

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Pembuatan Sediaan

Sediaan yang dibuat ada dua belas formula, yaitu krim kafein, krim kafein dan tretinoin, gel kafein, gel kafein dan tretinoin, salep kafein, salep kafein dan tretinoin, krim aminofilin, krim aminofilin dan tretinoin, gel aminofilin dan tretinoin, salep aminofilin, serta salep aminofilin dan tretinoin. Formula krim, gel, dan salep kafein dan aminofilin dapat dilihat pada Tabel 1 sampai Tabel 3.

2. Evaluasi Sediaan

a. Pengamatan organoleptis

Pada awal pembuatan, sediaan krim kafein atau aminofilin berwarna putih dan tak berbau; gel kafein atau aminofilin tak berwarna, transparan dan berbau alkohol; serta sediaan salep kafein atau aminofilin berwarna kuning dan berbau khas. Sediaan krim kafein atau aminofilin dengan tretinoin berwarna kuning muda dan tidak berbau. Sediaan gel kafein atau aminofilin dengan tretinoin berwarna kuning, transparan dan berbau alkohol. Sediaan

salep kafein atau aminofilin dengan tretinoin berwarna kuning tua dan berbau khas. Selama penyimpanan 8 minggu, sediaan krim kafein atau aminofilin yang mengandung tretinoin mengalami perubahan warna. Hasil pengamatan organoleptis dapat dilihat pada Gambar 14 sampai Gambar 17 dan Tabel 4 sampai Tabel 9.

b. Pemeriksaan homogenitas

Seluruh sediaan homogen dan tetap homogen pada penyimpanan selama 8 minggu pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$, $\pm 29^{\circ}\text{C}$, dan $\pm 40^{\circ}\text{C}$, kecuali gel yang hanya mengandung kafein dan gel yang mengandung kafein dan tretinoin karena terjadinya terbentuknya kristal. Data pemeriksaan homogenitas dapat dilihat pada Tabel 4 sampai Tabel 9.

c. Pengukuran pH

Sediaan mengalami perubahan pH selama penyimpanan 8 minggu tapi masih dalam batas pH mantel asam kulit, yaitu antara 4,5 dan 6,5. Selama penyimpanan 8 minggu, pH sediaan yang mengandung kafein berkisar antara 5,55-5,81 sedangkan pH sediaan yang mengandung aminofilin berkisar antara 5,1 hingga 6,0. Perubahan pH sediaan selama penyimpanan 8 minggu ditunjukkan pada Tabel 10.

d. Pemeriksaan viskositas

Sifat alir krim yang mengandung kafein atau aminofilin dengan atau tanpa tretinoin adalah pseudoplastis tiksotropik. Sediaan gel yang mengandung kafein atau aminofilin memiliki sifat alir pseudoplastis. Sifat alir salep kafein atau aminofilin adalah plastis tiksotropik. Sediaan krim, gel, dan salep

mengalami perubahan viskositas selama penyimpanan 8 minggu. Hasil tersebut dapat dilihat pada Tabel 11 sampai Tabel 16 dan Gambar 18 sampai Gambar 29.

e. Pemeriksaan konsistensi

Berdasarkan pengukuran angka penetrasi, gel memiliki angka penetrasi yang terbesar diikuti krim dan salep. Sediaan kafein atau aminofilin dengan tretinoin memiliki angka penetrasi yang lebih besar daripada sediaan yang hanya mengandung kafein atau aminofilin saja. Hasil pengukuran konsistensi dapat dilihat pada Tabel 17.

f. Pengukuran diameter globul rata-rata.

Pengukuran globul terhambat karena terjadinya rekristalisasi. Pengamatan mikroskopik sediaan selama penyimpanan 8 minggu menunjukkan terjadinya rekristalisasi. Foto mikroskopik sediaan dapat dilihat pada Gambar 30 sampai Gambar 32.

g. Uji mekanik

Hasil uji mekanik tidak stabil karena terjadi pemisahan fase dari sediaan, kecuali gel yang hanya mengandung kafein atau aminofilin saja. Hasil dapat dilihat pada Tabel 18 dan Gambar 33.

h. *Cycling test*

Hasil uji *cycling test* stabil karena tidak terjadi pemisahan fase. Hasil dapat dilihat pada Tabel 18 dan Gambar 34.

