



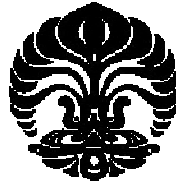
UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH ETANOL DAN ASAM OLEAT TERHADAP
PENETRASI TRANSDERMAL NANOEMULSI GLUKOSAMIN
SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN SEL DIFUSI FRANZ**

SKRIPSI

**YULIA ANGGRAENI
0706197843**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM SARJANA FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH ETANOL DAN ASAM OLEAT TERHADAP
PENETRASI TRANSDERMAL NANOEMULSI GLUKOSAMIN
SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN SEL DIFUSI FRANZ**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains

**YULIA ANGGRAENI
0706197843**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM SARJANA FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Yulia Anggraeni

NPM : 0706197843

Tanda Tangan : 

Tanggal : 25 - Januari - 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Yulia Anggraeni
NPM : 0706197843
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Pengaruh Etanol dan Asam Oleat terhadap Penetrasi Nanoemulsi Transdermal Glukosamin secara *In Vitro* Menggunakan Sel Difusi Franz

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, M.S., Ph.D. (.....)

Pembimbing II : Sutriyo. Msi., Apt (.....)

Penguji I : Dr. Berna Elya, MS., Apt (.....)

Penguji II : Dra. Juheini, MS., Apt (.....)

Penguji III : Dra. Rosmaladewi, MS., Apt (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 25 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, serta Junjungan Nabi Besar Muhammad SAW karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

Penulisan skripsi ini disusun sebagai syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.S. selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Ibu Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, M.S., Ph.D. sebagai Pembimbing I dan Bapak Sutriyo, MSi.,Apt sebagai Pembimbing II yang selalu sabar membimbing, memberi saran dan mendukung selama penelitian berlangsung sampai tersusunnya skripsi ini.
3. Bapak Dr. Abdul Mun'im, MSi selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan perhatian dan bimbingan selama pendidikan di Farmasi FMIPA UI.
4. Ibu Dra.Azizahwati.,MS.,Apt selaku Ketua Program Ekstensi Farmasi FMIPA UI.
5. Seluruh Bapak dan Ibu Dosen Farmasi FMIPA UI atas bimbingannya selama ini
6. Para Staf Laboratorium, Mbak Deva, Pak Imih, Pak Surya, Pak Rustam, dan Bapak/Ibu laboran serta karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI lainnya atas semua bantuan yang diberikan, terutama saat penelitian berlangsung.
7. Pusat Penelitian Teknologi (PUSPITEK) Serpong bagian inkubator Nanotech yang bersedia memberikan bantuan alat yang digunakan dalam penelitian ini.
8. Keluargaku tercinta, Ibu, Bapak (Alm), Kakak-kakak ku dan keponakan atas semua kasih sayang, perhatian, kesabaran, dan do'a yang tidak henti- hentinya tercurah, dukungan baik moril maupun materil yang diberikan kepada penulis.

9. Teman-teman Farmasi Ekstensi, KBI Farmasetika, Kimia dan Farmakologi, terutama teman baikku, Leoni, D'anti, Mba yeni, Mba ike, Mba kamel, Nana, Vinta, Tera atas do'a dan semua dukungan serta bantuan yang telah diberikan selama ini.
10. Semua pihak yang telah memberikan bantuan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.



Penulis

2012

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

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

Nama : Yulia Anggraeni
NPM : 0706197843
Program Studi : Sarjana (S1 Ekstensi)
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
Jenis karya : Skripsi

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

Pengaruh Etanol dan Asam Oleat terhadap Penetrasi Nanoemulsi Transdermal
Glukosamin secara *In Vitro* Menggunakan Sel Difusi Franz

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 25 - Januari - 2012

Yang menyatakan


(..... YULIA. ANGGRAENI)

ABSTRAK

Nama : Yulia Anggraeni

Program Studi : Farmasi

Judul : Pengaruh Etanol dan Asam Oleat Terhadap Penetrasi Transdermal Nanoemulsi Glukosamin Secara *In Vitro* Menggunakan Sel Difusi Franz

Glukosamin memiliki efek terapi farmakologis alternatif untuk pengobatan osteoarthritis. Pemakaian glukosamin secara transdermal merupakan salah satu upaya untuk mengatasi bioavailabilitas yang baik. Bentuk sediaan nanoemulsi dapat meningkatkan kelarutan obat, stabil secara termodinamika dan memiliki penampilan yang transparan dengan ukuran partikel kurang dari 100 nm. Senyawa peningkat penetrasi percutan diantaranya etanol dan asam oleat ditambahkan ke dalam masing-masing formula nanoemulsi glukosamin, Uji daya penetrasi secara *in vitro* dengan sel Difusi Franz menggunakan membran abdomen tikus *Rattus norvegicus* menghasilkan jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi setelah 8 jam dari sediaan formula A (etanol 6%) dan formulasi B (asam oleat 6%) secara berturut turut sebanyak $1147,30 \pm 27,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $708,72 \pm 10,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Laju penetrasi atau fluks dari sediaan formula A dan formula B berturut - turut sebesar $218,41 \pm 2,68 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{jam}$; $88,59 \pm 2,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{jam}$. Uji kestabilan fisik dilakukan melalui pengamatan seperti organoleptis, homogenitas, pH, Viskositas, sentrifugasi dan ukuran partikel. Ukuran rata – rata partikel yang diperoleh pada formulasi A 4,5 nm dan formulasi B 12,3.

Kata kunci : Glukosamin HCl, Osteoarthritis, Nanoemulsi, Transdermal, Senyawa peningkat penetrasi, Difusi Franz

Halaman : xvii + 76 Halaman.; 32 gambar; 17 tabel; 7 lampiran

Acuan : 37 (1987 – 2010)

ABSTRACT

Name : Yulia Anggraeni

Program Study : Pharmacy

Title : The Effects of Ethanol, Oleic Acid on Transdermal
Nanoemulsion Penetration of Glucosamine by In Vitro Test
Using Franz Diffusion Cell

Glucosamine have an alternative pharmacologic therapy for osteoarthritis. Oral glucosamine does not show any good bioavailability, for that reason transdermal route is one which was developed to overcome the problem. Nanoemulsion dosage form can improve drug solubility, thermodynamically stable and has a transparent appearance with particle size less than 100 nm. Percutaneous penetration ethanol and oleic acid were added to each nanoemulsion formula glucosamine. Penetration test *in vitro* with Franz diffusion cell using *Rattus norvegicus* rat abdomen skin as membrane diffusion. Cumulative amount of glucosamine penetrated after 8 hours from formula A (ethanol 6%) and formula B (6%) were $1147,30 \pm 27,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $708,72 \pm 10,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectively. Penetration rate or flux of glucosamine from formula A and formula B, $218,41 \pm 2,68 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{hour}$; $88,59 \pm 2,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{hour}$. Physical stability test is done through organoleptic, homogeneity, pH, viscosity, centrifugation and particle size. The average particle size obtained from formula A and formula B were 4,5 nm and 12,3 nm respectively.

Keyword : Glucosamine HCl, Osteoarthritis, Transdermal, Nanoemulsion,
Skin penetration enhancer, Franz diffusion cell

Page : xv + 76 pages; 31 figures; 17 tables; 7 appendixes

Bibliography : 37 (1978 – 2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
PERNYATAAN ORISINIL	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRAC	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Kulit	3
2.1.1 Anatomi Kulit	3
2.1.1.1 Epidermis	3
2.1.1.2 Dermis	4
2.1.1.3 Subkutan atau hipodermis	4
2.1.2 Fungsi Kulit	5
2.2 Faktor – faktor yang mempengaruhi penetrasi	6
2.3 Penetrasi Obat Melalui Kulit	6
2.3.1 Senyawa Peningkat Penetrasi Perkutan	7
2.3.2 Etanol	9
2.3.3 Asam Oleat	10
2.4 Glukosamin HCl	10
2.5 Nanoemulsi	12
2.6 Bahan Tambahan Formulasi	12
2.6.1 Tween 80	12
2.6.2 Propilen glikol	13
2.6.3 Gliserin	13
2.6.4 Isopropil miristat	14
2.6.5 Nipagin	14

2.6.6 Nipasol	15
2.6.7 Butilhidroksitoluen (BHT)	15
2.6.8 Asam Sitrat	15
2.7 Uji Penetrasi Perkulatan Secara <i>In vitro</i> Menggunakan Sel Difusi Franz	18
3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Lokasi dan Waktu	19
3.2 Bahan	19
3.3 Peralatan	19
3.4 Cara Kerja	20
3.4.1 Pembuatan Nanoemulsi Glukosamin	20
3.4.2 Evaluasi Sediaan Nanoemulsi	21
3.4.2.1 Uji Organoleptis	21
3.4.2.2 Uji Ukuran Partikel	21
3.4.2.3 Pengukuran pH	21
3.4.2.4 Pengukuran Viskositas Nanoemulsi	21
3.4.2.5 Uji Mekanik	22
3.4.3 Uji Stabilitas Fisik nanoemulsi	22
3.4.4 Uji Penetrasi Perkulatansecara <i>In Vitro</i>	22
3.4.4.1 Pembuatan Dapar Fosfat pH 7,4	22
3.4.4.2 Pembuatan Dapar Borat pH 9,3	23
3.4.4.3 Pembuatan Pereaksi o-Ftalaldehid dan 2Merkapto- etanol (OPA/2-ME)	23
3.4.4.4 Pembuatan Fase Gerak Tetrahidrofuram 0,25% - Asetonitril (83:17)	23
3.4.4.5 Pengukuran Panjang Gelombang Eksitasi dan Emisi Maksimum Glukosamin dengan Pereaksi o- ftalaldehid/2-merkapttoetanol	23
3.4.4.6 Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Metanol dan Dapar Borat pH 9,3	24
3.4.4.7 Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Pelarut Dapar Fosfat pH 7,4 dan Dapar Borat 9,3.....	24
3.4.4.8 Uji Penetrasi Glukosamin	25
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Hasil	27
4.1.1 Pembuatan Nanoemulsi	28
4.1.2 Evaluasi Sediaan Nanoemulsi	28
4.1.2.1 Pengamatan Organoleptis	28

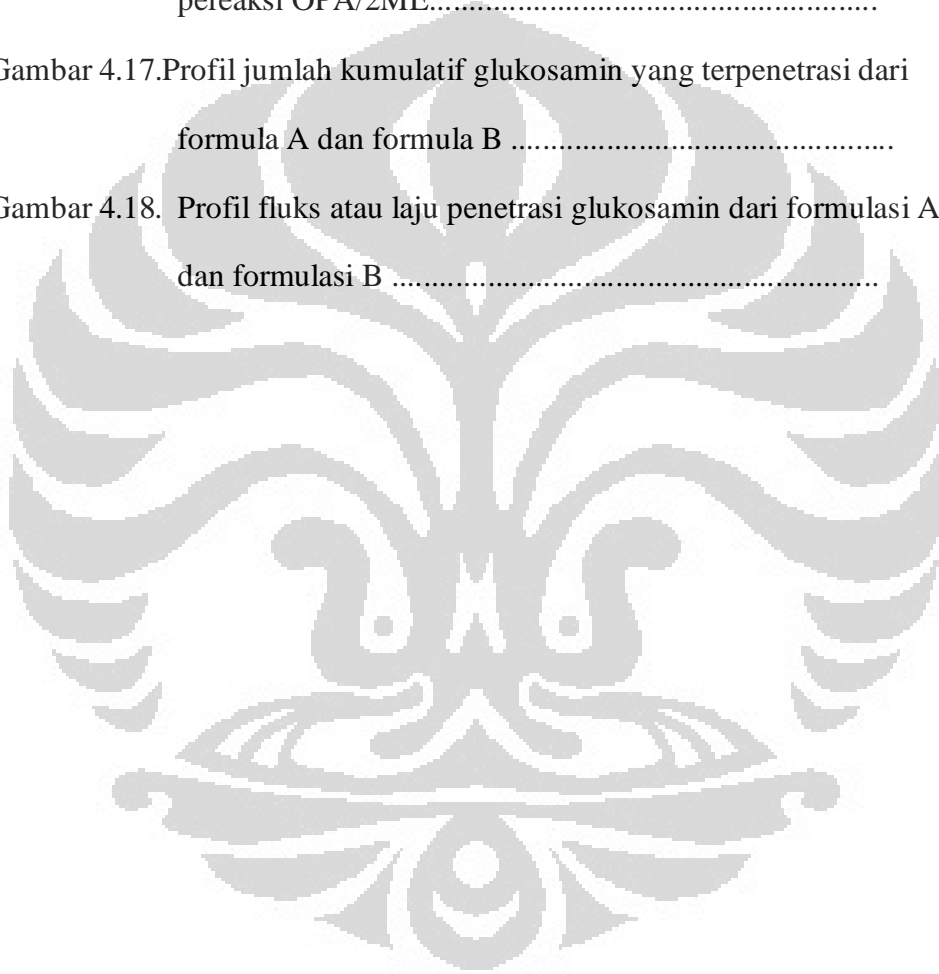
4.1.2.2 Pengukuran Ukuran Partikel	29
4.1.2.3 Pengukuran pH	29
4.1.2.4 Pengukuran Viskositas Nanomeulsi.....	29
4.1.2.5 Uji Sentrifugasi	30
4.1.3 Uji Stabilitas Fisik Nanoemulsi	30
4.1.3.1 Penyimpanan pada suhu kamar ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$)	30
4.1.3.2 Penyimpanan pada suhu hangat ($40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$)	30
4.1.3.3 Penyimpanan pada suhu rendah ($4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$).....	31
4.1.3.4 <i>Cycling Test</i>	31
4.1.4 Uji Penetrasi Perkulatan secara <i>In Vitro</i>	31
4.1.4.1 Pengukuran Panjang Gelombang Eksitasi dan Emisi Maksimum Glukosamin dengan Pereaksi OPA/2-ME..	32
4.1.4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Metanol dan Dapar Borat pH 9,3	32
4.1.4.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Dapar Fosfat pH 7,4 dan Dapar Borat 9,3.....	32
4.2 Pembahasan	33
4.2.1 Evaluasi Nano emulsi	33
4.2.2.1 Pengamatan Organoleptis	33
4.2.2.2 Pengukuran Ukuran Partikel	33
4.2.2.3 Pengukuran pH	34
4.2.2.4 Pengukuran Viskositas Nanomeulsi.....	34
4.2.2.5 Uji Sentrifugasi	34
4.2.2 Uji Stabilitas Fisik Nanoemulsi	35
4.2.2.1 <i>Cycling Test</i>	35
4.2.3 Uji Penetrasi Glukosamin	35
5. KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran	38
DAFTAR REFERENSI	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur Kulit	4
Gambar 2.2.	Rute penetrasi obat	7
Gambar 2.3.	Struktur kimia Etanol	9
Gambar 2.4.	Struktur kimia Asam Oleat	9
Gambar 2.5.	Struktur kimia D-glukosamin HCl	10
Gambar 2.6	Struktur kimia Propilenglikol	13
Gambar 2.7	Struktur kimia Gliserin	13
Gambar 2.8	Struktur kimia Isopropil miristat	13
Gambar 2.9	Struktur kimia Metil paraben	14
Gambar 2.10	Struktur kimia Propil paraben	14
Gambar 2.11	Struktur kimia Butil Hidroksi Toluena (BHT)	15
Gambar 2.12	Struktur kimia Asam sitrat	15
Gambar 2.13	Sel Difusi Franz	16
Gambar 3.1.	Foto alat	44
Gambar 4.1.	Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin yang mengandung senyawa penetrasi etanol (formula A) dan asam oleat (formula B) pada minggu ke- 0.....	46
Gambar 4.2.	Grafik rheologi nanoemulsi glukosamin formula A pada minggu ke-0	47
Gambar 4.3.	Grafik rheologi nanoemulsi glukosamin formula A pada minggu ke-6	47
Gambar 4.4.	Grafik rheologi nanoemulsi glukosamin formula B pada minggu ke-0	48

