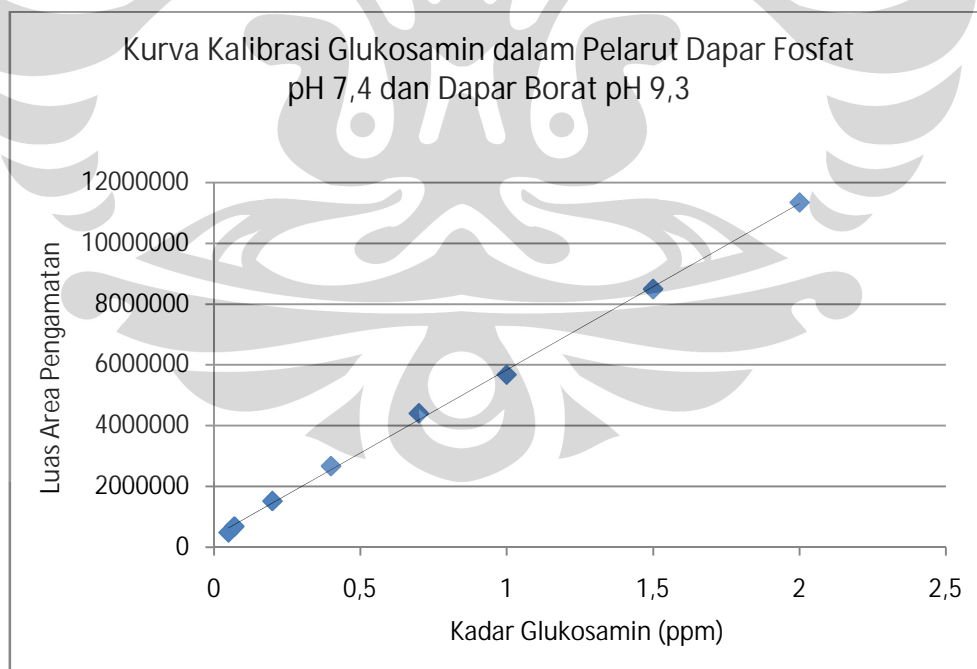


Gambar 4.13. Spektrum serapan glukosamin setelah diderivatisasi dengan pereaksi OPA/2-ME



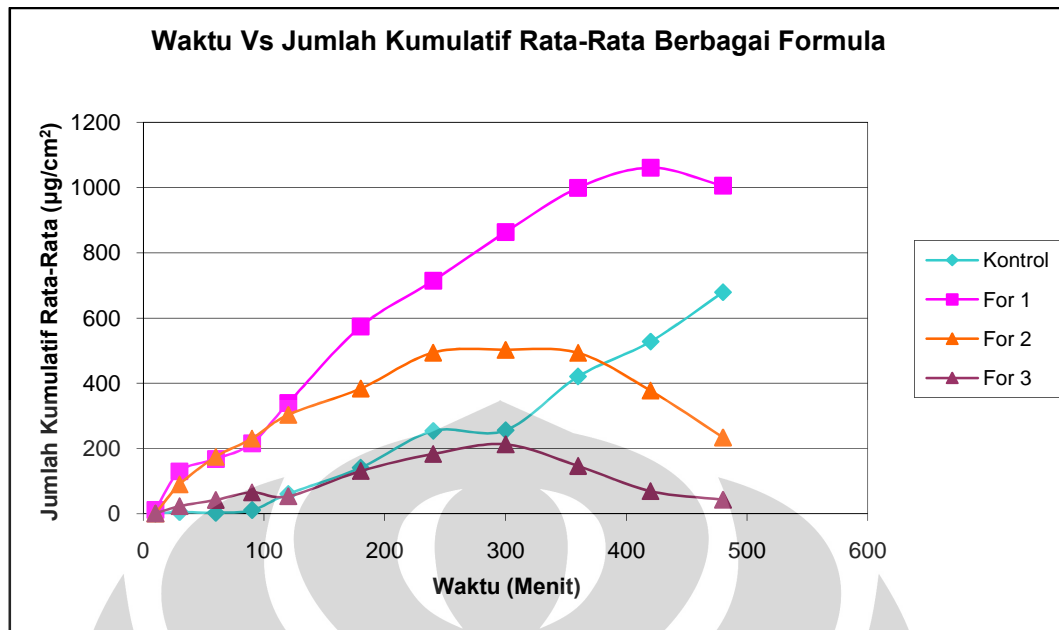
Gambar 4.14. Kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut metanol dan dapar borat pH 9,3

$$y = 100070,40 + 3976876x \text{ dengan } r = 0,998514$$

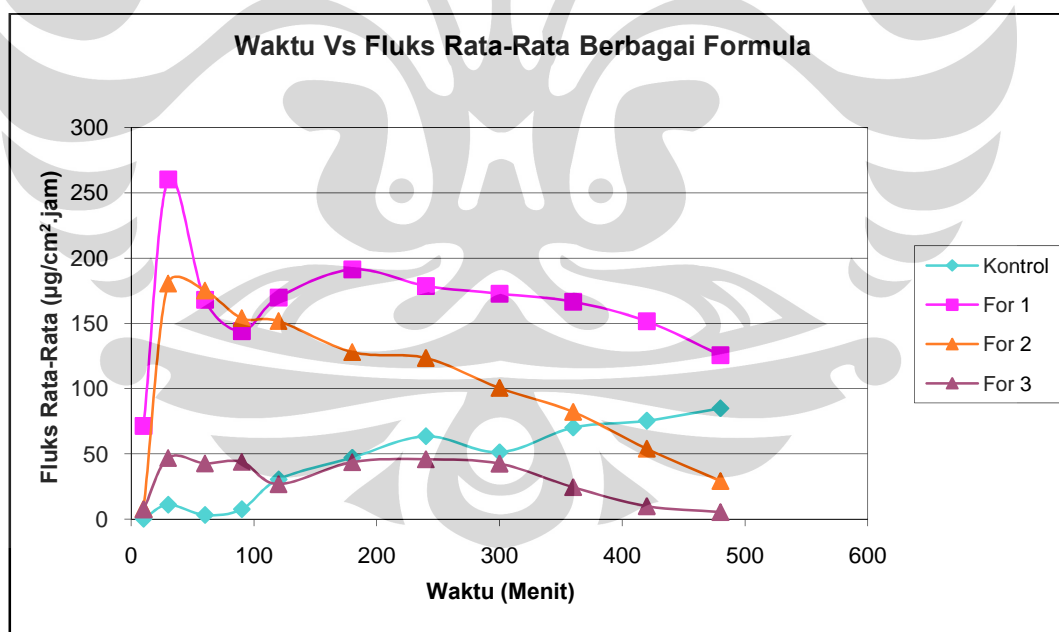


Gambar 4.15. Kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 dan dapar borat pH 9,3

