



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PREPARASI DAN KARAKTERISASI FILM BIOADHESIF  
UNTUK PENGHANTARAN BUKAL INSULIN DENGAN  
MENGUNAKAN KITOSAN-N-ASETIL SISTEIN**

**TESIS**

**PIETRADEWI HARTRIANI  
0806477075**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM MAGISTER FARMASI  
DEPOK  
JUNI 2011**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PREPARASI DAN KARAKTERISASI FILM BIOADHESIF  
UNTUK PENGHANTARAN BUKAL INSULIN DENGAN  
MENGUNAKAN KITOSAN-N-ASETIL SISTEIN**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister**

**PIETRADEWI HARTRIANI  
0806477075**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM MAGISTER FARMASI  
ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
JUNI 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

**Nama : Pietradewi Hartrianti**

**NPM : 0806477075**

**Tanda Tangan : **

**Tanggal : 9 Juni 2011**

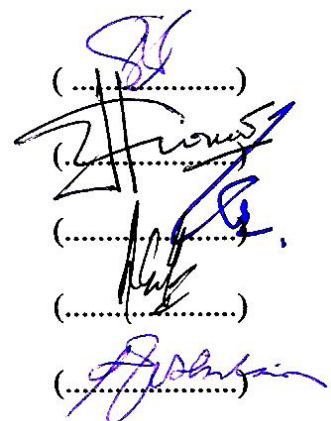
## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Pietradewi Hartrianti  
NPM : 0806477075  
Program Studi : Ilmu Kefarmasian  
Judul Tesis : Preparasi dan Karakterisasi Film Bioadhesif  
Untuk Penghantaran Bukal Insulin dengan  
Menggunakan Kitosan-N-Asetil Sistein

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

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc.  
Pembimbing : Prof. Dr. Effionora Anwar, M.S.  
Penguji : Dr. Iskandarsyah, M.S.  
Penguji : Dr. Arry Yanuar, M.Si.  
Penguji : Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, M.S., Ph.D



(.....)  
(.....)  
(.....)  
(.....)  
(.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 6 Juli 2011

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT atas berkah dan rahmatnya sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister dalam Jurusan Ilmu Kefarmasian, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan, penelitian, sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc. selaku dosen pembimbing pertama atas waktu, masukan dan bimbingan yang telah diberikan.
- (2) Prof. Dr. Effionora Anwar, M.S. selaku dosen pembimbing kedua dan Ketua Program Pascasarjana Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
- (3) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S. selaku Ketua Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
- (4) Seluruh dosen/staf pengajar Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
- (5) Seluruh laboran dan karyawan Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
- (6) Orang tua dan keluarga yang telah memberikan dukungan material dan moral.
- (7) Sahabat yang telah membantu saya dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, 3 Juni 2011

Penulis

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

---

---

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

Nama : Pietradewi Hartrianti  
NPM : 0806477075  
Program Studi : Ilmu Kefarmasian  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Tesis

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

**PREPARASI DAN KARAKTERISASI FILM BIOADHESIF UNTUK PENGHANTARAN BUKAL INSULIN DENGAN MENGGUNAKAN KITOSAN-N-ASETIL SISTEIN**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, 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 : 9 Juni 2011

Yang menyatakan



Pietradewi Hartrianti

## ABSTRAK

Nama : Pietradewi Hartrianti  
Program studi : Ilmu Kefarmasian  
Judul : Preparasi dan Karakterisasi Film Bioadhesif untuk Penghantaran Insulin dengan Menggunakan Kitosan-N-Asetil Sistein

Penggunaan film mukoadhesif dengan sifat fleksibel dan berpori yang diproduksi dari kitosan-N-asetil sistein sebagai sistem penghantaran insulin melalui rute bukal telah diteliti. Kitosan-N-asetil sistein (KNAC) didapatkan melalui reaksi antara kitosan dengan N-asetil sistein yang dimediasi karbodiimida. Hasil sintesis KNAC kemudian dikarakterisasi dalam hal jumlah gugus tiol, spektrum IR, serta kemampuan mengembang. KNAC tersebut kemudian dibuat menjadi sediaan film dengan metode *solvent casting* yang dilanjutkan dengan pengeringan beku. Film yang dihasilkan kemudian dikarakterisasi morfologi permukaan film serta kekuatan dan waktu mukoadhesinya. Selain itu, pelepasan dan difusi insulin dari film KNAC juga dilaksanakan pada penelitian ini. Untuk membandingkan efek hipoglikemik *in vivo*, sejumlah tikus sehat diberikan film insulin KNAC secara bukal dengan injeksi insulin subkutan sebagai pembandingnya. Hasil dari sintesis KNAC menunjukkan kandungan gugus tiol bebas yang tinggi ( $423,28 \pm 12,99$   $\mu\text{mol}$  per gram polimer) dengan kemampuan mengembang hingga 1,5 kali berat awalnya. Film dari KNAC yg disintesis menunjukkan gaya mukoadhesi dan waktu mukoadhesi secara berturut-turut hingga mencapai 1,25 kali dan 2,4 kali dibandingkan film kitosan yang tidak dimodifikasi ( $p < 0.05$ , t-test). Hasil uji juga menunjukkan bahwa film KNAC dapat memberikan pelepasan dan difusi obat secara berturut-turut hingga 95 % dalam 30 menit dan 70 % dalam 3 jam. Film insulin KNAC yang diberikan melalui rute bukal mampu memberikan efek hipoglikemik hingga 65,46 % dari kadar gula darah awal. Selain itu, hasil availabilitas farmakologi dari film insulin KNAC terhadap injeksi insulin subkutan mencapai 18,91%. Sebagai kesimpulan, penelitian ini memberikan gambaran bahwa film kitosan-NAC memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai pembawa dalam penghantaran bukal insulin dan makromolekul lainnya.

Kata kunci : Kitosan-N-asetil sistein, Penghantaran bukal, Insulin, Film bioadhesif, Mukoadhesif

## ABSTRACT

Name : Pietradewi Hartrianti  
Study Program : Pharmaceutical sciences  
Title : Preparation and Characterization of Bioadhesive Film for Buccal Delivery of Insulin using Chitosan-N-Acetyl Cysteine

The development of a new porous and flexible mucoadhesive films based on chitosan-N-acetyl cysteine (Ch-NAC) for potential buccal delivery system of insulin was carried out in this study. Ch-NAC was synthesized from carbodiimide-mediated reaction between chitosan and N-acetyl cysteine. The obtained Ch-NAC was then characterized by determining the thiol group content, FT-IR spectra and swelling ability. The Ch-NAC was then prepared into insulin-containing film by a simple solvent casting method followed with subsequent freeze drying. The resulting film was then observed in terms of morphology and mucoadhesion properties. Moreover, the diffusion and release study of insulin from the Ch-NAC film was also studied. The hypoglycaemic effect of buccally administered insulin containing Ch-NAC film compared to subcutaneous insulin injection was then observed using healthy rats. The obtained Ch-NAC showed high free thiol group content ( $423,28 \pm 12,99 \mu\text{mol}$  per gram polymer) and swelling ability up to 1.5 times its initial weight. The insulin-containing Ch-NAC films showed up to 1.25 and 2.4 times mucoadhesion force and mucoadhesion time compared to chitosan film as blanks, respectively ( $p < 0.05$ , t-test). The Ch-NAC films were able to show sufficient diffusion of insulin up to 70 % within 3 hours and provide 95 % release of insulin within 30 minutes. The insulin-containing Ch-NAC films which were buccally administered reached hypoglycemic effect up to 65,46 % of initial blood glucose level. The insulin pharmacological availability of the buccally administered Ch-NAC films compared to subcutaneous injection were 18,91 %. These results suggested that Ch-NAC films were a promising carrier for buccal delivery of insulin and other macromolecules.

Keywords: Chitosan-N-acetyl cysteine, Buccal delivery, Insulin, Bioadhesive film, Mucoadhesive



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	v
ABSTRAK.....	vi
DAFTAR ISI.....	Viii
DAFTAR GAMBAR.....	X
DAFTAR TABEL.....	Xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	Xii
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Hipotesis Penelitian.....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Fisiologi Mukosa Oral.....	4
2.2 Mukoadhesi.....	6
2.3 Film Mukoadhesif.....	7
2.4 Insulin.....	8
2.5 Kitosan.....	10
2.6 N-asetil sistein.....	11
2.7 Gliserin.....	12
2.8 Pembentukan Ikatan Amida yang Dimediasi Karbodiimida.....	13
2.9 Penentuan Jumlah Gugus Tiol dengan Reagen Ellman.....	15
<b>3. METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>16</b>
3.1 Bahan.....	16
3.2 Alat.....	16
3.3 Pembuatan Larutan Buffer.....	16
3.4 Sintesis dan Karakterisasi kitosan-N-asetil sistein.....	16
3.4.1 Sintesis kitosan-N-asetil sistein.....	17
3.4.2 Pemisahan Hasil Sintesis.....	17
3.4.3 Penentuan Jumlah Gugus Tiol Bebas.....	18
3.4.4 Penentuan Jumlah Gugus Tiol Total.....	18
3.4.5 Pengukuran Menggunakan FT-IR.....	19
3.4.6 Viskositas dan Rheologi.....	19
3.4.7 Uji <i>Swelling</i> .....	19
3.5 Pembuatan Film kitosan-N-asetil sistein.....	20
3.6 Morfologi.....	20
3.7 Uji Kekuatan Mukoadhesi.....	20
3.8 Uji Waktu Mukoadhesi.....	21
3.9 Uji Difusi Insulin <i>In vitro</i> .....	21
3.10 Uji Pelepasan Insulin <i>In vitro</i> .....	21
3.11 Analisis Insulin Menggunakan KCKT.....	22

3.12 Uji <i>In vivo</i> .....	22
3.13 Perhitungan Availabilitas Farmakologi.....	23
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>24</b>
4.1 Sintesis dan Karakterisasi kitosan-N-asetil sistein.....	24
4.1.1 Sintesis kitosan-N-asetil sistein.....	24
4.1.2 Pemisahan Hasil Dialisis.....	24
4.1.3 Jumlah Gugus Tiol bebas dan Tiol Total.....	26
4.1.4 Spektrum IR.....	27
4.1.5 Viskositas dan Rheologi.....	28
4.1.6 <i>Swelling</i> .....	29
4.2 Pembuatan film kitosan-N-asetil sistein/Insulin.....	30
4.3 Morfologi.....	31
4.4 Kekuatan dan Waktu Mukoadhesi.....	32
4.5 Difusi Insulin <i>In Vitro</i> .....	33
4.6 Pelepasan Insulin <i>In Vitro</i> .....	34
4.7 Hasil Uji <i>In Vivo</i> .....	35
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>40</b>
<b>DAFTAR REFERENSI.....</b>	<b>41</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>44</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Skema matriks film dan arah pelepasan obat.....	8
Gambar 2.2	Susunan asam amino insulin manusia.....	10
Gambar 2.3	Struktur formula kitosan yang tersusun dari kopolimer Glukosamin (RH) dan N-Asetilglukosamin (RCOCH <sub>3</sub> ).....	10
Gambar 2.4	Struktur N-asetil sistein.....	11
Gambar 2.5	Struktur gliserin.....	12
Gambar 2.6	Reaksi pembentukan ikatan amida yang dimediasi oleh karbodiimida antara N-asetil sistein dengan kitosan.....	14
Gambar 2.7	Struktur asam -5-5'-ditiobis-2-dinitrobenzoat (DTNB).....	15
Gambar 2.8	Reaksi gugus tiol dengan reagen Ellman/DTNB...	15
Gambar 4.1	Serbuk (a) kitosan (b) kitosan-N-asetil sistein.....	24
Gambar 4.2	Spektrum IR kitosan dan kitosan-N-asetil sistein.....	27
Gambar 4.3	Reogram dari larutan (a) kitosan-N-asetil sistein dan (b) kitosan.....	28
Gambar 4.4	Film kitosan-N-asetil sistein.....	29
Gambar 4.5	Hasil SEM dari (a) irisan melintang film perbesaran 200 kali (b) irisan melintang film perbesaran 500 kali (c) permukaan film perbesaran 1000 kali dan (d) permukaan film perbesaran 3000 kali.....	30
Gambar 4.6	Kurva jumlah kumulatif insulin terhadap waktu.....	32
Gambar 4.7	Kurva jumlah kumulatif insulin terhadap waktu.....	33
Gambar 4.8	Kurva persen kadar gula darah dari kadar gula darah awal terhadap waktu.....	35

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Jumlah gugus tiol bebas dan jumlah gugus tiol total ( $\mu\text{mol}$ per gram polimer).....	26
Tabel 4.2	Hasil indeks <i>swelling</i> kitosan dan kitosan-N-asetil sistein.....	29
Tabel 4.3	Gaya mukoadhesi dan waktu mukoadhesi film kitosan dan kitosan-N-asetil sistein.....	31



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Tabel viskositas larutan kitosan-N-asetil sistein dengan konsentrasi 0,92 % .....	44
Lampiran 2	Tabel viskositas larutan kitosan dengan konsentrasi 0,92 %.....	44
Lampiran 3	Tabel data perbandingan luas puncak insulin dengan metil paraben sebagai baku dalam pada medium dapat fosfat pH 7,4 yang dianalisis menggunakan KCKT pada panjang gelombang 214 nm dengan persamaan regresi linier $y = 0,0262x - 0,1279$ dan $r = 0,9991$ .....	45
Lampiran 4	Tabel data rata-rata persen insulin terdifusi <i>in vitro</i> .....	45
Lampiran 5	Tabel data rata-rata pelepasan insulin <i>in vitro</i> .....	46
Lampiran 6	Tabel data rata-rata uji <i>in vivo</i> .....	46
Lampiran 7	Tabel data difusi insulin.....	47
Lampiran 8	Tabel data pelepasan insulin.....	48
Lampiran 9	Tabel data uji efek hipoglikemik <i>in vivo</i> .....	49
Lampiran 10	Perhitungan jumlah gugus tiol bebas dan tiol total.....	50
Lampiran 11	Perhitungan difusi dan pelepasan.....	51
Lampiran 12	Perhitungan fluks difusi insulin.....	52
Lampiran 13	Perhitungan area di atas kurva pada uji <i>in vivo</i> .....	53
Lampiran 14	Gambar kromatogram insulin konsentrasi 121 ppm dengan penambahan baku dalam metal paraben. Kondisi : kolom C18 (150 x 4,6 mm) fase gerak asetonitril- larutan asam trifluoroasetat 0,1 % (31:69), kecepatan alir 1,2 mL/menit dan detector UV pada panjang gelombang 214,0 nm.....	54
Lampiran 15	Gambar kurva kalibrasi insulin dengan menggunakan KCKT....	54
Lampiran 16	Gambar sel difusi horizontal.....	55
Lampiran 17	Gambar texture analyzer TX2.....	55
Lampiran 18	Sertifikat analisa N-asetil sistein.....	56
Lampiran 19	Sertifikat analisa kitosan.....	57
Lampiran 20	Sertifikat analisa insulin.....	58
Lampiran 21	Sertifikat analisa EDAC HCl.....	59
Lampiran 22	Sertifikat analisa DTNB.....	60
Lampiran 23	Sertifikat analisa metil paraben.....	61

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bagi penderita diabetes yang bergantung pada insulin, injeksi insulin merupakan satu-satunya cara untuk menghantarkan insulin ke sirkulasi sistemik. Akan tetapi, terapi insulin dengan menggunakan injeksi ini seringkali memiliki berbagai keterbatasan (Carino dan Mathiowitz, 1999). Terapi insulin dengan injeksi menyebabkan rasa sakit dan juga memiliki kemungkinan terjadinya infeksi. Ketidaknyamanan ini makin bertambah bagi pasien yang harus mendapatkan terapi insulin setiap hari (Zambanini et al. 1999). Oleh karena itu, banyak usaha dilakukan untuk menghantarkan insulin dengan kenyamanan yang lebih baik melewati rute alternatif selain injeksi (Owens, Zinman dan Bolli, 2003). Rute oral yang merupakan rute konvensional yang nyaman memiliki keterbatasan antara lain lingkungan pH yang ekstrem, degradasi enzimatis dan masalah permeabilitas insulin melewati membran gastrointestinal (Bonder et al, 1984, Goldberg dan Gomez-Orellana, 2003, Damge, Maincent dan Ubrich, 2007). Alasan tersebut menyebabkan para peneliti mencari rute alternatif lain.

Salah satu rute alternatif yang diteliti saat ini adalah rute bukal. Rute bukal memiliki kelebihan yaitu memiliki aliran darah yang cukup tinggi, lebih tinggi daripada area sublingual. Selain itu, pemberian melalui rute bukal lebih mudah untuk diakses dan penghentian pemberian obat juga lebih mudah. Kelebihan rute bukal dibandingkan rute oral antara lain, menghindari lingkungan saluran cerna yang ber-pH rendah dan menghindari metabolisme lintas pertama di hati. Kelebihan rute bukal dibandingkan rute transdermal adalah membran pada area bukal yang memiliki permeabilitas yang relatif tinggi dibandingkan dengan membran kulit, walaupun sedikit lebih rendah dibandingkan area sublingual. Akan tetapi rute bukal juga memiliki keterbatasan antara lain permeabilitas membrannya yang rendah dibandingkan dengan membran sublingual, luas area yang terbatas (sekitar 50 cm<sup>2</sup>) dan sekresi saliva secara terus menerus yang dapat berujung pada terlarutnya obat dan membatasi waktu tinggal obat di rongga mulut (Salamat-Miller, Chittchang dan Johnston, 2005, Touitou dan Barry, 2007).

Salah satu masalah utama dalam penghantaran obat melalui mukosa oral adalah retensi dari *device* pada area membran yang diinginkan untuk periode waktu yang cukup panjang agar dapat terjadi absorpsi obat dan dapat tercapai kadar obat dalam darah yang cukup. Agar hal yang disebutkan sebelumnya dapat terjadi, sistem bioadhesif didesain untuk tetap tinggal dan mempertahankan kontak dengan membran mukosa yang menyelubungi epitel. Sistem ini juga seringkali disebut sebagai “mukoadhesif”, dan sistem ini dapat mengisolasi penghantaran obat dari beberapa faktor lingkungan di rongga mulut serta membuat obat dapat diabsorpsi hanya pada daerah spesifik pada mukosa oral. Dengan alasan tersebut maka kontak sediaan dengan mukosa menjadi diperpanjang dan sistem ini juga memungkinkan untuk didesain agar dapat mengontrol laju pelepasan obat (Touitou dan Barry, 2007).

Sediaan bukal dapat dibuat dalam bentuk *lozenges*, permen karet kunyah, *spray* dan juga tablet. Selain itu juga terdapat beberapa sistem sediaan mukoadhesif dengan bentuk sediaan film dan tablet mukoadhesif. Dari sediaan di atas, sediaan film mukoadhesif memiliki kelebihan dibandingkan sediaan tablet karena memiliki luas permukaan kontak yang lebih besar dan bersifat lebih fleksibel, sehingga lebih nyaman digunakan. Selain itu, sediaan berbentuk film sesuai untuk zat aktif yang poten yaitu zat aktif yang membutuhkan dosis kecil untuk memberikan efek, seperti insulin (Touitou dan Barry, 2007).