Gambar 4.5.	Grafik rheologi nanoemulsi glukosamin formula B pada minggu ke-6	48
Gambar 4.6.	Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin formula A dan formula B pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) selama 6 minggu	49
Gambar 4.7.	Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin formula A dan formula B pada penyimpanan suhu hangat ($40^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) selama 6 minggu	49
Gambar 4.8.	Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin formula A dan formula B pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) selama 6 minggu	49
Gambar 4.9.	Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH Formula A dan B pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$) selama 6 minggu	50
Gambar 4.10.	Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH formula A dan B pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$) selama 6 minggu50
Gambar 4.11.	Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH formula A dan B pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$) selama 6 minggu	50
Gambar 4.12.	Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin sebelum dan setelah <i>Cycling test</i>	51
Gambar 4.13	Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin sebelum dan setelah uji mekanik	51

Gambar 4.14. Kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut metanol dan dapar borat pH 9,.....	52
Gambar 4.15. Kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 dan dapar borat pH 9,3.....	52
Gambar 4.16. Spektrum serapan glukosamin setelah diderivatisasi dengan pereaksi OPA/2ME.....	53
Gambar 4.17. Profil jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari formula A dan formula B	54
Gambar 4.18. Profil fluks atau laju penetrasi glukosamin dari formulasi A dan formulasi B	54



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Formulasi sediaan nanoemulsi	20
Tabel 4.1.	Hasil pengamatan sediaan nanoemulsi pada minggu ke-0	56
Tabel 4.2.	Hasil pengamatan organoleptis sediaan nanoemulsi pada suhu kamar ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) selama penyimpanan 6 minggu	56
Tabel 4.3.	Hasil pengamatan organoleptis sediaan nanoemulsi pada suhu tinggi ($40 \pm 2^{\circ}\text{C}$) selama penyimpanan 6 minggu	57
Tabel 4.4.	Hasil pengamatan organoleptis sediaan nanoemulsi pada suhu rendah ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) selama penyimpanan 6 minggu	57
Tabel 4.5.	Hasil pengukuran pH kedua formula nanoemulsi pada suhu kamar ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$)	58
Tabel 4.6.	Hasil pengukuran pH kedua formula nanoemulsi pada suhu panas ($40 \pm 2^{\circ}\text{C}$)	58
Tabel 4.7.	Hasil pengukuran pH kedua formula nanoemulsi pada suhu rendah ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$)	58
Tabel 4.8	Hasil pengamatan organoleptis dan pH formula A dan B setelah dilakukan <i>cycling test</i>	59
Tabel 4.9.	Hasil pengukuran viskositas formulasi A pada minggu ke-0	60
Tabel 4.10.	Hasil pengukuran viskositas formulasi A pada minggu ke-6	61
Tabel 4.11.	Hasil pengukuran viskositas formulasi B pada minggu ke-0 ...	62
Tabel 4.12.	Hasil pengukuran viskositas formulasi B pada minggu ke-6	63
Tabel 4.13.	Data kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut metanol dan dapar borat pH 9,3.....	64
Tabel 4.14.	Data kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 dan dapar borat pH 9,3.....	64
Tabel 4.15.	Jumlah kumulatif hasil uji penetrasi glukosamin dalam dapar fosfat pH 7,4 dari formulasi A dan formulasi B	65
Tabel 4.16.	Hasil perhitungan fluks atau laju penetrasi glukosamin dari formula A dan formula B.....	66

LAMPIRAN

Lampiran 1. Contoh perhitungan jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari sediaan formula A pada menit ke- 10	68
Lampiran 2. Contoh perhitungan fluks atau laju penetrasi glukosamin dari sediaan formulasi A pada menit ke- 60	70
Lampiran 3. Hasil ukuran partikel nanoemulsi glukosamin yang mengandung senyawa peningkat penetrasi etanol	71
Lampiran 4. Hasil ukuran partikel nanoemulsi glukosamin yang mengandung senyawa peningkat penetrasi asam oleat	72
Lampiran 5. Serifikat analisis glukosamin HCl	73
Lampiran 6. Sertifikat analisis etanol	74
Lampiran 7. Sertifikat analisis tikus <i>Rattus norvegicus</i>	76

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Osteoarthritis adalah penyakit degeneratif ditandai dengan jaringan kartilago yang melindungi persendian semakin menipis sehingga memicu rasa nyeri dan membatasi kemampuan gerak pasien (Tiralocche, Gabrielle, *et al*, 2005). Glukosamin memiliki terapi farmakologi alternatif yang efek sampingnya lebih ringan dan memberikan efek farmakologis berupa perbaikan jaringan kartilago, karena dapat memenuhi kedua kriteria tersebut, selain dapat mengurangi rasa nyeri pada persendian. Pada pemberian per oral bioavailabilitas glukosamin hanya sekitar 44 % dan sekitar 15% mengalami metabolisme lintas pertama di hati (Setnikar & Rovatti, 2010). Untuk memperbaiki bioavailabilitas glukosamin tersebut dikembangkan rute pemberian alternatif, yaitu rute transdermal. Rute pemberian transdermal mempunyai beberapa keuntungan seperti menghindari masalah pada saluran cerna, meminimalisir metabolisme lintas pertama di hati, dan meningkatkan kenyamanan pasien (Walters & Brain, 2002).

Nanoemulsi dapat digunakan sebagai pembawa obat melalui berbagai macam rute pemberian antara lain secara topikal, oral dan parenteral. Pada pemberian secara topikal nanoemulsi dapat meningkatkan penghantaran obat secara transdermal dibandingkan bentuk sediaan topikal seperti krim, lotion dan gel (Basker. R. *Et al.*2010).

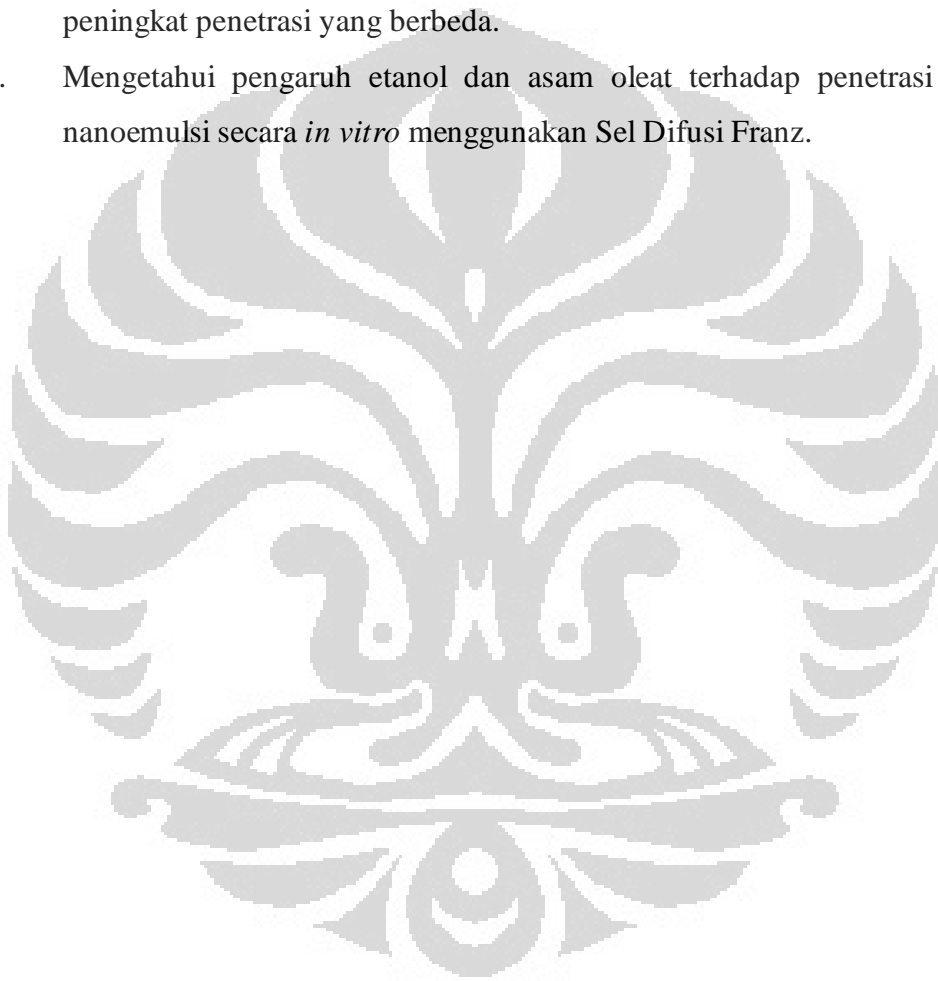
Nanoemulsi merupakan sistem dispersi yang terdiri dari air, minyak, surfaktan dan kosurfaktan. Kelebihan dari bentuk nanoemulsi antara lain meningkatkan kelarutan obat, stabil secara termodinamika dan memiliki penampilan transparan karena memiliki ukuran partikel kurang dari 100 nm.

Selain dipengaruhi oleh bentuk sediaan, penetrasi obat yang melintasi kulit juga dapat ditingkatkan dengan penambahan senyawa peningkat penetrasi percutan (William dan Barry, 2001). Kecepatan penetrasi obat ke dalam kulit dapat diamati melalui fluks obat. Fluks obat yang melalui membran kulit

dipengaruhi oleh konsentrasi efektif , obat yang terlarut dalam pembawa, koefisien difusi dan partisi obat yang melewati stratum corneum dengan cara mengganggu sistem penghalang dari stratum korneum.

1.2 Tujuan penelitian

- a. Membuat formulasi nanoemulsi transdermal glukosamin HCl dengan zat peningkat penetrasi yang berbeda.
- b. Mengetahui pengaruh etanol dan asam oleat terhadap penetrasi sediaan nanoemulsi secara *in vitro* menggunakan Sel Difusi Franz.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

Kulit merupakan organ terbesar pada tubuh, bobot kulit dapat mencapai 10% bobot individu dengan luas permukaan kulit pada orang dewasa mencapai 1,5 – 1,75 m² (Walters & Robert,2002). Secara anatomi, kulit terdiri dari banyak lapisan jaringan, tetapi pada umumnya kulit dibagi dalam tiga lapisan jaringan yaitu, *epidermis*, *dermis*, dan *subkutaneum (lapisan lemak dibawah kulit)* (Trenggono & Latifah, 2007).

2.1.1 Anatomi Kulit

2.1.1.1 Epidermis

a. Stratum korneum

Stratum korneum merupakan lapisan epidermis paling luar, terdiri atas beberapa sel yang mati, tidak memiliki inti, tidak mengalami proses metabolisme, sangat sedikit mengandung air. Stratum korneum atau sel tanduk merupakan sel mati yang terdiri atas keratin(70%) dan lipid (20%). Di antara sel tanduk terdapat cairan interseluler yang tersusun atas lapisan lipid *bilayer* (Walters, Kenneth A.(ed), 2002).

b. Stratum granulosum

Stratum granulosum tersusun oleh sel-sel keratinosit yang berbentuk poligonal, berbutir kasar, berinti mengkerut (Trenggono. Retno Iswari & Latifah. Fatma. 2007).

c. Stratum lusidum

Stratum lusidum terletak tepat dibawah stratum korneum, merupakan lapisan yang tipis, jernih, mengandung eleidin, sangat tampak jelas pada telapak tangan dan telapak kaki (Trenggono & Latifah, 2007).

d. **Stratum germinativum**

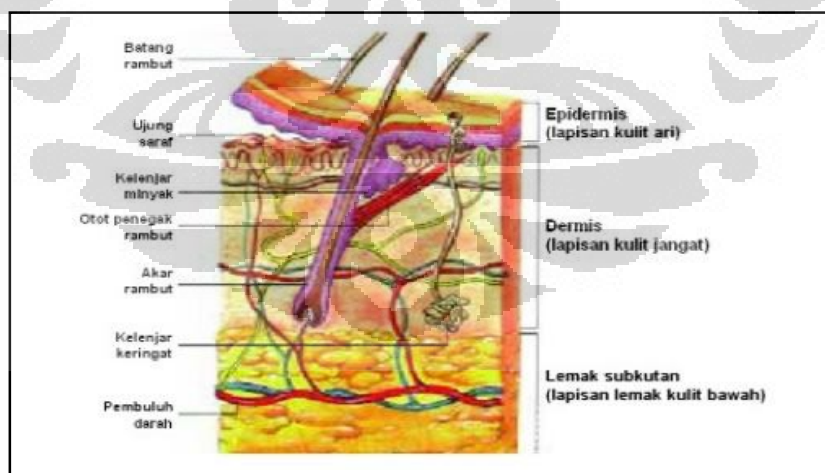
Stratum germinativum merupakan lapisan terbawah epidermis. Lapisan ini tersusun atas sel-sel yang aktif melakukan mitosis. Stratum germinativum dapat dibagi menjadi dua, yaitu stratum basale dan stratum spinosum (Langley, Leroy Lester. 1980).

2.1.1.1 **Dermis**

Berbeda dengan epidermis yang tersusun oleh sel-sel dalam berbagai bentuk dan keadaan. Didalam dermis terdapat adneksa kulit seperti folikel rambut, papila rambut, kelenjar keringat, saluran keringat, kelenjar sebacea, otot penegak rambut, ujung pembuluh darah dan ujung saraf, juga sebagian serabut lemak yang terdapat pada lapisan lemak bawah kulit. (Trenggono & Latifah, 2007)

2.1.1.2 **Subkutan atau hipodermis**

Merupakan jaringan ikat di bawah kulit yang banyak mengandung sel lemak (kurang lebih 50% dari total lemak tubuh). Salah satu peranan penting lapisan subkutan adalah menghantarkan sistem vaskuler dan neural pada kulit (Walters, 2002).



[Sumber : Transdermal Drug Delivery Review, 2010]

Gambar 2.1. Struktur kulit

2.1.2 Fungsi Kulit

Kulit merupakan organ yang mempunyai fungsi penting bagi tubuh. Fungsi tersebut antara lain:

a. Fungsi perlindungan

Kulit melindungi tubuh dari berbagai gangguan eksternal, baik fisik, kimiawi, maupun biologis. Lapisan epidermis yang tersusun rapat bertujuan untuk mencegah kehilangan cairan tubuh yang berlebihan. Selain itu adanya lapisan asam lemak tak jenuh di permukaan kulit dapat mencegah pertumbuhan bakteri di kulit. (Luciano, 1978; Langley, 1980; Mitsui, (ed). 1997).

b. Fungsi pengaturan panas

Pengaturan suhu tubuh oleh kulit dilakukan dengan cara pengeluaran keringat dan vasodilatasi atau vasokonstriksi pada pembuluh darah kapiler kulit (Luciano, 1978; Langley, 1980).

c. Fungsi sensori

Ujung-ujung saraf sensori untuk mendeteksi perubahan lingkungan sekitar, seperti panas, dingin, tekanan, dan rabaan tersebar di lapisan dermis dan subkutan (Luciano, 1978; Langley, 1980; Mitsui, (ed). 1997).

d. Fungsi absorpsi

Senyawa larut lemak dapat diabsorpsi melalui kulit. Sedangkan senyawa larut air tidak mudah di absorpsi. Absorpsi ini dapat melalui celah antarsel, kelenjar sebum, atau akar rambut. Adanya fungsi absorpsi ini memberikan kesempatan untuk pengembangan rute transdermal (Luciano, 1978; Mitsui, (ed). 1997).

e. Fungsi ekskresi

Pengeluaran keringat tidak hanya untuk mengatur suhu tubuh, namun juga menjadi cara untuk mengekskresikan senyawa sisa metabolisme tubuh, seperti urea, asam urat, amonia dan NaCl (Luciano, 1978; Langley, 1980; Mitsui, (ed). 1997).

f. Fungsi metabolisme

Kulit mempunyai peranan dalam membentuk prekursor vitamin D dengan bantuan sinar matahari (Langley, 1980; Mitsui, (ed). 1997).