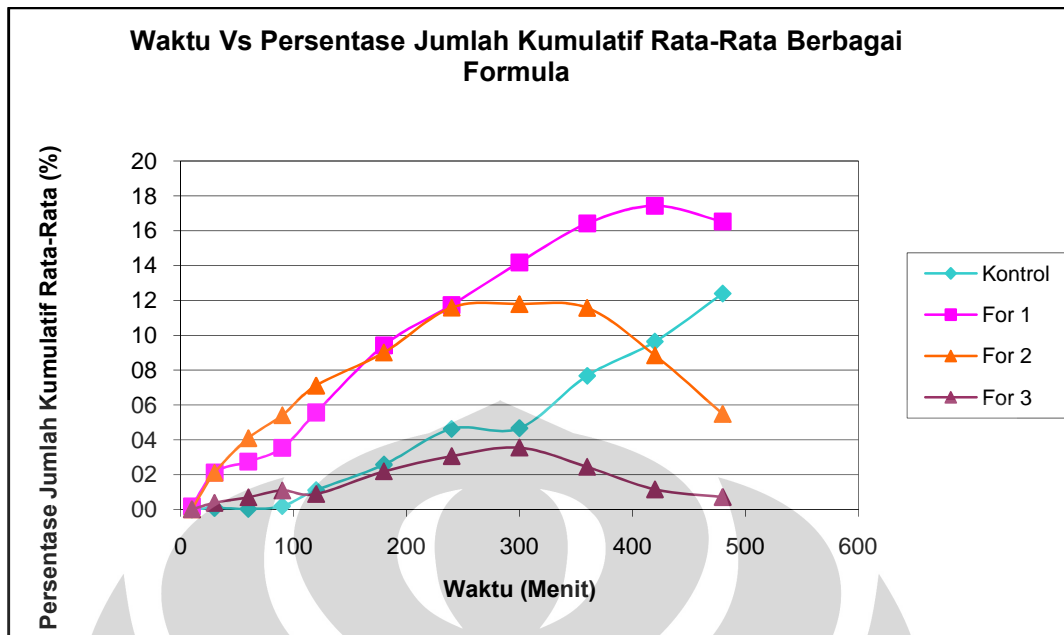
$$y = 359645,6574 + 5472743,537x \text{ dengan } r = 0,99945$$



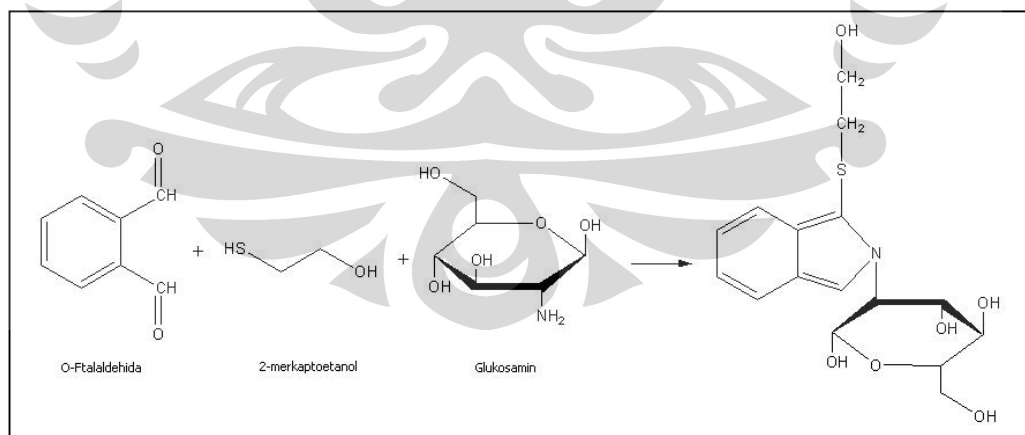
Gambar 4.16. Profil jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari masing-masing formula



Gambar 4.17. Profil laju penetrasi atau fluks glukosamin dari masing-masing formula

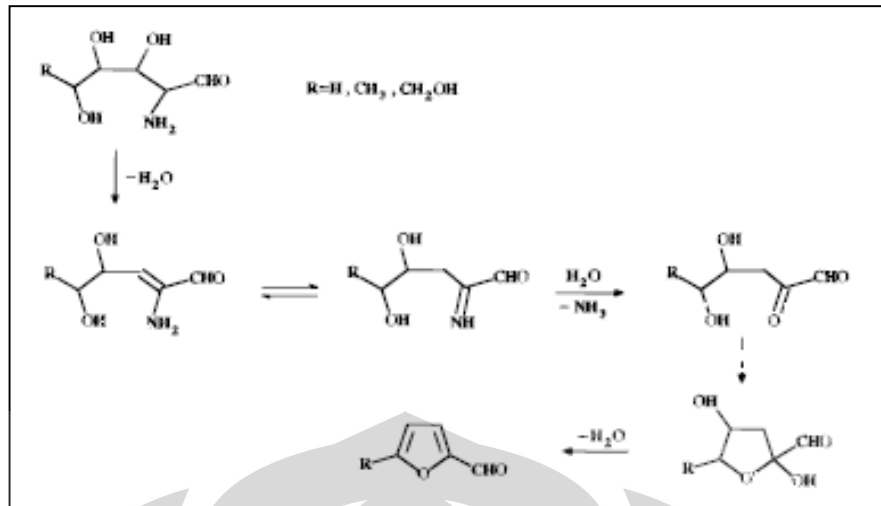


Gambar 4.18. Profil persentase jumlah kumulatif glukosamin dari masing-masing formula