3. Uji penetrasi kafein dan aminofilin

a. Uji penetrasi kafein

Kurva kalibrasi kafein anhidrat dalam dapar fosfat pH 7,4 pada panjang gelombang 273,5 nm memiliki persamaan $y = 7,0397 \cdot 10^{-3} + 0,0493 x$ dengan harga r sebesar 0,9999. Data dapat dilihat pada Tabel 19 dan Gambar 34 dan 35. Fluks ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{jam}^{-1}$) kafein yang terpenetrasi pada jam ke-8 dari sediaan krim, gel dan salep berturut-turut sebesar $70,10 \pm 0,75$; $444,67 \pm 0,97$ dan $55,39 \pm 5,86$ serta dengan adanya tretinoin berturut-turut sebesar $121,33 \pm 1,55$; $555,47 \pm 4,27$; dan $63,77 \pm 1,04$. Jumlah kumulatif kafein yang terpenetrasi dapat dilihat pada Tabel 23 dan Gambar 44 sedangkan fluks kafein yang terpenetrasi dapat dilihat pada Tabel 24 dan Gambar 45.

b. Uji penetrasi aminofilin

Kurva kalibrasi teofilin dalam dapar fosfat pH 7,4 pada panjang gelombang 272,5 nm memiliki persamaan $y = 1,7499 \cdot 10^{-3} + 0,0561 x$, dengan harga r sebesar 0,9999 dan data dapat dilihat pada Tabel 21 dan Gambar 37 dan Gambar 38. Kadar teofilin dalam aminofilin sebesar 85,15% memenuhi syarat, yaitu tidak kurang dari 84,0% dan tidak lebih dari 87,4% (20). Data penetapan kadar teofilin dalam aminofilin dapat dilihat pada Tabel 21 dan spektrum serapan aminofilin 10 ppm dapat dilihat pada Gambar 39.

Fluks ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{jam}^{-1}$) aminofilin yang terpenetrasi pada jam ke-8 dari sediaan krim, gel dan salep berturut-turut sebesar $86,20 \pm 0,32$; $240,20 \pm 3,00$; dan $22,54 \pm 1,25$ serta dengan adanya tretinoin berturut-turut sebesar

140,33 ± 2,77; 379,45 ± 3,15; dan 27,05 ± 0,78. Jumlah kumulatif aminofilin yang terpenetrasi dapat dilihat pada Tabel 25 dan Gambar 44 sedangkan fluks aminofilin yang terpenetrasi dapat dilihat pada Tabel 26 dan Gambar 45.

B. Pembahasan

1. Pembuatan Sediaan

Sediaan yang akan diuji penetrasinya adalah sediaan yang mengandung kafein atau aminofilin yang dikombinasikan dengan tretinoin dengan kadar kafein sebesar 3% dan aminofilin sebesar 2%, yaitu kadar zat aktif sediaan antiselulit yang beredar di pasaran sedangkan kadar tretinoin sebesar 0,05% pada krim dan salep serta 0,01% pada sediaan gel, yaitu kadar tretinoin dengan sifat iritasi yang masih dapat ditoleransi .

Untuk mengetahui adanya pengaruh tretinoin terhadap penetrasi kafein dan aminofilin maka juga dibuat sediaan yang hanya mengandung kafein atau aminofilin sebagai blanko. Sediaan yang dibuat berupa krim, gel, dan salep. Hal ini dimaksudkan agar dapat mengetahui pelepasan obat dari ketiga bentuk sediaan tersebut, karena sebagaimana diketahui krim adalah emulsi dari minyak dan air, gel memiliki air dengan jumlah yang dominan sedangkan salep hampir seluruh kandungannya fase minyak.

Krim yang dibuat menggunakan emulgator steareth-21 dan steareth-2. Kombinasi steareth-21 dan steareth-2 dipilih karena merupakan stearil

alkohol dengan nilai KHL yang rendah dan tinggi (37). Gel HPMC mengandung alkohol 90% sebanyak 10% untuk melarutkan tretinoin yang kelarutannya sangat kecil dalam air. Basis salep yang digunakan adalah basis serap dikarenakan zat aktif larut dalam air sehingga basis serap dapat menyerap air yang jumlahnya cukup untuk melarutkan zat aktif tersebut, yaitu kafein dan aminofilin.