2.2 Faktor – faktor yang mempengaruhi penetrasi : (Ansel, Howard C., L.V. Allen & N.G.Popovich, 1999)

a. Kondisi kulit

Penetrasi obat akan meningkat pada kondisi kulit yang rusak dan pada kulit dengan lapisan tanduk tipis.

b. Sifat fisika kimia, antara lain :

Koefisien partisi, pH, ukuran molekul dan kelarutan.

c. Sifat pembawa diantaranya, pembawa harus dapat melarutkan zat aktif tetapi tidak mengalami pelepasan zat aktif dari sediaan, Profil pelepasan obat dari pembawa tergantung dari afinitas obat terhadap pembawa, kelarutan obat dan pH pembawa, Pembawa dapat meningkatkan kelembaban kulit, yang dapat mendorong terjadinya penetrasi pada kulit.

d. Koefisien difusi, yang menggambarkan tahanan pergerakan molekul obat melalui barier pembawa dan pembatas kulit.

2.3 Penetrasi Obat Melalui Kulit

Obat dapat menembus melewati kulit melalui tiga cara yaitu: (Touitou & William, 2007; Walters, Kenneth A, 2002).

a. Transelular atau intraselular

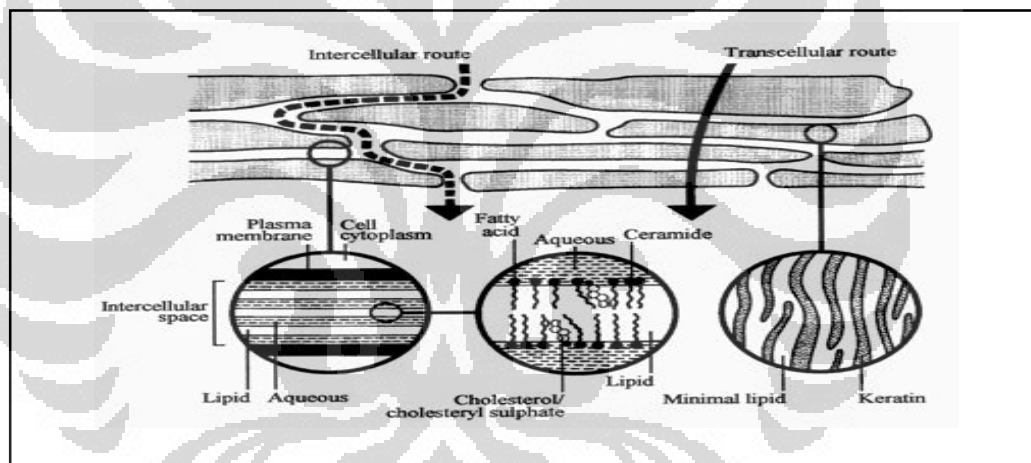
Permeasi obat melalui jalur transeluler langsung menembus sel hanya terjadi dalam jumlah sangat kecil. Hal ini dipengaruhi oleh sel tanduk yang sulit ditembus.

b. Interselular

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

c. Transpendageal

Permeasi obat melalui kelenjar sebacea, folikel rambut, ataupun kelenjar keringat. Jalur ini kurang memegang peranan penting dalam permeasi obat karena luas permukaan yang kecil. Akan tetapi jalur ini dapat menjadi rute alternatif untuk obat dengan target spesifik.



[Sumber : Barry, B.W. 2001]

Gambar 2.2. Rute penetrasi obat

2.3.1 Senyawa Peningkat Penetrasi Perkutanean

Peningkat penetrasi dapat digunakan dalam formulasi obat transdermal untuk memperbaiki fluks obat yang melewati membran. Peningkat penetrasi yang efektif dapat meningkatkan penghalang *stratum corneum*. Senyawa peningkat penetrasi percutanean diharapkan mempunyai sifat-sifat berikut: (Touitou, Elka & Brian W. Barry (eds). 2007).

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

Peningkat penetrasi dapat digunakan dalam formulasi obat transdermal untuk memperbaiki fluks obat yang melewati membran. Peningkat penetrasi yang efektif dapat meningkatkan penghalangan dari stratum korneum (William dan Barry, 2004).

Secara umum senyawa peningkat penetrasi percutan mempengaruhi stratum korneum dengan beberapa cara : (Touitou, Elka & Brian W. Barry (eds). 2007)

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

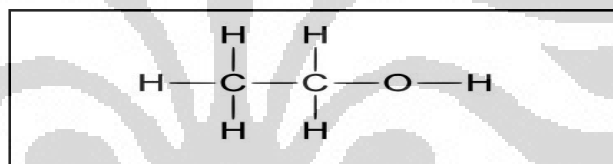
kondisi aktif secara termodinamik dan mendorong obat untuk menembus stratum korneum.

Beberapa senyawa peningkat penetrasi percutan yang biasa digunakan (Touitou, & Brian W. Barry (eds). 2007; Pathan & C Mallikarjuna Setty, 2009) :

- a. Golongan alkohol (etanol, benzil alkohol)
- b. Golongan Asam karboksilat (asam oleat)
- c. Golongan amida (urea, laktam ,contohnya: laurocapram (azone)
- d. Dimetilsulfoxida (DMSO)
- e. Prolidon
- f. Minyak essensial, terpenoid

Berikut akan dijelaskan mengenai senyawa peningkat penetrasi

2.3.2. Etanol

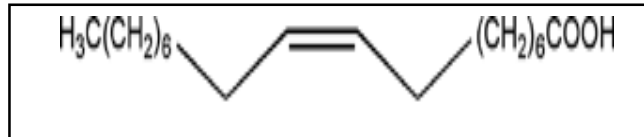


[Sumber : Rowe, Owen., 2006]

Gambar.2.3 Struktur kimia etanol

Pemerian dari etanol cairan tidak berwarna, jernih, mudah menguap, sedikit berbau dan menimbulkan rasa panas, dengan bobot molekul 46,07. Etanol banyak digunakan dalam formulasi sediaan farmasi sebagai kosolven. Di sisi lain etanol dapat meningkatkan penetrasi obat menembus stratum korneum. Mekanisme kerjanya mengubah sifat kelarutan stratum korneum hingga koefisien partisi obat ke dalam jaringan meningkat. Selain itu etanol meningkatkan aktivitas termodinamik obat karena etanol cepat menembus melewati stratum korneum dan memiliki sifat cepat menguap sehingga membuat obat dalam sediaan mencapai kondisi jenuh dan memberikan daya dorong permeasi yang kuat. Ketika digunakan dalam konsentrasi tinggi dan dalam jangka waktu yang panjang, etanol mengubah struktur lipid *bilayer* stratum korneum dengan mengekstraksi lipid.

2.3.3. Asam oleat



[Sumber : Rowe, Owen., 2006]

Gambar 2.4. Struktur kimia Asam Oleat

Pemerian asam oleat minyak berwarna kuning hingga kecoklatan dengan bau dan rasa khas lemak. Tidak larut dalam air, larut dalam etanol, dengan berat molekul 282,47.

Pada asam lemak, peningkatan penetrasi percutan meningkat dengan semakin panjangnya rantai asam lemak. Asam oleat dapat meningkatkan penetrasi senyawa- senyawa yang bersifat hidrofilik atau lipofilik. Mekanisme kerja asam oleat selain sebagai bahan pengemulsi, dapat bekerja sebagai peningkat penetrasi percutan dengan mengganggu struktur lipid *bilayer* stratum korneum secara reversibel dengan berikatan pada gugus polar lipid bilayer sehingga memungkinkan penetrasi obat melalui stratum korneum (Swarbrick dan Boylan, 1995; William dan Barry, 2007)

2.4. Glukosamin HCl



[Sumber : Lockwood, Brian., 2007]

Gambar 2.5. Struktur kimia D-glukosamin HCl

Nama Kimia	: 2-Amino-2-deoxy-D-glucopyranose hydrochloride
Sinonim	: Chitosamin HCl
BM	: 215,63

- Kelarutan : Sangat larut dalam air, (1:10 dalam air (20°C), larut dalam 38 bagian metanol mendidih, sedikit larut dalam metanol atanol dingin. Praktis tidak larut dalam eter dan kloroform.
- Organoleptis : Serbuk kristalin putih dengan rasa agak manis dan bau tidak spesifik
- pH Stabilitas : 3 – 5
- Penyimpanan : Di wadah tertutup rapat dan terhindar dari cahaya

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

Pada dasarnya tubuh manusia dapat memproduksi sendiri glukosamin sebagai salah satu komponen biosintesis glikosaminoglikan (GAG). GAG ini akan berikatan secara kovalen pada inti protein proteoglikan, salah satu komponen matriks jaringan kartilago, dan menjaga integritas struktur dan fungsi jaringan kartilago. Glukosamin yang diproduksi tubuh berada dalam bentuk glukosamin-6-fosfat dan dihasilkan dari glukosa mengikuti jalur biosintesis heksosamin. Biosintesis glukosamin-6-fosfat ini dibatasi oleh enzim glutamin: fruktosa-6-fosfat-amindotransferase (GFAT) sebagai rate limiting enzyme (Oegema, Theodore R., *et al.* 2002).

Mekanisme kerja glukosamin dapat mengurangi penyempitan ruang sendi.(Sukandar. Elin Yulinah. *Et al.* 2008). Salah satu efek samping glukosamin adalah menimbulkan resistensi insulin karena biosintesisnya mengikuti jalur heksosamin dan strukturnya mirip dengan glukosa. Selain itu masih belum ada penelitian lebih lanjut mengenai efek samping glukosamin lainnya (Christina, 2010).

2.5. Nano emulsi

Nanopartikel adalah partikel koloid dengan ukuran antara 1 sampai 100 nm. Senyawa aktif tersebut dapat dibuat dalam bermacam-macam keadaan fisik. Dapat dilarutkan dalam matrik polimer, dapat di enkapsulasi, atau dapat di adsorpsi atau dilekatkan pada permukaan pembawa koloid (Nanoemulsi Technology, 2010)

Nanopartikel memiliki keuntungan yaitu dapat meningkatkan stabilitas obat dan dapat dimanfaatkan sifat pelepasan terkendalinya, targeting pada lokasi spesifik. Nanopartikel tersebut terdiri dari bahan makromolekular yang mengalami pelarutan, penjerapan, enkapsulasi ataupun adsorpsi atau perlekatan. Distribusi pembawa dapat dikendalikan melalui pengaturan ukuran dan sifat permukaan. Tujuan utama membuat sediaan nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat adalah untuk mengontrol ukuran partikel, sifat permukaan dan pelepasan zat aktif untuk memperoleh aksi spesifik obat secara farmakologis pada dosis regimennya (Pathak, Yashwant & Deepak Thassu, 2009).

Nanoemulsi adalah sebuah kelas emulsi dengan ukuran tetesan antara 1 nm dan 100 nm, ditandai dengan cairan transparan yang tergantung pada ukuran partikel dan perbedaan indeks bias antara fase minyak dan fase air yang dapat dilihat setelah menggunakan homogenezer. (Pathak, Yashwant & Deepak Thassu, 2009) Nano emulsi merupakan sebuah sistem yang setidaknya terdiri dari satu surfaktan non-ionik seperti Tween 80. Pada penggunaan topikal nanoemulsi dapat lebih mudah menembus lapisan kulit dengan mempengaruhi permeabilitas obat ke dalam kulit dan memiliki ukuran globul yang lebih kecil. (Basker. R. *Et al.*2010.)

2.6. Bahan Tambahan formulasi

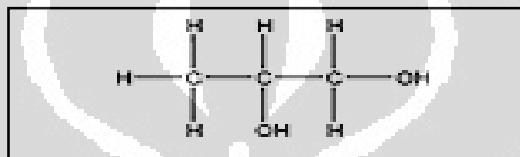
2.6.1 Tween 80 (Rowe, Sheskey & Owen, S.C. 2006)

Polioksietilen sorbitan monooleat atau Tween 80 termasuk kedalam golongan surfaktan nonionik hidrofilik, berupa cairan kuning, bau khas, memberikan sensasi hangat pada kulit, dan rasanya pahit. Dapat bercampur

dengan air, alkohol, kloroform, eter, etil asetat, dan metil alkohol. Memiliki bobot molekul 1310, dan HLB 15.

Digunakan secara luas sebagai *emulsifying agent* dalam pembuatan emulsi minyak dalam air. Digunakan juga sebagai solubiling agent minyak esensial dan vitamin larut minyak, tidak bersifat toksik dan tidak menimbulkan iritasi.

2.6.2 Propilen glikol

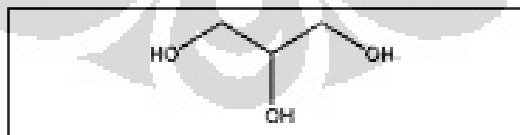


[Sumber : Rowe, Sheskey, Owen, S.C., 2006]

Gambar 2.6. Struktur kimia propilen glikol

Cairan tidak berwarna, jernih, tidak berbau, dapat bercampur dengan etanol, gliserin dan air, memiliki bobot molekul 76,09. Berfungsi sebagai pengawet antimikroba, disinfektan, pelarut, kosolven. Dapat digunakan sebagai humektan untuk menjaga agar sediaan tidak kehilangan kandungannya secara drastis dan juga sebagai kosolven.

2.6.3 Gliserin

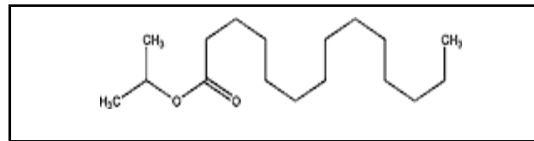


[Sumber : Rowe, Sheskey, Owen, S.C., 2006]

Gambar 2.7. Struktur kimia gliserin

Cairan jernih, tidak berwarna, tidak berbau, higroskopik, sedikit manis. Larut dalam air, etanol 95% dan metanol, praktis tidak larut dalam minyak, chloroform, dan benzen. Berfungsi sebagai emolien, solven.

2.6.4 Isopropil miristat



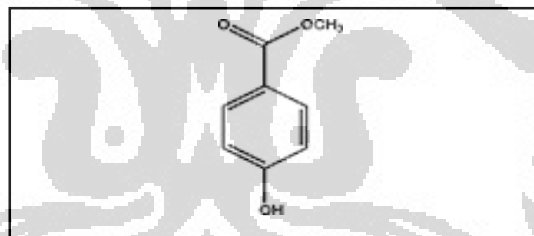
[Sumber : Rowe, Sheskey, Owen, S.C. 2006]

Gambar. 2.8. Struktur Kimia Isopropil miristat

Cairan jernih, tidak berwarna, tidak berbau, agak kental. Dapat bercampur dengan aseton, kloroform, etanol, etil asetat, lemak, toluen, dan wax. Praktis tidak larut dalam gliserin, propilenglikol, dan air. Memiliki bobot molekul 270,51.

Isopropil miristat merupakan bahan yang tidak toksik dan tidak mengiritasi sehingga dapat digunakan secara luas untuk bidang kosmetik.

2.6.5 Nipagin



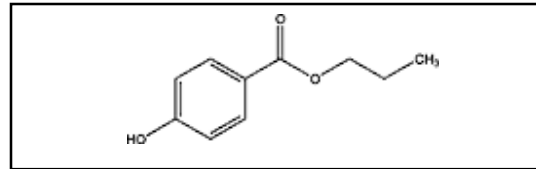
[Sumber : Rowe, Sheskey, Owen, S.C., 2006]

Gambar.2.9. Struktur kimia Metil paraben

Pemerian kristal tidak berwarna atau serbuk kristalin putih, memberikan rasa panas dan bau tidak spesifik. Mudah larut dalam etanol, larut dalam eter, gliserin, praktis tidak larut dalam propilen glikol, air. Memiliki bobot molekul 152,15.

Berfungsi sebagai pengawet efektif pada pH 4-8, penggunaannya dapat dikombinasikan dengan paraben lain. Aktivitas antimikroba meningkat dengan adanya propilen glikol 2-5%.