Salah satu polimer alami yang memiliki sifat mukoadhesi adalah kitosan. Kitosan merupakan polimer yang terdiri dari kopolimer glukosamin dan N-asetilglukosamin dan merupakan produk deasetilasi parsial dari Kitin yang dapat berasal dari cangkang hewan *Crustacean* seperti udang dan kepiting. Kitosan diketahui merupakan polimer yang biodegradabel dan telah disetujui penggunaannya sebagai eksipien farmasi (Rowe, Sheskey dan Quinn, 2009). Berbagai modifikasi telah dilakukan terhadap kitosan untuk meningkatkan sifat mukoadhesinya. Salah satu modifikasi yang tengah diteliti adalah penambahan konjugat yang mengandung gugus tiol seperti sistein. (Salamat-Miller, Chittchang dan Johnston, 2005). Modifikasi ini dilakukan dengan melakukan reaksi yang dimediasi oleh karbodiimida (1-etil-3-dimetilaminopropil karbodiimida hidroklorida//EDAC HCl) untuk menggabungkan gugus amin pada kitosan

dengan gugus karboksilat pada sistein. (Schmitz, T. et al., 2007). Penambahan gugus sistein pada polimer kitosan ini dapat memungkinkan terbentuknya ikatan disulfida antara gugus sistein pada polimer dengan residu sistein pada glikoprotein mukus. Ikatan disulfida yang merupakan ikatan kovalen akan menghasilkan mukoadhesi yang lebih kuat dibandingkan mukoadhesi yang didasari oleh ikatan ionik atau hidrogen (Bernkop-Schnurch, 2005). Atas dasar pemikiran tersebut, penambahan konjugat yang mengandung gugus tiol pada kitosan diharapkan dapat meningkatkan sifat mukoadhesi film yang dihasilkan dari derivat kitosan tertiolasi serta dapat memecahkan masalah retensi dari sediaan bukal.

## **1.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Melakukan sintesis dan karakterisasi kitosan N-asetil sistein.
2. Melakukan preparasi dan karakterisasi sediaan film bioadhesif dari kitosan-N-asetil sistein untuk penghantaran bukal insulin.
3. Mengevaluasi efek hipoglikemik dari insulin yang diberikan melalui film bukal kitosan-N-asetil sistein secara *in vivo*.

## **1.3 Hipotesis Penelitian**

1. Kitosan-N-asetil sistein dapat disintesis dari kitosan dan N-asetil sistein
2. Kitosan-N-asetil sistein dapat digunakan sebagai bahan pada pembuatan film.
3. Film kitosan-N-asetil sistein yang dihasilkan dari kitosan N-asetil sistein akan memiliki sifat bioadhesif
4. Film kitosan-N-asetil sistein yang dihasilkan dapat menghantarkan insulin melalui rute bukal.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Fisiologi Mukosa Oral

##### 2.1.1 Struktur mukosa oral

Pipi, bibir, langit-langit mulut (bagian keras dan bagian lunak) serta lidah merupakan bagian yang membentuk rongga mulut. Perbedaan mendasar antara mukosa oral dan kulit dibandingkan dengan saluran gastrointestinal adalah adanya perbedaan pada epitel. Saluran cerna memiliki sel epitel satu lapis membentuk jaringan epitel sederhana, sedangkan kulit dan rongga mulut memiliki beberapa lapis sel dengan derajat diferensiasi yang berbeda (Touitou dan Barry, 2007).

Pada rongga mulut, terdapat tiga jenis mukosa yaitu mukosa mastikatori (*masticatory*), mukosa pelapis (*lining*), dan mukosa khusus (*specialized*). Mukosa mastikatori memiliki epitel terkeratinisasi yang menyelubungi daerah *gingival* dan langit-langit keras mulut, sehingga dapat memberikan resistensi secara kimia dan mekanis pada bagian tersebut. Mukosa tersebut dibagi menjadi empat lapis sel yaitu lapisan sel terkeratinisasi, sel granular, *prickle-cell* dan lapisan basal. Sebaliknya, mukosa pelapis yang memiliki sifat elastis hanya tersusun dari permukaan epitel yang tidak terkeratinisasi. Mukosa pelapis menyelubungi daerah pipi, bibir, dasar mulut dan langit-langit lunak mulut. Mukosa pelapis dapat dibagi menjadi lapisan *superficial*, *intermediet*, *prickle cell* dan lapisan basal. Tipe mukosa yang lain adalah mukosa khusus yang terdiri dari lapisan terkeratinisasi dan tidak terkeratinisasi. Mukosa ini terbatas hanya pada bagian permukaan dorsal lidah. Ruang interseluler dari mukosa mengandung air, lipid, dan protein (Touitou dan Barry, 2007).

Ketebalan epitel manusia bergantung pada daerahnya. Pada dasar mulut ketebalannya 190  $\mu\text{m}$ , pada langit-langit keras 310  $\mu\text{m}$  dan pada bagian bukal 580  $\mu\text{m}$ . Perbedaan regional morfologi mukosa ini menyebabkan adanya perbedaan karakteristik permeabilitas dan dapat memberikan pengaruh pada penempatan suatu sistem penghantaran obat. Waktu *turnover* lebih lambat untuk jaringan yang terkeratinisasi. Misalnya, langit-langit keras yang terkeratinisasi membutuhkan waktu 24 hari untuk *turnover* sementara mukosa bukal yang tidak terkeratinisasi

hanya membutuhkan waktu *turnover* selama 13 hari (Rathbone, Hadgraft dan Robert, 2003).

### 2.1.2 Saliva dan Mukus

Jaringan mukosa diselubungi oleh mukus yang bermuatan negatif dan mengandung glikoprotein yang disebut musin. Mukus dianggap berkontribusi secara signifikan terhadap sifat viskoelastis saliva dan memiliki pH sekitar 5,8-7,4. Musin dari mukus mengandung inti protein yang mengandung residu prolin dan kaya akan serin dan treonin ter-O-glikosilasi. Kelenjar saliva yang mensekresikan mukus juga mensintesis saliva sehingga ia dapat sekaligus melindungi jaringan lunak dari abrasi mekanis dan kimia (Touitou dan Barry, 2007).

Ketebalan rata-rata film saliva pada mulut berkisar antara 0,07 sampai 0,10 mm (Touitou dan Barry, 2007). Sekitar 750 mL saliva diproduksi setiap harinya. Sebanyak 60 % diproduksi kelenjar submandibular, 30 % dari parotid, kurang dari 5 % dari kelenjar sublingual dan sekitar 6 % diproduksi oleh kelenjar saliva minor yang terdapat di bawah epitel pada sebagian besar daerah mukosa oral. Saliva merupakan campuran dari sekresi *serous* berviskositas rendah yang tinggi akan protein terglykosilasi dengan sekresi mukus yang memiliki rasio karbohidrat-protein lebih tinggi namun aktivitas enzimatik yang rendah atau tidak ada sama sekali. Saliva juga mengandung berbagai esterase (sebagian besar merupakan karboksilesterase) yang dapat menghidrolisis gugus ester pada obat. Parotid hampir seluruhnya menghasilkan sekresi *serous* sedangkan submandibular sebagian besar menghasilkan sekresi mucus (Rathbone, Hadgraft dan Robert, 2003).

Adhesi diperpanjang dari bentuk sediaan (film) pada mukosa merupakan faktor penting dan utama dalam kesuksesan penghantaran bukal. Mukus memegang peranan penting selama proses mukoadhesif karena interaksi antara mukus dan polimer mukoadhesif merupakan dasar utama terjadinya suatu mukoadhesi (Touitou dan Barry, 2007).

## 2.2 Mukoadhesi

### 2.2.1 Definisi

Mukoadhesi didefinisikan sebagai penempelan makromolekul sintetik atau alami pada permukaan mukus atau epitel. Secara umum, mukoadhesi juga dapat didefinisikan sebagai penempelan material polimerik pada jaringan mukosa (Longer dan Robinson, 1986).

### 2.2.2 Teori mukoadhesi

Mekanisme penempelan polimer pada jaringan mukosa belum sepenuhnya dipahami, akan tetapi beberapa teori bioadhesi menyimpulkan bahwa bioadhesi terjadi melalui interaksi kimia. Interaksi kimia pada bioadhesi antara lain adalah interaksi elektrostatis, hidrofobik, van der Waals, ikatan hidrogen ataupun pembelitan fisik (Salamat-Miller, Chittchang dan Johnston, 2005).

Terdapat lima teori yang menjelaskan mengenai mekanisme terjadinya penempelan polimer pada mukosa yaitu teori adsorpsi, difusi, elektronik, fraktur dan pembasahan. Teori adsorpsi menjelaskan mengenai terbentuknya ikatan kimia primer dan sekunder dari jenis kovalen dan non-kovalen (gaya elektrostatis dan van der Waals ataupun ikatan hidrogen dan hidrofobik) selama kontak awal antara mukus dan polimer mukoadhesif. Kebanyakan gaya ikatan antarmuka disebabkan oleh gaya non kovalen. Pembentukan ikatan kimia sekunder sangat bergantung pada sifat polimer. Saat ini, ikatan kovalen dan juga ikatan disulfida diketahui dapat berkontribusi pada interaksi yang berperan pada terjadinya mukoadhesi (Salamat-Miller, Chittchang dan Johnston, 2005). Mukoadhesi yang berdasarkan ikatan kovalen dapat terjadi melalui pembentukan ikatan disulfida antara gugus tiol pada polimer dengan residu sistein pada glikoprotein mukus. Dua mekanisme yang mungkin terjadi pada pembentukan ikatan disulfida ini antara lain interaksi antara tiomer (polimer yang memiliki gugus tiol) dengan mukus melalui reaksi pertukaran disulfida dengan tiol maupun proses oksidasi sederhana dari gugus tiol (Bernkop Scnhurch, 2005).

Teori difusi menjelaskan mengenai pembelitan antara glikoprotein mukus dengan polimer mukoadhesif. Selama kontak awal antara kedua polimer ini, terjadi difusi polimer bioadhesif ke jaringan mukus dan menghasilkan suatu

belitan antara kedua polimer. Faktor yang mempengaruhi interdifusi dari jaringan makromolekul ini antara lain adalah fleksibilitas rantai polimer yang adekuat, pemaparan permukaan kontak kedua polimer yang adekuat, struktur kimia yang serupa, dan koefisien difusi dari polimer bioadhesif (Salamat-Miller, Chittchang dan Johnston, 2005).

Teori elektronik menjelaskan mengenai terjadinya transfer elektron antara dua permukaan terjadi disebabkan terdapat perbedaan sifat elektronik antara polimer mukoadhesif dan glikoprotein mukus. Transfer elektron berkontribusi pada pembentukan lapisan ganda bermuatan pada permukaan mukus dan polimer, sehingga terjadi gaya tarik menarik pada interdifusi kedua permukaan dan daerah tersebut (Salamat-Miller, Chittchang dan Johnston, 2005).

Teori fraktur menghubungkan gaya yang dibutuhkan untuk memisahkan polimer dari mukus dengan kekuatan ikatan adhesifnya. Telah diketahui bahwa kerja fraktur lebih kuat ketika ikatan jaringan lebih panjang atau derajat sambung silang dikurangi (Salamat-Miller, Chittchang dan Johnston, 2005).

Teori yang terakhir adalah teori pembasahan. Teori pembasahan menjelaskan mengenai kemampuan polimer bioadhesif menyebar pada permukaan biologis. Teori ini sangat aplikatif terutama pada sistem bioadhesif likuid (Salamat-Miller, Chittchang dan Johnston, 2005).

### **2.3 Film Mukoadhesif**

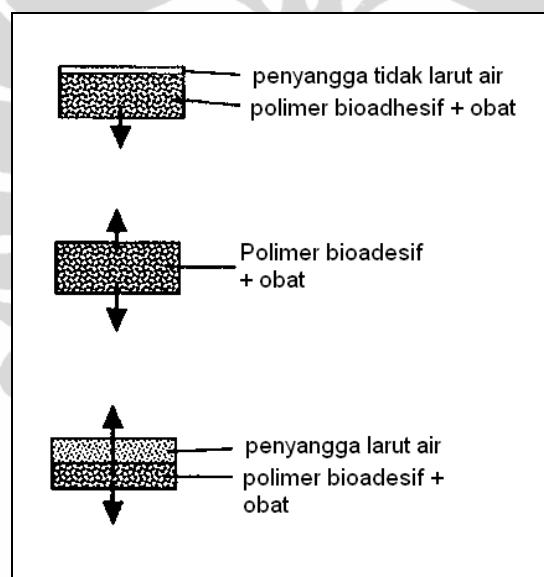
Film mukoadhesif merupakan bentuk sediaan fleksibel yang menempel pada daerah spesifik mukosa dan memberikan aliran obat unidireksional maupun bidireksional tergantung dari tipe penghantaran yang diinginkan. Permeasi obat dari film menembus membran akan bergantung pada luas permukaan film (Touitou dan Barry, 2007).

Secara umum, suatu film mengandung suatu “sistem matriks” dimana obat didispersikan bersama dengan eksepian atau mukoadhesif, atau “sistem *reservoir*”. Zat mukoadhesif dapat didispersikan pada matriks obat atau berada pada lapisan terpisah (Touitou dan Barry, 2007).

Film dapat mengandung lapisan penyangga (*backing layer*) yang dapat melindungi film dari lingkungan rongga mulut jika diinginkan penghantaran

transmukosal saja. Jika tidak, lapisan penyangga tidak perlu digunakan. Polimer dalam lapisan mukoadhesif akan mengembang dan dihasilkan jaringan dimana obat akan berdifusi menuju membran (Touitou dan Barry, 2007).

Kombinasi dari faktor yang telah disebutkan sebelumnya telah digunakan untuk mendesain dan mengembangkan beberapa macam film yaitu film dengan matriks yang dapat terlarut, film dengan penyangga yang tidak dapat melarut dan film dengan penyangga yang dapat melarut. Film dengan matriks yang dapat melarut akan melepaskan obat ke seluruh bagian rongga mulut, akan tetapi dengan adanya lapisan mukoadhesif maka proses tersebut akan diperpanjang. Film dengan penyangga yang tidak dapat melarut akan memberikan aliran obat satu arah ke mukosa untuk jangka waktu yang panjang sedangkan film dengan penyangga yang dapat melarut bersifat kerja pendek (Touitou dan Barry, 2007).



Gambar 2.1 Skema matriks film dan arah pelepasan obat

## 2.4 Insulin

Insulin merupakan hormon yang diproduksi oleh sel beta langerhans pankreas dan terdiri dari 2 rantai asam amino yang dihubungkan oleh 2 jembatan disulfida yaitu rantai A dan rantai B. Insulin yang ada diproduksi dari berbagai spesies yang serupa namun memiliki beberapa perbedaan dalam hal sekuens asam aminonya. Insulin dari babi (BM=5777.5) berbeda dengan insulin manusia (BM=5807.6) hanya pada satu asam amino pada rantai B sedangkan insulin dari

sapi (BM=5733.5) berbeda pada dua sekuens asam amino pada rantai B dengan insulin manusia (Sweetman, 2009).

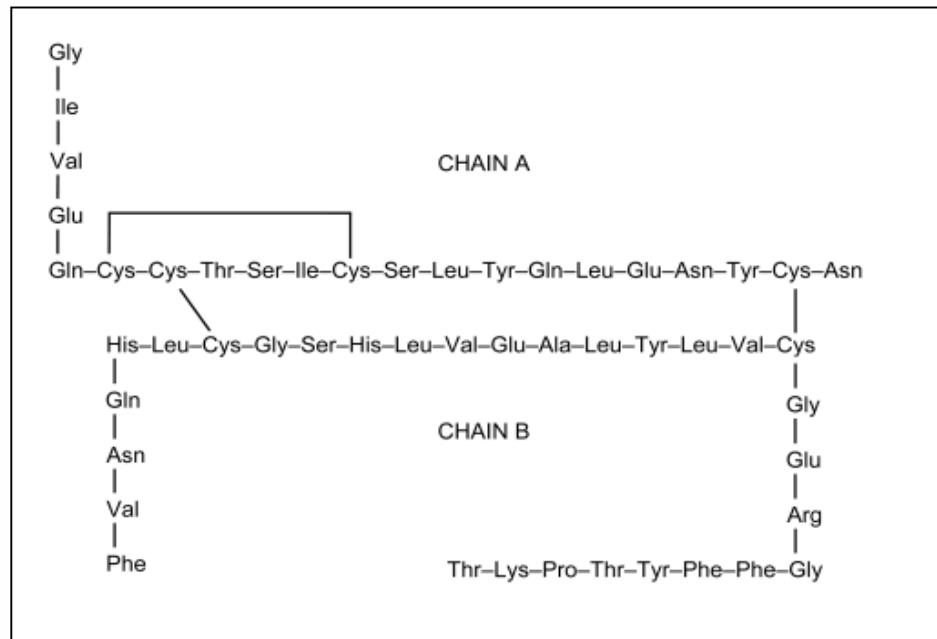
Produksi skala besar insulin awalnya berasal dari ekstraksi insulin dari pankreas babi dan sapi, akan tetapi dengan perkembangan teknologi sekarang ini, dapat diproduksi insulin dengan sekuens asam amino yang identik dengan insulin manusia oleh bakteri yang telah melalui teknologi rekayasa genetika (Sweetman, 2009).

Insulin merupakan serbuk putih atau serbuk berwarna hampir putih. Insulin praktis tidak larut dalam air dan alkohol, akan tetapi larut dalam larutan asam encer. Insulin juga dapat larut pada larutan basa encer, akan tetapi dengan terjadinya penguraian. Temperatur yang baik untuk menyimpan Insulin adalah temperatur dibawah 18 °C (Sweetman, 2009).

Insulin merupakan pengobatan utama pada diabetes mellitus tipe I, yaitu diabetes yang dependen terhadap Insulin. Pemberian insulin pada penderita diabetes tipe II (diabetes yang independen terhadap insulin) dimaksudkan bagi penderita yang kadar gula darahnya sudah tidak lagi dapat dikontrol oleh antidiabetik oral dan diet (Sweetman, 2009).

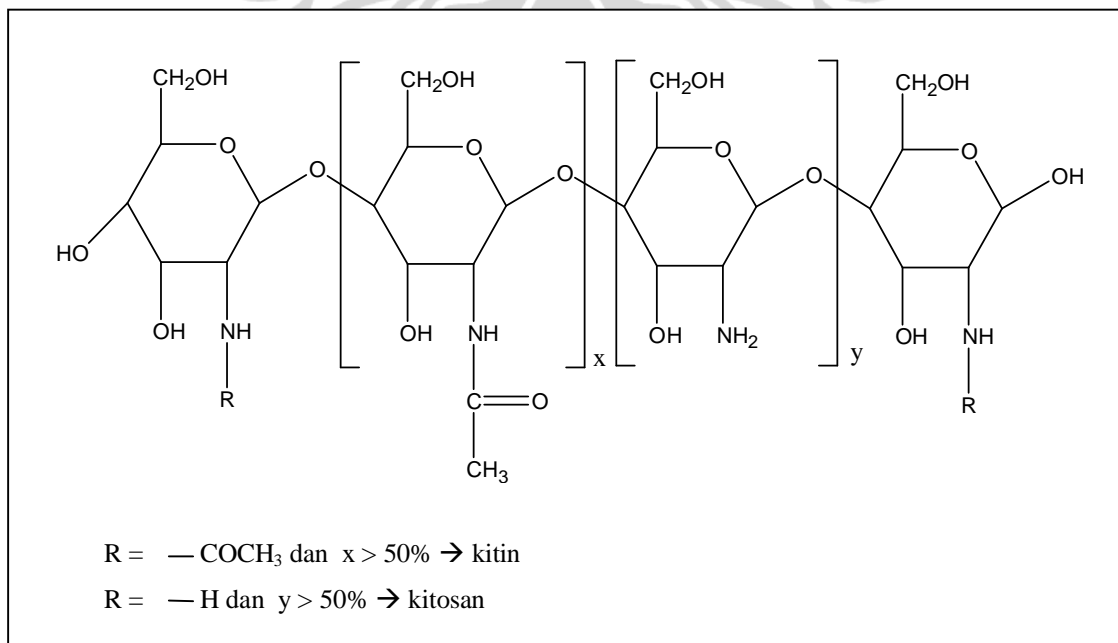
Saat ini sebagian besar insulin yang terdapat secara komersial merupakan insulin dalam bentuk injeksi, baik intravena maupun subkutan. Sediaan insulin dalam bentuk alternatif yang lain masih dalam tahap penelitian (Sweetman, 2009).