Nipagin dan nipasol digunakan sebagai antimikroba karena dapat memberikan efek sinergistik. Nipagin larut dalam air sedangkan nipasol hampir tidak larut dalam air (22). Oleh karena itu, kedua pengawet ini akan berguna pada fase air dan fase minyak. Sediaan mengandung BHT yang berguna sebagai antioksidan. Selain itu, BHT juga berguna untuk menstabilkan tretinoin (31). Asam sitrat dan natrium sitrat berguna sebagai pengatur pH. Asam sitrat juga berguna untuk menurunkan pH sediaan karena pH sediaan kafein atau aminofilin terlalu basa, antara 7-8, di atas pH mantel asam kulit.

2. Evaluasi Sediaan

a. Pengamatan organoleptis

Berdasarkan Tabel 4 sampai Tabel 9, sediaan krim, gel, dan salep yang hanya mengandung kafein atau aminofilin tidak mengalami perubahan fisik setelah 8 minggu. Hal ini menunjukkan sediaan stabil secara fisik. Krim kafein dan aminofilin yang mengandung tretinoin mengalami perubahan warna selama penyimpanan 8 minggu. Sediaan mengalami pemudaran

warna. Hal ini dapat disebabkan terjadinya oksidasi BHT sehingga terjadi perubahan warna BHT (22).

b. Pemeriksaan homogenitas

Tabel 4 sampai Tabel 9 menunjukkan sediaan yang mengandung kafein atau aminofilin tetap homogen selama 8 minggu, kecuali gel kafein dengan atau tanpa tretinoin pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Gel tidak homogen karena kafein mengalami rekristalisasi. Rekristalisasi dapat terjadi karena kondisi lewat jenuh.

c. Pengukuran pH

Tabel 4 menunjukkan bahwa terjadi fluktuasi nilai pH yang tidak terlalu besar karena dalam formula terdapat asam sitrat dan natrium sitrat pada sediaan yang mengandung kafein yang berfungsi sebagai *buffering agent* sehingga dapat menjaga pH tetap stabil. Penurunan pH dapat terjadi karena pengaruh CO_2 karena CO_2 bereaksi dengan fase air sehingga membentuk asam.

d. Pemeriksaan viskositas

Kurva aliran dari krim yang mengandung kafein atau aminofilin pada Gambar 18 dan Gambar 24 tidak memperlihatkan adanya *Bingham bodies* karena tidak adanya *yield value*. Sifat alirnya adalah pseudoplastis tiksotropik. Viskositas sediaan berkurang dengan meningkatnya kecepatan geser. Akan tetapi, berdasarkan Gambar 20, Gambar 21, Gambar 26, dan Gambar 27, gel menunjukkan sifat aliran pseudoplastis. Hal ini dikarenakan gel mirip seperti HPMC yang didispersikan dalam air.

Gambar 22, Gambar 23, Gambar 28, dan Gambar 29 menunjukkan rheogram salep kafein dan aminofilin dengan bentuk kurva yang lengkung dan adanya bagian yang linear sehingga dapat ditarik garis lurus yang dapat diekstrapolasikan pada sumbu x. Rheogram tidak melalui titik (0,0) tapi memotong sumbu tekanan geser pada titik tertentu yang dikenal sebagai harga *yield*. Pada harga tekanan geser di bawah harga *yield value*, zat bertindak seperti bahan elastis. Walau harga *yield value* awalnya tinggi, tapi melembut ketika dioleskan dan mudah menyebar.