2.6.6 Nipasol

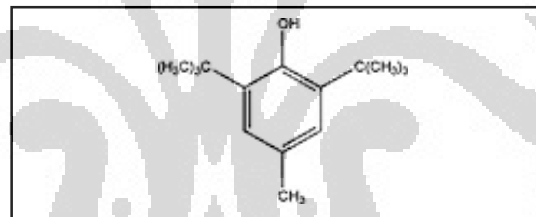


[Sumber: Rowe, Sheskey, Owen, S.C, 2006]

Gambar 2.10. Struktur kimia Propil paraben

Serbuk hablur berwarna putih, tidak berbau atau sedikit berbau, dan tidak berasa tetapi memberikan rasa kebal pada lidah. Mudah larut dalam etanol (95%) P, dalam aseton P, dan dalam eter P, sangat sukar larut dalam air. Memiliki Bobot molekul 180,20 berfungsi sebagai pengawet, aktif melawan ragi dan jamur dibandingkan bakteri.

2.6.7 BHT

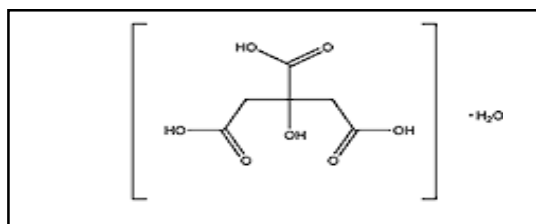


[Sumber : Rowe, Sheskey, Owen, S.C, 2006]

Gambar 2.11 Struktur Kimia Butil Hidroksi Toluen

Serbuk kristal putih atau hampir kuning. Mudah larut dalam aseton, benzen, metanol dan parafin cair, praktis tidak larut dalam air, gliserin, propilenglikol. Memiliki bobot molekul 220.35. Berfungsi sebagai antioksidan, untuk memperlambat atau mencegah oksidasi dari fase lemak dan minyak.

2.6.8 Asam sitrat



[Sumber : Rowe, Sheskey, Owen, S.C, 2006]

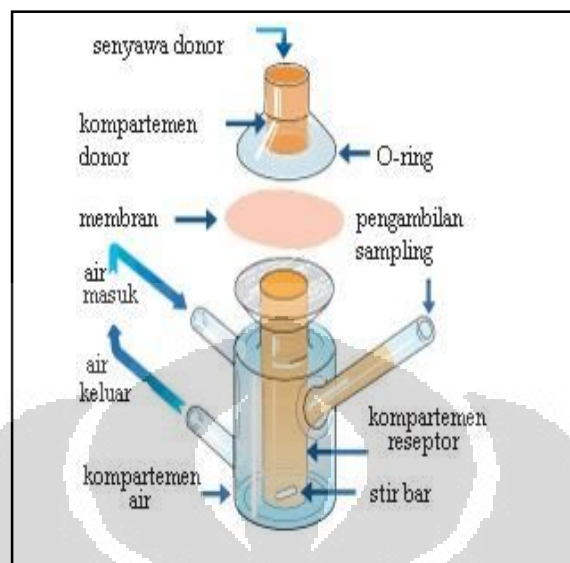
Gambar 2.12 Struktur Kimia Asam sitrat

Serbuk kristal tidak berwarna atau kristal putih, tidak berbau, rasa asam kuat. Larut dalam 1.5 bagian etanol 95% dan larut dalam kurang dari 1 bagian air. Memiliki bobot molekul 210.14 berfungsi sebagai chelating agent.

2.7 Uji Penetrasi Perkulatan Secara *In Vitro* Menggunakan Sel Difusi Franz

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

Sel difusi Franz, salah satu alat untuk menguji permeasi obat melalui kulit secara *in vitro*, merupakan sistem permeasi tipe vertikal. Perangkat ini terdiri atas kompartemen reseptor, tempat pengambilan sampel, dan water jacket. Membran kulit diletakkan diantara kompartemen donor dan reseptor yang telah diisi dengan larutan penerima terdapat pengaduk magnetik yang diatur pada kecepatan 600 rpm untuk larutan dengan viskositas rendah dan water jacket untuk menjaga suhu sistem. (Thakker, Kailas D & Wendy H. Chern., 2003)



[Sumber : PermeGear Franz Cell, 2005]

Gambar 2.13 Sel Difusi Franz

Sediaan yang akan di uji diaplikasikan pada membran kulit. Setelah beberapa waktu diambil sejumlah tertentu cairan dari larutan penerima dan diganti dengan larutan penerima yang baru dengan volume yang sama dengan yang diambil. Sampel ini diambil pada interval waktu tertentu. Kadar obat yang ada dalam masing-masing sampel dihitung dengan metode analisis yang ada kemudian digunakan untuk perhitungan laju penetrasi obat.

Secara umum laju difusi obat melewati kulit mengikuti hukum Ficks I karena pada dasarnya obat melalui kulit dengan cara difusi pasif (Shargel, Leon, *et al.* 2004).

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DAK}{h} (C_d - C_r)$$

Dimana:

$$\frac{dQ}{dt} = \text{Laju Difusi}$$

D = Koefisien difusi

A = Luas area difusi

K = Koefisien partisi obat

h = Tebal membran difusi

C_d = Konsentrasi obat dalam kompartemen donor

C_r = Konsentrasi obat dalam kompartemen reseptor

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

$$J = \frac{Q}{A \cdot t} = k_p \cdot C_v$$

di mana:

Q = Jumlah obat yang terpenetrasi

k_p = Koefisien permeabilitas stratum korneum

A = Luas area pemberian obat

C_v = Konsentrasi obat dalam sediaan

t = Lama pemaparan terhadap obat

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu

Pembuatan dan evaluasi nanoemulsi serta uji penetrasi secara *in vitro* menggunakan sel difusi Franz dilakukan di Laboratorium Penelitian Farmasetika Departemen Farmasi, FMIPA UI. Analisis kuantitatif glukosamin dilakukan di Laboratorium Kimia Kuantitatif Departemen Farmasi, FMIPA UI.

3.2. Bahan

Glukosamin HCl (diberikan oleh PT Otto Pharmaceutical Industries, Indonesia), standar glukosamin HCl (Sigma Aldrich, Singapura), asam oleat (Indonesia), etanol 96% (Merck, Jerman), tween 80, propilen glikol, nipagin, nipasol (Indonesia), gliserin (Merck, Jerman), aquabidest (Ikapharmindo, Indonesia), o-ftalaldehid (Sigma Aldrich, Singapura), metanol, tetrahidrofuran, asetonitril, 2-merkptoetanol, kalium dihidrogen fosfat, asam borat, natrium hidroksida, dietil eter (Merck, Jerman), filter eluen, tikus (Institut Pertanian Bogor, Indonesia).

3.3. Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah sel difusi Franz dengan luas area difusi 1,89 cm² dan volume kompartemen 12,7 ml (Bengkel gelas ITB, Indonesia), perangkat KCKT fluoresensi (Shimadzu, Jepang), spektrofluorometer F-2000, timbangan analitik (Adam, USA), homogenizer (Multimix, Malaysia), viskometer model HAT dengan spindel tipe HA (Brookfield, USA), pH meter tipe 510 (Eutech Instrument, Singapura), DelsaTMNano C Particle analiszer beckman coulter, vortex (Branstead, USA), sentrifugator Kubota-1500 (Kubota, Jepang), oven (Memmert, Jerman), pipet mikro (Socorex, Swiss), kolom C18 Symmetry Shield (Waters, USA), kamera digital, dan peralatan gelas yang biasa digunakan.

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Pembuatan Nanoemulsi Glukosamin

Tabel 3. 1. Formula sediaan nanoemulsi

Bahan	Formula A (%)	Formula B (%)
Glukosamin HCl	1,5	1,5
Etanol	6	-
Asam oleat	-	6
Tween 80	40	40
Propilen glikol	5	5
Gliserin	15	15
Isopropil miristat	5	5
Nipagin	0,18	0,18
Nipasol	0,02	0,02
BHT	0,1	0,1
As.sitrat	0,1	0,1
Aquadest	ad 100	ad 100

Asam sitrat dilarutkan dalam aquadest, lalu tween 80 ditambahkan dalam larutan tersebut. Di wadah yang berbeda nipagin dan nipasol dilarutkan dalam propilen glikol, lalu ditambahkan gliserin. Glukosamin HCl yang telah dilarutkan dalam aquadest (1,5 gram dalam 10ml) ditambahkan ke dalam fase air. Sebagai senyawa peningkat penetrasi etanol dilarutkan terlebih dahulu dalam aquadest lalu dicampur dalam fase air. Sedangkan asam oleat di larutkan bersama dengan propilenglikol. BHT dilarutkan dalam isopropil miristat sebagai fase minyak. Fase air yang terbentuk dimasukkan dalam campuran fase minyak dan dilanjutkan proses homogenisasi menggunakan homogenizer dengan kecepatan konstan 1800 rpm selama 3 menit.

3.4.2. Evaluasi sediaan Nanoemulsi

3.4.2.1. Uji Organoleptis

Sediaan diamati kejernihan, sedimentasi, bau serta perubahan warna.

3.4.2.2. Uji Ukuran Partikel (Beckman. Coulter, 2010)

Pengukuran ukuran partikel nanoemulsi diukur menggunakan alat DelsaTMNano C Particle analiszer beckman coulter.

3.4.2.3. Pengukuran pH (*Farmakope Indonesia* Ed ke-4, 1995)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Mula-mula elektroda dikalibrasi dengan dapar standar pH 4 dan 7. Setelah itu elektroda dicelupkan kedalam sediaan. Catat nilai pH yang muncul dilayar. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang.

3.4.2.4. Pengukuran Viskositas Nanoemulsi (Martin, A., J. Swarbrick & A. Cammarata. 1993)

Pengukuran viskositas dilakukan dengan viskometer Brookfield HA. Sediaan nanoemulsi dimasukkan dalam *beaker glass* 500 ml sebanyak 300 ml. Pasang spindel pada gantungan spindel. Turunkan spindel sedemikian rupa hingga batas spindel tercelup kedalam emulsi. Pasang stop kontak, kemudian nyalakan motor dan spindel dibiarkan berputar. Angka viskositas yang ditunjukkan oleh jarum merah dicatat, kemudian dikalikan dengan faktor yang dilihat pada tabel yang ada yang terdapat pada brosur alat. Dengan mengubah rpm dari 0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10; dan 20 rpm kemudian dari sebaliknya 20; 10; 5; 2,5; 2; 1; 0,5 rpm.

3.4.2.5. Uji Mekanik

Uji ini dilakukan untuk mengetahui efek guncangan pada saat transportasi produk terhadap tampilan fisik produk. Uji mekanik yang dilakukan yaitu *centrifugal test*. Dengan mensentrifugasi nanoemulsi pada kecepatan 3750 rpm selama 5 jam.

3.4.3. Uji Stabilitas Fisik Nanoemulsi

i. Penyimpanan Pada Suhu Kamar

Stabilitas sediaan meliputi organoleptis, pH, dan viskositas dievaluasi pada suhu kamar $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 6 minggu dengan pengamatan 2 minggu sekali.

ii. Penyimpanan Pada Suhu Hangat

Stabilitas sediaan meliputi organoleptis, pH, dan viskositas dievaluasi pada suhu antara $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ antara 6 minggu dengan pengamatan selama 2 minggu sekali.

iii. Penyimpanan Pada Suhu Rendah

Stabilitas sediaan meliputi organoleptis, pH, dan viskositas dievaluasi pada suhu antara $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ selama 6 minggu dengan pengamatan selama 2 minggu sekali. (Pathak, Yashwant & Deepak Thassu. 2009)

iv. *Cycling Test* (Pathak, Yashwant & Deepak Thassu. 2009).

Sediaan disimpan pada suhu $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ selama 24 jam kemudian dikeluarkan dan ditempatkan di suhu $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ selama 24 jam. Perlakuan ini adalah satu siklus. Percobaan diulang sebanyak 6 siklus. Stabilitas sediaan dievaluasi selama percobaan. Guna penentuan ini untuk melihat adanya perubahan fisik nanoemulsi dan kemungkinan adanya pertumbuhan Kristal.

3.4.4. Uji penetrasi perkutan secara *In Vitro*

3.4.4.1. Pembuatan Dapar Fosfat pH 7,4 (United State, 2007)

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

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

Timbang 2,47 gram asam borat, lalu dilarutkan dalam larutan natrium hidroksida jenuh hingga pH 9,3, kemudian diencerkan dengan air hingga volume 100 ml.

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

Timbang 27 mg o-ftalaldehid, larutkan dalam 500 μ l etanol dan 20 μ l 2-merkaptoetanol, dikocok dengan vorteks, lalu encerkan dengan dapar borat pH 9,3 sampai volume 5 ml. Larutan disimpan 24 jam dalam lemari pembeku sebelum digunakan.

3.4.4.4. Pembuatan Fase Gerak Tetrahidrofurana 0,25% - asetonitril (83:17)

Larutkan 1,25 ml tetrahidrofurana dalam 500,0 ml aquabides. Saring larutan dengan filter. Larutkan 102,6 ml asetonitril HPLC grade dalam larutan pertama. Homogenkan larutan tersebut selama 5 menit dengan pengaduk magnetik kecepatan 300 rpm.

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

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

Panjang gelombang emisi : larutan glukosamin 10 μ g/ml atau blanko air di pipet 10,0 μ l ke dalam tabung reaksi, ditambah 10,0 μ l pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptoetanol. Campuran dibiarkan bereaksi selama 2 menit, selanjutnya ditambahkan fase gerak sampai volume 2 ml. Larutan dimasukkan ke dalam kuvet

Universitas Indonesia

spektrofluorometer dan dilakukan pengukuran spektrum emisi pada 350-600 nm, menggunakan panjang gelombang emisi untuk analisis.

3.4.4.6. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosamin dalam Metanol dan Dapar Borat pH 9,3 (Purwadi, 2007)

Standar glukosamin HCl ditimbang sebanyak $\pm 12,0$ mg lalu dilarutkan dalam metanol hingga 100,0 ml. Akan didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm dihitung terhadap glukosamin base. Larutan 100 ppm ini digunakan sebagai larutan induk. Dari larutan induk ini dipipet masing-masing 200,0; 300,0; 400,0; 500,0; 600,0; dan 700,0 μ l kemudian diencerkan dengan dapar borat pH 9,3 dalam labu ukur 10,0 ml sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6 dan 7 ppm. Masing-masing larutan standar tersebut dipipet 50,0 μ l dan direaksikan dengan 50,0 μ l pereaksi o-flalaldehid/2 merkptoetanol. Setelah itu larutan uji tersebut dianalisis dengan KCKT detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi dan emisi terpilih dengan laju alir 1,5 ml/menit kemudian dihitung persamaan regresi linearnya.

3.4.4.7. Pembuatan Kurva kalibrasi Glukosamin dalam Pelarut Dapar Fosfat pH 7,4 dan Dapar Borat pH 9,3

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

emisi terpilih dengan laju alir 1,5 ml/menit kemudian dihitung persamaan regresi linearnya.

