

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. Lokasi

Penelitian dilakukan di laboratorium Farmasetika, Farmakologi, Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif, dan Farmakognosi, Departemen Farmasi fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok, mulai bulan Februari hingga Maret 2008.

B. Bahan

Kafein anhidrat (Jilin, Cina), aminofilin (Cina), tretinoin (DSM Nutritional Products Ltd., Indonesia), teofilin anhidrat (Jilin, Cina), isopropil miristat (Uniqema, Malaysia), steareth-21, steareth-2 (Cognis, Malaysia), HPMC 4000 (Shin-Etsu, Jepang), lanolin anhidrat (Lanor, Perancis), etanol 90%, BHT, setil alkohol, akuades (Brataco Chemika, Indonesia), parafin cair (Sonneborn, Australia), propilen glikol (Dow Chemical Co., Jerman), metilparaben, propilparaben (Clariant UK Ltd., Inggris), kalium dihidrogen fosfat, asam sitrat, natrium sitrat (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Mallinckrodt,

Swedia), hewan coba: tikus betina strain Sprague Dawley usia 2-3 bulan dengan berat \pm 150 gram (Institut Pertanian Bogor, Indonesia).

C. Peralatan

Sel difusi Franz dengan volume kompartemen reseptor 14,0 ml (Bengkel Gelas Institut Teknologi Bandung, Indonesia), Spektrofotometer Shimadzu UV-1601 (Shimadzu Scientific Instrument Inc., Jepang), pH meter Eutech-510 (Spectronic Analytical Instrument, Inggris), viskometer Brookfield tipe RVF (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Amerika Serikat), mikroskop optik Nikon Eclipse E-200 (Nikon Instrument Inc., Amerika Serikat), kamera digital DSC-600 (Sony, Jepang), timbangan analitik Adam AFA 210-LC (Adam, Amerika Serikat), homogenizer Multimix CKL (Omni-Multimix Inc., Malaysia), termostat (Julabo, Jerman), pengaduk magnetik (Wiggen Hauser), penetrometer Herz 009 (Humboldt Mfg Co., Jerman), penangas air, termometer, jangka sorong Vernier Caliper Tricle Brand (Hangzou SDK Measuring Tool Co. Ltd., Cina), oven (Beschikking), gunting bedah (Gold Cross, Jepang), lemari pendingin (Toshiba, Jepang), pisau cukur Gillete Goal (The Gillete Company, Jerman), alat sentrifugasi Kubota 5100 (Kubota Corp., Jepang), *syringe* 1 ml (Terumo Corp., Filipina) dan alat-alat gelas (Schott Duran, Jerman).

D. Cara Kerja

1. Pembuatan Sediaan

Sediaan dibuat tiga bentuk, yaitu krim, gel, dan salep serta mengandung bahan aktif kafein atau aminofilin dengan atau tanpa adanya tretinoin. Sediaan yang dibuat dinamai menggunakan kode berupa dua huruf. Huruf pertama menunjukkan bentuk sediaan, yaitu huruf K untuk krim, huruf G untuk gel, dan huruf S untuk salep. Huruf kedua menunjukkan zat aktif yang dikandungnya, yaitu huruf K untuk kafein dan huruf A untuk aminofilin. Karena ada tretinoin sebagai zat aktif yang ditambahkan maka sediaan yang ditambahkan tretinoin ditambahkan kode +T. Sebagai contoh, kode KK mewakili krim yang hanya mengandung kafein sedangkan kode KK+T mewakili krim yang mengandung kafein dan tretinoin.

a. Krim

Krim dibuat dalam empat formulasi. Krim KK dan KK+T sama-sama mengandung kafein tapi krim KK tidak mengandung tretinoin. Krim KA+T dan KA mengandung aminofilin tapi krim KA tidak mengandung tretinoin. Formulasi yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Untuk membuat krim KK+T adalah sebagai berikut:

- 1) Bahan-bahan fase minyak meliputi setil alkohol, isopropil miristat, dan steareth-2, dipanaskan di cawan porselen di atas penangas air pada suhu 70°C, sambil diaduk hingga homogen.

- 2) Bahan-bahan fase air meliputi propil paraben, metil paraben steareth-21 dan propilen glikol dipanaskan di cawan porselen di atas penangas air pada suhu 70°C, sambil diaduk hingga homogen.
- 3) Sebelum dilakukan pencampuran dengan fase air, BHT dan tretinoin dimasukkan ke dalam fase minyak.
- 4) Kafein, asam sitrat dan natrium sitrat dilarutkan dalam air panas, aduk hingga larut.
- 5) Selanjutnya, semua bahan dicampur kemudian diaduk dengan homogenizer pada suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$ dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.
- 6) Setelah homogen, massa krim dibiarkan hingga dingin.

