

BAB III

BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA

A. Bahan

Aminofilin (Jilin, China), teofilin (Jilin, China), isopropil miristat (Cognis Oleochemicals, Malaysia), steareth-21, steareth-2 (Carechemicals, Jerman), HPMC 4000 (Shin-Etsu Chemical, Jepang), adeps lanae (Lanor, Perancis), paraffin cair (Sonneborn, Australia), setil alkohol (Indonesia), propilen glikol (Dow Chemical Pacific, Singapura), asam sitrat, BHT, Kalium hidrogen fosfat/ KH_2PO_4 (Merck, Jerman), metil paraben, propil paraben (Clariant UK Ltd, Inggris), Natrium hidroksida (Mallinckrodt, Amerika Serikat), aquadest, hewan coba : tikus betina galur *Sprague-Dawley* dengan berat ± 150 gram berumur 8-10 minggu (Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Indonesia).

B. Alat

Sel difusi franz dengan diameter 1,33 cm, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1601, Jepang) , pH meter tipe 510 (Eutech Instrument, Singapura), viskometer Brookfield (Brookfield Synchroelectric, Amerika Serikat), penetrometer (Herzoo, Jerman), mikroskop optik (Nikon model

eclipse E200, Jepang), kamera digital (Panasonic DMC-FX10, Jepang), timbangan analitik tipe 210-LC (ADAM, Amerika Serikat), magnetik stirer (Health magnetic stirer), homogenizer (Multimix) , penangas air, termostat (Julabo F20), jangka sorong (Vernier Caliper, China), alat-alat gelas dan alat-alat bedah (Gold Cross).

C. Cara Kerja

1. Formulasi dan Pembuatan Sediaan

a. Krim

Formulasi krim aminofilin yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Formula krim aminofilin

Bahan	Formula (%)
Aminofilin	2
Isopropil miristat	8
Setil alkohol	7
Steareth-21	3,9
Steareth-2	1,1
Propilen glikol	15
Metil paraben	0,2
Propil paraben	0,1
Asam sitrat	0,75
Aquadest	Ad 100

Krim dibuat dengan cara :

Bahan-bahan fase minyak meliputi isopropil miristat, setil alkohol, dan propil paraben dipanaskan di cawan porselen di atas penangas air pada suhu 70°C sambil diaduk hingga homogen.

Kemudian metil paraben dilarutkan dalam propilen glikol aduk hingga larut. Campurkan dengan bahan-bahan fase air lainnya meliputi steareth-21 dan steareth-2 dipanaskan di cawan porselen di atas penangas air pada suhu 70°C sambil diaduk hingga homogen.

Campurkan bahan-bahan fase minyak dan fase air lalu diaduk dengan homogenizer pada suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$ dengan kecepatan 3000 rpm. Masukkan aminofilin yang telah dilarutkan dalam air. Lalu tambahkan asam sitrat yang telah dilarutkan dalam air, homogenkan. Setelah homogen, massa krim dibiarkan hingga dingin.

b. Gel

Formulasi gel aminofilin yang digunakan dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Formula gel aminofilin

Bahan	Formula (%)
Aminofilin	2
HPMC 4000	2
Propilen glikol	10
Metil paraben	0,2
Propil paraben	0,1
Asam sitrat	0,75
Aquadest	ad 100

Gel dibuat dengan cara :

HPMC 4000 dikembangkan dalam air panas sejumlah 10 kali bobotnya selama setengah jam, kemudian diaduk menggunakan alat homogenizer dengan kecepatan 3000 rpm sehingga terdispersi sempurna dan terbentuk basis gel. Kemudian larutkan metil paraben dan propil paraben dalam propilen glikol hingga larut sempurna, campurkan ke dalam basis gel, aduk hingga homogen. Masukkan aminofilin yang telah dilarutkan dalam air. Lalu Tambahkan asam sitrat yang telah dilarutkan dalam air, homogenkan.

c. Salep

Formulasi salep aminofilin yang digunakan dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Formula salep aminofilin

Bahan	Formula (%)
Aminofilin	2
Adeps lanae	65
Paraffin cair	3
Metil paraben	0,2
Propil paraben	0,1
BHT	0,05
Asam sitrat	1
Aquadest	ad 100

Salep dibuat dengan cara :

Adeps lanae, paraffin cair, propil paraben dan BHT dipanaskan di cawan porselen di atas penangas air hingga melebur sempurna. Setelah melebur, aduk menggunakan alat homogenizer dengan kecepatan 3000 rpm.