Hasil pengukuran viskositas sediaan selama 8 minggu dengan menggunakan viskometer Brookfield pada suhu kamar menunjukkan bahwa sediaan krim mengalami penurunan viskositas dari minggu ke-0 ke minggu ke-8. Penurunan viskositas krim kafein dapat disebabkan karena peristiwa rekristalisasi kafein sehingga bentuk fisik krim berubah. Viskositas gel kafein dan aminofilin meningkat selama penyimpanan dikarenakan terjadinya penguapan pelarut sehingga terjadi pemekatan. Akan tetapi, perubahan ini tidak terlihat nyata karena kurva aliran gel pada minggu ke-0 dan minggu ke-8 hampir berhimpitan. Salep mengalami peningkatan viskositas karena penyerapan air pada kandungan sediaan salep tidak baik sehingga terjadi perubahan fisik salep.

e. Pemeriksaan konsistensi

Angka yang terukur pada skala menunjukkan kedalaman penetrasi dari sediaan. Makin besar angka yang ditunjukkan skala maka makin besar pula kedalaman penetrasinya. Berdasarkan Tabel 17, sediaan yang memiliki

kedalaman penetrasi dari yang besar ke yang kecil adalah gel, krim, dan salep. Hal ini dimungkinkan karena salep memiliki viskositas yang terbesar sedangkan gel memiliki viskositas yang terkecil. Selain itu, adanya tretinoin dalam sediaan meningkatkan kedalaman penetrasi karena tretinoin bersifat asam sehingga menurunkan konsistensi dari sediaan.

f. Pengukuran diameter globul rata-rata

Gambar 30 sampai Gambar 32 menunjukkan sediaan tidak stabil karena terjadi rekristalisasi selama penyimpanan 8 minggu. Pengukuran diameter globul rata-rata terhambat karena adanya kristal kafein. Kristal kafein terjadi karena terjadinya kondisi lewat jenuh sehingga kafein mengalami rekristalisasi. Hal ini dapat terjadi karena kafein dilarutkan dalam kondisi adanya panas maka setelah kondisi menjadi lebih dingin kelarutannya menurun. Selain itu, terdapatnya kristal pada sediaan aminofilin dapat disebabkan aminofilin terurai sehingga terbentuk teofilin.

g. Uji mekanik

Uji mekanik dengan sentrifugasi bertujuan untuk mengetahui kestabilan sediaan. Becher menyatakan bahwa sentrifugasi pada 3750 rpm dalam suatu radius 10 cm selama 5 jam setara dengan efek gravitasi kira-kira selama 1 tahun (22). Gambar 33 menunjukkan bahwa adanya pemisahan fase sediaan yang menunjukkan sediaan tidak stabil, kecuali gel yang hanya mengandung kafein atau aminofilin. Pada pengujian ini, sediaan mengalami gaya sentrifugasi sehingga menyebabkan terjadinya pemisahan sediaan karena perbedaan densitas. Air yang memiliki densitas yang lebih besar dari fase

minyak akan mengendap lebih dulu sehingga berada pada dasar wadah. Fase minyak yang memiliki densitas yang lebih kecil akan berada pada bagian atas.

h. *Cycling test*

Cycling test dapat mendorong pertumbuhan partikel dan bisa menunjukkan keadaan yang mungkin terjadi di masa yang akan datang setelah penyimpanan yang lama pada suhu kamar. Berdasarkan Gambar 34, sediaan tetap stabil karena tidak mengalami pemisahan fase dan tetap homogen.

3. Uji penetrasi kafein dan aminofilin

Sediaan yang akan diuji penetrasinya adalah sediaan krim, gel, dan salep yang mengandung kafein atau aminofilin yang dikombinasikan dengan tretinoin. Untuk mengetahui adanya pengaruh tretinoin terhadap penetrasi kafein dan aminofilin maka juga dibuat sediaan hanya mengandung kafein dan aminofilin sebagai blanko. Hal ini ditujukan agar dapat mempelajari pelepasan obat dari ketiga bentuk sediaan tersebut karena sebagaimana diketahui, krim adalah emulsi dari minyak dan air, gel memiliki air dengan jumlah yang dominan sedangkan salep memiliki kandungan fase minyak yang hampir seluruhnya. Semua sediaan yang dibuat mengandung air sebagai pelarut zat aktif karena salah satu tahapan penetrasi per kutan adalah pelarutan zat aktif dalam pembawa (45). Sediaan yang digunakan

untuk uji penetrasi adalah sediaan yang relatif stabil yaitu pada awal pembuatan.