Penghantaran insulin melalui jalur alternatif selain injeksi memiliki berbagai kendala antara lain degradasi insulin selama penghantaran dan juga permeabilitas insulin yang termasuk sebagai molekul besar. Insulin yang merupakan protein bermolekul besar akan sulit menembus membran dan tersedia pada sirkulasi sistemik. Selain itu insulin juga dapat rusak pada suasana yang terlalu asam maupun terlalu basa serta rentan terhadap degradasi enzimatis. Penelitian yang dilakukan saat ini kebanyakan adalah pemecahan masalah kestabilan selama penghantaran insulin, ketersediaan insulin pada sirkulasi sistemik dan efikasi insulin secara terapi yang dihadapi pada penghantaran insulin selain melewati rute injeksi (Lin et al, 2008).



Gambar 2.2 Susunan asam amino insulin manusia (diolah dari Sweetman, 2009)

## 2.5 Kitosan



Gambar 2.3 Struktur formula kitosan yang tersusun dari kopolimer glukosamin (RH) dan N-asetilglukosamin (RCOCH<sub>3</sub>)

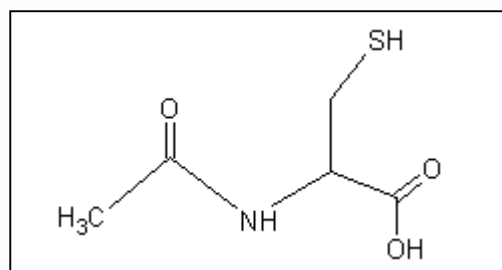
Kitosan merupakan polisakarida yang terdiri dari kopolimer glukosamin dan N-asetilglukosamin dan merupakan produk deasetilasi parsial dari Kitin. Istilah kitosan digunakan untuk produk deasetilasi Kitin yang memiliki berbagai derajat deasetilasi dan depolimerisasi sehingga komposisi kimia pastinya tidak dapat dipastikan. Kitosan tersedia secara komersial dalam berbagai jenis mulai dari yang berberat molekul 10.000 -1000000 dan dengan derajat deasetilasi yang berbeda-beda (Rowe, Sheskey dan Quinn, 2009).

Kitosan memiliki bentuk serbuk atau serpihan berwarna putih atau putih pucat dan tidak berbau. Kitosan juga merupakan polimer biokompatibel dan biodegradabel karena ia dapat terdegradasi oleh lisozim yang banyak terdapat pada jaringan manusia. Kitosan tidak larut dalam suasana basa dan netral akan tetapi dapat bereaksi dengan asam organik dalam suasana asam (Rowe, Sheskey dan Quinn, 2009).

Kitosan dapat diproses menjadi berbagai bentuk seperti mikrosfer, tablet, film dan sebagai penyalut serta dapat diproduksi menjadi sistem penghantaran obat menggunakan berbagai teknik seperti semprot kering, koarsevasi, dan granulasi konvensional (Rowe, Sheskey dan Quinn, 2009).

Penggunaan kitosan sebagai eksipien dalam formulasi farmasetis telah diinvestigasi dalam berbagai macam penelitian. Contoh-contoh aplikasinya adalah untuk penghantaran obat terkendali, sebagai komponen sediaan mukoadesif dan untuk meningkatkan penghantaran protein (Rowe, Sheskey dan Quinn, 2009).

## 2.6 N-asetil sistein ( $C_6H_9NO_3S$ BM =163.19)



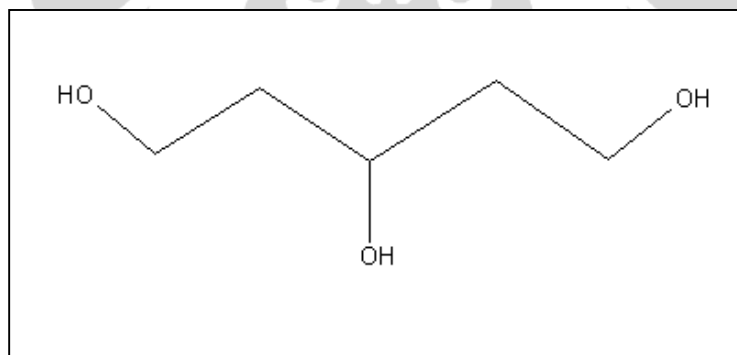
Gambar 2.4 Struktur N-asetil sistein



N-asetil sistein merupakan derivat asam amino sistein dimana pada atom nitrogennya terikat gugus asetil. N-asetil sistein berbentuk serbuk kristal putih atau tidak berwarna yang mudah larut dalam air dan alkohol dan tidak larut dalam diklorometan, kloroform dan eter. N-asetil sistein inkompatibel dengan beberapa logam seperti besi dan tembaga serta beberapa antimikroba seperti amfoterisin dan penisillin. Secara klinis, N-asetil sistein biasa digunakan sebagai senyawa mukolitik dikarenakan kemampuannya dalam menurunkan viskositas mukus dengan memecah ikatan disulfida pada mukoprotein (Sweetman, 2009).

Pada modifikasi kitosan dengan menggunakan N-asetil sistein, diharapkan gugus tiol yang terdapat pada N-asetil sistein dapat membentuk ikatan disulfida dengan glikoprotein mukus, sehingga menghasilkan mukoadhesi yang lebih kuat dibandingkan mukoadhesi yang terjadi karena interaksi hidrofobik ataupun ikatan hidrogen (Schmitz T. et al, 2007).

## 2.7 Gliserin ( $C_3H_8O_3$ BM = 92.09)



Gambar 2.5 Struktur gliserin

Gliserin berbentuk cairan jernih kental yang tidak berwarna, tidak berbau, memiliki rasa manis dan bersifat higroskopis (Rowe, Sheskey dan Quinn, 2009).

Penggunaannya pada aplikasi untuk formulasi sediaan farmasi antara lain sebagai humektan, emolien, kosolven dan pelarut pada sediaan cair dan setengah padat. Sedangkan pada produksi kapsul gelatin lunak, gliserin digunakan sebagai zat pemberi sifat plastis (*plasticizer*) (Rowe, Sheskey dan Quinn, 2009).

Sifat gliserin yang dapat digunakan sebagai zat pemberi sifat plastis ini dimanfaatkan pada penelitian ini untuk meningkatkan sifat plastis dari film kitosan-N-asetil sistein yang didapat. Film yang nanti akan dihasilkan diperkirakan akan memiliki sifat rapuh dan regas, sehingga untuk meningkatkan penampilannya secara fisik dan kemudahan dalam penanganan, gliserin ditambahkan pada saat preparasi film dengan tujuan agar film yang dihasilkan memiliki sifat plastis. Pada penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa gliserin dapat digunakan sebagai zat pemberi sifat plastis yang baik dalam preparasi film kitosan, sifat tersebut diharapkan dapat diaplikasikan pada sediaan film kitosan-N-asetil sistein (Cui et al, 2008).

## **2.8 Pembentukan Ikatan Amida Yang Dimediasi Karbodiimida**

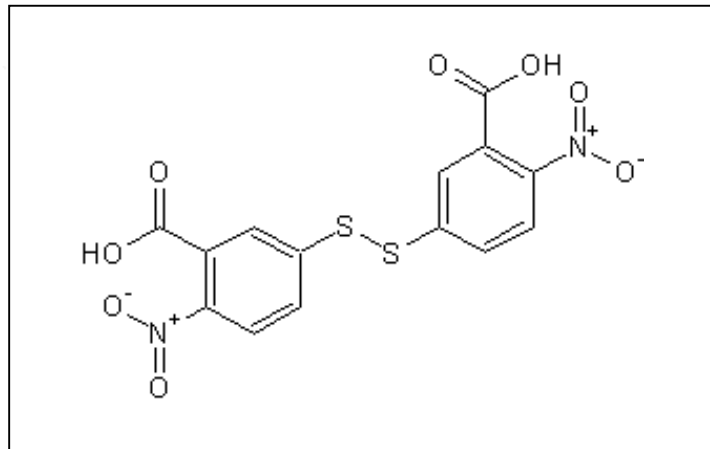
Kitosan-N-asetil sistein terjadi karena terbentuknya Ikatan amida antara kitosan dan N-asetil sistein. Ikatan amida ini terjadi antara gugus karboksilat pada N-asetil sistein dengan gugus amin primer pada kitosan dengan dimediasi oleh suatu karbodiimida (Schmitz, T., et al., 2007).

Reaksi pembentukan ikatan amida yang dimediasi oleh karbodiimida ini berlangsung dalam dua langkah. Pada reaksi awal, gugus karboksil (N-asetil sistein) akan diaktivasi oleh karbodiimida membentuk intermediet O-asilisourea yang dapat bereaksi lebih jauh. Serangan nukleofilik dari air akan menghidrolisis intermediet dan menghasilkan gugus karboksil bebas. Reaksi berikutnya terjadi antara senyawa amin (kitosan) dengan intermediet membentuk ikatan amida yang diinginkan. Intermediet yang reaktif ini juga dapat mengalami hidrolisis secara perlahan dan dapat bereaksi dengan nukleofil lain untuk membentuk derivat karboksilat lain (Wong, 1993).

Karbodiimida jenis apapun dapat digunakan untuk memfasilitasi pembentukan ikatan amida. Derivat larut air yang banyak digunakan antara lain adalah 1-sikloheksil-3-(2-morfolinil-4-etil) karbodiimida (CMC) dan 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida (EDAC) (Wong, 1993).

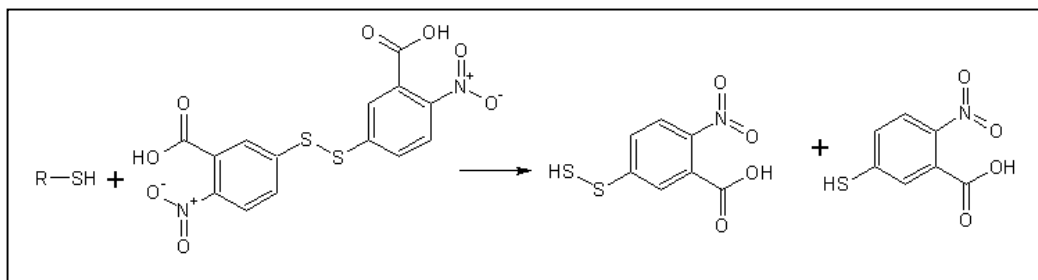


## 2.9 Penentuan Jumlah Gugus Tiol dengan Reagen Ellman



Gambar 2.7 Struktur asam -5-5'-ditiobis-2-dinitrobenzoat (DTNB)

Jumlah gugus tiol dapat ditentukan dengan menggunakan Reagen Ellman (Asam-5-5'-ditiobis-2-dinitrobenzoat/DTNB). Tiol akan bereaksi dengan DTNB dan memutus ikatan disulfida, menghasilkan 2-nitro-5-tiobenzoat (NTB<sup>-</sup>) yang akhirnya terionisasi menjadi dianion (NTB<sup>2-</sup>) pada larutan pH netral dan alkali. Ion NTB<sup>2-</sup> ini memiliki warna kuning dan dapat diukur secara spektrofotometri dengan mengukur serapan ion tersebut pada panjang gelombang 412 nm. Reaksi ini terjadi dengan cepat dan bersifat stoikiometri, dimana tambahan 1 mol tiol menghasilkan satu mol NTB.



Gambar 2.8 Reaksi gugus tiol dengan reagen Ellman/DTNB

## BAB 3

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Bahan

Kitosan (berat molekul sedang : 200 kDa; derajat deasetilasi 85 %, Vitalhouse, Indonesia), N-asetil-L-sistein (ChemImpex International Inc., Amerika Serikat), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida hidroklorida/EDAC HCl (ChemImpex International Inc., Amerika Serikat), asam-5-5'-ditiobis-2-dinitrobenzoat/Reagen Ellman/DTNB (ChemImpex International Inc., Amerika Serikat), insulin rekombinan manusia (Wako Chemicals Ltd, Jepang), tikus Sprague Dawley (Institut Pertanian Bogor, Indonesia), mukosa bukal sapi (Institut Pertanian Bogor, Indonesia). Reagen yang digunakan untuk kromatografi adalah reagen dengan spesifikasi *chromatography grade* sedangkan reagen lain merupakan reagen dengan spesifikasi *reagent grade*.

#### 3.2 Alat

Pengaduk magnetik, freeze dryer, alat dialisis, Fourier-Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) 8400 S (Shimadzu, Jepang), sel difusi frans, timbangan analitik, spektrofotometer UV-1800 (Shimadzu, Jepang), viskometer Brookfield (Brookfield Engineering Lab, Amerika Serikat) Texture analyzer TX-2 (Stable Micro Systems, Amerika Serikat), kromatografi cair kinerja tinggi dengan pompa model LC-6A (Shimadzu, Jepang) detektor UV-Vis SPD-6AV (Shimadzu, Jepang), kolom C 18 (GL Science, Jepang), pengolah data pada komputer tipe CBM-102 (Shimadzu, Jepang) serta Scanning Electron Microscope (JEOL, Jepang) dan alat-alat gelas lainnya.

#### 3.3 Pembuatan Larutan Buffer

##### 3.3.1 Pembuatan Buffer fosfat 0,5 M pH 8,0

Larutan kalium hidrogen fosfat 0,5 M sebanyak 25 mL dan 23 mL NaOH 0,5 M dimasukkan ke dalam labu ukur kemudian volumenya dicukupkan hingga 100 mL

### 3.3.2 Pembuatan Buffer fosfat 0,5 M pH 6,8

Larutan kalium hidrogen fosfat 0,5 M sebanyak 25 mL dan 11,2 mL NaOH 0,5 M dimasukkan ke dalam labu ukur kemudian volumenya dicukupkan hingga 100 mL

### 3.3.3 Pembuatan Buffer fosfat 0,5 M pH 7,4

Larutan kalium hidrogen fosfat 0,5 M sebanyak 25 mL dan 19,5 mL NaOH 0,5 M dimasukkan ke dalam labu ukur kemudian volumenya dicukupkan hingga 100 mL

## 3.4 Sintesis dan Karakterisasi kitosan-N-asetil sistein

### 3.4.1 Sintesis kitosan-N-asetil sistein

Sintesis kitosan-N-asetil sistein dilaksanakan mengikuti metode yang telah dijelaskan oleh Schmitz et al. tahun 2007. Lima ratus miligram kitosan dilarutkan dalam HCl encer 1 %. Setelah kitosan larut, larutan kitosan sebagai campuran pertama segera disesuaikan pHnya dengan NaOH 1 M hingga mencapai pH 5. Kemudian sebanyak 4 gram N-asetil sistein yang dilarutkan dalam 50 mL aquadest segera disiapkan. Gugus karboksilat N-asetil sistein kemudian diaktifkan dengan penambahan EDAC HCl sebanyak 2 gram hingga tercapai konsentrasi EDAC HCl total sebanyak 150 mM. Campuran kedua ini dibiarkan selama 20 menit pada suhu 25 °C dalam kondisi pengadukan. Kondisi selama eksperimen dijaga pada rentang pH 4-5. Setelah itu campuran pertama dengan campuran kedua tersebut dicampur dan volume total dari kedua campuran dicukupkan hingga 80 mL. Campuran kemudian segera diinkubasi selama 6 jam di bawah pengadukan pada temperatur kamar.

### 3.4.2 Pemisahan Hasil Sintesis

Hasil kitosan-N-asetil sistein yang didapat diisolasi dalam gelap dengan cara didialisis dengan medium HCl 5 mM yang mengandung 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA pada temperatur 10 °C selama 3 hari, kemudian dalam kondisi yang sama dengan HCl 5 mM yang mengandung 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA dan 1% NaCl selama 3 hari kemudian terakhir didialisis selama 3 hari dengan HCl 1 mM. Setelah didialisis

seluruh sampel dibekukan dan diliofilisasi pada temperatur  $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 70mmHg.

#### 3.4.3 Penentuan Jumlah Gugus Tiol Bebas

Penentuan derajat modifikasi dilaksanakan mengikuti metode yang telah dijelaskan oleh Schmitz et al dengan sedikit modifikasi. Derajat modifikasi ditentukan dengan menentukan jumlah gugus tiol bebas pada konjugat kitosan-N-asetil sistein. Penentuan derajat modifikasi dilakukan secara fotometri menggunakan reagen Ellman untuk menghitung jumlah gugus tiol bebas.

Sebanyak 2 mg konjugat dan juga kontrol dihidrasi dalam 2 mL buffer fosfat 0,5 M pH 8,0 dan kemudian ditambahkan 2 mL reagen Ellman (3 mg DTNB dilarutkan dalam 10 mL buffer fosfat 0,5 M pH 8,0). Sampel kemudian diadkan hingga volume 50,0 mL dan diinkubasi selama 2 jam dalam temperatur kamar. Setelah itu sebanyak 3 mL sampel masing-masing dipindahkan ke kuvet dan absorbansinya ditentukan pada panjang gelombang 412 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

#### 3.4.4 Penentuan Jumlah Gugus Tiol Total

Penentuan jumlah gugus tiol total dalam polimer dilakukan dengan terlebih dahulu mereduksi ikatan disulfida yang terjadi. Pertama, sejumlah 2 mg konjugat dihidrasi dengan 4 mL buffer fosfat pH 8,0 50 mM selama 30 menit. Natrium borohidrid 3 % ditambahkan sebanyak 2,5 mL ke dalam larutan polimer dan campuran tersebut diinkubasi selama 2 jam dalam *waterbath* suhu  $37\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . kemudian 2 mL HCl 1 M ditambahkan untuk menghancurkan sisa natrium borohidrid. Setelah penambahan aseton 0,5 mL, campuran diaduk selama 5 menit.

Setelah itu, 4 mL buffer fosfat 1 M pH 8,5 dan 0,8 mL DNTB 0,5 % (m/v) dalam buffer fosfat 0,5 M pH 8,0 ditambahkan ke dalam campuran. Setelah diinkubasi selama 15 menit pada temperatur kamar kemudian sampel dicukupkan volumenya hingga 50,0 mL dan 3 mL aliquot diukur serapannya pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 412 nm dengan menggunakan kuvet.

#### 3.4.5 Pengukuran Menggunakan FT-IR

Sebanyak 2 mg kitosan-N-asetil sistein dengan 98 mg KBr yang telah di keringkan dilarutkan dalam HCl 1% dan dikeringkan dalam oven suhu 40 °C selama 1 jam. Hasil campuran tersebut kemudian diukur spektrum IRnya menggunakan spektrofotometer FT-IR. Sebagai pembandingan digunakan hasil spektrum IR dari campuran 2 mg kitosan dengan 98 mg KBr yang diberi perlakuan yang sama dengan campuran kitosan-N-asetil sistein dengan KBr.