[Sumber: Lee & Drescher, 1979]

Gambar 4.19. Reaksi pembentukan senyawa berfluorosensi antara glukosamin dengan pereaksi OPA/2-ME (telah diolah kembali)



[Sumber: Chi-Kuen Shu, 1998]

Gambar 4.20. Reaksi degradasi glukosamin menjadi senyawa furfural





Tabel 4.1. Hasil pengamatan organoleptis keempat formula pada minggu ke-0

Sediaan	Warna	Kejernihan	Bau	Sineresis	Gelembung udara
Kontrol	Putih	Tidak	Mentol	Tidak	Banyak terperangkap
Formula 1	Putih	Tidak	Mentol	Tidak	Banyak terperangkap
Formula 2	Putih	Tidak	Mentol	Tidak	Banyak terperangkap
Formula 3	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak teramati

Tabel 4.2. Hasil pemeriksaan konsistensi keempat formula pada minggu ke-0

Sediaan	Penetrasi (1/10 mm)	Yield value (dyne/cm²)
Kontrol	415	2143,4436
Formula 1	382	2227,3522
Formula 2	368	2309,0119
Formula 3	370	2457,0633

Tabel 4.3. Hasil pengukuran viskositas sediaan kontrol pada minggu ke-0

Spindel	Kecepatan Putaran (rpm)	Dial Reading (dr)	Faktor Koreksi (f)	Viskositas ($\eta = dr \cdot f$)	Shearing Stress ($F/A = dr \cdot 14.374$)	Rate of Shear ($dv/dr = F/A \cdot 1/\eta$)
7	0,5	1,00	160000	160000	14,374	0,0000898375
	1	2,00	80000	160000	28,748	0,0001796750
	2	3,75	40000	150000	53,903	0,0003593500
	2,5	4,50	32000	144000	64,683	0,0004491875
	5	7,00	16000	112000	100,618	0,0008983750
	10	11,00	8000	88000	158,114	0,0017967500
	20	16,00	4000	64000	229,984	0,0035935000
	50	25,50	1600	40800	366,537	0,0089837500
	100	35,50	800	28400	510,277	0,0179675000
	100	35,50	800	28400	510,277	0,0179675000
	50	26,00	1600	41600	373,724	0,0089837500
	20	15,50	4000	62000	222,797	0,0035935000
	10	10,50	8000	84000	150,927	0,0017967500
	5	6,50	16000	104000	93,431	0,0008983750
	2,5	4,00	32000	128000	57,496	0,0004491875
	2	3,50	40000	140000	50,309	0,0003593500
	1	2,00	80000	160000	28,748	0,0001796750
0,5	1,25	160000	200000	17,968	0,0000898375	

Tabel 4.4. Hasil pengukuran viskositas formula 1 pada minggu ke-0

Spindel	Kecepatan Putaran (rpm)	Dial Reading (dr)	Faktor Koreksi (f)	Viskositas ($\eta = dr * f$)	Shearing Stress ($F/A = dr * 14.374$)	Rate of Shear ($dv/dr = F/A * 1/\eta$)
7	0,5	1,00	160000	160000	14,374	0,0000449188
	1	1,50	80000	120000	25,155	0,0000898375
	2	2,50	40000	100000	43,122	0,0001796750
	2,5	3,00	32000	96000	50,309	0,0002245938
	5	5,00	16000	80000	86,244	0,0004491875
	10	8,50	8000	68000	140,147	0,0008983750
	20	13,50	4000	54000	219,204	0,0017967500
	50	22,00	1600	35200	373,724	0,0044918750
	100	31,50	800	25200	524,651	0,0089837500
	100	31,50	800	25200	524,651	0,0089837500
	50	22,50	1600	36000	373,724	0,0044918750
	20	13,50	4000	54000	219,204	0,0017967500
	10	8,50	8000	68000	140,147	0,0008983750
	5	5,00	16000	80000	86,244	0,0004491875
	2,5	3,00	32000	96000	50,309	0,0002245938
	2	2,50	40000	100000	43,122	0,0001796750
	1	1,50	80000	120000	25,155	0,0000898375
	0,5	1,00	160000	160000	14,374	0,0000449188

Tabel 4.5. Hasil pengukuran viskositas formula 2 pada minggu ke-0

Spindel	Kecepatan Putaran (rpm)	Dial Reading (dr)	Faktor Koreksi (f)	Viskositas ($\eta = dr * f$)	Shearing Stress ($F/A = dr * 14.374$)	Rate of Shear ($dv/dr = F/A * 1/\eta$)
7	0,5	1,	160000	160000	21,561	0,0000898375
	1	1,75	80000	140000	32,342	0,0001796750
	2	3,00	40000	120000	57,496	0,0003593500
	2,5	3,50	32000	112000	64,683	0,0004491875
	5	6,00	16000	96000	107,805	0,0008983750
	10	9,75	8000	78000	172,488	0,0017967500
	20	15,25	4000	61000	334,196	0,0035935000
	50	26,00	1600	41600	416,846	0,0089837500
	100	36,50	800	29200	571,367	0,0179675000
	100	36,50	800	29200	571,367	0,0179675000
	50	26,00	1600	41600	416,846	0,0089837500
	20	15,25	4000	61000	334,196	0,0035935000
	10	9,75	8000	78000	172,488	0,0017967500
	5	6,00	16000	96000	107,805	0,0008983750
	2,5	3,50	32000	112000	64,683	0,0004491875
	2	3,00	40000	120000	57,496	0,0003593500
	1	1,75	80000	140000	32,342	0,0001796750
0,5	1,00	160000	160000	21,561	0,0000898375	