Kemudian larutkan metil paraben dalam air panas, campurkan ke dalam basis salep. Masukkan aminofilin yang telah dilarutkan dalam air, homogenkan. Lalu campurkan asam sitrat yang telah dilarutkan dalam air secukupnya dan aduk hingga homogen.

2. Evaluasi (22)

a. Pengamatan organoleptis

Sediaan diamati terjadinya pemisahan fase atau tidak, bau serta perubahan warna.

b. Pemeriksaan homogenitas

Sediaan diletakkan di antara dua kaca objek lalu diperhatikan adanya partikel-partikel kasar atau ketidakhomogenan di bawah cahaya.

c. Pengukuran pH

pH sediaan diukur dengan menggunakan pH meter. Mula-mula elektroda dikalibrasi dengan dapar standar pH 4 dan pH 7. Kemudian elektroda dicelupkan ke dalam sediaan, catat nilai pH yang muncul di layar.

d. Pengukuran viskositas

Viskositas sediaan diukur dengan menggunakan viskometer Brookfield. Sediaan dimasukkan ke dalam gelas piala sampai mencapai volume 600 ml, lalu spindel diturunkan hingga batas spindel tercelup ke dalam formulasi. Selanjutnya alat dinyalakan dengan menekan tombol on. Kecepatan spindel diatur berturut-turut pada 2, 4, 10, 20 rpm, lalu dibalik 20, 10, 4, 2 rpm, kemudian dibaca skalanya (*dial reading*) dimana jarum merah yang bergerak telah stabil. Nilai viskositas (η) dalam centipoise (cps) diperoleh dari hasil perkalian *dial reading* dengan faktor koreksi khusus untuk masing-masing kecepatan spindel. Sifat aliran diperoleh dengan membuat kurva antara tekanan geser (F/A) terhadap kecepatan geser (dv/dr).

e. Pemeriksaan konsistensi

Sediaan yang akan diperiksa dimasukkan ke dalam wadah khusus dan diletakkan pada meja penetrometer. Peralatan diatur hingga ujung kerucut menyentuh bayang permukaan sediaan yang dapat diperjelas dengan menyalakan lampu. Batang pendorong dilepas dengan mendorong tombol *start*. Angka penetrasi dibaca lima detik setelah kerucut menembus sediaan.

f. Pengukuran diameter globul rata-rata

Sediaan diletakkan diatas kaca objek dan ditutup dengan gelas penutup, kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 kali yang dilengkapi lensa okuler mikrometer yang telah dikalibrasi. Diameter partikel diukur dan dikali dengan faktor kalibrasi.

g. Uji stabilitas fisik sediaan

1) Metode *cycling test*

Sediaan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu 40°C selama 24 jam. Perlakuan ini adalah satu siklus. Percobaan diulang sebanyak enam siklus. Kondisi fisik sediaan dibandingkan selama percobaan dengan kondisi sediaan sebelumnya.

2) Uji mekanik (sentrifugasi)

Sampel disentrifugasi dengan kecepatan putaran 3800 rpm selama 5 jam menggunakan sentrifugator. Setelah disentrifugasi, diamati apakah terjadi pemisahan fase.