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

Membran yang digunakan adalah abdomen kulit tikus betina *Rattus norvegicus* usia 2-3 bulan dengan berat ± 150 gram. Pertama-tama tikus dibius dengan eter hingga mati kemudian bulu tikus dicukur dengan hati-hati. Setelah itu kulit tikus di sayat pada bagian perut dengan ketebalan $0,6 \pm 0,1$ mm. Kemudian kulit tikus direndam dalam medium yang akan digunakan selama 30 menit setelah itu disimpan dalam suhu 4°C . Kulit dapat digunakan pada rentang waktu 24 jam. Uji penetrasi dilakukan menggunakan sel difusi Franz dengan luas area difusi $1,39\text{ cm}^2$ dan volume kompartemen 14 ml. Kompartemen reseptor diisi dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 dan dijaga suhunya sekitar $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ serta diaduk dengan pengaduk magnetik kecepatan 500 rpm. Kulit abdomen tikus kemudian diletakkan diantara kompartemen donor dengan kompartemen reseptor dengan posisi stratum korneum menghadap ke atas. Sampel 1 gram diaplikasikan pada permukaan kulit. Kemudian pada menit ke-10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 420, 480 diambil sampel sebanyak 0,5 ml dari kompartemen reseptor menggunakan *syringe* dengan segera digantikan dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 sejumlah volume yang sama. Setelah itu, sampel dimasukkan kedalam labu ukur 5,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan dapar borat pH 9,3. Jika konsentrasi sampel tidak berada dalam rentang kurva kalibrasi, dapat dilakukan pengenceran lagi. Dari larutan tersebut dipipet $200,0\ \mu\text{l}$ dan dimasukkan ke labu ukur 5,0 ml lalu dicukupkan volumenya dengan dapar borat pH 9,3. Larutan sampel tersebut dipipet $50,0\ \mu\text{l}$ dan direaksikan dengan $50,0\ \mu\text{l}$ pereaksi OPA/2-ME. Setelah itu larutan uji tersebut dianalisis dengan KCKT detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi dan emisi terpilih dengan laju alir 1,0 ml/menit kemudian dihitung kadarnya menggunakan persamaan kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 dan dapar borat pH 9,3. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali.

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

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

Keterangan :

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

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

V = Volume sel difusi Franz (14,0 ml)

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

S = Volume sampling (0,5 ml)

A = Luas area membran (1,88692 cm^2)

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

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

Keterangan :

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

Q = Jumlah kumulatif glukosamin yang melalui membran (μg)

t = Waktu (jam)

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

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Pembuatan Nano emulsi

Pada pembuatan nanoemulsi dengan zat aktif glukosamin digunakan juga bahan tambahan formulasi untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dengan proses pengadukan untuk meningkatkan homogenisasi sediaan sehingga dihasilkan produk yang homogen. Nanoemulsi yang dibentuk adalah tipe minyak dalam air, dimana minyak sebagai fase dalam dan air sebagai fase luar.

Nanoemulsi terdiri dari fase minyak, air, surfaktan dan kosurfaktan. Dalam proses pembuatannya bahan yang bersifat hidrofil dilarutkan dalam fase air, dan bahan yang bersifat hidrofob dilarutkan ke dalam fase minyak. Kemudian fase minyak didispersikan kedalam fase air membentuk campuran yang jernih pada kondisi tertentu. (Ansel, Howard C., L.V. Allen & N.G. Popovich. 1999).

Tween 80 dipilih karena penggunaannya secara luas sebagai bahan pengemulsi dalam pembuatan emulsi minyak dalam air, berperan juga sebagai surfaktan, selain itu juga mempengaruhi proses solubilisasi. Adanya logam dapat mengkatalisis, sehingga dapat terjadi penurunan solubilitas emulsi. Untuk menghindari hal tersebut digunakan asam sitrat sebagai *chelating agent*. Butil hidroksitoluen digunakan untuk mencegah terjadinya oksidasi pada emulsi karena adanya kandungan air dan minyak. Nipagin dan nipasol digunakan sebagai pengawet pada konsentrasi yang memberikan aktivitas antimikroba. (Rowe, Sheskey & Owen, S.C. 2006) Emulsi membutuhkan pengawet karena bahan yang digunakan mengandung air dalam jumlah tinggi yang merupakan medium pertumbuhan mikroba. Adanya tween 80 dapat mempengaruhi efektivitas antimikroba, sehingga ditambahkan kombinasi antimikroba dengan konsentrasi maksimum. (Ansel, Howard C., L.V. Allen & N.G. Popovich. 1999). Propilenglikol sebagai kosurfaktan dimaksudkan untuk membantu surfaktan mengurangi tegangan antarmuka minyak dan air, selain itu propilenglikol juga berfungsi untuk melarutkan asam oleat. Masing-masing senyawa peningkat penetrasi yaitu etanol dan asam oleat dicampurkan dalam propilenglikol lalu ditambahkan ke dalam fase air dan

dihomogenkan. Penambahan gliserin berfungsi sebagai emollient. Fase minyak yang digunakan adalah isopropil miristat, semakin sedikit jumlah fase minyak yang digunakan, akan semakin mudah terbentuk nanoemulsi karena fase minyak yang akan disolubilisasi oleh misel semakin sedikit.

Kecepatan pengadukan sangat mempengaruhi pembentukan ukuran partikel yang diinginkan, tidak boleh terlalu cepat atau lambat. Jika terlalu cepat tetesan yang terdapat dalam nanoemulsi akan mudah saling berbenturan sehingga ukuran partikel yang dihasilkan menjadi lebih besar dan emulsi akan keruh, selain itu dengan pengadukan yang cepat juga akan menghasilkan busa karena banyak udara yang terperangkap. Sedangkan jika pengadukan terlalu lambat maka bahan-bahan akan sulit untuk homogen. (Lachman, Leon. *et al.* 1994) Kecepatan pengadukan divariasikan mulai dari 1500 sampai 4000 rpm dengan variasi waktu pengadukan 3-5 menit.

Kondisi temperatur pada saat pembuatan nanoemulsi juga mempengaruhi pembuatan nanoemulsi, terutama jika menggunakan surfaktan nonionik. Peningkatan suhu akan menyebabkan hidrolisis bagian non polar dari surfaktan, menghasilkan asam lemak yang akan menjadi bagian fase minyak. (Lachman, Leon. *et al.* 1994).

Sebelum pengamatan, dilakukan uji pendahuluan untuk dipilih kondisi terbaik pembuatan sediaan nanoemulsi yang transparan. Kondisi yang terbaik itu adalah dengan kecepatan pengadukan 1800 rpm, waktu pengadukan optimum selama 3 menit dan pada suhu kamar ($28 \pm 2^\circ\text{C}$).

4.1.2. Evaluasi Sediaan Nano emulsi

Kedua formula dievaluasi setelah dilakukan uji pendahuluan. Hasil evaluasi pada minggu ke-0 akan digunakan sebagai perbandingan terhadap perubahan yang terjadi pada kedua formula setelah disimpan pada kondisi suhu yang berbeda.

4.1.2.1. Pengamatan Organoleptis

Untuk formula A dan B nano emulsi berwarna kuning jernih tetapi banyak gelembung udara yang terperangkap. Pada penyimpanan suhu kamar ($28^\circ \pm 2^\circ\text{C}$), suhu hangat ($40^\circ \pm 2^\circ\text{C}$) dan suhu rendah ($4^\circ \pm 2^\circ\text{C}$), kedua formula pada minggu kedua

masih terdapat gelembung udara yang jumlahnya semakin sedikit. Sediaan formula A tidak berbau sampai minggu ke-6, pada formula B berbau khas lemak dari asam oleat sampai minggu ke-6. Pada formula A dan formula B pada minggu ke-6 pada masing-masing suhu penyimpanan terjadi perubahan warna menjadi kuning tua. Foto hasil pengamatan organoleptis masing-masing formula selama 6 minggu pada ketiga suhu dapat dilihat pada gambar 4.6, 4.7, dan 4.8. Hasil data pengamatan organoleptis kedua formula dapat dilihat pada tabel 4.2, 4.3, 4.4.

4.1.2.2. Pengukuran Ukuran Partikel

Pengukuran ukuran partikel dilakukan pada minggu ke-0 dengan menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*) Delsa™ Nano C beckman coulter. Ukuran rata-rata untuk formula A adalah 4,5 nm, sedangkan pada formula B adalah 12,3 nm. Hasil pengukuran dapat dilihat pada lampiran 3 dan 4.

4.1.2.3. Pengukuran pH

Nanoemulsi di ukur setiap 2 minggu sekali selama 6 minggu. Pengukuran dilakukan pada nanoemulsi yang disimpan pada suhu $28^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, $4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, $40^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. pH nano emulsi menunjukkan pH tidak stabil. Data pengukuran pH dapat di lihat pada tabel 4.5, 4.6 dan 4.7 dan grafik pH pada ketiga suhu dapat dilihat pada Gambar 4.9, 4.10 dan 4.11. Penurunan nilai pH sediaan nano emulsi pada penyimpanan selama 6 minggu dari ketiga suhu untuk tiap dua minggu terlalu besar. pH formula A pada minggu ke-0 4,71, pH terendah pada minggu ke-6 pada penyimpanan suhu hangat yaitu 4,16. Pada formula B pada minggu ke-0 4,62, pH terendah pada minggu ke-6 pada penyimpanan suhu hangat yaitu 3,93.

4.1.2.4. Pengukuran Viskositas Nano emulsi

Pengukuran viskositas nanoemulsi menggunakan viskometer Brookfield HA, menggunakan spindel 2 untuk formulasi A dan spindel 3 untuk formulasi B pada suhu kamar ($28^{\circ}\text{C}\pm 2$). Dengan mengubah rpm dari 0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10; dan 20 rpm kemudian dari sebaliknya 20; 10; 5; 2,5; 2; 1; 0,5 rpm. Hasil pengukuran viskositas

minggu ke-0 formula A 1400 cps dan formula B 15000 cps. Pada minggu ke-6 formula A mengalami peningkatan viskositas menjadi 2000 cps, sedangkan pada formula B terjadi penurunan viskositas menjadi 7500 cps. Data hasil pengukuran viskositas minggu ke-0 dan minggu ke-6 dapat dilihat pada tabel 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 dan grafik rheologi nanoemulsi kedua formula pada minggu ke-0 dan minggu ke-6 dapat di lihat pada gambar 4.2, 4.3, 4.4, 4.5.

Berdasarkan grafik rheologi sediaan formula A dan formula B mempunyai sifat alir plastis yang merupakan sistem non-Newton karena tidak melalui titik (0,0) melainkan memotong sumbu shearing stress.

4.1.2.5. Uji sentrifugasi

Sediaan nanoemulsi disentrifugasi dengan kecepatan 3750 rpm selama 5 jam pada minggu ke-0. Setelah uji sentrifugasi, tidak terjadi pemisahan fase dan tetap jernih. kedua formula tetap stabil, Gambar nanoemulsi setelah sentrifugasi dapat dilihat pada gambar 4.13.

4.1.3. Uji Stabilitas Fisik Nano emulsi

4.1.3.1. Penyimpanan pada suhu kamar ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$)

Pada minggu ke-0 formula A terdapat gelembung udara, berwarna kuning muda, tidak berbau. Pada minggu ke-6 gelembung udara hilang, warna kuning dan tidak berbau.

Pada minggu ke-0 formula B terdapat gelembung udara yang membentuk warna kuning muda hingga putih, berbau khas lemak. Pada minggu ke-6 gelembung udara hilang, warna kuning, bau tidak berubah.

4.1.3.2. Penyimpanan pada suhu hangat ($40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$)

Pada minggu ke-0 formula A terdapat gelembung udara, warna kuning, tidak berbau. Pada minggu ke-6, gelembung udara hilang, warna kuning jernih dan tidak berbau.

Pada minggu ke-0 formula B terdapat gelembung udara, warna kuning muda, berbau khas lemak. Pada minggu ke-6 gelembung udara hilang, warna kuning tua, tidak berbau.

4.1.3.3. Penyimpanan pada suhu rendah ($4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$)

Pada minggu ke-0 formula A terdapat gelembung udara warna kuning, tidak berbau. Pada minggu ke-6 gelembung udara hilang, warna kuning jernih dan tidak berbau.

Pada minggu ke-0 sampai ke-6 formula B terdapat gelembung udara, berbau khas lemak, warna kuning jernih.

4.1.3.4. *Cycling Test*

Setelah melewati 6 siklus, nano emulsi pada formula A tidak terdapat gelembung, berwarna kuning jernih, tidak berbau. Pada formula B masih terdapat gelembung udara, berwarna kuning jernih, dan berbau khas lemak. Hasil gambar pengamatan organoleptis nanoemulsisebelum dan setelah *Cycling test* dapat dilihat pada gambar 4.12

4.1.4. Uji Penetrasi Perkulatan secara *In Vitro*

Untuk mengetahui kadar glukosamin yang terpenetrasi, sampel diuji secara *in vitro* dengan menggunakan sel difusi franz. Kemudian dilakukan penetapan kadar dengan menggunakan kromatografi cair kerja tinggi (KCKT). Kolom yang digunakan yaitu C-18 dengan fase gerak THF 0,25% - asetonitril dengan perbandingan (83:17). Detektor yang digunakan adalah detektor fluoresensi. Sampel glukosamin diderivatisasi terlebih dahulu dengan menggunakan pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptotanol (OPA/2-ME) yang dibiarkan selama 2 menit agar diperoleh derivat glukosamin yang maksimum, yang dapat berfluoresensi. Gambar spektrum serapan glukosamin setelah diderivatisasi dengan pereaksi o-ftalaldehid/2-merkaptotanol dapat dilihat pada gambar 4.16

Luas puncak derivat glukosamin berada pada panjang gelombang eksitasi maksimum 336 nm dan panjang gelombang emisi maksimum 450 nm. Nilai kedua panjang gelombang tersebut sedikit bergeser dari data yang tercantum di literatur, yaitu 335 nm dan 445 nm (Purwadi,2007). Pergeseran tersebut dapat dipengaruhi oleh perbedaan spektrofotometer yang digunakan, selain itu bahan lain seperti pereaksi dan fase gerak yang digunakan.

Glukosamin yang dianalisis bukan dalam bentuk garam HCl, melainkan dalam bentuk base. Oleh sebab itu glukosamin HCl harus di ubah dahulu menjadi glukosamin base dengan menyesuaikan pH larutan dengan dapar borat pH 9,3. pKa glukosamin HCl pada suhu 37°C adalah 6,91 (Lockwood,2007)

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

Sebelum melakukan penetapan kadar glukosamin yang terpenetrasi, dilakukan derivatisasi terlebih dahulu untuk mengetahui panjang gelombang eksitasi maksimum dan panjang gelombang emisi maksimum glukosamin. Hasil spektrofotometer menunjukkan panjang gelombang eksitasi maksimum pada 336 nm dan panjang gelombang emisi pada 450 nm.

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

Hasil data kurva kalibrasi dapat dilihat pada tabel 4.14 dan grafik kalibrasi dapat dilihat pada gambar 4.14. Persamaan regresi yang diperoleh adalah :
 $y = 94820,10 + 259991,8x$ dengan $r = 0,9982$

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

Hasil data kurva kalibrasi dapat dilihat pada tabel 4.15 dan grafik kalibrasi dapat dilihat pada gambar 4.14. Persamaan regresi yang diperoleh adalah :
 $y = 231659,91 + 2548648,53x$ dengan $r = 0,9987$

4.2. Pembahasan

4.2.1. Evaluasi Nano emulsi

4.2.1.1. Pengamatan Organoleptis

Pengamatan fisik dari kedua formula minggu ke-0 menunjukkan emulsi yang tidak bening atau transparan. Terperangkapnya gelembung udara dalam jumlah yang cukup banyak di duga akibat pengadukan pada saat pembuatan nano emulsi menggunakan homogenizer. Gelembung yang terbentuk pada formula A lebih cepat hilang dibandingkan dengan formula B, gelembung udara yang terperangkap berkurang setelah beberapa hari penyimpanan. Warna yang terlihat menjadi lebih putih pada formula B karena pengaruh adanya asam oleat yang tergolong kedalam asam lemak yang bercampur dengan fase air pada emulsi.

Perubahan warna kuning yang terjadi pada formula A dan formula B pada minggu ke-6, hal tersebut karena terjadi degradasi pada glukosamin. Glukosamin akan terdegradasi menjadi senyawa furfural (Chi-kuen, 1998). Senyawa furfural ini berwarna kuning dan berubah menjadi coklat jika terekspos udara dan cahaya (*The Merck*, 2001). Sedangkan pada formula B warna kuning yang lebih pekat selain terjadi degradasi pada glukosamin, juga disebabkan karena adanya asam oleat yang lama kelamaan menjadi gelap jika terpapar udara.