Tabel 4.6. Hasil pengukuran viskositas formula 3 pada minggu ke-0

Spindel	Kecepatan Putaran (rpm)	Dial Reading (dr)	Faktor Koreksi (f)	Viskositas ($\eta = dr \times f$)	Shearing Stress ($F/A = dr * 14.374$)	Rate of Shear ($dv/dr = F/A * 1/\eta$)
7	0,5	1,50	160000	240000	14,374	0,0000898375
	1	2,25	80000	180000	21,561	0,0001796750
	2	4,00	40000	160000	35,935	0,0003593500
	2,5	4,50	32000	144000	43,122	0,0004491875
	5	7,50	16000	120000	71,870	0,0008983750
	10	12,00	8000	96000	122,179	0,0017967500
	20	23,25	4000	93000	194,049	0,0035935000
	50	29,00	1600	46400	316,228	0,0089837500
	100	39,75	800	31800	452,781	0,0179675000
	100	39,75	800	31800	452,781	0,0179675000
	50	29,00	1600	46400	323,415	0,0089837500
	20	23,25	4000	93000	194,049	0,0035935000
	10	12,00	8000	96000	122,179	0,0017967500
	5	7,50	16000	120000	71,870	0,0008983750
	2,5	4,50	32000	144000	43,122	0,0004491875
	2	4,00	40000	160000	35,935	0,0003593500
	1	2,25	80000	180000	21,561	0,0001796750
0,5	1,50	160000	240000	14,374	0,0000898375	

Tabel 4.7. Hasil pengamatan organoleptis keempat formula pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu

Sediaan	Minggu ke-	Warna	Kejernihan	Bau	Sineresis	Gelembung udara
Kontrol	2	Agak putih	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	4	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	6	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	8	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
Formula 1	2	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	4	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	6	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	8	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
Formula 2	2	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	4	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	6	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	8	Keemasan	Ya	mentol	Tidak	Tidak ada
Formula 3	2	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada
	4	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada
	6	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada
	8	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada

Tabel 4.8. Hasil pengamatan organoleptis keempat formula pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu

Sediaan	Minggu ke-	Warna	Kejernihan	Bau	Sineresis	Gelembung udara
Kontrol	2	Putih	Ya	Mentol	Tidak	Banyak terperangkap
	4	Agak kekuningan	Ya	Mentol	Tidak	Banyak terperangkap
	6	Agak kekuningan	Ya	Mentol	Tidak	Banyak terperangkap
	8	Agak kekuningan	Ya	Sedikit sekali bau mentol	Tidak	Banyak terperangkap
Formula 1	2	Sedikit kuning	Ya	Mentol	Tidak	Banyak terperangkap
	4	Sedikit kuning	Ya	Mentol	Tidak	Ada terperangkap
	6	Sedikit kuning	Ya	Mentol	Tidak	Sedikit terperangkap
	8	Sedikit kuning	Ya	Sedikit bau mentol	Tidak	Lebih sedikit terperangkap
Formula 2	2	Agak kekuningan	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	4	Kuning	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	6	Kuning terang	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	8	Kuning terang	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
Formula 3	2	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada
	4	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada
	6	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada
	8	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada

Tabel 4.9. Hasil pengamatan organoleptis keempat formula pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu

Sediaan	Minggu ke-	Warna	Kejernihan	Bau	Sineresis	Gelembung udara
Kontrol	2	Agak putih	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	4	Agak putih	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	6	Agak putih	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	8	Agak putih	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
Formula 1	2	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	4	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	6	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	8	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
Formula 2	2	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	4	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	6	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
	8	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada
Formula 3	2	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada
	4	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada
	6	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada
	8	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada

Tabel 4.10. Hasil pengukuran pH keempat formula pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu

Minggu ke-	pH Sediaan			
	Blanko	Formula 1	Formula 2	Formula 3
2	3,97	4,19	4,97	3,84
4	4,01	4,02	5,16	3,75
6	4,05	3,94	5,05	3,77
8	3,95	3,94	5,14	3,74

Tabel 4.11. Hasil pengukuran pH keempat formula pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu

Minggu ke-	pH Sediaan			
	Blanko	Formula 1	Formula 2	Formula 3
2	3,84	3,83	5,43	3,76
4	3,65	3,61	5,67	3,49
6	3,58	3,51	6,07	3,45
8	3,54	3,48	6,54	3,46

Tabel 4.12. Hasil pengukuran pH keempat formula pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu

Minggu ke-	pH Sediaan			
	Blanko	Formula 1	Formula 2	Formula 3
2	4,35	4,43	4,71	4,09
4	4,43	4,64	4,65	4,08
6	4,56	4,60	4,76	4,05
8	4,51	4,73	4,91	4,05

Tabel 4.13. Hasil pengukuran viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) kamar selama 8 minggu diukur pada kecepatan putaran 2 rpm

Minggu ke-	Viskositas Sediaan (cps)			
	Blanko	Formula 1	Formula 2	Formula 3
2	90000	100000	50000	120000
4	70000	80000	15000	80000
6	60000	80000	8000	80000
8	45000	80000	4000	60000

Tabel 4.14. Hasil pengukuran viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu diukur pada kecepatan putaran 2 rpm

Minggu ke-	Viskositas Sediaan (cps)			
	Blanko	Formula 1	Formula 2	Formula 3
2	160000	110000	16000	180000
4	77500	110000	2500	80000
6	90000	140000	1250	120000
8	55000	70000	600	80000

Tabel 4.15. Hasil pengukuran viskositas keempat formula pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) selama 8 minggu diukur pada kecepatan putaran 2 rpm

Minggu ke-	Viskositas Sediaan (cps)			
	Blanko	Formula 1	Formula 2	Formula 3
2	120000	100000	140000	140000
4	120000	100000	110000	130000
6	140000	100000	120000	140000
8	90000	17000	100000	180000

Tabel 4.16. Hasil pengamatan organoleptis, pH, dan viskositas keempat formula setelah dilakukan *cycling test*