#### 3.4.6 Viskositas dan Rheologi

Pengukuran viskositas dan penentuan sifat rheologi dari hidrogel kitosan-N-asetil sistein dilakukan dengan menggunakan viskometer. Sebanyak 2 g kitosan-N-asetil sistein dilarutkan dalam HCl 1% dan dicukupkan volumenya dengan aquades hingga 250 mL. Campuran tersebut kemudian diukur viskositasnya dengan viskometer Brookfield dan larutan kitosan dengan konsentrasi sama digunakan sebagai pembandingan.

#### 3.4.7 Uji *Swelling*

Sebanyak 200 mg kitosan-N-asetil sistein dan kitosan sebagai pembandingan dikempa menjadi tablet dan diukur masing-masing beratnya. Tablet yang telah ditimbang kemudian diletakkan pada cawan petri yang mengandung buffer fosfat pH 7,4. Setelah 5 jam, tablet diambil dan dibersihkan menggunakan kertas tissue untuk menghilangkan sisa air berlebih. Tablet yang telah dihilangkan sisa airnya kemudian segera ditimbang pada temperatur kamar (25°C).

Indeks *Swelling* (*Swelling Index/SI*) dihitung menurut :

$$\frac{W_t - W_o}{W_o}$$

$W_t$  : Berat tablet yang mengembang setelah 5 jam

$W_o$  : Berat awal tablet



### 3.5 Pembuatan Film kitosan-N-asetil sistein/Insulin

Sebanyak 150 mg kitosan-N-asetil sistein dilarutkan dalam HCl 1 %. Setelah polimer larut, pH larutan polimer segera disesuaikan dengan NaOH 1 M hingga pH mencapai 5-6. Campuran yang dihasilkan kemudian dicampurkan dengan gliserin sebagai *plasticizer* dengan jumlah gliserin 50 % dari berat kitosan N-asetil sistein. Campuran tersebut kemudian dicampur dengan 1 mg insulin yang sebelumnya telah dilarutkan dalam 0,2 mL HCl 0.01 M. Campuran yang telah mengandung insulin tersebut kemudian dicukupkan dengan aquadest hingga konsentrasi polimer mencapai 2,5 %. Campuran akhir kemudian dituang kedalam suatu penyangga gelas berbentuk silinder dengan diameter 3,5 cm dan dikeringkan dengan *freeze dryer* hingga didapat suatu sediaan film yang kering. Film tersebut kemudian disimpan pada temperatur 2-8 °C.

### 3.6 Morfologi

Untuk melihat mikrostruktur dari film, irisan menyilang dari film digunakan untuk diamati pada Scanning Electron Microscope (SEM) dengan perbesaran 200 dan 500 kali. Selain itu, struktur dari permukaan film juga diamati dengan perbesaran 1000 dan 3000 kali.

### 3.7 Uji Kekuatan Mukoadhesi

Uji kekuatan mukoadhesi dilakukan dengan menggunakan texture analyzer TX2. Mukosa bukal sapi yang didapat dari tempat penjagalan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor digunakan sebagai model mukosa. Mukosa bukal sapi yang telah dihidrasi dan dibersihkan dengan buffer fosfat 6,8 diletakkan pada probe bawah alat. Film kitosan-N-asetil sistein (film KNAC) dengan luas 1 cm<sup>2</sup> direkatkan pada probe bagian atas dari alat dengan lem sianokrilat. Probe atas kemudian diturunkan kepada probe bagian bawah dengan kecepatan 0,5 mm/detik dan kecepatan naik sebesar 1,0 mm/detik. Film dibiarkan menempel pada mukosa dengan gaya yang diaplikasikan sebesar 150 g, jarak kembali 15 mm dan waktu kontak 15 detik. Gaya mukoadhesi yang didapat (dalam gF) kemudian dicatat dan pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali. Film kitosan digunakan sebagai pembanding pada uji kali ini.

### **3.8 Uji Waktu Mukoadhesi**

Uji waktu mukoadhesi dilakukan dengan mengukur lama waktu film KNAC menempel pada mukosa bukal. Mukosa bukal sapi yang telah dibersihkan sebagaimana yang telah disebutkan sebelumnya direkatkan pada suatu kaca objek menggunakan lem sianokrilat dengan bagian mukosa menghadap ke atas. Film direkatkan kepada mukosa bukal setelah film dibasahkan dengan satu tetes buffer fosfat pH 6.8 dengan memberikan sedikit tekanan selama 30 detik pada saat proses penempelan. Kaca objek kemudian diletakkan secara vertikal pada beaker yang berisi 200 mL buffer fosfat pH 6,8 suhu  $37 \pm 1$  °C. Penempelan film diamati selama 12 jam dan waktu hingga film terlepas atau tererosi seluruhnya dari mukosa bukal dicatat sebagai waktu mukoadhesi (Patel, Vishnu et al, 2007).

### **3.9 Uji Difusi Insulin *In vitro***

Uji difusi dilaksanakan untuk mengetahui kemampuan insulin berdifusi melewati film KNAC. Sel difusi horizontal digunakan pada eksperimen ini. Film KNAC diletakkan pada bagian tengah di antara kompartemen donor dan kompartemen reseptor. Luas permukaan kontak dari film adalah  $1,13 \text{ cm}^2$ . Kompartemen reseptor diisi dengan 3 mL buffer fosfat pH 7,4 pada temperatur 37 °C. Kompartemen donor diisi dengan larutan insulin 0,03 % dalam buffer fosfat pH 7,4. Sampel sebanyak 0,5 mL diambil dari medium pada interval waktu yang diinginkan dan segera digantikan dengan jumlah yang sama.

### **3.10 Analisis Insulin Menggunakan KCKT**

Insulin dianalisis secara kuantitatif dengan KCKT menggunakan metil parahidroksibenzoat sebagai baku dalam. Kolom C18 (panjang 150 x 4,6 mm) digunakan sebagai kolom dan sebagai fase gerak digunakan campuran asetonitril dan 0,1 % larutan asam trifluoroasetat dengan perbandingan 31:69 serta kecepatan alir fase gerak 1,2 mL/menit. Detektor yang digunakan merupakan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 214 nm. Kadar insulin dihitung dengan menggunakan persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi.

### 3.11 Uji Pelepasan Insulin *In vitro*

Uji ini dilakukan untuk mengetahui profil pelepasan insulin dari film kitosan-N-asetil sistein. Film kitosan-N-asetil sistein dengan ukuran  $1,96 \text{ cm}^2$  dan mengandung insulin digunakan dalam eksperimen ini. Film ditempatkan ke dalam suatu medium yang berisi 5 mL buffer fosfat pH 6,8 dengan suhu  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  dan kecepatan pengadukan 50 rpm. Sampel sebanyak 0,5 mL diambil dari medium pada interval waktu yang diinginkan dan segera digantikan dengan jumlah yang sama. Kadar insulin ditentukan secara kuantitatif dengan menggunakan KCKT.

### 3.12 Uji *In vivo*

Tikus Sprague Dawley jantan berat 200-250 g usia 8 minggu digunakan dalam uji secara *in vivo*. Sebanyak 18 tikus dipuasakan dan hanya diberi air minum selama 12 jam sebelum digunakan. Tikus dianestesi dengan uretan secara intraperitoneal dengan dosis 700 mg/kg. Formulasi blanko negatif (film tanpa insulin) dan sampel (film yang mengandung insulin  $\pm 3 \text{ IU/cm}^2$ ) diberikan kepada tikus. Pemberian diberlakukan dengan cara meletakkan film pada mukosa bukal setelah sebelumnya rongga mulut tikus dilembabkan dengan 50  $\mu\text{L}$  air. Larutan insulin dengan konsentrasi 1 IU/kg diberikan secara injeksi subkutan sebagai blanko positif, sedangkan untuk sampel film yang mengandung insulin diberikan dengan dosis 3,5 IU/kg ukuran  $0,5 \times 0,5 \text{ cm}$  ( $0,25 \text{ cm}^2$  atau  $\pm 0.7 \text{ IU}$ ). Sampel darah diambil dari vena bagian ekor pada 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 dan 360 menit setelah pemberian. Kadar glukosa darah ditentukan dengan menggunakan glukometer NESCO<sup>®</sup> N-08. Kemudian, persen kadar gula darah (%) dihitung sebagai persentase kadar gula darah terhadap kadar gula darah awal.

### 3.13 Perhitungan Availabilitas Farmakologi

Avalilabilitas farmakologi dihitung dengan membandingkan area diatas kurva efek hipoglikemik pada pemberian insulin melalui film bukal terhadap pemberian insulin melalui injeksi subkutan. Persen kadar gula darah diplot terhadap waktu, dan area diatas kurva kadar gula darah-waktu/*Area Above Curve* (AAC) ditentukan dengan menggunakan metode trapezoid. Availabilitas farmakologi (PA/*Pharmacological Availability* (%)) dikalkulasi menurut :

$$PA (\%) = \frac{AAC \text{ bukal}}{AAC \text{ subkutan}} \times \frac{\text{dosis subkutan}}{\text{dosis bukal}} \times 100 \%$$

dimana AAC bukal adalah area diatas kurva yang ditentukan setelah administrasi bukal film yang mengandung insulin selama 6 jam dan AAC subkutan adalah area diatas kurva yang ditentukan setelah administrasi injeksi subkutan insulin setelah 6 jam.



## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Sintesis dan Karakterisasi kitosan-N-asetil sistein

##### 4.1.1 Sintesis kitosan-N-asetil sistein

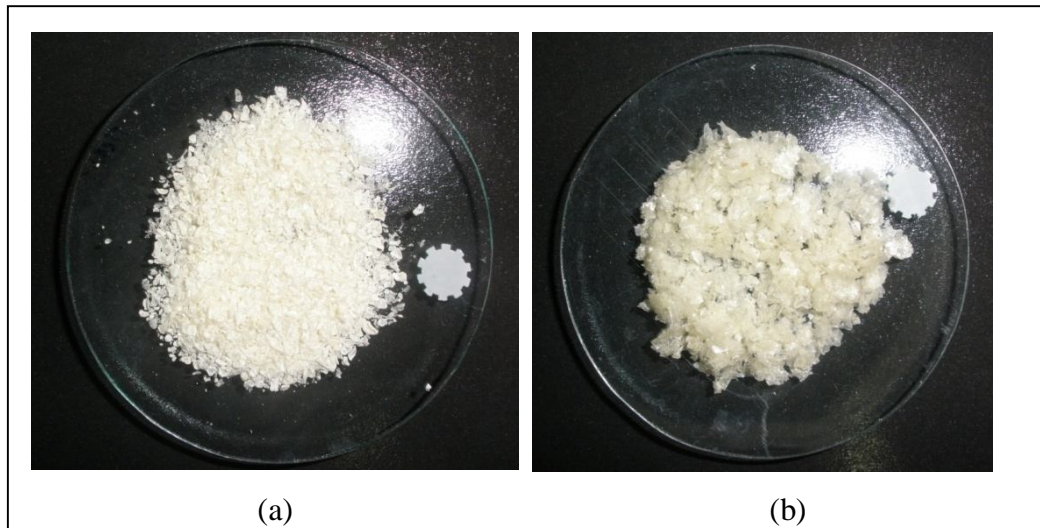
Kitosan-N-asetil sistein diperoleh dari pembentukan ikatan amida antara gugus amino dari kitosan dengan gugus karboksilat yang telah diaktivasi oleh karbodiimida (EDAC HCl) dari senyawa N-asetil sistein. Pada pembuatan kitosan-N-asetil sistein, kitosan yang telah dilarutkan dengan HCl 1% kemudian segera disesuaikan pHnya dengan NaOH 1 M, dengan jumlah perbandingan kurang lebih 1:2 (v/v, HCl 1% : NaOH 1 M) hingga mencapai pH 5. pH diatur pada pH 5 karena menurut penelitian yang dilakukan oleh Schmitz et al dan Wang et al diketahui bahwa pH paling stabil selama melakukan reaksi adalah pH 5. Pada penelitian tersebut diketahui bahwa kitosan-N-asetil sistein yang dilarutkan pada pH diatas 5 lebih cepat teroksidasi dibandingkan dengan kitosan-N-asetil sistein yang dilarutkan pada pH 5.

##### 4.1.2 Pemisahan Hasil Sintesis

Larutan akhir hasil sintesis didialisis menggunakan membran dialisis dengan *cutoff* 20 kDa dan medium dialisis 5 mM HCl mengandung 2mM EDTA dalam gelap pada suhu 10 °C selama 3 hari. Setelah didialisis dengan medium tersebut, kemudian larutan akhir hasil sintesis didialisis kembali pada keadaan dan medium yang sama, akan tetapi mengandung NaCl 1% dan terakhir didialisis kembali dengan medium dialisis HCl 1 mM. Dialisis dilakukan dalam gelap dan suhu rendah untuk mencegah oksidasi lebih lanjut dari gugus tiol yang membentuk ikatan disulfida. Medium dialisis digantikan setiap 12 jam untuk mencegah kejenuhan dari larutan medium dialisis.

Larutan hasil sintesis yang telah didialisis kemudian dipindahkan dalam wadah *freeze dry* dan dibekukan pada suhu 0 °C selama satu malam. Setelah dibekukan, larutan hasil sintesis segera diliofilisasi selama 2 hari 2 malam pada suhu -110 °C dan tekanan 70 mmHg. Kitosan-N-asetil sistein yang didapatkan setelah diliofilisasi merupakan suatu serpihan menyerupai plastik berwarna putih

hingga putih pucat. Apabila diamati secara visual, maka akan terlihat perbedaan fisik dari kitosan dengan kitosan-N-asetil sistein dimana kitosan berupa serbuk sedangkan kitosan-N-asetil sistein berupa seperti serpihan plastik berwarna putih sampai putih pucat kekuningan yang menyatakan bahwa telah terjadi perubahan fisik dari kitosan menjadi kitosan-N-asetil sistein.



Gambar 4.1 serbuk (a) kitosan (b) kitosan-N-asetil sistein

Kontrol yang merupakan kitosan yang direaksikan dengan N-asetil sistein tanpa karbodiimida diberi perlakuan dialisis yang sama dengan kitosan yang direaksikan dengan N-asetil sistein dengan karbodiimida. Kontrol tidak menunjukkan adanya serapan setelah direaksikan dengan reagen Ellman. Hal ini menunjukkan bahwa reaksi pembentukan ikatan amida tidak terjadi tanpa adanya penambahan karbodiimida. Selain itu hal ini juga menunjukkan bahwa dialisis yang dilakukan dapat dinyatakan sempurna.

Sebagai kontrol atas proses dialisis yang dilakukan, medium pada dialisis terakhir direaksikan dengan reagen Ellman dan diukur hasil serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis. Kontrol yang digunakan sebagai blank pada spektrofotometer UV-Vis adalah HCl 1 mM sebagai medium dialisis terakhir dan Reagen Ellman dengan jumlah yang sama. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa tidak ada serapan yang didapatkan sehingga dapat disimpulkan bahwa proses dialisis yang dilakukan sempurna.

Uji kelarutan kitosan-N-asetil sistein yang diamati pada rentang pH 1,2 hingga 14 menunjukkan bahwa kitosan-N-asetil sistein larut air pada rentang pH yang luas yaitu pada pH 1,2 hingga pH 9. Kelarutan kitosan-N-asetil sistein dalam air lebih baik dibandingkan kitosan kemungkinan disebabkan karena meningkatnya hidrofilitas polimer yang diakibatkan oleh penambahan gugus sistein yang memiliki banyak gugus hidrofil seperti gugus tiol dan amin (Wang et al, 2008).

#### 4.1.3 Jumlah Gugus Tiol Bebas dan Tiol Total

Pada sintesis kitosan-N-asetil sistein, jumlah gugus tiol bebas menandakan derajat modifikasi dari kitosan menjadi kitosan N-asetil sistein dalam satuan mol. Jumlah gugus tiol dapat ditentukan dengan menggunakan Reagen Ellman (Asam-5-5'-ditiobis-2-dinitrobenzoat/DTNB). Tiol akan bereaksi dengan DTNB dan memutus ikatan disulfida, menghasilkan 2-nitro-5-tiobenzoat ( $\text{NTB}^-$ ) yang akhirnya terionisasi menjadi dianion ( $\text{NTB}^{2-}$ ) pada larutan pH netral dan alkali. Ion  $\text{NTB}^{2-}$  ini memiliki warna kuning dan dapat dikuantitasi secara spektrofotometri dengan mengukur serapan ion tersebut pada panjang gelombang 412 nm. Reaksi ini terjadi dengan cepat dan bersifat stoikiometri, dimana tambahan 1 mol tiol menghasilkan satu mol NTB. Reaksi ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui total mol N-asetil sistein yang terkonjugasi pada kitosan.

Hasil sintesis kitosan-N-asetil sistein yang didapatkan menunjukkan hasil gugus tiol bebas mencapai  $423,28 \pm 12,99$   $\mu\text{mol}$  per gram polimer. Sebanyak 74,54 % gugus tiol berada dalam bentuk bebas, sedangkan sebanyak 25,46 % gugus tiol bebas teroksidasi menjadi gugus disulfida selama reaksi pembentukan ikatan amida terjadi. Hal ini ditunjukkan dari jumlah gugus tiol total yang didapatkan setelah mereduksi ikatan disulfida sebanyak  $567,83 \pm 17,82$   $\mu\text{mol}$  per gram polimer. Terjadinya oksidasi selama reaksi menyebabkan terjadinya ikatan antar gugus tiol (-SH) membentuk ikatan disulfida (S-S). Ikatan disulfida perlu direduksi dengan natrium borohidrid karena reagen Ellman hanya dapat membentuk ion 2-nitro-5-tiobenzoat ( $\text{NTB}^-$ ) dengan gugus tiol bebas (-SH) dan tidak dapat membentuk  $\text{NTB}^-$  dengan ikatan disulfida sehingga tanpa mereduksi

ikatan disulfida tidak dapat diketahui jumlah total N-asetil sistein yang tersubstitusi pada kitosan (Schmitz et al, 2007, Wong,1993).