Krim KK dibuat dengan cara sama seperti krim KK+T, tetapi pada krim KK tidak menggunakan tretinoin. Krim KA+T dibuat dengan cara sama seperti KK+T tetapi krim KA+T mengandung aminofilin yang dilarutkan terlebih dahulu dengan air sesaat sebelum dilakukan pencampuran. Krim KA dibuat dengan cara sama seperti krim KA+T tetapi krim KA tidak mengandung tretinoin.

b. Gel

Gel dibuat dalam empat formulasi. Gel GK+T menggunakan bahan aktif kafein dan tretinoin. Gel GA menggunakan bahan aktif aminofilin dan tretinoin. Gel GK dan GA tidak mengandung bahan aktif tretinoin dan hanya

mengandung kafein dan aminofilin. Formulasi yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 2.

Gel GK+T dibuat sebagai berikut:

- 1) HPMC didispersikan ke dalam air, didiamkan selama 30 menit hingga terdispersi sempurna kemudian diaduk dengan pengadukan cepat sampai terdispersi sempurna dan terbentuk basis gel.
- 2) Metilparaben dan propilparaben dilarutkan dalam propilen glikol. Setelah larut sempurna ditambahkan ke dalam basis gel.
- 3) Kafein, asam sitrat dan natrium sitrat dilarutkan dalam air panas kemudian dimasukkan ke dalam basis gel.
- 4) BHT dan tretinoin yang telah dilarutkan terlebih dahulu dengan etanol 90% ditambahkan ke dalam sediaan gel kemudian dicampur hingga homogen.

Gel GA+T dibuat dengan cara sama seperti gel GK+T hanya saja mengandung aminofilin sehingga aminofilin terlebih dahulu dilarutkan dengan air kemudian dimasukkan ke dalam basis. Gel GK juga dibuat dengan cara yang sama seperti gel GK+T hanya saja gel GK tidak mengandung tretinoin. Gel GA juga dibuat dengan cara yang sama seperti gel GA+T hanya saja pada gel GA+T tidak mengandung tretinoin.

c. Salep

Salep dibuat dalam empat formulasi. Salep SK+T menggunakan bahan aktif kafein dan tretinoin. Salep SA+T menggunakan bahan aktif aminofilin dan tretinoin. Salep SK dan SA tidak mengandung bahan aktif tretinoin dan hanya mengandung kafein dan aminofilin. Formulasi yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.

Salep dibuat dengan cara:

- 1) Semua bahan fase minyak (lanolin anhidrat dan parafin cair, dan nipasol) dipanaskan di cawan porselen di atas penangas air pada suhu 70°C hingga melebur. Bahan diaduk kuat untuk mempercepat pelelehan dan untuk mencampurkan bahan-bahan tersebut.
- 2) Kafein, metil paraben, asam sitrat dan natrium sitrat dilarutkan dalam air panas.
- 3) Selanjutnya bahan-bahan basis diangkat dari pemanas kemudian BHT dan tretinoin ditambahkan ke dalamnya.
- 4) Setelah itu, dilakukan pencampuran dengan larutan kafein dengan pengadukan yang kuat hingga dingin dan terbentuk massa salep.

Salep SA+T dibuat dengan cara sama seperti salep SK+T hanya saja salep SA+T mengandung aminofilin maka aminofilin dilarutkan dalam air terlebih dahulu kemudian dicampur dengan bahan pembentuk basis yang telah dilelehkan. Salep SK dibuat dengan cara sama seperti salep SK+T

hanya saja tidak menggunakan tretinoin. Salep SA dibuat dengan cara sama seperti salep SA+T tetapi tidak menggunakan tretinoin.