Sediaan	Warna	Kejernihan	Bau	Sineresis	Gelembung udara	pH	Viskositas (mPa.s)
Kontrol	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada	4,06	80000
Formula 1	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada	4,08	80000
Formula 2	Bening	Ya	Mentol	Tidak	Tidak ada	5,44	50000
Formula 3	Putih susu	Tidak	Asam oleat	Tidak	Tidak ada	3,85	100000

Tabel 4.17. Data kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut metanol dan dapar borat pH 9,3

Kadar Glukosamin (ppm)	Luas Puncak Pengamatan (A)
0,5	2019153
1,0	3987342
1,5	6252132
2,0	8226570
2,5	9841731

Tabel 4.18. Data kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 dan dapar borat pH 9,3

Kadar Glukosamin (ppm)	Luas Puncak Pengamatan (A)
0,05	487304
0,07	682734
0,20	1520268
0,40	2669822
0,70	4406114
1,00	5678314
1,50	8492101
2,00	11339150

Tabel 4.19. Hasil uji perolehan kembali (UPK) glukosamin dari keempat formula

Sediaan	Luas puncak	Konsentrasi (ppm)	Perolehan kembali (%)	Perolehan rata-rata (%)
Kontrol	7452342	1.84876	92,4380	92,4453
	7617035	1.89017	94,5085	
	7289447	1.80779	90,3895	
Formula 1	8503535	2,1131	104,7333	105,4161
	8363918	2,0780	102,9937	
	8566671	2,1290	105,5214	
Formula 2	6477975	1,6038	80,1875	79,3613
	6273296	1,5523	77,6140	
	6485542	1,6057	80,2825	
Formula 3	7896359	1,9604	98,0200	97,9428
	7949806	1,9738	98,6920	
	7824490	1,9423	97,1165	

Tabel 4.20. Jumlah kumulatif hasil uji penetrasi glukosamin dalam dapar fosfat pH 7,4 dari masing-masing formula

Waktu (menit)	Jumlah kumulatif ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
	Kontrol	Formula 1	Formula 2	Formula 3
10	0,04 ± 0,06	11,90 ± 0,81	1,32 ± 0,33	1,24 ± 0,51
30	5,49 ± 0,33	130,12 ± 1,07	90,28 ± 1,62	23,47 ± 0,80
60	3,15 ± 0,31	168,05 ± 5,07	175,09 ± 10,76	42,77 ± 1,56
90	11,40 ± 0,15	216,11 ± 12,86	230,98 ± 7,58	65,93 ± 1,72
120	61,07 ± 2,16	339,68 ± 16,92	303,57 ± 9,48	53,68 ± 0,43
180	141,54 ± 1,12	573,68 ± 17,88	384,24 ± 7,86	131,15 ± 5,39
240	254,07 ± 5,20	714,47 ± 20,37	494,09 ± 5,37	183,51 ± 2,41
300	256,15 ± 10,24	863,26 ± 11,71	502,64 ± 18,67	212,76 ± 3,52
360	421,00 ± 12,38	999,16 ± 14,76	493,38 ± 18,22	146,66 ± 3,86
420	528,22 ± 19,41	1060,62 ± 12,18	377,57 ± 8,28	69,52 ± 2,96
480	679,50 ± 17,81	1005,49 ± 13,99	234,09 ± 4,84	43,11 ± 0,46

Tabel 4.21. Hasil perhitungan fluks atau laju penetrasi glukosamin dari masing-masing formula

Waktu (menit)	Fluks ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$)			
	Kontrol	Formula 1	Formula 2	Formula 3
10	0,27 \pm 0,35	71,40 \pm 4,88	7,89 \pm 1,99	7,43 \pm 3,07
30	10,98 \pm 0,67	260,24 \pm 2,15	180,56 \pm 3,24	46,94 \pm 1,61
60	3,15 \pm 0,31	168,05 \pm 5,07	175,09 \pm 10,76	42,77 \pm 1,56
90	7,60 \pm 0,10	144,07 \pm 8,58	153,99 \pm 5,06	43,95 \pm 1,15
120	30,53 \pm 1,08	169,84 \pm 8,46	151,79 \pm 4,74	26,84 \pm 0,22
180	47,18 \pm 0,37	191,23 \pm 5,96	128,08 \pm 2,62	43,72 \pm 1,80
240	63,52 \pm 1,30	178,62 \pm 5,09	123,52 \pm 1,34	45,88 \pm 0,60
300	51,23 \pm 2,05	172,65 \pm 2,34	100,53 \pm 3,73	42,55 \pm 0,70
360	70,17 \pm 2,06	166,53 \pm 2,46	82,23 \pm 3,04	24,44 \pm 0,64
420	75,46 \pm 2,77	151,52 \pm 1,74	53,94 \pm 1,18	9,93 \pm 0,42
480	84,94 \pm 2,23	125,69 \pm 1,75	29,26 \pm 0,61	5,39 \pm 0,06

Tabel 4.22. Data persentase jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari masing-masing formula

Waktu (menit)	Persentase jumlah kumulatif (%)			
	Kontrol	Formula 1	Formula 2	Formula 3
10	0,001 \pm 0,001	0,20 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01
30	0,10 \pm 0,006	2,14 \pm 0,02	2,12 \pm 0,04	0,39 \pm 0,01
60	0,04 \pm 0,03	2,76 \pm 0,08	4,11 \pm 0,25	0,72 \pm 0,03
90	0,21 \pm 0,002	3,55 \pm 0,21	5,42 \pm 0,18	1,10 \pm 0,03
120	1,11 \pm 0,04	5,58 \pm 0,28	7,13 \pm 0,22	0,90 \pm 0,01
180	2,58 \pm 0,02	9,42 \pm 0,29	9,02 \pm 0,18	2,20 \pm 0,09
240	4,66 \pm 0,09	11,74 \pm 0,33	11,60 \pm 0,13	3,07 \pm 0,04
300	4,67 \pm 0,19	14,18 \pm 0,19	11,80 \pm 0,44	3,56 \pm 0,06
360	7,68 \pm 0,23	16,41 \pm 0,24	11,58 \pm 0,43	2,46 \pm 0,06
420	9,64 \pm 0,35	17,42 \pm 0,20	8,86 \pm 0,19	1,16 \pm 0,05
480	12,40 \pm 0,32	16,52 \pm 0,23	5,50 \pm 0,11	0,72 \pm 0,01