3. Uji Penetrasi Secara *In Vitro*

a. Pembuatan dapar fosfat pH 7,4

Kalium dihidrogenfosfat 0,2 M sebanyak 50,0 ml dicampur dengan 39,1 ml NaOH 0,2 N dan diencerkan dengan air bebas CO₂ secukupnya hingga 200,0 ml.

b. Pembuatan kurva kalibrasi teofilin

Teofilin ditimbang seksama sebanyak $\pm 100,0$ mg, larutkan dengan dapar fosfat pH 7,4 dalam labu ukur ad 100,0 ml. Didapatkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan tersebut dipipet 10,0 ml, larutkan dengan dapar fosfat pH 7,4 dalam labu ukur ad 100,0 ml. Didapat larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Dari larutan induk 100 ppm, dipipet dan diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 hingga didapat konsentrasi 5, 7, 10, 12, dan 15 ppm. Ukur serapannya pada panjang gelombang (λ) maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang (λ) maksimum teofilin dalam dapar fosfat pH 7,4 ditentukan dengan melakukan *scanning* pada panjang gelombang antara 200 – 400 nm. Kemudian dibuat kurva kalibrasi dan persamaan regresinya.

c. Penetapan kadar teofilin dalam aminofilin

Aminofilin ditimbang seksama sebanyak $\pm 100,0$ mg, larutkan dengan dapar fosfat pH 7,4 dalam labu ukur ad 100,0 ml. Didapatkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan tersebut pipet 10,0 ml dan diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Dari larutan induk 100 ppm, pipet 10,0 ml dan diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 dalam labu ukur 100,0 ml hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10 ppm. Ukur serapannya pada panjang gelombang (λ) maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Hitung kadar teofilin dalam aminofilin dengan menggunakan persamaan regresi dari pembuatan kurva kalibrasi teofilin.

d. Uji penetrasi aminofilin (19, 23, 24)

Membran yang digunakan adalah kulit tikus. Pertama-tama tikus dibius dengan eter hingga mati kemudian bulu tikus dicukur dengan hati-hati. Setelah itu 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 setelah itu disimpan dalam suhu 4°C . Kulit dapat digunakan pada rentang waktu 24 jam. Uji penetrasi dilakukan menggunakan sel difusi Franz dengan luas area difusi $1,389 \text{ cm}^2$ dan volume kompartemen reseptor 13 ml. Kompartemen reseptor diisi dengan dapar fosfat pH 7,4 dan dijaga suhunya sekitar $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ serta diaduk dengan stirer kecepatan 300 rpm. Kulit

abdomen tikus kemudian diletakkan di antara kompartemen donor dengan kompartemen reseptor dengan posisi stratum korneum menghadap ke atas. Sampel 1 g diaplikasikan pada permukaan kulit. Kemudian pada menit ke-10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, dan 480 diambil sampel sebanyak 0,5 ml dari kompartemen reseptor menggunakan syringe dan segera digantikan dengan dapar fosfat pH 7,4 sejumlah volume yang sama. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 5, 0 ml untuk krim dan salep, labu ukur 10,0 ml untuk gel, lalu di adkan dengan dapar fosfat pH 7,4. Sampel diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali.

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

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

Keterangan:

Q = jumlah kumulatif teofilin yang terpenetrasi per luas area difusi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

C_n = konsentrasi teofilin ($\mu\text{g}/\text{ml}$) pada sampling menit ke-n

V = volume sel difusi Franz (13,0 ml)

$\sum_{i=1}^{n-1} C_i$ = jumlah konsentrasi teofilin ($\mu\text{g}/\text{ml}$) pada sampling pertama (menit ke-10) hingga sebelum menit ke-n

S = volume sampling (0,5 ml)

A = luas area membran (1,389 cm^2)

Jumlah kumulatif teofilin yang terpenetrasi dikonversikan ke dalam aminofilin berdasarkan penetapan kadar teofilin dalam aminofilin.

Kemudian dilakukan perhitungan fluks obat berdasarkan hukum fick I:

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

Keterangan:

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

M = Jumlah kumulatif aminofilin yang melalui membran (μg)

S = Luas area difusi (cm^2)

t = waktu (jam)

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