Pada minggu ke-6 bau khas lemak pada formula B pada penyimpanan suhu semakin berkurang, hal ini karena asam oleat akan terurai pada suhu tinggi.

4.2.1.2. Pengukuran ukuran partikel

Ukuran partikel nanoemulsi di ukur menggunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*) Delsa™Nano C beckman coulter. Sediaan nanoemulsi yang diukur yaitu sediaan pada minggu ke-0. Hasil pengukuran rata – rata pada formula A yaitu 4,5 nm, dan formula B rata –rata 12,3 nm. Nanoemulsi memiliki ukuran partikel kurang dari 100 nm. (Pathak, Yashwant & Deepak Thassu, 2009) Hal tersebut menunjukkan sediaan formula A dan formula B adalah sediaan nanoemulsi. Hasil pengukuran dapat di lihat pada lampiran 1.

4.2.1.3. Pengukuran pH

Selama 6 minggu, pemeriksaan pH nano emulsi formula A dan B menunjukkan hasil yang kurang stabil, terjadi penurunan nilai pH yang besar. Penurunan pH pada formula A dan formula B diduga karena pengaruh senyawa peningkat penetrasi yang bersifat asam.

4.2.1.4 Pengukuran viskositas nanoemulsi

Pengukuran viskositas nanoemulsi dilakukan sebanyak 2 kali, pengukuran pertama pada minggu ke-0, kemudian pengukuran yang kedua dilakukan pada minggu ke-6. Hasil pengukuran menunjukkan kenaikan viskositas pada formula A 1400 cps meningkat menjadi 2000 cps. Sedangkan pada formula B terjadi penurunan viskositas 15000 cps turun menjadi 7500 cps. Data hasil pengukuran dapat dilihat pada tabel 4.9 – 4.12.

Kenaikan viskositas pada formula A, dipengaruhi oleh ukuran partikel yang sangat kecil (A. Martin, J. Swarbrick, A. Cammarata. 1993), selain itu kemungkinan karena adanya partikel-partikel yang terflokulasi dalam emulsi, sehingga nilai *yield value* menjadi tinggi. Penurunan viskositas pada formula B kemungkinan berhubungan dengan meningkatnya ukuran globul sehingga luas permukaan menjadi kecil, dan fase luar yaitu fase air mengisi ruang antar globul tersebut. Hal ini menyebabkan ruang partikel menjadi kecil, sehingga partikel-partikel dapat bergerak dari satu tempat ke tempat yang lainnya pada kecepatan geser yang rendah sehingga viskositas rendah. (M.Alfred, S.James, C.Arthur, 1993)

4.2.1.5 Uji sentrifugasi

Uji sentrifugasi juga merupakan salah satu indikator kestabilan fisik sediaan emulsi. sampel yang di sentrifugasi dengan kecepatan 3750 rpm selama 5 jam hasilnya ekuivalen dengan efek gravitasi selama 1 tahun (Rieger, 2000). Hasil pengamatan yang di dapat pada formula A dan B tidak terjadi pemisahan fase, Hal ini menunjukkan bahwa sediaan nano emulsi stabil secara fisik selama 1 tahun.

4.2.2. Uji Stabilitas Fisik Nano emulsi

Adanya gelembung udara pada formula A dan B yang terperangkap di sebabkan penggunaan homogenizer dengan kecepatan 1800 rpm selama 3 menit pada pembuatan nanoemulsi. Pompa pada homogenizer dapat menaikkan tekanan dispersi, ketika tekanan meningkat, dispersi bebas di antara katup yang menyebabkan udara masuk. (Lachman, Leon, Lieberman A. Hebbert, Kanig A. Joseph, 1994). Bau khas lemak masih ada sampai minggu ke-6 pada formula B karena asam oleat yang merupakan asam lemak.

4.2.2.1. *Cycling test*

Cycling test dilakukan untuk mengetahui kestabilan sediaan selama 6 siklus dengan penyimpanan suhu yang berbeda. Siklus *Cycling test* mendekati kondisi penyimpanan realistik. Reaksi yang terjadi bersifat reversibel. Hasil pengamatan menunjukkan sediaan formulasi A dan B stabil, warna tetap jernih, tidak terjadi pemisahan fase atau pertumbuhan kristal (polimorfi). Hal tersebut menyatakan apabila sediaan disimpan pada kondisi suhu rendah atau tinggi bersifat reversibel.

4.2.3. Uji Penetrasi Glukosamin

Hasil uji penetrasi selama 8 jam menunjukkan bahwa jumlah glukosamin yang berpenetrasi lebih besar pada formula A yang mengandung senyawa peningkat penetrasi etanol. Jumlah kumulatif yang terpenetrasi melalui kulit tikus setelah 8 jam pada sediaan formula A sebesar $1147,30 \pm 27,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dan formula B $708,72 \pm 10,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Fluks atau laju penetrasi glukosamin menembus membran kulit tikus setelah 8 jam pada formula A sebesar $218,114 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{jam}$ dan $88,59 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{jam}$ pada formula B. Jumlah kumulatif hasil uji penetrasi glukosamin dapat dilihat pada tabel 4.15 dan hasil perhitungan fluks atau laju penetrasi glukosamin dapat dilihat pada tabel 4.16.

Dalam penelitian ini dilakukan uji penetrasi perkutan secara *in vitro* menggunakan sel difusi Franz. Membran yang digunakan adalah kulit bagian abdomen tikus *rattus norvegicus* yang telah dicukur terlebih dahulu bulunya. Digunakan kulit tikus karena memiliki permeabilitas yang mendekati permeabilitas kulit manusia.

Kulit tikus yang digunakan dalam keadaan segar kemudian di hidrasi terlebih dahulu dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 selama 30 menit yang merupakan cairan penerima di kompartemen reseptor. Setelah dihidrasi, kulit tikus dipasang secara hati – hati dalam sel difusi Franz, dijepit menggunakan *o-ring* dan jangan sampai ada udara yang terperangkap di antara membran dengan cairan penerima. Karena udara yang terperangkap dapat menghambat penetrasi glukosamin karena kontak antara membran dengan cairan penerima terhalang (Walters, 2002).

Cairan yang terdapat dalam kompartemen penerima adalah dapar fosfat pH 7,4 yang menggambarkan sistem aliran darah di bawah kulit. Air dialirkan dari termostat masuk ke dalam *water jacket* untuk menjaga suhu 37°C yang merupakan suhu tubuh manusia. Suhu harus tetap dijaga karena perubahan suhu dapat mengakibatkan perubahan laju difusi glukosamin menembus membran. Untuk menjaga cairan kompartemen reseptor tetap homogen, kompartemen reseptor diaduk dengan pengaduk magnetik pada kecepatan ± 500 rpm.

Formula A mengandung etanol sebanyak 6% sebagai senyawa peningkat penetrasi memberikan laju penetrasi lebih besar di banding formula B yang mengandung senyawa penetrasi asam oleat sebanyak 6%.

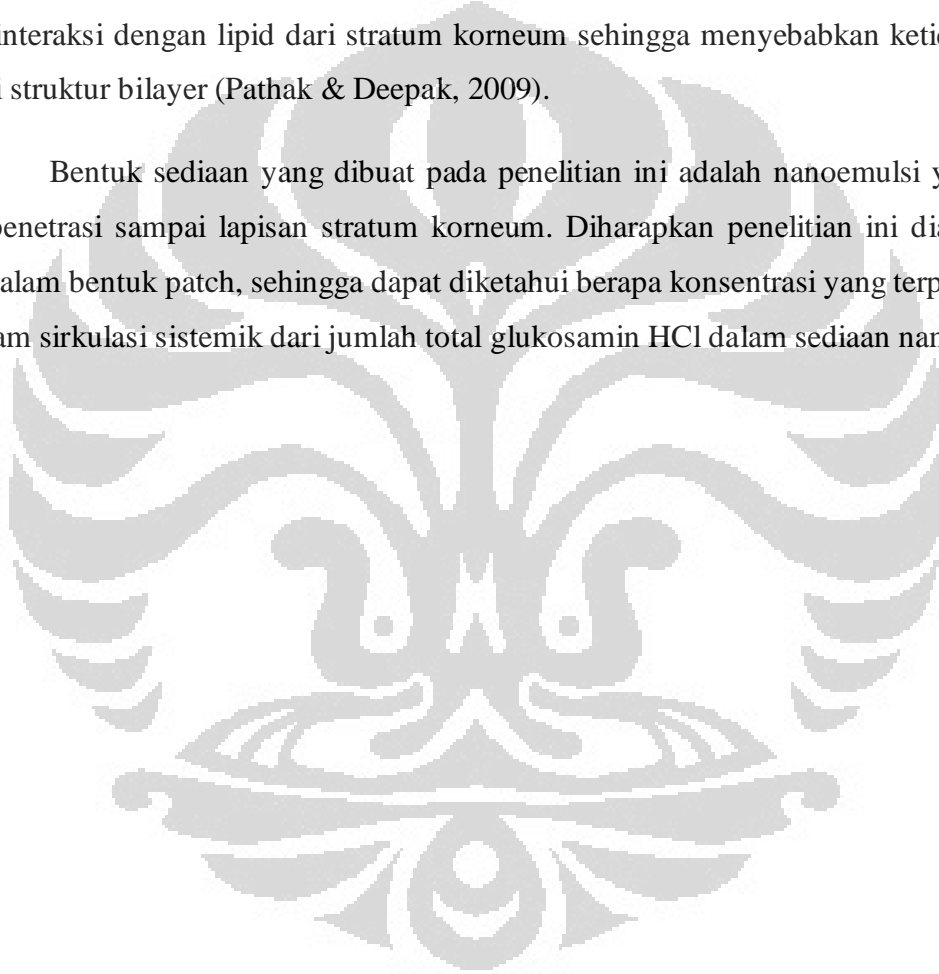
Glukosamin merupakan senyawa yang sangat hidrofilik sehingga sulit untuk menembus barier lipid *bilayer* stratum korneum (Kanwischer et. al., 2005). Penggunaan etanol dapat meningkatkan laju penetrasi glukosamin. Etanol mampu mengubah sifat melarutkan stratum korneum, membuat glukosamin lebih banyak terlarut kedalam stratum korneum sehingga penetrasi meningkat.

Penggunaan asam oleat dapat meningkatkan penetrasi obat dengan cara mengganggu susunan lapisan bilayer masuk ke bagian lipofilik dari stratum korneum sehingga dapat menembus barier (Touitou & Barry, 2007). Akan tetapi pada penelitian ini asam oleat dapat menurunkan kelarutan glukosamin dalam stratum korneum, sehingga efek peningkatan penetrasi tidak terjadi.

Ukuran partikel nanoemulsi dapat membantu meningkatkan penetrasi obat. Jika ukuran partikel sangat kecil, jumlah obat yang berinteraksi dengan area pada stratum korneum akan meningkat (Pathak & Deepak, 2009).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi masuknya bahan obat ke dalam kulit adalah bentuk sediaan obat. Nanoemulsi memiliki fase air sehingga dapat mengubah *polar pathway* dengan cara menghidrasi stratum korneum, sedangkan fase minyak akan berinteraksi dengan lipid dari stratum korneum sehingga menyebabkan ketidakstabilan dari struktur bilayer (Pathak & Deepak, 2009).

Bentuk sediaan yang dibuat pada penelitian ini adalah nanoemulsi yang hanya terpenetrasi sampai lapisan stratum korneum. Diharapkan penelitian ini diaplikasikan kedalam bentuk patch, sehingga dapat diketahui berapa konsentrasi yang terpenetrasi ke dalam sirkulasi sistemik dari jumlah total glukosamin HCl dalam sediaan nanoemulsi.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Nanoemulsi dengan menggunakan senyawa peningkat penetrasi etanol lebih stabil secara fisik dibandingkan yang menggunakan asam oleat. Berdasarkan uji penetrasi *in vitro* dengan sel difusi Franz diperoleh hasil jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi setelah 8 jam dari formula A (etanol) lebih besar dari formula B (asam oleat).

5.2. Saran

Perlu ditambahkan dapar untuk meningkatkan kestabilan pH dalam sediaan nanoemulsi. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan kestabilan fisik dan penetrasi obat dalam sediaan nanoemulsi dengan menggunakan senyawa peningkat penetrasi lainnya serta dilakukan uji stabilitas kimia.

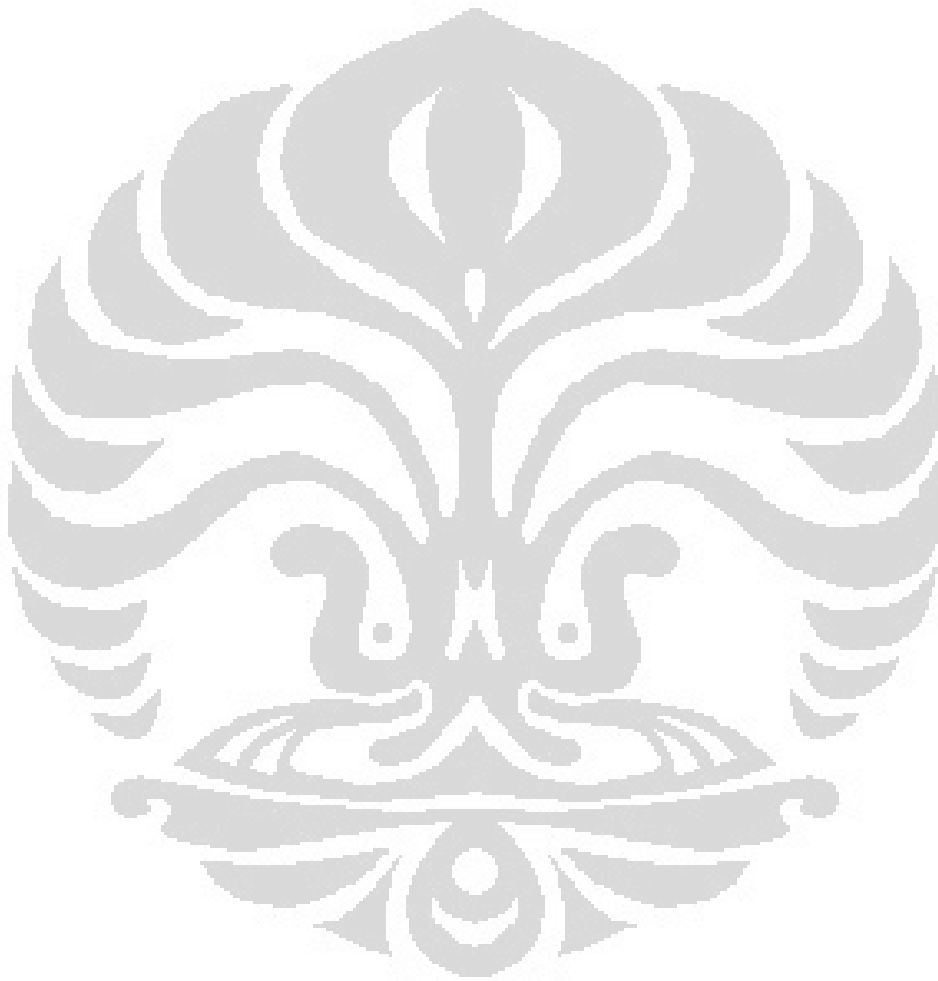
DAFTAR REFERENSI

- Ansel, Howard C., L.V. Allen & N.G. Popovich. (1999). *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Sistem*. Seventh Edition. Lippincott Williams and Wilkins. USA : 371-373.
- Barry, B. W. 1987. Mode of action of penetration enhancers in human skin
 Dalam: Anderson, James M, & Sung Wan Kim (eds). 1987. *Advances in drug delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences* 101-114
- Basker. R. *Et al.* 2010. *Formulation and evaluation of celecoxib loaded nanosized emulsion as transdermal drug delivery vehicle*. International Journal of Pharma Science and Research. Vol 1(2), 112-121
- Beckman. Coulter, 2010. Delsa™ Nano Series Particle characterization. www.beckmancoulter.com/eStore USA.
- Christina. 2010. *Pengaruh Asam Oleat, Etanol, dan Urea terhadap Profil Penetrasi Perkuatan Glukosamin secara In Vitro Menggunakan Sel Difusi Franz*. Skripsi Sarjana Farmasi. FMIPA UI, Depok.
- Dong, Michael W. 2006. *Modern HPLC for practicing scientist*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Farmakope Indonesia* (Ed ke-4). (1995). Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Gandjar, Ibnu Gholib & Abdul Rohman. 2007. *Kimia farmasi analisis*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta: 378-406
- Iswanda. Raditya. 2009. *Penetapan daya penetrasi secara in vitro dan uji stabilitas fisik sediaan krim, salep, dan gel yang mengandung kurkumin dari kunyit (Curcuma longa L)*. Skripsi sarjana farmasi. FMIPA UI, Depok.
- Kanwischer, M., et. Al. (2005). Evaluation of the physicochemical stability and skin permeation of glucosamin sulfate. *Drug Dev. Ind. Pharm*, 1, 91-97.
- Lachman. Leon, Lieberman A. Hebbert, Kanig A. Joseph, 1994. *Teori dan Praktek Farmasi Industri II* edisi ketiga. Terj. Dari *The theory and practise of industrial pharmacy*, oleh Siti Suyatmi. UI Press, Jakarta.