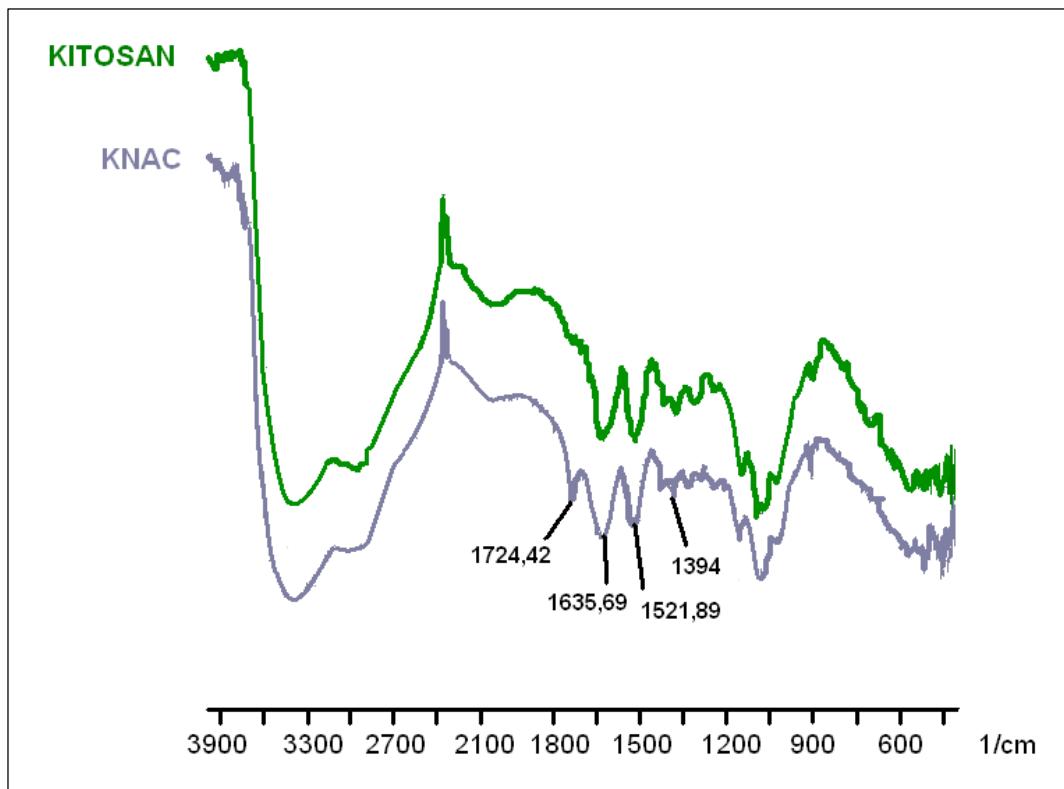
Tabel 4.1 Jumlah gugus tiol bebas dan jumlah gugus tiol total ( $\mu\text{mol}$  per gram polimer)

	Mean $\pm$ SD (n=3)
Jumlah gugus tiol bebas	423,28 $\pm$ 12,99
Jumlah gugus tiol total	567,83 $\pm$ 17,82

#### 4.1.4 Spektrum IR Kitosan dan Kitosan-N-Asetil Sistein

Pada karakterisasi kitosan dan kitosan-N-asetil sistein dengan menggunakan alat FT-IR, pita yang muncul pada spektrum IR kitosan-N-asetil sistein yaitu pada  $1635,69\text{ cm}^{-1}$  untuk pita amida pertama;  $1521,89\text{ cm}^{-1}$  untuk pita amida yang kedua dan  $1394\text{ cm}^{-1}$  untuk pita amida yang ketiga. Gugus amida terbentuk karena adanya reaksi dari gugus amino dari kitosan dan gugus karboksilat dari senyawa sulfhidril. Apabila spektrum IR kitosan-N-asetil sistein dibandingkan dengan spektrum IR kitosan, maka pada spektrum IR kitosan-N-asetil sistein terdapat pita serapan baru pada bilangan gelombang  $1724,42\text{ cm}^{-1}$ . Pita serapan pada bilangan gelombang tersebut menunjukkan adanya tambahan gugus keton yang merupakan gugus karbonil dari gugus keton pada N-asetil sistein. Sebagai pembanding, pada penelitian terdahulu oleh Wang et al Kitosan-N-asetil sistein yang disintesis menunjukkan adanya pita serapan pada  $1652\text{ cm}^{-1}$  sebagai pita amida pertama,  $1520\text{ cm}^{-1}$  sebagai pita amida kedua dan  $1311\text{ cm}^{-1}$  sebagai pita amida ketiga. Hasil penelitian Wang menunjukkan sedikit peningkatan intensitas pada pita amida pertama dan kedua walau interpretasi data IR yang didapat oleh Wang tidak menunjukkan karakter yang signifikan. Dari hasil data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa spektum IR kitosan-N-asetil sistein menunjukkan perbedaan dibandingkan dengan spektrum IR kitosan.





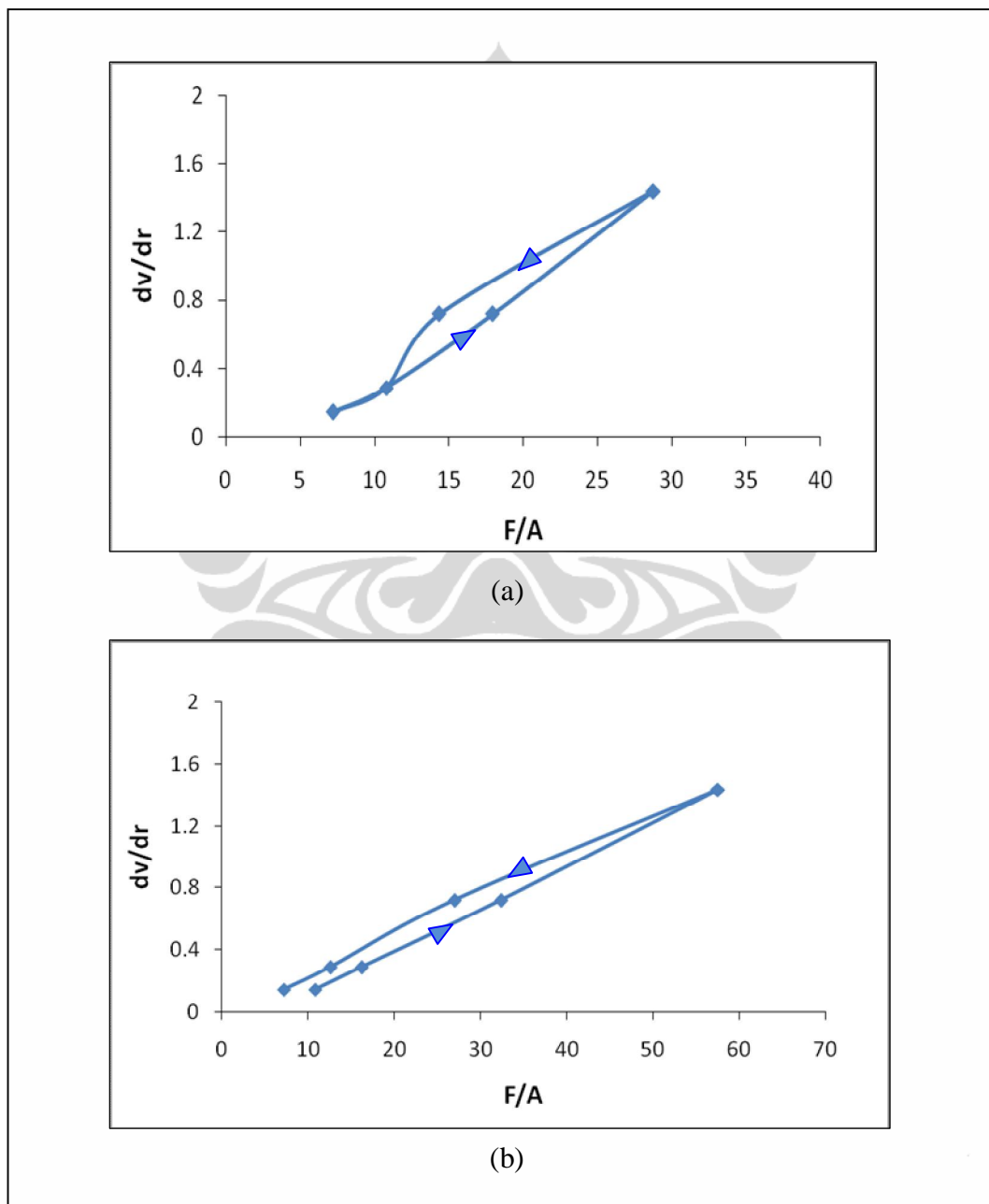
Gambar 4.2 Spektrum IR kitosan dan kitosan-N-asetil sistein

#### 4.1.5 Viskositas dan Rheologi

Viskositas larutan kitosan-N-asetil sistein dibuat dengan konsentrasi 0,92% (2,0659 gram dalam 225 mL aquadest). Uji viskositas dilakukan untuk melihat viskositas serta sifat rheologi dari larutan kitosan-N-asetil sistein dan dibandingkan dengan larutan kitosan dengan konsentrasi yang sama.

Reogram pada Gambar 4.3 menunjukkan bahwa sifat aliran dari kedua larutan merupakan aliran tiksotropik yaitu sifat aliran yang umum dimiliki oleh polimer pembentuk gel. Pada polimer pembentuk gel, pemberian tekanan geser akan mengubah sistem tersebut menjadi sistem yang cair. Reogram tersebut juga menunjukkan terjadi sedikit perubahan kurva sifat aliran serta penurunan viskositas dari kitosan menjadi kitosan-N-asetil sistein. Viskositas kitosan dengan pengukuran menggunakan spindel 1 pada rpm 2 menunjukkan nilai  $75 \text{ dyne s cm}^{-2}$  sedangkan viskositas kitosan-N-asetil sistein pada kondisi pengukuran yang sama adalah  $50 \text{ dyne s cm}^{-2}$ . Hal ini menunjukkan terjadinya perubahan sifat fisik dari

kitosan menjadi kitosan-N-asetil sistein. Penurunan viskositas terjadi kemungkinan disebabkan polimer kitosan-N-asetil sistein yang memiliki derajat modifikasi tinggi akan mempengaruhi jaringan 3 dimensi dari polimer. Hal tersebut sangat berpengaruh pada kemampuan polimer mengikat air, dimana semakin kuat polimer mengikat air, maka semakin tinggi viskositasnya (Cui et al, 2008).



Gambar 4.3 Reogram dari larutan (a) kitosan-N-asetil sistein dan (b) kitosan

#### 4.1.6 Swelling

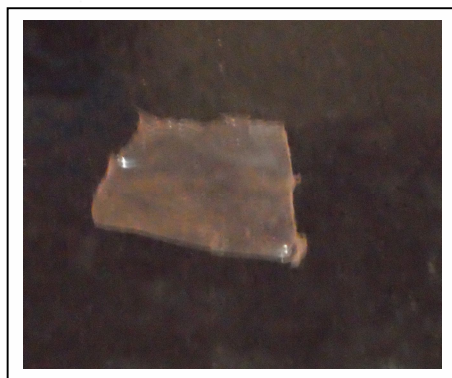
Hasil *swelling* menunjukkan bahwa kitosan-N-asetil sistein memiliki kemampuan mengembang hingga mendekati 1,5 kali beratnya. Hasil perhitungan yang didapatkan memberikan nilai indeks *swelling* untuk kitosan-N-asetil sistein adalah  $0,483 \pm 0,058$  sedangkan untuk kitosan adalah  $0,406 \pm 0,017$ . Berdasarkan analisis statistik dengan t-test, indeks *swelling* kitosan-N-asetil sistein dengan kitosan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik. Walaupun demikian hasil ini menunjukkan bahwa *swelling* kitosan-N-asetil sistein cenderung lebih tinggi dibandingkan kitosan. Hal ini dapat terjadi kemungkinan disebabkan oleh meningkatnya hidrofilisitas dari konjugat kitosan-N-asetil sistein yang diakibatkan oleh penambahan gugus Asetil sistein yang memiliki gugus hidrofil (Wang et al, 2008).

Tabel 4.2 Hasil indeks *swelling* kitosan dan kitosan-N-asetil sistein

	Mean $\pm$ SD (n=3)
Kitosan	$0,406 \pm 0,017$
Kitosan-N-asetil sistein	$0,483 \pm 0,058$

#### 4.2 Pembuatan Film kitosan-N-asetil sistein/Insulin

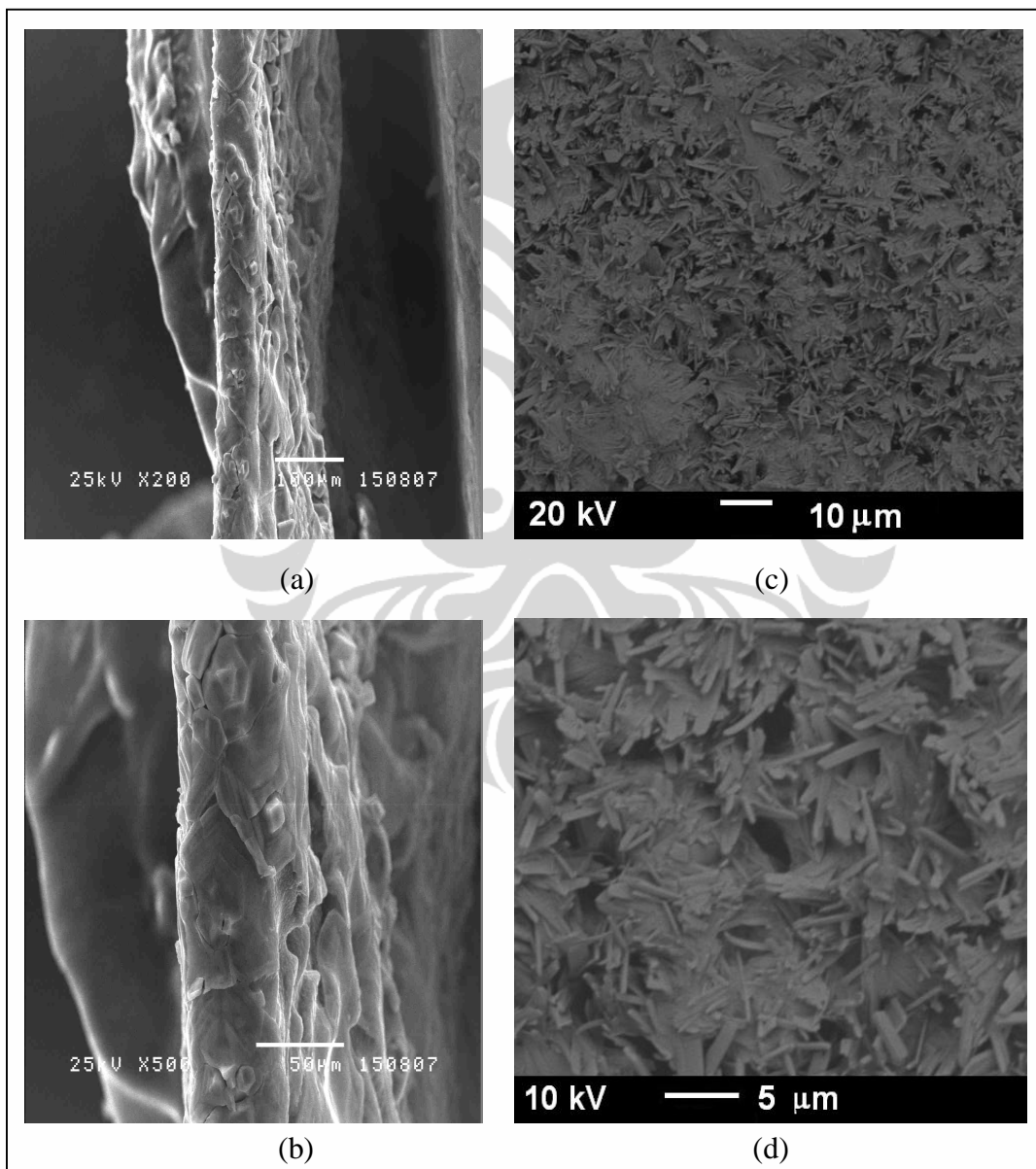
Film kitosan-N-asetil sistein yang dihasilkan merupakan film fleksibel dan berwarna transparan hingga agak keputih-putihan. Film yang didapatkan memiliki berat sekitar 200 mg dengan diameter hingga 3,5 cm.



Gambar 4.4 Film kitosan-N-asetil sistein

### 4.3 Morfologi

Hasil SEM dari irisan melintang dan permukaan film yang didapatkan menunjukkan bahwa film memiliki tebal hingga mencapai 200  $\mu\text{m}$ . Selain itu, hasil SEM dari permukaan film menunjukkan film yang didapat memiliki permukaan yang tidak halus dan sedikit berpori. Permukaan film yang berpori ini akan memfasilitasi difusi dan berpotensi untuk menyebabkan pelepasan *burst release* dari senyawa obat (Cui et al., 2008).



Gambar 4.5 Hasil SEM dari film kitosan-N-asetil sistein (a) irisan melintang dengan perbesaran 200 kali, (b) irisan melintang dengan perbesaran 500 kali, (c) permukaan dengan perbesaran 1000 kali dan (d) permukaan dengan perbesaran 3000 kali

#### 4.4 Kekuatan dan Waktu Mukoadhesi

Hasil uji mukoadhesi dari film dengan menggunakan texture analyzer menunjukkan bahwa film kitosan-N-asetil sistein memiliki gaya mukoadhesi  $9,97 \pm 0,25$  gF, sedangkan film kitosan sebagai pembanding memiliki gaya mukoadhesi  $7,97 \pm 0,15$  gF. Hasil tersebut menunjukkan bahwa film kitosan-N-asetil sistein memberikan gaya mukoadhesi lebih besar yang berbeda secara bermakna dibandingkan dengan kitosan (t-test,  $p < 0.05$ ).

Tabel 4.3 Gaya mukoadhesi dan waktu mukoadhesi film kitosan dan kitosan-N-asetil sistein (n=3)

	Waktu Mukoadhesi (jam)	Gaya Mukoadhesi (gF)
Film Kitosan	$3,16 \pm 0,38$	$7,97 \pm 0,15$
Film Kitosan-N-asetil sistein	$7,58 \pm 0,30$	$9,97 \pm 0,25$

Pengujian waktu mukoadhesi juga dilaksanakan untuk mengetahui lamanya film melekat pada mukosa. Film kitosan-N-asetil sistein memberikan waktu mukoadhesi yang lebih panjang hingga 2,4 kali lipat dari waktu mukoadhesi film kitosan, dimana waktu mukoadhesi film kitosan-N-asetil sistein adalah  $7,58 \pm 0,30$  jam dan waktu mukoadhesi film kitosan adalah  $3,16 \pm 0,38$  jam. Dari hasil uji gaya mukoadhesi dan waktu mukoadhesi yang diperoleh dapat diambil kesimpulan bahwa film kitosan-N-asetil sistein memiliki sifat mukoadhesi yang lebih tinggi dibandingkan dengan film kitosan.

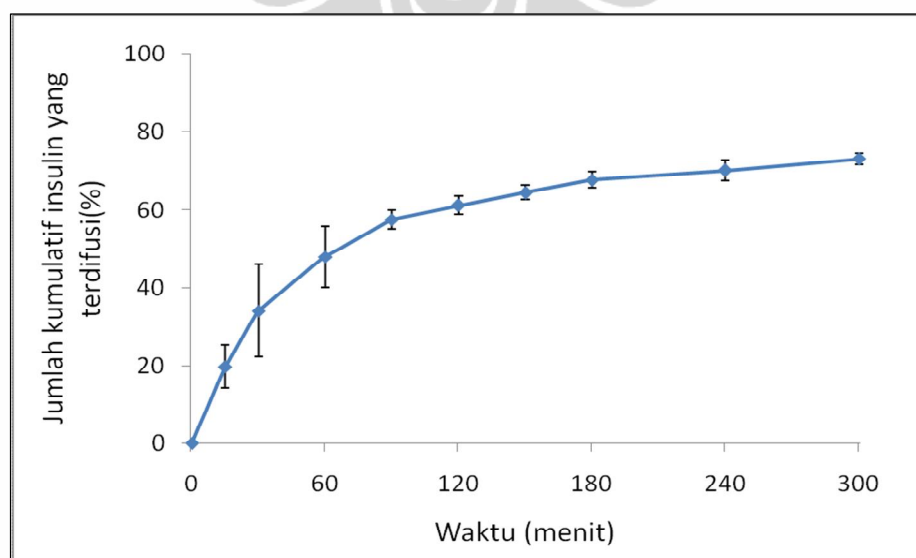
Sifat mukoadhesi film kitosan-N-asetil sistein lebih tinggi dibandingkan film kitosan dapat disebabkan oleh adanya gugus tiol tambahan pada struktur kitosan-N-asetil sistein. Gugus tiol (-SH) pada kitosan-N-asetil sistein dapat bereaksi dengan gugus tiol dari gugus sistein pada mukus membentuk ikatan disulfida dan menghasilkan suatu interaksi mukoadhesi yang merupakan ikatan kovalen. Apabila dibandingkan dengan kitosan yang interaksi mukoadhesinya berdasarkan interaksi ikatan ionik dan ikatan hidrogen antara kitosan dengan mukus, ikatan kovalen antara kitosan-N-asetil sistein dengan mukus merupakan ikatan yang lebih kuat. Berdasarkan hal tersebut, hasil uji mukoadhesi yang

didapatkan sesuai dengan dasar pemikiran bahwa kitosan-N-asetil sistein memiliki sifat mukoadhesi yang lebih tinggi dibandingkan kitosan (Shmitz et al, 2007).