Lampiran 1. Contoh perhitungan *yield value* dari pengukuran konsistensi sediaan formula 3

Untuk mencari nilai *yield value* digunakan rumus:

$$S_o = \frac{k_1 \cdot m \cdot g}{p^n}$$

S_o = *Yield value* (dyne/cm²)

m = Massa kerucut

g = Gravitasi (cm/df²)

p = Dalamnya penetrasi (cm)

n = Konstanta, yaitu 2

k_1 = $1/\pi \cos^2 \alpha \cos \alpha = 0,14281$

α = Sudut kerucut terhadap bidang datar, yaitu 37⁰

Data

Dalamnya penetrasi = $415 \frac{1}{10}$ mm

Massa kerucut = 263,5 g

Yield value = $\frac{0,14281 \times 263,5 \times 981}{(4,15)^2} = 2143,4436$ dyne/cm²

Lampiran 2. Contoh perhitungan perolehan kembali glukosamin dalam sediaan

Persamaan regresi: $y = 100070,40 + 3976876x$

dengan y = luas puncak glukosamin

x = kadar glukosamin (ppm)

Gel diencerkan dengan metanol dan dicukupkan volumenya hingga 25,0 ml

Larutan tersebut dipipet 125,0 μ l dan diencerkan lagi dengan dapar borat pH 9,3
hingga 25,0 ml.

$$\text{Faktor pengenceran} = \frac{25 \times 25 \times 10^3}{125 \times 1000} = 5$$

Perolehan kembali glukosamin = $\frac{\text{kadar diperoleh} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{bobot glukosamin seharusnya}} \times 100\%$

Berat gel formula 1 sebesar 1,0088 gram (mengandung 10,088 mg glukosamin)

Data 1 Luas puncak = 8503535
 Kadar diperoleh = 2,1131 ppm
 Perolehan kembali = 104,7333%

Data 2 Luas puncak = 8363918
 Kadar diperoleh = 2,0780 ppm
 Perolehan kembali = 102,9937%

Data 3 Luas puncak = 8566671
 Kadar diperoleh = 2,1290 ppm
 Perolehan kembali = 105,5214%

Perolehan kembali rata-rata = $\frac{104,7333 + 102,9937 + 105,5214}{3} = 105,4161\%$

Lampiran 3. Contoh perhitungan jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari sediaan kontrol pada menit ke-10

Persamaan regresi: $y = 359645,6574 + 5472743,537x$

Faktor pengenceran = volume labu ukur : volume *sampling*
 $= 5,0 : 0,5 = 10$

Konsentrasi terpenetrasi = $x \times 10$

Jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi =

$$Q = \frac{\{C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C \cdot S\}}{A}$$

= Konsentrasi glukosamin ($\mu\text{g/ml}$) pada *sampling* menit ke-n

= Volume sel difusi Franz (12,7 ml)

Σ = Jumlah konsentrasi glukosamin ($\mu\text{g/ml}$) pada *sampling* pertama (menit ke-10) hingga sebelum menit ke-n

= Volume *sampling* (0,5 ml)

= Luas area membran ($1,89 \text{ cm}^2$)

Data 1

Luas puncak = 361524

Konsentrasi diperoleh = 0,0003 ppm

Konsentrasi terpenetrasi = 0,0030 ppm

Jumlah kumulatif = $\frac{\{(0,0030 \times 12,7) + (0 \times 0,5)\}}{1,88692} = 0,0231 \mu\text{g/cm}^2$

Data 2

Luas puncak = 321721

Konsentrasi diperoleh = 0,0000 ppm

Konsentrasi terpenetrasi = 0,0000 ppm

Jumlah kumulatif = $\frac{\{(0,0000 \times 12,7) + (0 \times 0,5)\}}{1,88692} = 0,0000 \mu\text{g/cm}^2$

(lanjutan)

Data 3

Luas puncak = 368527

Konsentrasi diperoleh = 0,0016 ppm

Konsentrasi terpenetrasi = 0,0160 ppm

Jumlah kumulatif = $\frac{\{(0,0160 \times 12,7) + (0 \times 0,5)\}}{1,88692} = 0,1092 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

Jumlah kumulatif rata-rata = $\frac{0,0231 + 0,0000 + 0,1092}{3} = 0,0441 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

3



Lampiran 4. Contoh perhitungan jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari sediaan kontrol pada menit ke-30

Persamaan regresi: $y = 359645,6574 + 5472743,537x$

Faktor pengenceran = volume labu ukur : volume *sampling*
 $= 5,0 : 0,5 = 10$

Konsentrasi terpenetrasi = $x \times 10$

Jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi =

$$Q = \frac{\{C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C \cdot S\}}{A}$$

= Konsentrasi glukosamin ($\mu\text{g/ml}$) pada *sampling* menit ke-n

= Volume sel difusi Franz (12,7 ml)

Σ = Jumlah konsentrasi glukosamin ($\mu\text{g/ml}$) pada *sampling* pertama (menit ke-10) hingga sebelum menit ke-n

= Volume *sampling* (0,5 ml)

= Luas area membran ($1,89 \text{ cm}^2$)

Data 1

Luas puncak = 591007

Konsentrasi diperoleh = 0,0423 ppm

Konsentrasi terpenetrasi pada menit ke-30 = 0,4230 ppm

Konsentrasi terpenetrasi pada menit ke-10 = 0,0030 ppm

$$Q = \frac{\{(0,4230 \times 12,7) + (0,0030 \times 0,5)\}}{1,88692} = 5,3708 \mu\text{g/cm}^2$$

Data 2

Luas puncak = 612371

Konsentrasi diperoleh = 0,0462 ppm

Konsentrasi terpenetrasi pada menit ke-30 = 0,4620 ppm

Konsentrasi terpenetrasi pada menit ke-10 = 0,0000 ppm

(lanjutan)

$$Q = \frac{\{(0,4620 \times 12,7) + (0 \times 0,5)\}}{1,88692} = 5,8647 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