Uji penetrasi secara *in vitro* menggunakan sel difusi Franz dapat mensimulasikan penetrasi obat secara *in vitro*. Cairan yang digunakan untuk uji difusi sebagai cairan reseptor adalah dapar fosfat pH 7,4 yang mensimulasikan cairan fisiologis tubuh. Uji difusi mengikuti hukum Fick yang dapat menunjukkan hasil berupa keadaan tunak (*steady-state*) dari zat aktif yang terpenetrasi.

Kompartemen donor dan reseptor dipisahkan oleh kulit tikus yang tidak berambut sebagai membran karena kulit tersebut memiliki permeabilitas yang hampir mirip dengan permeabilitas kulit manusia (8). Kulit tikus digunakan sebagai membran karena jika dibandingkan dengan kulit manusia, kulit hewan tersedia dalam jumlah yang banyak dan memperkecil variasi antar hewan karena tikus-tikus tersebut dipelihara dengan kondisi dan perlakuan yang sama. Akan tetapi, penggunaan kulit tikus ini juga memiliki kekurangan yaitu permeabilitasnya lebih besar dibandingkan kulit manusia (46). Selain itu, kulit ini memiliki luas penampang yang kecil. Untuk mengatasinya, kulit diambil pada daerah yang sama sehingga memperkecil variasi tempat yang akan digunakan untuk uji penetrasi.

Kulit yang telah diambil disimpan pada suhu 4°C hingga digunakan. Wester *et al* menunjukkan bahwa kulit tidak rusak pada penyimpanan tersebut (42). Sebelum disimpan, lemak-lemak yang menempel dan lapisan subkutan dihilangkan karena penetrasi zat aktif yang diinginkan adalah zat

aktif dapat mencapai subkutan (4). Selain itu, penghilangan lemak tersebut juga mempermudah penanganan kulit yang telah disimpan pada lemari pendingin untuk penggunaan selanjutnya, yaitu ketika uji penetrasi (15).

Sediaan yang mengandung zat aktif ditempatkan pada kompartemen donor dari sel difusi Franz. Sel difusi Franz dapat dilihat pada Gambar 40. Dapar fosfat pH 7,4 ditempatkan pada kompartemen reseptor dan zat aktif atau penetran berdifusi melalui membran dari kompartemen donor ke kompartemen reseptor. Cairan dalam kompartemen donor diaduk dengan batang magnet. Alat ini terjaga suhunya karena adanya *water jacket* yang terhubung dengan termostat bersuhu 37°C seperti pada Gambar 41. Perubahan suhu dapat mempengaruhi penetrasi karena penetrasi bergantung pada temperatur (15). Pengaturan suhu 37°C pada kompartemen reseptor menghasilkan suhu 32°C pada permukaan kulit (9). Akan tetapi, pada penelitian ini tidak dilakukan pengukuran suhu pada permukaan kulit.

Sampel cairan reseptor diambil secara periodik kemudian diganti dengan cairan reseptor yang baru untuk menjaga agar konsentrasi selalu rendah. Keadaan ini disebut keadaan sink (*sink condition*). Kompartemen donor sebagai sumber sedangkan kompartemen reseptor sebagai *sink* (22).

Konsentrasi kafein atau aminofilin yang terpenetrasi diukur menggunakan spektrofotometer karena kafein memiliki gugus kromofor sehingga bisa dideteksi dengan alat tersebut. Selain itu, penggunaan alat tersebut juga efisien. Akan tetapi, penggunaan alat ini memiliki beberapa

kekurangan. Salah satunya adalah mendeteksi senyawa lain yang juga memiliki gugus kromofor. Dalam sediaan zat yang memiliki gugus kromofor selain kafein dan aminofilin adalah tretinoin, nipagin, nipasol, dan BHT. Dalam hal ini, yang mengganggu adalah nipagin. Zat ini memiliki panjang gelombang maksimum 255 nm dan masih memberikan serapan pada panjang gelombang maksimum kafein dan aminofilin. Untuk mengatasinya, dilakukan percobaan blanko yang hanya mengandung basis saja (tanpa zat aktif). Hasilnya adalah nipagin memberikan serapan meskipun nilainya kecil. Oleh karena itu, dikoreksi dengan hasil dari serapan yang diberikan nipagin.