#### 4.5 Difusi Insulin *In Vitro*

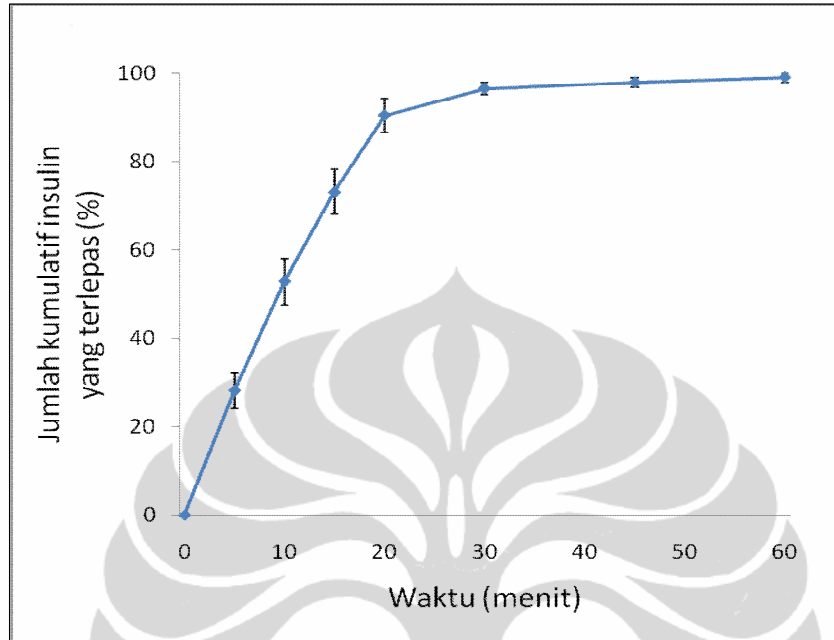
Kadar insulin dianalisis menggunakan KCKT dengan waktu retensi insulin 12,8 menit dan baku dalam 4,6 menit. Persamaan regresi dari kurva kalibrasi perbandingan luas puncak insulin/baku dalam terhadap konsentrasi insulin adalah  $y = 0,0262x - 0,1279$  dengan  $r = 0,9991$ . Hasil uji difusi *in vitro* seperti terlihat pada Gambar 4.6 menunjukkan bahwa jumlah kumulatif insulin yang terdifusi melewati film mencapai hingga 70 % dalam 3 jam. Nilai fluks dari insulin pada menit ke 15 hingga menit ke 90 adalah  $4,29 \pm 0,59 \mu\text{g menit}^{-1} \text{cm}^{-2}$  sedangkan pada menit ke 120 hingga menit ke 300 adalah  $0,55 \pm 0,02 \mu\text{g menit}^{-1} \text{cm}^{-2}$ . Pengujian dihentikan pada jam ke-5 disebabkan tidak ada perubahan bermakna yang diamati dari jumlah kumulatif insulin yang terdifusi mulai dari jam ke 3 hingga jam ke 5 ( $p > 0,01$ ). Hal tersebut terjadi karena kadar insulin pada kompartemen donor dan kompartemen reseptor tidak berbeda secara bermakna dan telah tercapai kesetimbangan.

Difusi insulin melewati film kitosan-N-asetil sistein yang relatif cepat dapat terjadi dimungkinkan karena struktur matriks film kitosan-N-asetil sistein yang cukup berpori. Pori pada matriks film dapat memfasilitasi proses difusi dari makromolekul besar seperti insulin.



Gambar 4.6 Kurva jumlah kumulatif insulin terhadap waktu (n=3)

#### 4.6 Pelepasan Insulin *In Vitro*



Gambar 4.7 Kurva jumlah kumulatif insulin terhadap waktu (n=4)

Hasil uji pelepasan insulin dari film kitosan-N-asetil sistein menunjukkan bahwa jumlah kumulatif insulin yang terlepas mencapai lebih dari 95 % dalam 30 menit. Hasil uji pelepasan yang terlihat pada Gambar 4.7 juga menunjukkan bahwa jumlah kumulatif insulin yang terlepas telah mencapai lebih dari 70 % pada menit ke 15 dan mencapai lebih dari 90 % pada menit ke 20. Hasil uji ini mengindikasikan bahwa pelepasan insulin dari film kitosan-N-asetil sistein memberikan profil pelepasan “*burst release*” yaitu insulin terlepas dengan segera dari matriks film. Profil pelepasan yang cepat ini dapat terjadi disebabkan oleh adanya pori pada matriks film yang memfasilitasi penetrasi cairan ke dalam matriks dan menjadikan proses difusi dari insulin serta erosi dari film menjadi lebih cepat.

Insulin sebagai bahan aktif dapat terdispersi secara merata pada matriks polimer kitosan-N-asetil sistein atau berada pada bagian berpori dari film. Hal ini menjadi dasar bahwa pelepasan insulin melewati film kitosan-N-asetil sistein



dapat berdasarkan pada mekanisme difusi dan erosi. Kitosan-N-asetil sistein yang memiliki sifat hidrofilitas tinggi dan *swelling* yang baik dapat memfasilitasi proses pelepasan insulin melalui mekanisme difusi dari insulin serta erosi dari matriks film. Selain itu, adanya pori pada film memungkinkan air berpenetrasi lebih cepat ke dalam matriks film sehingga proses difusi dari insulin serta erosi dari film menjadi lebih cepat (Wang et al, 2008).

#### 4.7 Hasil Uji *In Vivo*

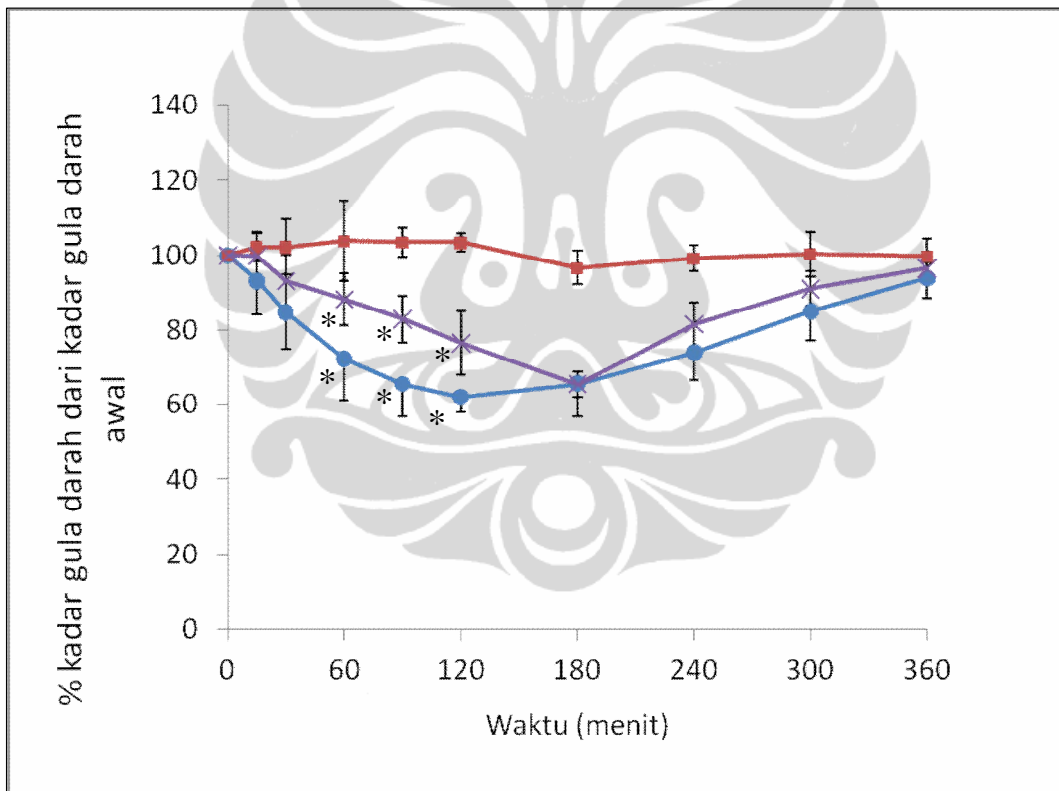
Gambar 4.8 menunjukkan bahwa pada pemberian film insulin bukal kitosan-NAC (3,5 IU/kg) dan injeksi insulin subkutan (1 IU/kg) terlihat adanya penurunan kadar gula darah yang cukup signifikan hingga mencapai 65,46 % dari kadar gula darah awal untuk film insulin bukal dan 62,11 % dari kadar gula darah awal untuk injeksi insulin subkutan. Sebaliknya film kitosan-NAC tanpa insulin tidak memperlihatkan adanya efek hipoglikemik. Perubahan kadar gula darah pada blanko negatif hanya menunjukkan penurunan maksimal hingga  $96,16 \pm 5,71$  % yang tidak berbeda bermakna secara statistik dibandingkan dengan kadar gula darah awal ( $p > 0,01$ ).

Pada pemberian insulin melalui injeksi subkutan, efek hipoglikemik dianggap mulai terjadi pada menit ke 30 hingga menit ke 360, sedangkan pada pemberian insulin melalui film bukal kitosan-NAC efek hipoglikemik dianggap mulai terjadi pada menit ke 60 hingga menit ke 360. Pada durasi tersebut efek hipoglikemik dianggap terjadi karena nilai kadar gula darah pada waktu tersebut menunjukkan perbedaan bermakna secara statistik ( $p < 0,05$ ) terhadap nilai kadar gula darah awal. Sebagai perbandingan, perbedaan penurunan kadar gula darah yang bermakna secara statistik antara injeksi insulin subkutan dengan film tanpa insulin pada waktu ke-t mulai teramati dari menit ke 30 hingga menit ke 300, sedangkan untuk film insulin bukal kitosan-NAC dengan film tanpa insulin perbedaan mulai teramati dari menit ke 60 hingga menit ke 300 ( $p < 0,05$ ).

Data tersebut menunjukkan bahwa pemberian insulin via rute bukal dengan menggunakan film kitosan-NAC memiliki peranan dalam penurunan kadar gula darah apabila dibandingkan dengan film tanpa insulin. Data ini juga menunjukkan bahwa penurunan kadar gula darah yang dibandingkan terhadap



film tanpa insulin dan berbeda bermakna secara statistik tercapai sedikit lebih cepat pada injeksi insulin subkutan dibandingkan dengan film insulin bukal kitosan-NAC. Hal ini dapat disebabkan karena membran mukosa pada rute bukal berperan sebagai *rate-limiting step* yang membatasi tersedianya insulin secara segera ke sirkulasi sistemik. Selain itu hal-hal lain seperti tebal film dapat mempengaruhi jumlah insulin yang terdifusi memasuki sirkulasi sistemik, karena untuk mencapai membran mukosa insulin harus berdifusi pada matriks film itu sendiri sehingga semakin tebal film jumlah insulin yang tersedia akan semakin terbatas (Rathbone et al, 2003).



Gambar 4.8 Kurva persen kadar gula darah dari kadar gula darah awal terhadap waktu. (●) merupakan injeksi insulin subkutan (1 IU/kg), (■) merupakan film bukal kitosan-NAC tanpa insulin dan (X) merupakan film bukal kitosan-NAC dengan dosis 3,5 IU/kg. Setiap nilai menandakan mean ± SD (n=6)  
\* perbedaan bermakna antara 2 perlakuan (p<0,05)

Efek hipoglikemik dari pemberian insulin secara subkutan pada menit ke 60, 90 dan 120 lebih tinggi apabila dibandingkan dengan pemberian insulin melalui film bukal. Hal tersebut disimpulkan berdasarkan pada hasil perhitungan dengan t-test yang menunjukkan bahwa perbedaan bermakna secara statistik antara pemberian injeksi insulin subkutan dengan film insulin bukal teramati pada menit-menit tersebut ( $p < 0,05$ ).

Area diatas kurva (*Area Above Curve/AAC*) dikalkulasi untuk menggambarkan efek hipoglikemik dari masing-masing perlakuan. AAC dari perubahan kadar gula darah (persen kadar gula darah pada waktu-t terhadap kadar gula darah awal) terhadap waktu dihitung dengan menggunakan metode trapezoid. Hasil dari perhitungan menunjukkan bahwa AAC untuk injeksi insulin subkutan (1 IU/kg) menunjukkan nilai area 148,407 sedangkan AAC untuk film insulin bukal (3,5 IU/kg) menunjukkan nilai area 101,805. Hasil perhitungan area ini menandakan bahwa AAC untuk injeksi subkutan relatif lebih besar dibandingkan dengan AAC untuk film bukal. Hasil AAC juga dihitung untuk mendapatkan nilai availabilitas farmakologi dari film insulin bukal dibandingkan dengan injeksi insulin subkutan. Dari perhitungan tersebut didapatkan nilai availabilitas farmakologi dari film insulin bukal dibandingkan dengan injeksi insulin subkutan adalah 18,91 %.

Availabilitas farmakologi dihitung untuk mendapatkan gambaran perbandingan efek hipoglikemik dari injeksi insulin subkutan dengan film insulin bukal pada dosis yang sama, sehingga dapat diperkirakan berapa dosis yang dibutuhkan untuk mendapatkan efek hipoglikemik yang setara atau lebih baik. Hasil perhitungan availabilitas farmakologi menandakan bahwa untuk mendapatkan efek hipoglikemik yang setara atau lebih baik dari injeksi insulin subkutan (1 IU/kg) maka dibutuhkan peningkatan dosis insulin pada film bukal. Berdasarkan nilai availabilitas farmakologi yang didapatkan, diperkirakan dosis insulin pada film insulin bukal agar memberikan efek hipoglikemik yang setara dengan injeksi subkutan insulin adalah 5,29 IU/kg. Akan tetapi, hubungan antara dosis dengan efek hipoglikemik dari insulin pada penghantaran bukal seringkali tidak menunjukkan hubungan linear seperti pada penelitian yang dilakukan oleh

Wang et al, Cui et al dan Xu et al dimana kenaikan dosis insulin tidak linear dengan kenaikan efek hipoglikemik. Oleh karena itu pada penelitian ini dosis insulin yang dibutuhkan untuk mencapai kadar insulin yang setara dengan penghantaran insulin melalui injeksi subkutan tidak dapat dipastikan. Hasil penelitian ini sulit dibandingkan dengan penelitian serupa lainnya disebabkan penelitian ini dilakukan dengan metode formulasi serta perlakuan pada hewan yang berbeda. Namun sebagai perbandingan, availabilitas farmakologi film bukal kitosan-etilendiamintetraasetat yang mengandung insulin yang dibandingkan terhadap injeksi subkutan insulin 1 IU/kg dari penelitian Cui et al menunjukkan nilai hingga mencapai 17 %.

Pada penelitian ini diketahui bahwa film kitosan-N-asetil sistein memiliki kelebihan dalam hal sifat mukoadhesi yang tinggi dengan durasi penempelan yang cukup panjang hingga mencapai 6 jam. Sifat mukoadhesi yang tinggi ini memberikan keuntungan dalam hal penghantaran bukal dikarenakan mukoadhesi dapat meningkatkan waktu kontak antara mukosa bukal dengan polimer pembawa sehingga mengakibatkan dimungkinkannya absorpsi obat secara pasif dalam jangka waktu yang diperpanjang dan diharapkan meningkatnya jumlah obat yang masuk ke sirkulasi sistemik (Cui et al, 2008 dan Wang et al, 2008). Walaupun dibutuhkan dosis yang lebih besar dibandingkan dengan injeksi subkutan, pemberian insulin melalui rute bukal lebih nyaman dibandingkan dengan rute injeksi serta mengurangi kemungkinan terjadinya infeksi dari penyuntikkan terus menerus. Film sebagai bentuk sediaan terpilih juga memiliki kelebihan dibandingkan bentuk sediaan tablet bukal disebabkan sifatnya yang lebih fleksibel dari tablet sehingga memberikan kenyamanan yang lebih tinggi.

Selain itu, sebagaimana yang telah dijelaskan oleh Wang pada penelitiannya, kitosan yang dimodifikasi dengan gugus tiol dapat meningkatkan permeasi disebabkan oleh mekanisme inaktivasi protein tirosin fosfatase (PTP) yang bergantung pada tiol. PTP merupakan enzim yang bertanggung jawab dalam penutupan *tight junction*. Defosforilasi dari gugus tirosin pada daerah ekstraseluler yang dimediasi oleh PTP menyebabkan terjadinya penutupan *tight junction*. PTP yang merupakan enzim yang memiliki residu sistein pada bagian aktifnya dapat membentuk ikatan disulfida dengan gugus tiol dari polimer yang

dimodifikasi oleh gugus tiol. PTP yang berikatan dengan gugus tiol dari polimer ini akan menjadi tidak aktif dan menyebabkan terhentinya defosforilasi sehingga permeabilitas *tight junction* akan meningkat (Clausen dan Bernkop-Schnurch, 2000).



## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa :

1. Kitosan-N-asetil sistein yang disintesis memiliki jumlah gugus tiol bebas  $423,28 \pm 12,99 \mu\text{mol/gram}$  polimer dan gugus tiol total  $567,83 \pm 17,82 \mu\text{mol/gram}$  polimer.
2. Kitosan-N-asetil sistein memiliki karakteristik antara lain kelarutan yang meningkat pada pH basa serta sifat *swelling* yang setara dibandingkan dengan kitosan yang tidak dimodifikasi.
3. Film kitosan-N-asetil sistein yang didapatkan memiliki sifat mukoadhesi yang lebih tinggi sehingga waktu kontak antara film dengan membran bukal dapat menjadi lebih panjang.
4. Difusi insulin melewati membran film dan pelepasan insulin dari film kitosan-N-asetil sistein secara berturut-turut dapat mencapai 70 % dalam 3 jam serta 95 % dalam 30 menit.
5. Film bukal insulin dari kitosan-N-asetil sistein yang dihasilkan juga dapat menghantarkan insulin dan memberikan efek hipoglikemik dengan availabilitas farmakologi hingga 18,91% dalam waktu 6 jam.
6. Film kitosan-N-asetil sistein yang dihasilkan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sistem pembawa dalam penghantaran bukal insulin ataupun senyawa makromolekul lainnya.