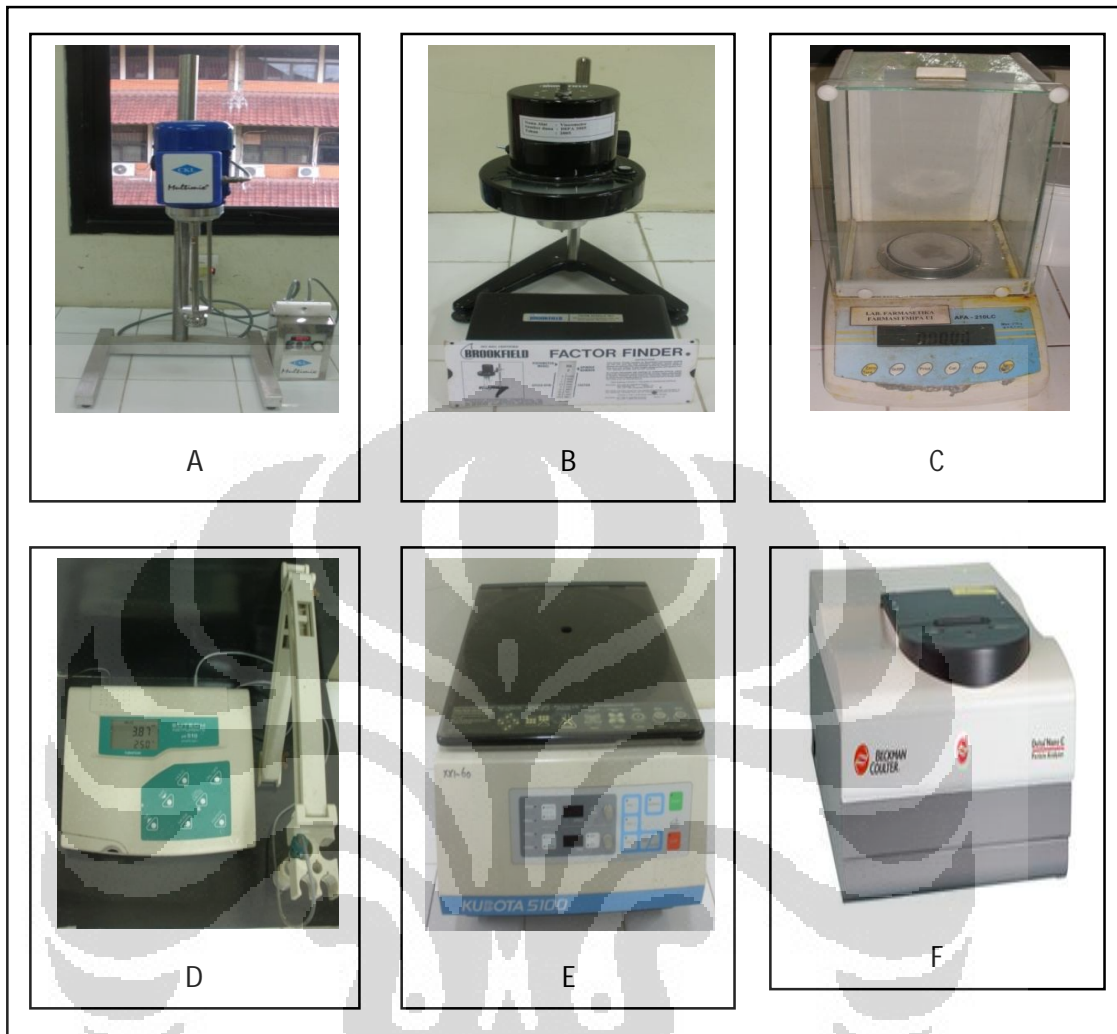
- Langley, Leroy Lester. 1980. *Dynamic anatomy and physiology*. McGraw-Hill, United States of America: 66-72
- Luciano, Dorothy S. 1978. *Human function and structure*. McGraw-Hill, United State of America: 84-87
- Lockwood, Brian. 2007. *Nutraceuticals 2nd ed*. Pharmaceutical Press Cornwall:19-20
- Malloy, Michael Shane., 2003. *Effectiveness and Safety Related to the Use of Glucosamine in Patients with Osteoarthritis*
- Martin, A., J. Swarbrick & A. Cammarata. 1993. *Farmasi Fisik Jilid II Edisi III*. Terjemahan dari *Physical Pharmacy : physical chemical Principles in The Pharmaceutical Sciences* oleh Joshita. UI Press. Jakarta.
- Mega, Roro.A.P.M.,2009. *Efek Penambahan Berbagai Peningkat Penetrasi Terhadap Penetrasi Perkutan Gel Natrium Diklofenak secara In Vitro*.Skripsi Sarjana Farmasi. Fakultas Farmasi UMS, Surakarta.
- Mitsui, T. (ed). 1997. *New Cosmetic Science*.Elsevier, Amsterdam: 19-21
- Nanoemulsi Technology, 2010. 27 agustus 2010
<http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Oil-in-water-nanoemulsion-comprising/WO2010069022.html>
- Oegema, Theodore R., *et al*. 2002. Effect of oral glucosamine on cartilage and meniscus in normal and chymopapain-injected knees of young rabbits. *Arthritis & Rheumatism* 46(9): 2495-2503
- Pathan, Inayat Bashir dan C Mallikarjuna Setty. 2009. *Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, April 2009; 8 (2): 173-179.
- Pathak, Yashwant & Deepak Thassu. 2009. *Drug delivery nanoparticles formulation and characterization*. Drugs and pharmaceutical sciences vol 191. USA.
- PermeGear Franz Cell, 2005. 20 Agustus 2010. <http://www.pearmegear.com/franz.htm>
- Purwadi. 2007. *Pengembangan metode kromatografi cair kinerja tinggi untuk analisis glukosamin dalam plasma darah*. Tesis magister farmasi. Sekolah Farmasi ITB, Bandung.

- Rieger , Martin M. (2000). *Harry's cosmeticology 8th edition*. New York: Chemical Publishing
- Rowe, R.C., Sheskey, P., & Owen, S.C.(Ed). (2006) *Handbook of pharmaceutical excipients* (5th ed). London: Pharmacheutical Press. Hal: 63;158; 257; 312; 390; 412; 479; 521;479; 521;
- Setnikar, I. & LC.Rovatti. 2001. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of glucosamine sulfate. A review. 27 juli 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/11642003>
- Shargel, Leon, *et al.* 2004. Physiologic factors related to drug absorption. In: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics 5th ed.* 2004.
- Sukandar. Elin Yulinah. *Et al.* 2008. *Iso Farmakoterapi*. PT. ISFI Penerbitan. Jakarta : 629, 640
- Tekko, I. A., Bonner, M. C. & Williams, A. C. (2006). An Optimized reversephase high performance liquid chromatography method for evaluating percutaneous absorption of glucosamine hydrochloride. *J. Pharm. Biomed Anal.*, 41, 385-392.
- Thakker, Kailas D. & Wendy H. Chern. 2003. Development and validation of in vitro release tests for semisolid dosage forms case study. *In: Dissolution Technologies. 2003.*
- Tiralocche, Gabrielle, *et al.* 2005. Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 52(4): 1118-1128
- Thong, H.-Y., H. Zhai, & H. I Maibach. 2007. Percutaneous penetration enhancers: An overview. *Skin Pharmacology and Physiology* 20:272-282
- Touitou, Elka. & Brian W. Barry (eds). 2007. *Enhancement in drug delivery*. CRC Press, United State of America
- Transdermal Drug Delivery System Review.* 20 juli 2010. <http://www.pharmainfo.net/reviews/transdermal-drug-delivery-systems-review>.
- Trenggono. Retno Iswari & Latifah. Fatma. 2007. *Buku pegangan ilmu pengetahuan kosmetik*. Edit oleh Joshita Djajadisastra. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta :12-13
- United State Pharmacopoeia 30 – National formulary 25* (2006). USA: The United State Pharmacopeial Convention.

- Walters, Kenneth A. & Brain, Keith R. 2002. The structure and function of skin. In Kenneth A. Walters (Ed). *Dermatological and transdermal formulations*. Marcel Dekker, New York
- William, A.c., & Barry, B.W (2007). Chemical permeaion enhancement. In Elka Touitou & Brian W. Barry (Ed). *Enhancement in drug delivery* (233-248).CRC Press, United State of America







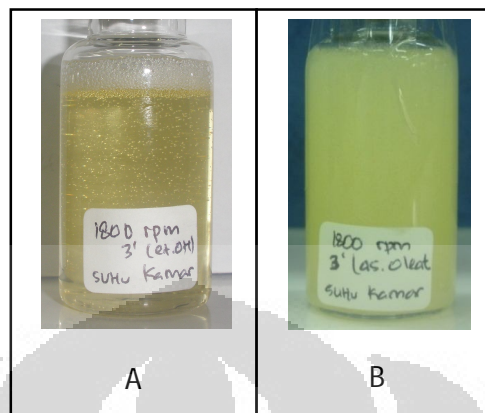
- Keterangan : A = Homogenizer
 B = Viskometer Brookfield
 C = Timbangan Analitik
 D = pH Meter
 E = Sentrifugator
 F = PSA (*Particle Size Analyzer*)

Lanjutan



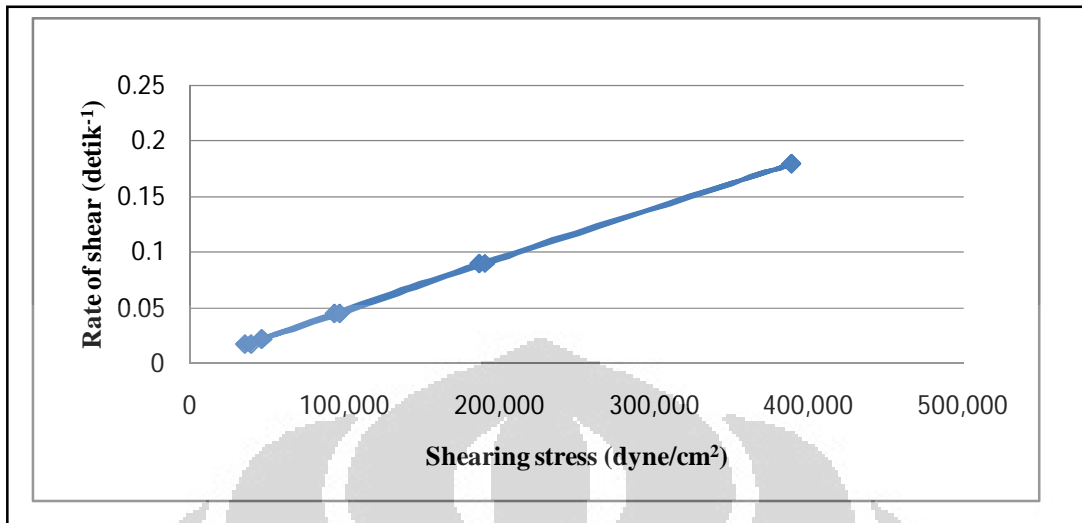
Keterangan : G = Perangkat Sel Difusi Franz
H = Rangkaian Alat KCKT

Gambar 3.1. Alat-alat

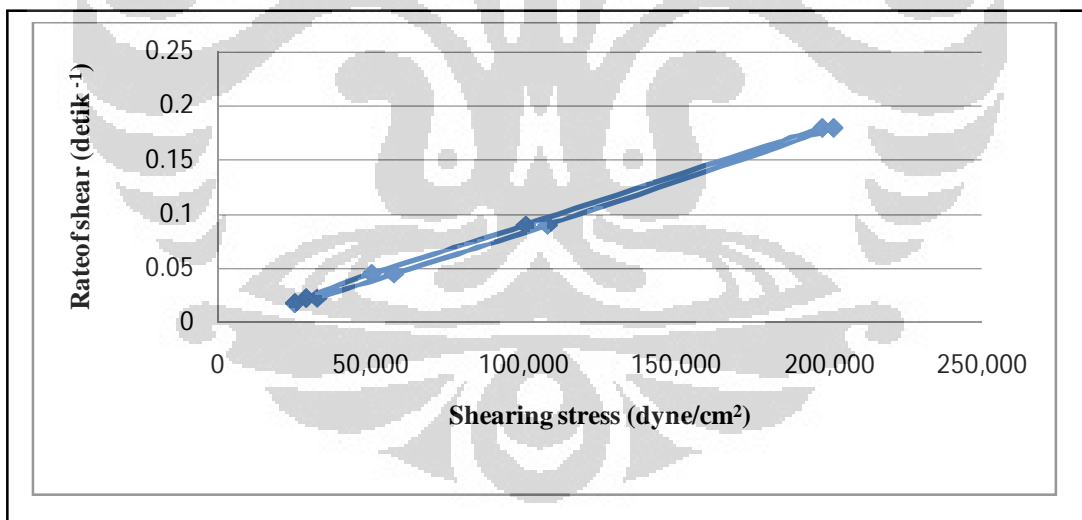


Keterangan : A = Formula A (Etanol)
B = Formula B (Asam Oleat)

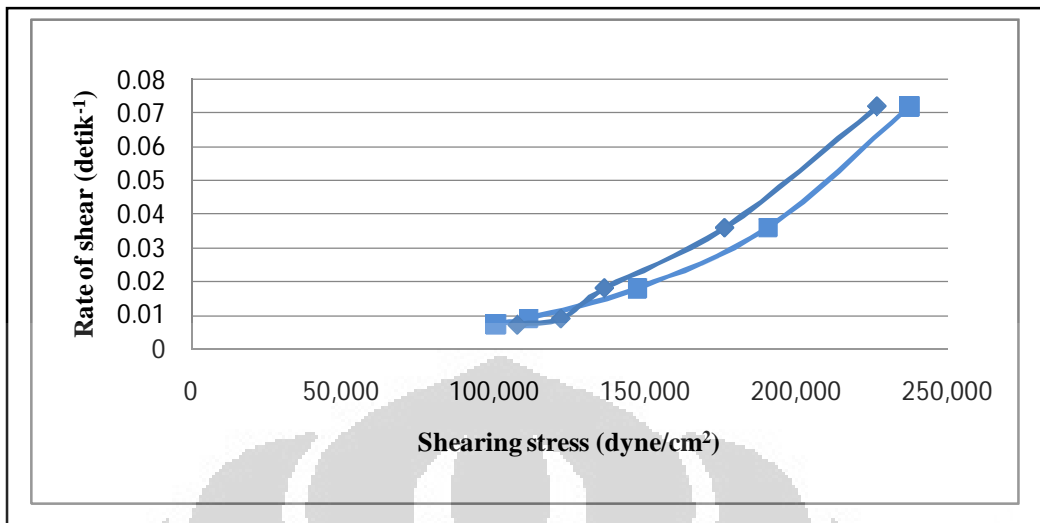
Gambar 4.1 Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin yang mengandung senyawa penetrasi etanol (formula A) dan asam oleat (formula B) pada minggu ke- 0