Data 3

Luas puncak = 584687

Konsentrasi diperoleh = 0,0411 ppm

Konsentrasi terpenetrasi pada menit ke-30 = 0,4110 ppm

Konsentrasi terpenetrasi pada menit ke-10 = 0,0160 ppm

$$Q = \frac{\{(0,4110 \times 12,7) + (0,0160 \times 0,5)\}}{1,88692} = 5,2283 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$\text{Jumlah kumulatif rata-rata} = \frac{5,3708 + 5,8647 + 5,2283}{3} = 5,4880 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

3

Lampiran 5. Contoh perhitungan fluks atau laju penetrasi glukosamin dari sediaan kontrol pada menit ke-30

Laju penetrasi dihitung dengan menggunakan rumus:

$$J = \frac{Q}{t}$$

J = Fluks atau laju penetrasi ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$)

Q = Jumlah kumulatif glukosamin yang melalui membran per luas area difusi ($\mu\text{g cm}^{-2}$)

t = Waktu (jam)

Data 1

$$Q = 5,3708 \mu\text{g/cm}^2$$

$$J = \frac{5,3708 \mu\text{g/cm}^2}{0,5 \text{ jam}} = 10,7417 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

Data 2

$$Q = 5,8647 \mu\text{g/cm}^2$$

$$J = \frac{5,8647 \mu\text{g/cm}^2}{0,5 \text{ jam}} = 11,7295 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

Data 3

$$Q = 5,2283 \mu\text{g/cm}^2$$

$$J = \frac{5,2283 \mu\text{g/cm}^2}{0,5 \text{ jam}} = 10,4566 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

$$\text{Fluks rata-rata} = \frac{10,7417 + 11,7295 + 10,4566}{3} = 10,9759 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

Lampiran 6. Contoh perhitungan persentase jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari sediaan kontrol pada menit ke-30

Jumlah total glukosamin per luas area difusi

$$= \frac{\text{Berat glukosamin seharusnya dalam gel} \times \text{perolehan kembali}}{1,88692}$$

Persentase jumlah kumulatif

$$= \frac{\text{Jumlah kumulatif terpenetrasi per luas area difusi}}{\text{Jumlah total glukosamin per luas area difusi}} \times 100\%$$

Berat gel untuk uji penetrasi = 1,1203 gram

Berat glukosamin seharusnya dalam gel = 11,203 mg

Perolehan kembali = 92,4453%

$$\begin{aligned} \text{Jumlah total glukosamin per luas area difusi} &= \frac{11,203 \times 92,4453\%}{1,88692} \\ &= 5480,8113 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \end{aligned}$$

Data 1 Jumlah kumulatif terpenetrasi pada menit ke-30 = 5,3708 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
 Persentase jumlah kumulatif = $\frac{5,3708}{5480,8113} \times 100\% = 0,0980\%$

Data 2 Jumlah kumulatif terpenetrasi pada menit ke-30 = 5,8647 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
 Persentase jumlah kumulatif = $\frac{5,8647}{5480,8113} \times 100\% = 0,1070\%$

Data 3 Jumlah kumulatif terpenetrasi pada menit ke-30 = 5,3708 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
 Persentase jumlah kumulatif = $\frac{5,2283}{5480,8113} \times 100\% = 0,0954\%$

$$\text{Jumlah kumulatif rata-rata} = \frac{0,0980 + 0,1070 + 0,0954}{3} = 0,1001\%$$

Lampiran 7. Sertifikat analisis glukosamin HCl

江苏九寿堂生物制品有限公司

JIANGSU JIUSHOUTANG ORGANISMS-MANUFACTURBS CO., LTD

成品检验报告书

1516/BB/VII/09

Certificate of Analysis

品名 Product	D-氨基葡萄糖盐酸盐 D-Glucosamine Hydrochloride				
批号 Batch No.	数量 Quantity	生产日期 Manuf. Date	有效日期 Exp. Date	包装 Packing	化验员 Analyst
XH2008091601 ✓	300Kg	08/08/03	10/08/03	25Kg/drum	Zou Wenlong
项目 Items	标准 Standard			结果 Results	
外观 Description	White Crystalline Powder			White Crystalline Powder	
味道 Taste	Hard Salty			Hard Salty	
气味 Odor	Characteristic			Characteristic	
比旋度 Specific Rotation(25°C)	+71.00°~+73.00°			+71.95°	
灼烧残渣 Residue on Ignition	<0.10%			0.03%	
干燥失重 Loss on Drying	<0.50%			0.12%	
pH值 pH(5%, 25°C)	3.50~4.50			3.83	
氯离子 Chloride	16.2~16.7%			16.48%	
铁离子 Iron	<10ppm			<10ppm	
重金属 Heavy Metal	<10ppm			<10ppm	
砷 Arsenic	<0.5ppm			<0.5ppm	
含量 Assay	98.00~102.00%			99.71%	
松密度 Bulk Density	0.6~0.8g/ml			0.77g/ml	
紧密度 Tapped Density	>0.8g/ml			0.97g/ml	
Microbial Test: Total Plate Count Yeast and Mold E. coli Salmonella	<500cfu/g <100cfu/g Negative Negative			364cfu/g 56cfu/g Negative Negative	

Lampiran 8. Sertifikat analisis standar glukosamin HCl

<http://www.sigmaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=G1514&LotNo=076k12451&b...>

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	D-(+)-Glucosamine hydrochloride, ≥99%, BioReagent, suitable for cell culture
Product Number	G1514
Product Brand	SIGMA
CAS Number	66-84-2
Molecular Formula	C ₆ H ₁₃ NO ₅ · HCl
Molecular Weight	215.63

TEST

APPEARANCE
SOLUBILITY
IR SPECTRUM
PURITY BY PERCHLORIC ACID TITRATION
HPLC WITH PULSED AMPEROMETRIC DETECTION
CELL CULTURE TEST
QC RELEASE DATE