#### 5.2 Saran

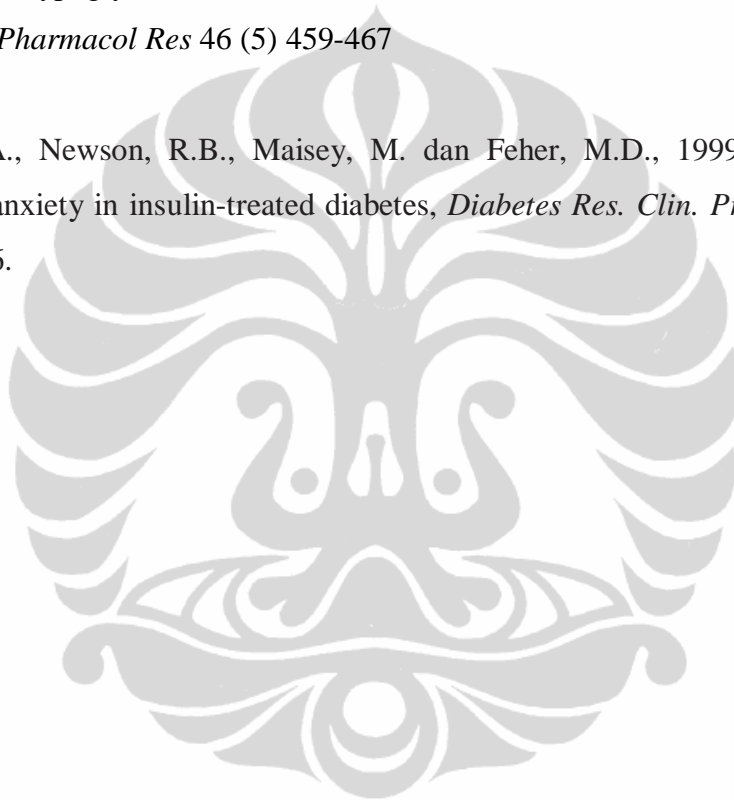
1. Penelitian lanjutan untuk membandingkan pengaruh perbedaan dosis dapat dilaksanakan untuk memberikan gambaran berapa dosis insulin yang dibutuhkan untuk mencapai efek hipoglikemik yang setara dengan injeksi subkutan.
2. Penelitian mengenai pengaruh perbedaan jumlah gugus tiol bebas terhadap efek hipoglikemik dari insulin dapat dilakukan untuk menguji pengaruh peningkatan gugus tiol terhadap efek hipoglikemik.

## DAFTAR REFERENSI

- Bernknop Schnurch, A. (2005). Thiomers : A new generation of mucoadhesive polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 1569-1582
- Bonder, C., Lauritzen, T., Faber, O. S. Pramming. (1984). Insulin pharmacokinetics. *Diabetes Care* 7 (2) 188–199.
- Carino, G.P. dan Mathiowitz, E. (1999). Oral insulin delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35 (2-3) 249–257
- Clausen, AE., Bernkop-Schnurch, A. (2000). In vitro evaluation of the permeation-enhancing effect of thiolated polycarbophil. *J Pharm Sci* (89)1253–1261.
- Cui, F., He, C., He, M., Cui, T., Yin, L., Qian, F., dan Cin, H. (2008). Preparation and evaluation of chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid hydrogel films for the mucoadhesive transbuccal delivery of insulin. *J Biomed Mater Res Part A* 1063-1071
- Damgé, C., Maincent, P. dan Ubrich, N. (2007). Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J. Control. Release* 117 (2) 163–170
- Goldberg, M. dan Gomez-Orellana., I. (2003). Challenges for the oral delivery of macromolecules. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (4) 289–295.
- Lin, Yu-Shin (2008). Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *J. Control. Release* 132, 141-149.

- Longer, M.A. dan Robinson, J.R.. (1986). Fundamental aspects of bioadhesion. *Pharm. Int.* 7, 114– 117.
- Owens, D.R., Zinman, B. dan Bolli. G. (2003). Alternative routes of insulin delivery. *Diabet. Med.* 20 (11) 886–898
- Portero, A., Teijeiro-Osorio, D., Alonso, M.J., Remunan-Lopez, C. (2007). Development of Chitosan Sponges for Buccal Administration of Insulin. *Carbohydr Polym* 68, 617-625
- Rathbone, M.J., Hadgraft, J. dan Robert, M.S. (ed). (2003). Modified-Release Drug Delivery Technology. New York : Marcel Dekker, Inc. 349-364
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J. dan Quinn, M.E. (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipient. Edisi 6. London : Pharmaceutical Press. 159-161, 283-286
- Salamat-Miller, N., Chittchang, M. dan Johnston, T.P. (2005). The Use of Mucoadhesive Polymer in Buccal Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (57) 1666-1691
- Schmitz, T., Grabovac, V., Palmberger, T. F., Hoffer, M.H., Bernkop-Schnurch, A., (2007). Synthesis and characterization of a chitosan-N-acetyl cysteine conjugate. *Int J Pharm* (347) 79-85
- Sweetman, S.C. (ed). (2009). Martindale : The complete drug reference. Edisi 36. London : Pharmaceutical Press. 443-453, 1548-1550
- Touitou, E. dan Barry, B.W. (ed). (2007). Enhancement in drug delivery, Florida : CRC Press. 176-198

- Wang, X., Zheng, C., Wu, Z., Teng, D., Zhang, X., Wang, Z., dan Li, C. (2008). Chitosan-NAC nanoparticles for nasal absorption enhancement for insulin. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, (88B) 150–161
- Wong, S.S. (1993). Chemistry of protein conjugation and cross-linking. Florida : CRC Press, Inc. 39-40, 195-199
- Xu, H. 2002. Hypoglycaemic effect of a novel insulin buccal formulation on rabbits. *Pharmacol Res* 46 (5) 459-467
- Zambanini, A., Newson, R.B., Maisey, M. dan Feher, M.D., 1999. Injection related anxiety in insulin-treated diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 46 (3) 239–246.





Lampiran 1.

Tabel viskositas larutan kitosan-N-asetil sistein dengan konsentrasi 0,92%

Spindel	Kecepatan (rpm)	Dial Reading (dr)	Faktor Koreksi (Fk)	Viskositas (dr x Fk)
1	2	1	50	50
	4	1,5	25	37,5
	10	2,5	10	25
	20	4	5	20
	20	4	5	20
	10	2	10	20
	4	1,5	25	37,5
	2	1	50	50

Lampiran 2.

Tabel viskositas larutan kitosan dengan konsentrasi 0,92%

Spindel	Kecepatan (rpm)	Dial Reading (dr)	Faktor Koreksi (Fk)	Viskositas (dr x Fk)
1	2	1,5	50	75
	4	2,25	25	56,25
	10	4,5	10	45
	20	8	5	40
	20	8	5	40
	10	3,75	10	37,5
	4	1,75	25	43,75
	2	1	50	50

### Lampiran 3

Tabel data perbandingan luas puncak insulin dengan metil paraben sebagai baku dalam pada medium dapat fosfat pH 7,4 yang dianalisis menggunakan KCKT pada panjang gelombang 214 nm dengan persamaan regresi linier  $y = 0,0262x - 0,1279$  dan  $r = 0,9991$ .

Konsentrasi Insulin (ppm)	Luas Puncak Insulin	Luas Puncak baku dalam	Perbandingan Luas Puncak
12,10	112258	486851	0,23
24,20	228716	493187	0,46
38,72	388982	436337	0,89
48,40	515805	463858	1,11
58,08	617038	428213	1,44
72,60	831853	483410	1,72
121,00	1373239	449568	3,05

### Lampiran 4

Tabel data rata-rata persen insulin terdifusi *in vitro*

Waktu (menit)	Jumlah kumulatif obat terdifusi, Mean $\pm$ SD n =3 (%)
0	0
15	19,82 $\pm$ 5,55
30	34,10 $\pm$ 11,85
60	47,89 $\pm$ 7,86
90	57,48 $\pm$ 2,53
120	61,14 $\pm$ 2,38
150	64,43 $\pm$ 1,83
180	67,67 $\pm$ 2,02
240	70,03 $\pm$ 2,61
300	72,97 $\pm$ 1,42

Lampiran 5

Tabel data rata-rata pelepasan insulin *in vitro*

Waktu (menit)	Jumlah kumulatif obat terlepas, Mean $\pm$ SD n =4 (%)
0	0
5	28,11 $\pm$ 3,97
10	52,86 $\pm$ 5,29
15	73,14 $\pm$ 5,04
20	90,48 $\pm$ 3,77
30	96,51 $\pm$ 1,41
45	97,92 $\pm$ 1,02
60	99,04 $\pm$ 1,07

Lampiran 6

Tabel data rata-rata uji *in vivo*

Waktu (menit)	Persen Penurunan Kadar Gula darah terhadap kadar gula darah awal, Mean $\pm$ SD n =6 (%)		
	Film tanpa insulin	Injeksi insulin subkutan	Film k-NAC dengan insulin
0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
15	102,17 $\pm$ 3,79	93,31 $\pm$ 8,98	99,80 $\pm$ 6,36
30	102,15 $\pm$ 7,34	84,88 $\pm$ 9,88	93,20 $\pm$ 6,82
60	103,73 $\pm$ 10,71	72,31 $\pm$ 11,29	88,22 $\pm$ 6,91
90	103,42 $\pm$ 3,84	65,59 $\pm$ 8,89	82,95 $\pm$ 6,19
120	103,39 $\pm$ 2,37	62,11 $\pm$ 4,29	76,59 $\pm$ 8,61
180	96,64 $\pm$ 4,49	65,70 $\pm$ 8,78	65,46 $\pm$ 3,42
240	99,23 $\pm$ 3,50	74,06 $\pm$ 7,57	81,54 $\pm$ 5,85
300	100,31 $\pm$ 5,89	85,15 $\pm$ 7,75	91,03 $\pm$ 4,60
360	99,76 $\pm$ 4,52	94,02 $\pm$ 5,40	96,40 $\pm$ 1,61

Lampiran 7  
Tabel data difusi insulin

Sampel	Waktu (menit)	Perbandingan luas puncak	Jumlah terdifusi ( $\mu\text{g}$ )	Persen Terdifusi (%)
1	0	0	0	0
	15	1,11	141,74	14,17
	30	1,51	211,17	21,12
	60	2,87	398,15	39,82
	90	3,72	552,69	55,27
	120	3,41	590,63	59,06
	150	3,17	630,67	63,07
	180	2,88	660,39	66,04
	240	2,52	676,58	67,66
	300	2,46	720,24	72,02
2	0	0	0	0
	15	1,62	200,14	20,01
	30	3,05	397,24	39,72
	60	3,42	500,25	50,02
	90	3,55	582,85	58,29
	120	3,34	628,99	62,90
	150	2,93	648,22	64,82
	180	2,72	682,53	68,25
	240	2,51	712,84	71,28
	300	2,25	733,41	73,34
3	0	0	0	0
	15	2,08	252,81	25,28
	30	3,18	420,90	42,09
	60	3,71	544,72	54,47
	90	3,51	595,06	59,51
	120	3,13	620,97	62,10
	150	2,93	660,25	66,03
	180	2,71	693,41	69,34
	240	2,45	717,80	71,78
	300	2,23	741,81	74,18

Lampiran 8  
Tabel data pelepasan insulin

Sampel	Waktu (menit)	Perbandingan luas puncak	Jumlah terlepas ( $\mu\text{g}$ )	Persen terlepas (%)
1	0	0	0	0
	5	0,14	51,13	25,56
	10	0,49	123,03	61,51
	15	0,52	140,55	70,27
	20	0,59	166,27	83,14
	30	0,64	189,52	94,76
	45	0,58	192,72	96,36
	60	0,53	196,69	98,34
2	0	0	0	0
	5	0,18	58,76	29,38
	10	0,41	108,53	54,26
	15	0,57	149,33	74,66
	20	0,65	177,91	88,96
	30	0,64	190,85	95,43
	45	0,58	194,06	97,02
	60	0,54	199,93	99,97
3	0	0	0	0
	5	0,2	62,58	31,29
	10	0,44	114,64	57,32
	15	0,49	135,02	67,51
	20	0,64	175,43	87,72
	30	0,65	192,00	96,00
	45	0,59	195,39	97,70
	60	0,52	195,73	97,87
4	0	0	0	0
	5	0,17	56,85	28,42
	10	0,47	119,79	59,89
	15	0,53	142,65	71,32
	20	0,69	185,74	92,87
	30	0,63	189,90	94,95
	45	0,58	194,82	97,41
	60	0,51	194,97	97,48

Lampiran 9  
Tabel data uji efek hipoglikemik *in vivo*

Pemberian film bukal kNAC tanpa insulin						
Persen penurunan kadar gula darah terhadap kadar gula darah awal						
Waktu	a	b	c	d	e	f
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
15	100,85	97,62	105,48	105,79	98,10	105,15
30	105,13	98,41	95,21	114,88	96,19	103,09
60	100,00	92,86	105,48	123,97	99,05	101,03
90	105,13	98,41	104,79	109,09	100,00	103,09
120	105,98	100,00	101,37	104,96	102,86	105,15
180	98,29	92,06	91,10	103,31	97,14	97,94
240	102,56	95,24	95,89	102,48	97,14	102,06
300	100,00	93,65	93,84	108,26	100,95	105,15
360	96,58	92,06	102,74	103,31	102,86	101,03
Pemberian injeksi insulin subkutan (1 IU/kg)						
Persen penurunan kadar gula darah terhadap kadar gula darah awal						
Waktu	a	b	c	d	e	F
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
15	88,52	92,17	85,92	111,01	90,38	91,84
30	80,33	86,09	71,83	101,83	86,54	82,65
60	67,21	73,91	60,56	93,58	69,23	69,39
90	63,11	67,83	52,11	79,82	65,38	65,31
120	56,56	62,61	61,97	69,72	60,58	61,22
180	59,02	57,39	68,31	81,65	62,50	65,31
240	67,21	67,83	74,65	88,07	72,12	74,49
300	77,05	78,26	83,10	98,17	85,58	88,78
360	87,70	93,91	88,73	101,83	98,08	93,88
Pemberian film bukal kNAC dengan insulin (3,5 IU/kg)						
Persen penurunan kadar gula darah terhadap kadar gula darah awal						
Waktu	a	b	c	D	e	f
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
15	103,96	91,60	97,22	109,01	101,89	95,15
30	98,02	83,21	94,44	102,70	91,51	89,32
60	94,06	77,86	91,67	95,50	87,74	82,52
90	85,15	74,81	87,96	90,99	81,13	77,67
120	87,13	63,36	72,22	84,68	76,42	75,73
180	62,38	61,07	68,52	64,86	66,04	69,90
240	83,17	72,52	83,33	87,39	76,42	86,41
300	97,03	84,73	95,37	90,99	87,74	90,29
360	95,05	94,66	99,07	97,30	96,23	96,12

Lampiran 10  
Perhitungan jumlah gugus tiol bebas dan tiol total

$$c = \frac{A}{bE}$$

c = konsentrasi dalam mol/L

A = Absorbansi/serapan

b = tebal kuvet (cm)

E = Absorptivitas molar dalam buffer fosfat pH 8.0 pada kuvet 1 cm di panjang gelombang 412 nm = 14150 / M cm

Jumlah gugus tiol bebas dalam  $\mu\text{mol}$  per gram polimer

$$\text{vol pengenceran (mL)} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times c \times 10^6 \times 1000 \text{ mg} \times \frac{1000 \text{ mg}}{\text{berat kNAC yg ditimbang (mg)}} \times \frac{1}{1 \text{ g}}$$

Contoh :

Berat kitosan NAC yang ditimbang = 2,2 mg

Serapan = 0,3512

Pengenceran = 50 mL

$$c = \frac{0.3512}{1 \text{ cm} \times \frac{14150}{\text{mol/L cm}}} = 2,482 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$50 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 2,482 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 10^6 \times \frac{1000 \text{ mg}}{2.2 \text{ mg}} \times \frac{1}{1 \text{ g}} \\ = 564,09 \mu\text{mol/g}$$

Lampiran 11  
Perhitungan difusi dan pelepasan

$$X_n = \sum \frac{(Y_n - a) \times F_p \times M}{b \times 1000} + \frac{(Y_{n-1} - a) \times F_p \times S}{b \times 1000}$$

Y = perbandingan luas puncak

Y<sub>n</sub> = perbandingan luas puncak pada menit ke-n

X = konsentrasi sampel

X<sub>n</sub> = konsentrasi sampel pada menit ke-n

F<sub>p</sub> = Faktor pengenceran

M = volume medium disolusi

S = volume sampling (0,5 mL)

a = intersep

b = slope

misal :

Persamaan regresi :

$$y = -0,1279 + 0,0262x$$

Diketahui :

$$Y_{15} = 1,11, Y_{30} = 1,51, Y_{60} = 2,87$$

$$S = 0,5 \text{ mL } M = 3 \text{ mL } F_p = 1$$

Maka :

$$X_{60} = \frac{(2,87 + 0,1279) \times 1 \times 3}{0,0262} + \frac{(1,51 + 0,1279) \times 1 \times 0,5}{0,0262} + \frac{(1,11 + 0,1279) \times 1 \times 0,5}{0,0262}$$

$$= 398,153 \mu\text{g}$$

Jumlah sampel : 1000 μg (difusi) dan 200 μg (pelepasan)

% obat terlepas/terdifusi

$$= 398,153/1000 \times 100 = 39,82 \%$$



## Lampiran 12

### Perhitungan fluks difusi insulin

Waktu	M1	M2	M3
0	0	0	0
15	223,73	125.4372	177.1161
30	372,48	186.876	351.5385
60	482,05	352.3475	442.7008
90	526,60	489.1086	515.7924
120	549,53	522.6812	556.627
150	584,29	558.1115	573.6489
180	613,64	584.4221	604.0127
240	635,22	598.7418	630.8299
300	656,46	637.3809	649.034

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

$$M/S = J \cdot t \quad (y = a + bx)$$

$$S = 1,13 \text{ cm}^2$$

contoh :

$$J_{M2(t10-t90)} = 4,94 \text{ } \mu\text{g menit}^{-1} \text{ cm}^{-2}$$

$$a = 47,51$$

$$b = 4,94$$

$$r = 0,998$$

$$J_{M2(t120-t300)} = 0,57 \text{ } \mu\text{g menit}^{-1} \text{ cm}^{-2}$$

$$a = 465,7$$

$$b = 0,58$$

$$r = 0,97$$

## Lampiran 13

### Perhitungan area diatas kurva pada uji *in vivo*

Perhitungan persen kadar gula darah pada waktu t terhadap kadar gula darah awal:

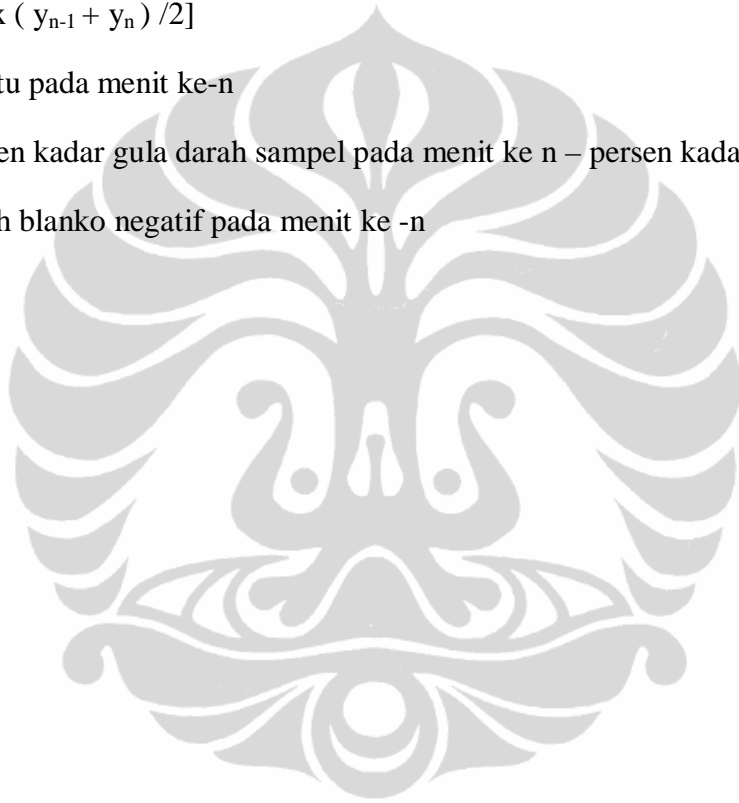
Kadar gula darah pada  $t_0$ /kadar gula darah pada  $t_n$  x 100