Konsentrasi zat aktif dalam kompartemen reseptor akan naik sampai sistem tersebut mencapai keseimbangan. Bila sistem tersebut telah berada dalam periode waktu yang cukup, konsentrasi zat aktif dalam kompartemen donor dan reseptor menjadi konstan terhadap waktu, tapi tidak sama dalam kedua kompartemen (22).

Laju penetrasi melalui kulit dari zat aktif *in vitro* didapat dari percobaan pada waktu-waktu tertentu, dan jumlah kumulatif zat aktif yang terpenetrasi diplot terhadap waktu dalam satuan jam. Sesudah tercapai *steady-state*, kemiringan garis lurus menghasilkan laju, dM/dt . Akan tetapi, berdasarkan Gambar 42 dan Gambar 44 tidak didapat peningkatan jumlah yang menghasilkan garis lurus. Hal ini menunjukkan kondisi *steady-state* belum tercapai karena waktu percobaan kurang.

Fluks kafein atau aminofilin yang terpenetrasi meningkat pada awal percobaan sebagaimana ditunjukkan Gambar 43 dan Gambar 44 karena

gradien konsentrasi pada awalnya sangat besar sehingga laju penetrasi menjadi besar. Selanjutnya fluks kafein atau aminofilin yang terpenetrasi menurun karena perbedaan konsentrasi menjadi lebih kecil dan masih adanya zat aktif yang berpenetrasi. Berdasarkan hasil yang didapat terlihat adanya peningkatan jumlah zat aktif yang terpenetrasi dari waktu ke waktu sedangkan fluks pada jam ke-6, 7, dan 8 relatif sama sehingga dihasilkan peningkatan jumlah zat aktif terpenetrasi yang hampir sama. Fluks gel yang mengandung kafein atau aminofilin terlihat fluktuatif. Hal tersebut dapat disebabkan gel mengandung alkohol yang mudah menguap sehingga terjadi perubahan pada perbedaan gradien konsentrasi. Untuk mencegah penguapan tersebut, sel difusi yang digunakan ditutup dengan *aluminium foil* (46).

Fluks kafein atau aminofilin yang terpenetrasi dari sediaan gel lebih besar dibandingkan dari sediaan krim dan salep. Hal ini dapat disebabkan gel mengandung alkohol sehingga mempunyai daya absorpsi yang lebih besar dibandingkan dengan pelarut dari bahan dasar air. Selain itu, Sediaan dengan pembawa yang mudah menguap, konsentrasinya dapat berubah menjadi lebih tinggi, sehingga dapat memperbesar daya absorpsi per kutan (12). Fluks sediaan kafein lebih besar daripada fluks sediaan aminofilin karena sediaan kafein mengandung zat aktif dengan kadar yang lebih besar, yaitu 3% sedangkan aminofilin hanya 2%. Hal ini menyebabkan terjadinya gradien konsentrasi yang besar sehingga *driving force* pada sediaan kafein lebih besar.

Berdasarkan hasil penelitian, terlihat peningkatan penetrasi zat aktif dari sediaan yang dikombinasikan dengan tretinoin baik dalam hal jumlah zat aktif yang terpenetrasi maupun fluks dari zat yang terpenetrasi melalui kulit. Hal ini dikarenakan tretinoin dapat menyebabkan iritasi, sehingga mempengaruhi permeabilitas stratum korneum. Hal tersebut dapat menyebabkan zat aktif dapat terpenetrasi melalui kulit dengan lebih mudah.

Tretinoin dapat mempengaruhi stratum korneum karena zat ini dapat menyebabkan kulit mengelupas. Zat yang dapat menyebabkan keratolisis bekerja dengan cara memutus ikatan kovalen sulfhidral yang menyatukan serat protein keratin dan menyebabkan disintegrasi serta terlepasnya lapisan tanduk sehingga kulit menipis (45).

Selain itu, penggunaan retinoid secara topikal juga dapat meningkatkan penguapan air transepidermal atau *Transepidermal Water Loss* (TEWL). Peningkatan TEWL diperkirakan terkait dengan gangguan fungsi barier air stratum korneum karena TEWL merupakan indikator berfungsinya stratum korneum. Peningkatan TEWL dapat mengganggu fungsi barier dari stratum korneum (5).