2. Evaluasi Sediaan

Uji terhadap sediaan krim, gel, dan salep dilakukan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$, $\pm 40^{\circ}\text{C}$ dan pada suhu $\pm 29^{\circ}\text{C}$. Pemeriksaan organoleptis, homogenitas, dan pH dilakukan tiap dua minggu selama 2 bulan.

a. Pengamatan organoleptis

Penampilan dari formulasi diamati warna dan baunya.

b. Pemeriksaan homogenitas

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

c. Pengukuran pH

Nilai pH diukur menggunakan pH meter. Sebelum pengukuran, elektroda dikalibrasi dengan dapar standar pH 4 dan pH 7. pH diukur dengan cara mencelupkan elektroda ke dalam formulasi. Nilai pH yang muncul di layar dicatat.

d. Pemeriksaan viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan menggunakan viskometer Brookfield pada suhu kamar. Formulasi dimasukkan ke dalam wadah, kemudian spindel diturunkan hingga batas spindel tercelup ke dalam formulasi, kemudian motor dinyalakan dengan menekan tombol *on*.

Kecepatan alat diatur mulai dari 2, 4, 10, 20 rpm kemudian dibalik 20, 10, 4, 2 rpm. Dari masing-masing pengukuran dengan perbedaan rpm skala dibaca ketika jarum merah yang bergerak telah stabil. Nilai viskositasnya kemudian dihitung. Viskositas diukur pada waktu awal ($t = 0$) dan setelah 2 bulan.

e. Pengukuran konsistensi

Sediaan yang akan diperiksa dimasukkan ke dalam wadah khusus dan diletakkan pada meja penetrometer. Permukaan sediaan harus tegak lurus dengan alat penetrometer. Peralatan diatur hingga ujung kerucut menyentuh bayang permukaan krim yang dapat diperjelas dengan menghidupkan lampu. Batang pendorong dilepas dengan mendorong tombol start dan biarkan hingga 5 detik. Angka penetrasi dibaca lima detik setelah kerucut menembus sediaan. Skala menunjukkan kedalaman penetrasi, dengan skala sepersepuluh millimeter (39).

f. Pengukuran diameter globul rata-rata

Formulasi diletakkan di atas 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 rata-rata dihitung dan dikalikan dengan faktor kalibrasi.

g. Uji mekanik

Uji ini dilakukan dengan cara mensentrifugasi sediaan dengan kecepatan 3800 rpm selama 5 jam (23).

h. *Cycling test*

Cycling test dilakukan dengan cara menaruh sediaan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ dan $\pm 40^{\circ}\text{C}$ masing-masing selama 24 jam dan dilakukan 6 siklus.

3. Uji penetrasi kafein dan aminofilin (40, 41)

a. Uji penetrasi kafein

1) Pembuatan larutan dapar fosfat pH 7,4

50,0 ml kalium dihidrogen fosfat 0,2 M dicampur dengan 39,1 ml NaOH 0,2 N kemudian diencerkan dengan air bebas CO_2 secukupnya hingga 200,0 ml. pH disesuaikan hingga didapat pH sebesar 7,4.

2) Pembuatan kurva kalibrasi kafein

Kafein ditimbang seksama sebanyak $\pm 100,0$ mg kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat pH 7,4 dalam labu ukur 100,0 ml. Larutan yang diperoleh mempunyai konsentrasi sebesar 1.000 ppm. Larutan induk ini dipipet sebanyak 10,0 ml kemudian diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 hingga 100,0 ml. Larutan yang diperoleh memiliki konsentrasi sebesar 100 ppm. Larutan kafein 100 ppm diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 hingga diperoleh konsentrasi 5, 6, 7, 10, 12, 15 ppm. Pengukuran serapan larutan 10 ppm

dilakukan dari panjang gelombang 200 nm sampai 400 nm kemudian panjang gelombang maksimumnya ditentukan dari spektrum serapan yang didapat. Dari masing-masing larutan ini, serapannya diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan dibuat kurva kalibrasinya.

3) Uji penetrasi kafein

Tikus dibius dengan menggunakan eter hingga mati. Selanjutnya keempat kakinya diikat di atas papan alas. Bulu tikus dicukur hati-hati menggunakan pisau cukur. Setelah itu kulit tikus disayat pada bagian perut. Bagian subkutan dan lemak-lemak yang menempel dihilangkan terlebih dahulu secara hati-hati menggunakan tangan (15). Kulit disimpan dalam dapar fosfat pH 7,4 pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (42). Sebelum digunakan, kulit didiamkan hingga mencapai suhu kamar, yaitu selama ± 1 jam (43).

Dapar fosfat pH 7,4 dimasukkan sebanyak 14,0 ml pada kompartemen reseptor. Kulit ditempatkan di antara kompartemen sel donor dan reseptor. Kompartemen reseptor diaduk menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan 300 rpm. Sampel lebih kurang satu gram diaplikasikan pada kompartemen donor. Temperatur dijaga pada *water jacket* dengan suhu $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ menggunakan termostat.