Perhitungan AAC (metode trapezoid) :

$$\Sigma [(x_n - x_{n-1}) \times (y_{n-1} + y_n) / 2]$$

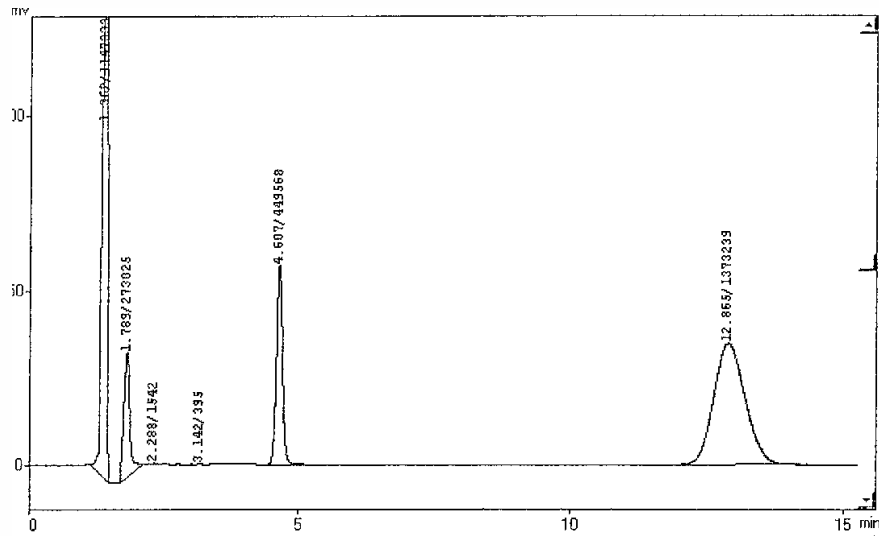
$x_n$  = waktu pada menit ke-n

$y_n$  = persen kadar gula darah sampel pada menit ke n – persen kadar gula darah blanko negatif pada menit ke -n



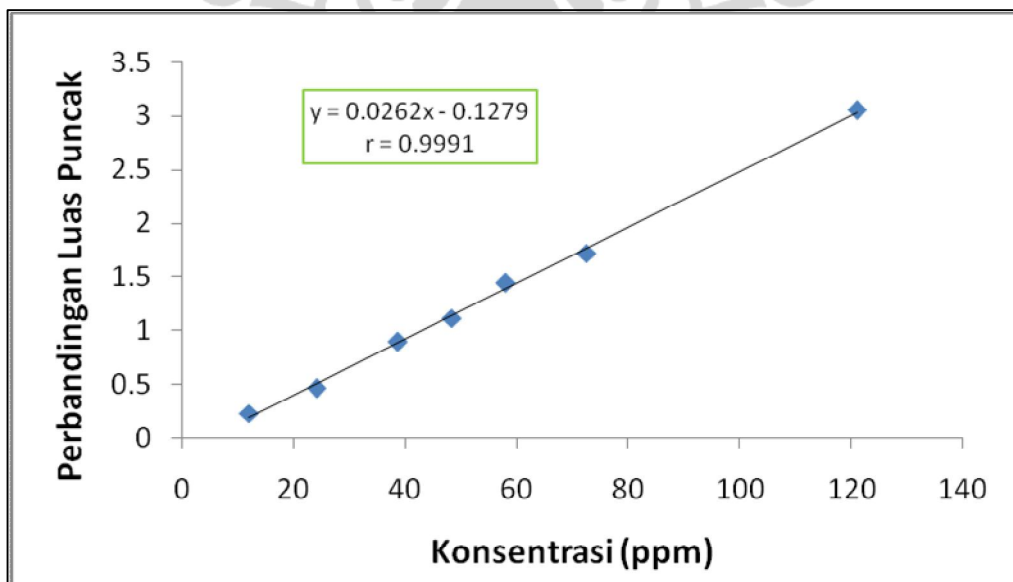
#### Lampiran 14

Gambar kromatogram insulin konsentrasi 121 ppm dengan penambahan baku dalam metal paraben. Kondisi : kolom C18 (150 x 4,6 mm) fase gerak asetonitril-larutan asam trifluoroasetat 0,1 % (31:69), kecepatan alir 1,2 mL/menit dan detektor UV pada panjang gelombang 214,0 nm

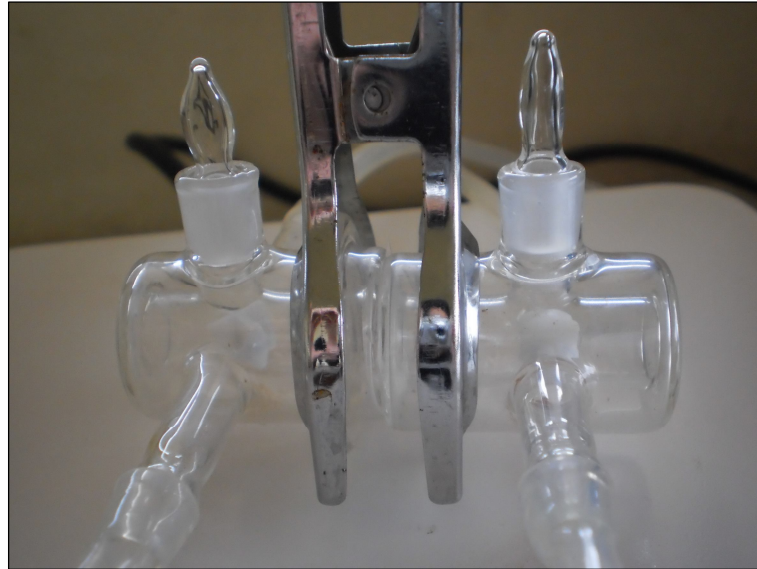


#### Lampiran 15

Gambar kurva kalibrasi insulin dengan menggunakan KCKT



Lampiran 16  
Gambar sel difusi horizontal



Lampiran 17  
Gambar alat texture analyzer TX2



Lampiran 18  
Sertifikat analisa N-asetil sistein

## ***Chem-Impex International, Inc.***

Tel: (630) 766-2112

E-mail: [sales@chemimpex.com](mailto:sales@chemimpex.com)

Shipping and Correspondence:

935 Dillon Drive

Wood Dale, IL 60191

Fax: (630) 766-2218

Web site: [www.chemimpex.com](http://www.chemimpex.com)

Manufacturing site:

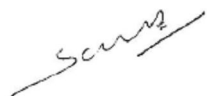
825 Dillon Drive

Wood Dale, IL 60191

### **Certificate of Analysis**

<b>Catalog Number</b>	00839
<b>Product Name</b>	N-Acetyl-L-cysteine
<b>Lot Number</b>	20081
<b>CAS Registry Number</b>	616-91-1
<b>Molecular Formula</b>	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> S
<b>Molecular Weight</b>	163.20
<b>Melting Point</b>	104-110°C
<b>Appearance</b>	White crystalline powder,
<b>Assay</b>	100.31%
<b>Identification IR</b>	Conformed
<b>Specific Rotation (<math>\alpha^25_D</math>)</b>	+22.95°
<b>pH</b>	2.63
<b>Loss on Drying</b>	0.22%
<b>Residue on Ignition (as sulfate)</b>	<0.38%
<b>Heavy Metals (as Pb)</b>	<0.001%
<b>Organic Volatile Impurities</b>	Meets USP requirements
<b>Storage</b>	Store at 0-5°C.
<b>Remarks</b>	See material safety data sheets for additional information.  For laboratory use only.

The foregoing is a copy of the Certificate of Analysis as provided by our supplier



Sashi Kumar  
Quality Control Manager

Lampiran 19  
Sertifikat analisa kitosan

# PT.VITALHOUSE INDONESIA

BIOTECNOLOGY ( CHITIN & CHITOSAN )

Jl.Raya Waruduwur Km.7 Mundu, Cirebon 45173 West Java-  
Indonesia

Telp.62.231-510636 Fax.62.231.510716 E-mail : [vital\\_house@yahoo.com](mailto:vital_house@yahoo.com)

## CERTIFICATION OF ANALYSIS


Product Name	Crab Chitosan Powder (Medicine Grade)/ Flake
Production Date	Mar. 14 , 2010
Analysis Date	Mar.15 , 2010
Expiry Date	Mar.14 , 2012

Items	Specification	Results
Appearance	White, Liht Yellow or Pale Yellow	Light Yellow Or Pale Yellow
Odor	Oderless	Odorless
Particle Size	10 - 40 mesh	20 mesh
Moisture Content	10% Max	8.45%
Degree Of Deacetylation	85% Min	85.57%
Viscosity	15-20 Cps	20.1 Cps
Insolubles	1% Max	Pass
Heavy metals	10 ppm Max	Complies
Arsenic	1 ppm Max	Complies
Coli Form Bacillus	Negatif	Negative
Microbe	$3 \times 10^7$ cells/g Max	Complies
pH	7.0-8.0	7.0

PT.VITALHOUSE INDONESIA



Lampiran 20  
Sertifikat analisa insulin

	<b>Wako Pure Chemical Industries, Ltd.</b> 1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan	
<b>Certificate of Analysis</b>		
Product Number : 096-03443		
Chemical Name : Insulin, Human, recombinant		
Grade : for Cell Culture		
Lot Number : PEH6002		
Unit : 100mg		
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>RESULT</b>
Appearance	White-nearly white, crystals-powder	Passed
Potency (calculated on the dried basis)	min. 26units/mg	28.5units/mg
Date of QC-Release		Aug. 27, 2008
 <i>M. Nanaura</i> Mitsuo Nanaura General Manager Q.A. Department		
This is an electronically generated document		Date of issue : Jun. 18, 2010 Issuing Number : 7612849

Lampiran 21  
Sertifikat analisa EDAC HCl

***Chem-Impex International, Inc.***

Tel: (630) 766-2112

E-mail: [sales@chemimpex.com](mailto:sales@chemimpex.com)

Shipping and Correspondence:

935 Dillon Drive

Wood Dale, IL 60191

Fax: (630) 766-2218

Web site: [www.chemimpex.com](http://www.chemimpex.com)

Manufacturing site:

825 Dillon Drive

Wood Dale, IL 60191

**Certificate of Analysis**

<b>Catalog Number</b>	00050
<b>Product Name</b>	<b>1-Ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, anhydrous</b>
<b>Lot Number</b>	FD058000802
<b>CAS Registry Number</b>	25952-53-8
<b>Molecular Weight</b>	191.50
<b>Appearance</b>	White crystals
<b>Melting Point</b>	110.7-111.7°C
<b>IR Spectrum</b>	Conforms to structure
<b>NMR</b>	Conforms to structure
<b>Water Content (KF)</b>	0.06%
<b>Purity (by Argentometria)</b>	99.8%
<b>Caution</b>	Irritant! Moisture sensitive!
<b>Remarks</b>	See Material Safety Data Sheets for additional information. For Laboratory use only

The foregoing is a copy of the Certificate of Analysis as provided by our supplier



Bala Kumar  
Quality Control Manager



Lampiran 22  
Sertifikat analisa DTNB

## ***Chem-Impex International, Inc.***

Tel: (630) 766-2112

E-mail: [sales@chemimpex.com](mailto:sales@chemimpex.com)

Shipping and Correspondence:

935 Dillon Drive

Wood Dale, IL 60191

Fax: (630) 766-2218

Web site: [www.chemimpex.com](http://www.chemimpex.com)

Manufacturing site:

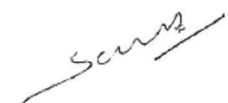
825 Dillon Drive

Wood Dale, IL 60191

### **Certificate of Analysis**

<b>Catalog Number</b>	01899
<b>Product Name</b>	5,5'-Dithio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoic acid) Ellman's reagent, 3-Carboxy-4-nitrophenyl disulfide, DTNB
<b>Lot Number</b>	22023
<b>CAS Registry Number</b>	69-78-3
<b>Molecular Formula</b>	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>
<b>Molecular Weight</b>	396.35
<b>Melting Point</b>	237-239°C
<b>Appearance</b>	Yellow crystalline powder
<b>Assay</b>	100.8% (Titration with 0.1N NaOH in Ethanol)
<b>Solution</b>	Clear, practically colorless (1% acetone)
<b>Water (Karl Fischer)</b>	<0.05%
<b>Elemental Analysis (actual)</b>	C 42.43%, H 2.03%, N 7.07% S 16.18%
<b>Elemental Analysis (theory)</b>	C 42.28%, H 2.07%, N 7.13% S 16.32%
<b>Molar Extinction</b>	$\epsilon_{412\text{nm}}^{\text{TNB}}$ 14045 l/mol/cm Phosphate Buffer pH8/2-mercaptoethanol
<b>Caution</b>	Irritant!
<b>Remarks</b>	See material safety data sheets for additional information.  For laboratory use only.

The foregoing is a copy of the Certificate of Analysis as provided by our supplier



Sashi Kumar  
Quality Control Manager

Lampiran 23

Sertifikat analisa metil paraben

**RASULA PHARMACEUTICALS AND FINE CHEMICALS**  
 F-8, PHASE -II, IDA, KUKATPALLY, HYDERABAD - 500 037  
**CERTIFICATE OF ANALYSIS**  
 (UNDER THE DRUGS ACT 1940 AND THE DRUG RULES 1945)

No : 263  
 Date: 01.07.2009

Purchase Order No : 04410/PH/1006 Dated : 25.06.2009

---

01. NAME OF THE PRODUCT: METHYL PARABEN BP/USP

02. a) Batch No : 907218M c) Date of Mfg.: July'2009  
 b) Qty Mfrd : 1000 Kgs d) Date of Exp. : June'2014

---

03. RESULTS OF ANALYSIS

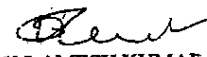
TEST CARRIED OUT	FOUND	SPECIFICATION
01.Characters/ Description and solubility	: White, crystalline powder, slightly soluble in water; freely soluble in Alcohol and in Methanol.	A white, crystalline powder; or colourless crystals, slightly soluble in water; freely soluble in Alcohol and in Methanol.
02.Identification		
A) Melting Point	: 128 °C	125 °C to 128 °C (Test as per BP)
B) IR Absorption	: Absorption spectrum concordant with Methyl Paraben Reference Standard.	IR absorption spectrum concordant with the spectrum obtained with Methyl Paraben reference standard.
C) TLC (BP Method)	: The principal spot in the chromatogram obtained with test solution(b) is similar in position and size to the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution(b)	The principal spot in the chromatogram obtained with test solution(b) is similar in position and size to the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution(b)
D) Colour Test (BP Method)	: Solution(a) develops an orange to red colour and solution(b) develops an yellow to orange brown.	When treated with sodium carbonate, aminopyrazolone and potassium ferricyanide solutions. Solution(a) develops an orange to red colour and solution(b) develops an yellow to orange-brown.
03.Melting Range	: 126.1 °C to 128 °C	125 °C to 128 °C
04.Appearance of solution	: Clear, and less intensely coloured than reference solution BY <sub>6</sub>	10% w/v solution is clear and not more intensely coloured than reference solution BY <sub>6</sub>
05.Colour of solution	: Clear, less intensely colour than comparison colour solution.	Test as per USP.
06.Acidity	: 0.03ml of 0.1N Sodium hydroxide solution consumed	Not more than 0.1ml of 0.1N Sodium hydroxide solution required to change the colour of the indicator to blue.
07.Residue on Ignition	: 0.018%w/w	Not more than 0.1%w/w
08.Related Substances (by TLC)	: Less than 0.1%	Not more than 0.5%
09.Residual solvent a) Methanol	: Complies	Not more than 3000 ppm
10.Assay	: 99.96%w/w	Methyl Paraben contains not less than 98.0%w/w and not more than 102.0%w/w of C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>

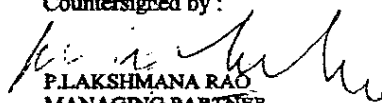
---

04. Storage condition: Store in well closed container.

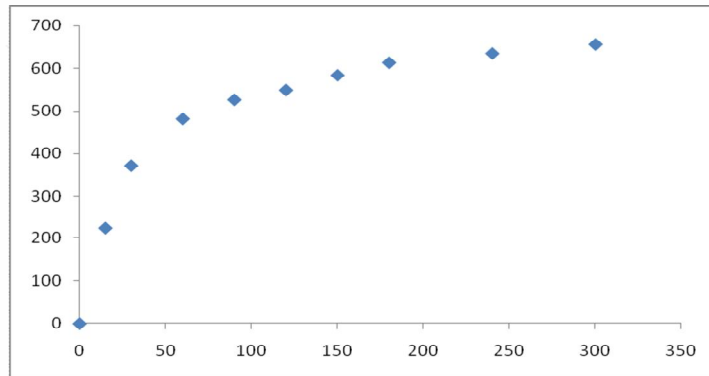
05. Report: The material complies with the prescribed/stated standards of quality of BP/USP

---

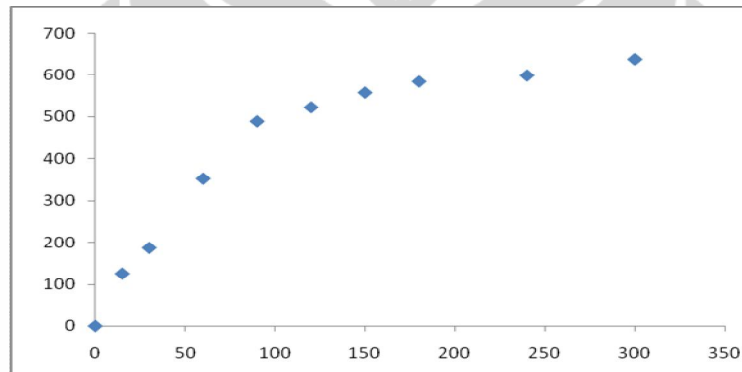
Tests Carried out by :   
 K.KAMESH KUMAR  
 ANALYST

Countersigned by :   
 P.LAKSHMANA RAO  
 MANAGING PARTNER

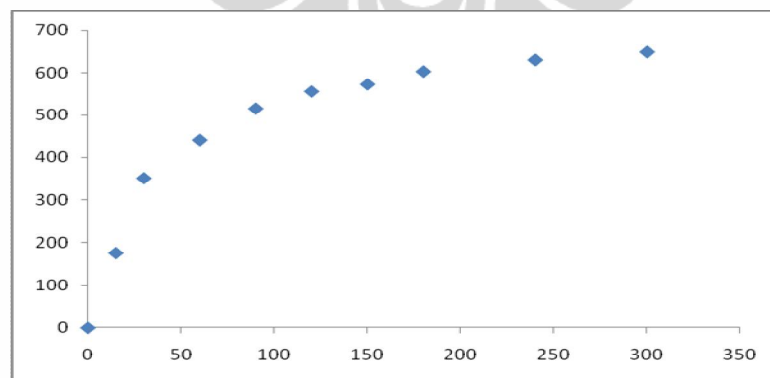
Lampiran  
Fluks difusi insulin



(1)



(2)



(3)