SPECIFICATION

WHITE POWDER
CLEAR COLORLESS SOLUTION AT 100MG/ML IN WATER
CONSISTENT WITH STRUCTURE
NLT 99%
NLT 99%
PASS

LOT 076K12451 RESULTS

CONFORMS
CONFORMS
CONFORMS
100%
100%
PASS
SEPTEMBER 2006



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

Lampiran 9. Sertifikat analisis tikus *Rattus norvegicus*

ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
LABORATORIUM NON RUMINANSIA DAN SATWA HARAPAN



FAKULTAS PETERNAKAN
I P B

Lantai 3, Wing 9 No. 301. Jl. Agatis,
 Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
 Tel/Fax. 0251-624774

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS
 Jabatan : Kepala Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan
 Alamat : Jl. Agatis kampus IPB Darmaga-Bogor
 Telp. 0251-8624774, Fax. 0251-8624774

Menyatakan bahwa Tikus Fatih (*Rattus norvegicus*) yang dikembangkan di Lab. Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Fakultas Peternakan IPB, adalah Tikus yang telah memenuhi standar untuk digunakan sebagai hewan penelitian.

Demikian surat keterangan ini dibuat dengan sebenar-benarnya.

Kepala Laboratorium
Non Ruminansia dan Satwa Harapan
Fakultas Peternakan IPB

Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS
NIP. 130 674 521

Lampiran 10. Sertifikat analisis etanol



Certificate of Analysis

<http://certificates.merck.de>

Date of print: 08.12.2009

1.00983.2500 Ethanol absolute for analysis EMSURE™
ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Batch K40282183

Batch Values		
Purity (GC)	≥ 99.9	%
Identity (IR)	conforms	
Appearance	conforms	
Colour	≤ 10	Hazen
Solubility in water	conforms	
Acidity or alkalinity	< 30 ppm	
Titration acid	≤ 0.0002	meq/g
Titration base	≤ 0.0002	meq/g
Density (d 20 °C/20 °C)	0.790 - 0.793	
UV absorption	conforms	
Aldehydes (as Acetaldehyd)	≤ 0.001	%
Fusel oils	conforms	
Substances reducing potassium permanganate (as O)	≤ 0.0002	%
Carbonyl compounds (as CO)	≤ 0.003	%
Readily carbonizable substances	conforms	
Acetone (GC)	≤ 0.001	%
Ethylmethylketone (GC)	≤ 0.02	%
Isamyl alcohol (GC)	≤ 0.05	%
2-Propanol (GC)	≤ 0.003	%
Higher alcohols (GC)	≤ 0.01	%
Volatiles impurities (GC)		
Acetaldehyde and Acetal	≤ 10	ppm
Benzene	≤ 2	ppm
Methanol	≤ 100	ppm
Total of ether impurities	≤ 300	ppm
disregard limit	≤ 9	ppm
Chloride (Cl)	≤ 0.3	ppm

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0

Page 1 of 2

(lanjutan)

Certificate of Analysis

1.00983.2500 Ethanol absolute for analysis EMSURE™
ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Batch K40282183

Batch Values

Nitrate (NO ₃)	≤ 0.3	ppm
Phosphate (PO ₄)	≤ 0.3	ppm
Sulphate (SO ₄)	≤ 0.3	ppm
Ag (Silver)	≤ 0.000002	%
Al (Aluminium)	≤ 0.000005	%
As (Arsenic)	≤ 0.000002	%
Au (Gold)	≤ 0.000002	%
Ba (Barium)	≤ 0.00001	%
Be (Beryllium)	≤ 0.000002	%
Bi (Bismuth)	≤ 0.000002	%
Ca (Calcium)	≤ 0.00005	%
Cd (Cadmium)	≤ 0.000005	%
Co (Cobalt)	≤ 0.000002	%
Cr (Chromium)	≤ 0.000002	%
Cu (Copper)	≤ 0.000002	%
Fe (Iron)	≤ 0.00001	%
Ga (Gallium)	≤ 0.000002	%
In (Indium)	≤ 0.000002	%
Li (Lithium)	≤ 0.000002	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.00001	%
Mn (Manganese)	≤ 0.000002	%
Mo (Molybdenum)	≤ 0.000002	%
Ni (Nickel)	≤ 0.000002	%
Pb (Lead)	≤ 0.00001	%
Pt (Platinum)	≤ 0.000002	%
Sb (Antimony)	≤ 0.000002	%
Sn (Tin)	≤ 0.00001	%
Ti (Titanium)	≤ 0.000002	%
Tl (Thallium)	≤ 0.000002	%
V (Vanadium)	≤ 0.000002	%
Zn (Zinc)	≤ 0.00001	%
Zr (Zirconium)	≤ 0.000002	%
Evaporation residue	≤ 0.0005	%
Water	≤ 0.1	%

Test date (DD.MM.YYYY): 10.07.2009
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY): 31.07.2014

Dr. Michael Savelsberg

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

Lampiran 11. Sertifikat analisis urea

Certificate of Analysis



<http://certificates.merck.de>

Date of print: 03.06.2010

1.08487.0500 Urea GR for analysis ACS

Batch K27437087

	Guaranteed Values		Batch Values	
Assay (DSC (differential scanning calorimetry))	min 99.5	%	99.9	%
Identity (IR-spectrum)	passes test		passes test	
Melting point (DSC (differential scanning calorimetry))	132 - 134	°C	134	°C
In water insoluble matter	max 0.01	%	0.004	%
Chloride (Cl)	max 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Sulphate (SO ₄)	max 0.001	%	≤ 0.001	%
Heavy metals (as Pb)	max 0.0004	%	≤ 0.0004	%
Fe (Iron)	max 0.0002	%	≤ 0.0002	%
Biuret	max 0.1	%	≤ 0.1	%
Sulfated ash (800 °C)	max 0.01	%	≤ 0.01	%

Test date: 11.02.2000

Corresponds to ACS

Dr. Mayer

Analytical laboratory

This document has been produced electronically and is valid without a signature

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0

Page 1 of 1

SA-7 Anfo:2055791 478835 - 10848700001000000 V. 987