Sampel diambil sebanyak 0,5 ml pada waktu 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 480 menit. Setiap kali sampel diambil,

larutan penerima ditambah 0,5 ml untuk mengganti yang terambil. Selanjutnya sampel diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 dalam labu ukur 5,0 ml hingga tanda kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum untuk mengetahui kadarnya. Percobaan dilakukan tiga kali. Jumlah kumulatif kafein yang terpenetrasi dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (44):

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

dimana:

Q= jumlah kumulatif yang terpenetrasi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

V= volume sel = 14,0 ml

S= volume pengambilan sampel = 0,5 ml

A= luas permukaan membran = 1,8376 cm^2

C_n = jumlah yang terpenetrasi pada pengambilan ke-n
($\mu\text{g}/\text{ml}$)

$\sum C_i$ = jumlah yang terpenetrasi pada interval pengambilan sampel 1 hingga n-1

b. Uji penetrasi aminofilin

1) Pembuatan kurva kalibrasi teofilin anhidrat

Teofilin anhidrat ditimbang seksama sebanyak $\pm 100,0$ mg.

Kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat pH 7,4 dalam labu ukur

100,0 ml. Larutan yang diperoleh mempunyai konsentrasi sebesar 1000 ppm. Larutan induk ini dipipet sebanyak 10,0 ml kemudian diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 hingga 100,0 ml. Larutan yang diperoleh memiliki konsentrasi sebesar 100 ppm. Larutan induk ini dipipet dan diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 hingga diperoleh konsentrasi 5, 6, 8, 9, 10, dan 12 ppm. Pengukuran serapan larutan 10 ppm dilakukan dari panjang gelombang 200 nm sampai 400 nm kemudian panjang gelombang maksimumnya ditentukan dari spektrum serapan yang didapat. Dari masing-masing larutan ini diukur serapannya pada panjang gelombang maksimumnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan dibuat kurva kalibrasinya.

2) Penetapan kadar teofilin dalam aminofilin

Aminofilin ditimbang seksama sebanyak $\pm 100,0$ mg. Kemudian dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 100,0 ml. Larutan yang diperoleh mempunyai konsentrasi sebesar 1000 ppm. Larutan induk ini dipipet sebanyak 10,0 ml kemudian diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 hingga 100,0 ml. Larutan yang diperoleh memiliki konsentrasi sebesar 100 ppm. Selanjutnya, larutan aminofilin 100 ppm dipipet dan diencerkan hingga mendapat konsentrasi sebesar 10 ppm. Larutan 10 ppm ini diukur serapannya pada gelombang maksimumnya kemudian dihitung kadar teofilinnya dengan menggunakan kurva kalibrasi.

3) Uji penetrasi aminofilin

Tikus dibius dengan menggunakan eter hingga mati. Selanjutnya keempat kakinya diikat di atas papan alas. Bulu tikus dicukur hati-hati menggunakan pisau cukur. Setelah itu kulit tikus disayat pada bagian perut. Lemak-lemak yang menempel dan bagian subkutan dihilangkan terlebih dahulu secara hati-hati menggunakan tangan (15). Kulit disimpan dalam dapar fosfat pH 7,4 pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (42). Sebelum digunakan, kulit didiamkan hingga mencapai suhu kamar, yaitu selama ± 1 jam (43).

Dapar fosfat pH 7,4 dimasukkan sebanyak 14,0 ml pada kompartemen reseptor. Kulit ditempatkan di antara kompartemen sel donor dan reseptor. Kompartemen reseptor diaduk menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan 300 rpm. Sampel lebih kurang satu gram diaplikasikan pada kompartemen donor. Temperatur dijaga pada *water jacket* dengan suhu $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ menggunakan termostat.

Sampel diambil sebanyak 0,5 ml pada waktu 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 480 menit. Setiap kali sampel diambil, larutan penerima ditambah 0,5 ml dapar fosfat pH 7,4 untuk mengganti yang terambil. Setelah itu, sampel diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 dalam labu ukur 5,0 ml hingga tanda, kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya untuk mengetahui kadarnya. Kadar ditentukan

sebagai teofilin anhidrat yang larut kemudian dikonversi menjadi kadar aminofilin yang terpenetrasi dengan menggunakan kadar teofilin yang terkandung dalam aminofilin. Percobaan dilakukan tiga kali.