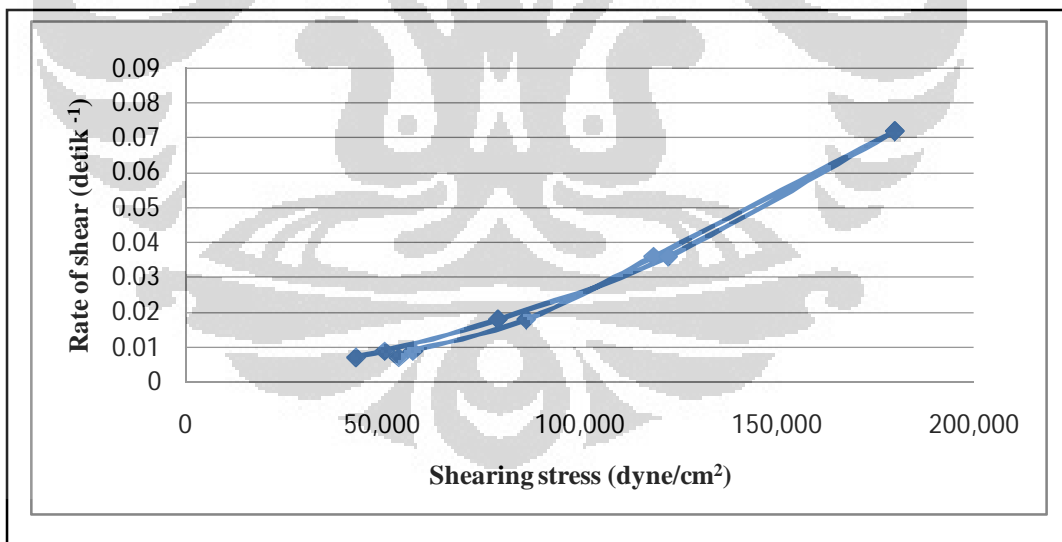
Gambar 4.2. Grafik rheologi nanoemulsi glukosamin formula A pada minggu ke-0



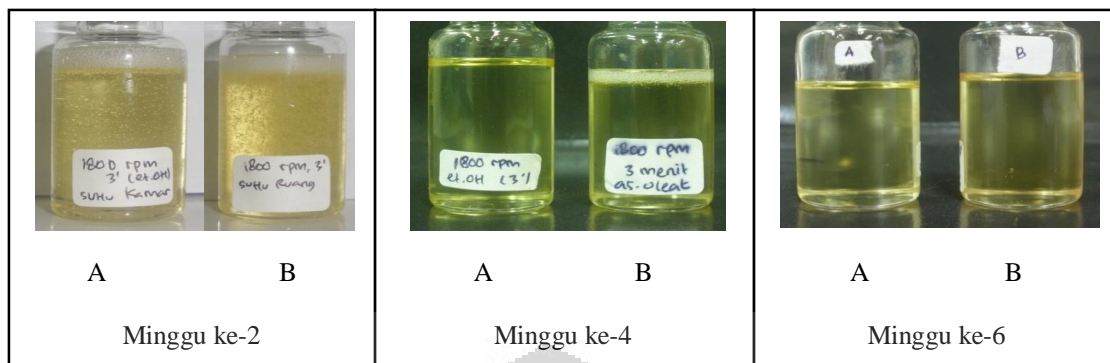
Gambar 4.3. Grafik rheologi nanoemulsi glukosamin formula A pada minggu ke-6



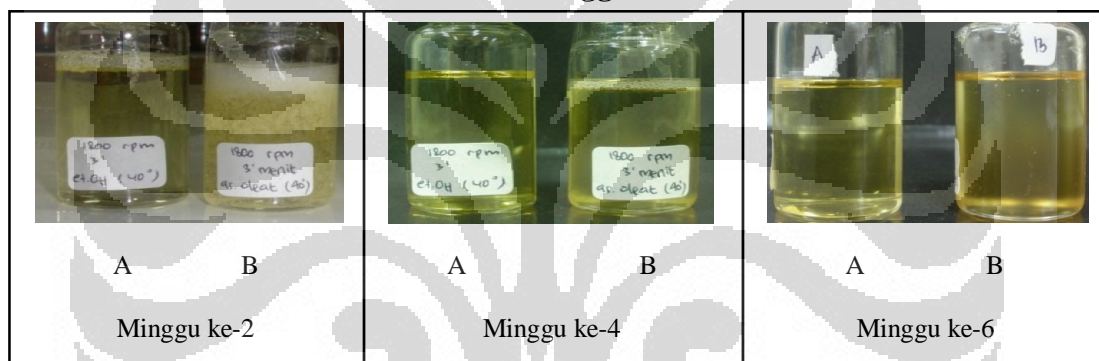
Gambar 4.4. Grafik rheologi nanoemulsi glukosamin formula B pada minggu ke-0



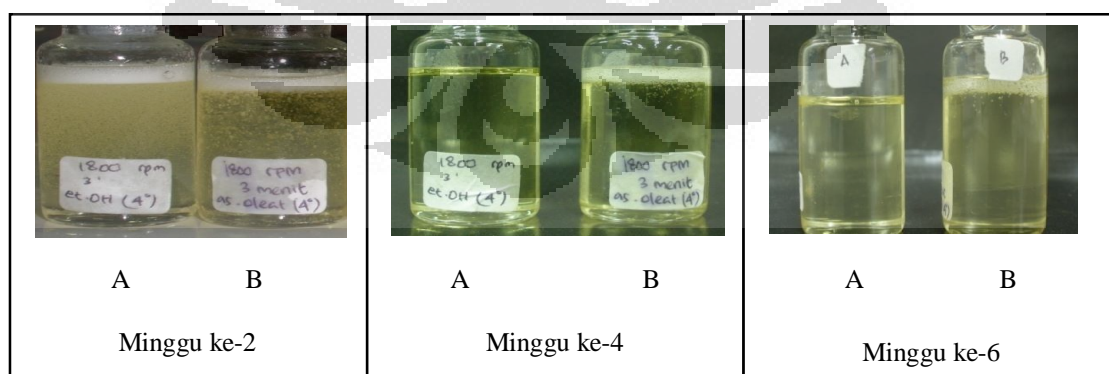
Gambar 4.5. Grafik rheologi nanoemulsi glukosamin formula B pada minggu ke-6



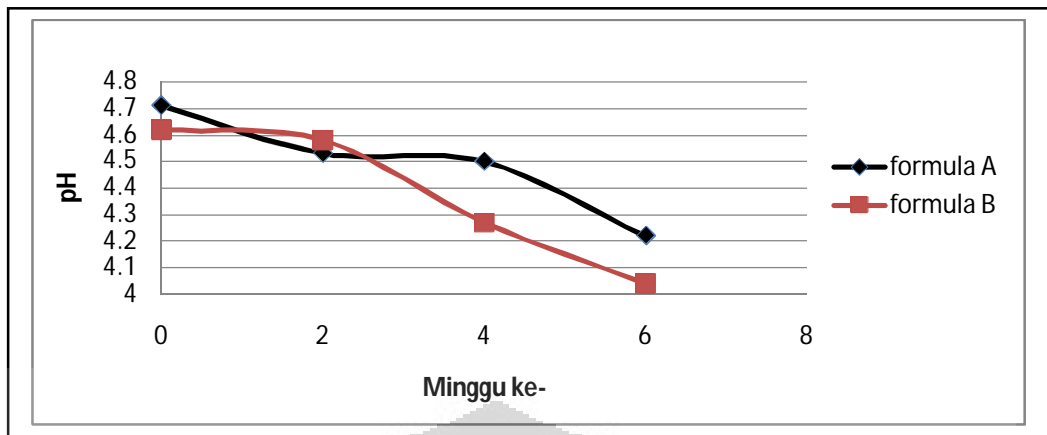
Gambar 4.6. Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin formula A dan formula B pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) selama 6 minggu



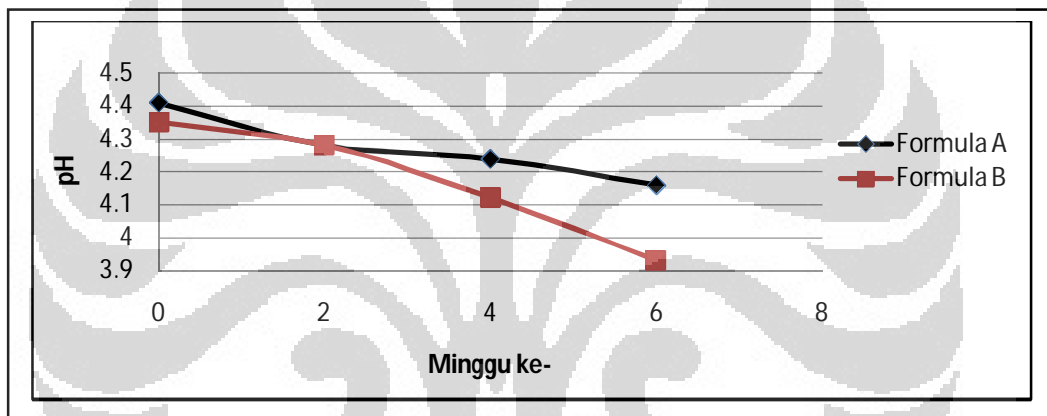
Gambar 4.7. Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin formula A dan formula B pada penyimpanan suhu hangat ($40^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) selama 6 minggu



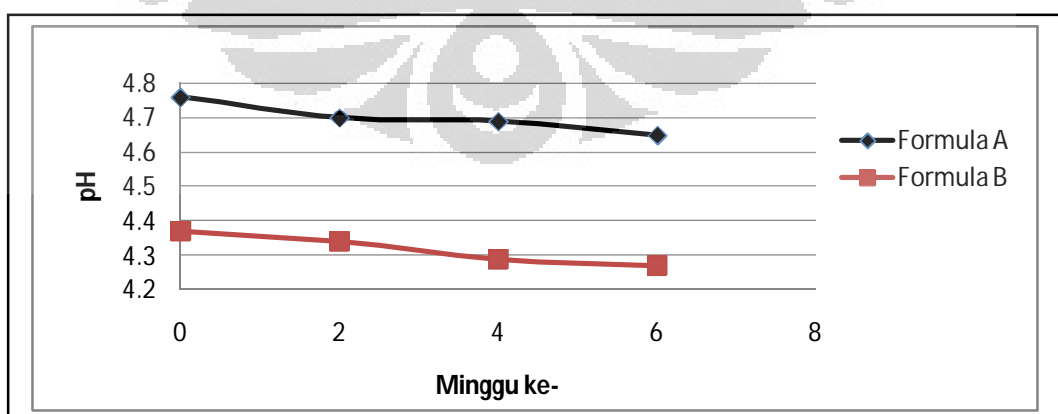
Gambar 4.8. Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin formula A dan formula B pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) selama 6 minggu



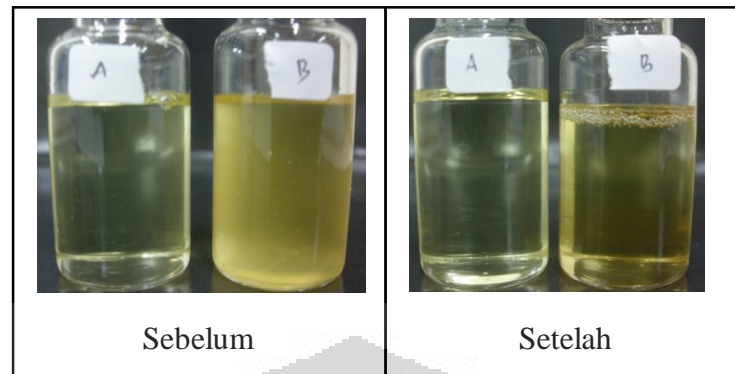
Gambar 4.9. Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH formula A dan B pada penyimpanan suhu kamar ($28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$) selama 6 minggu



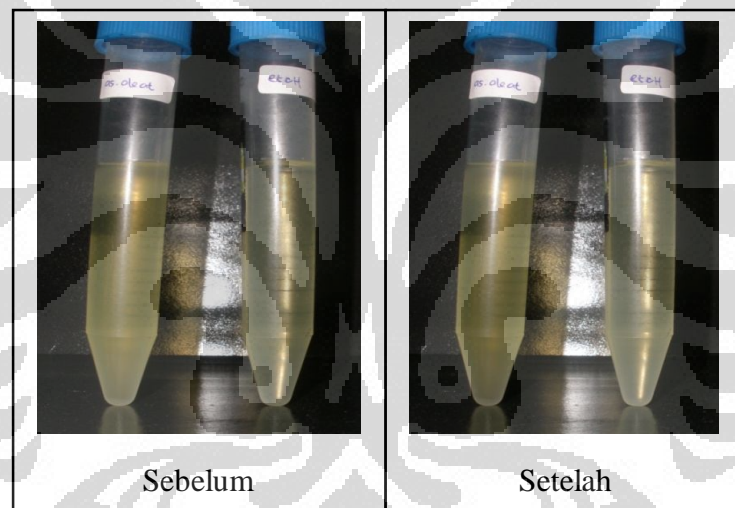
Gambar 4.10. Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH formula A dan B pada penyimpanan suhu tinggi ($40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$) selama 6 minggu



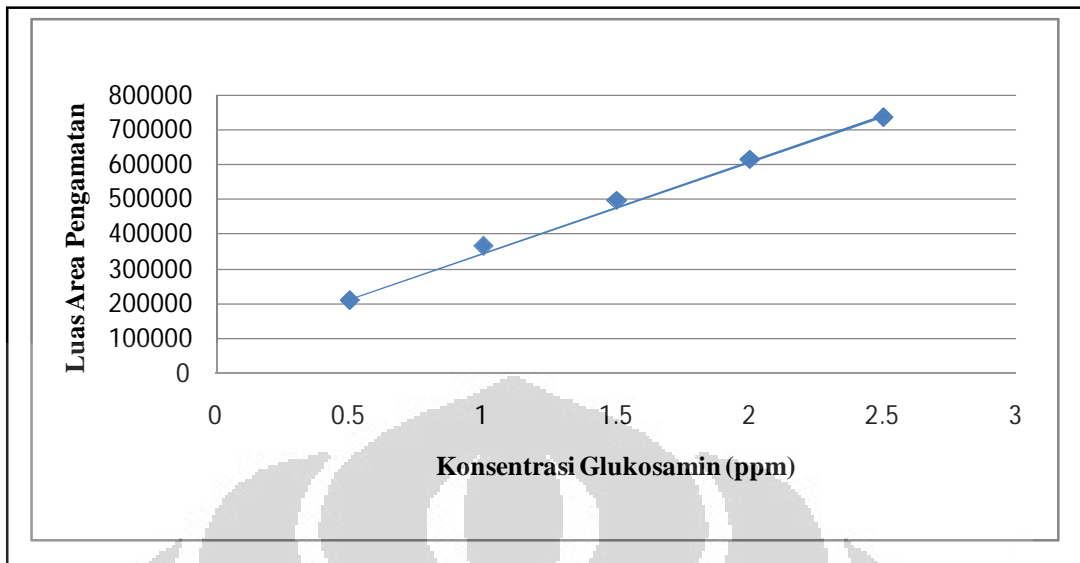
Gambar 4.11. Grafik hubungan antara waktu penyimpanan dengan pH formula A dan B pada penyimpanan suhu rendah ($4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$) selama 6 minggu



Gambar 4.12. Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin sebelum dan setelah *Cycling test*

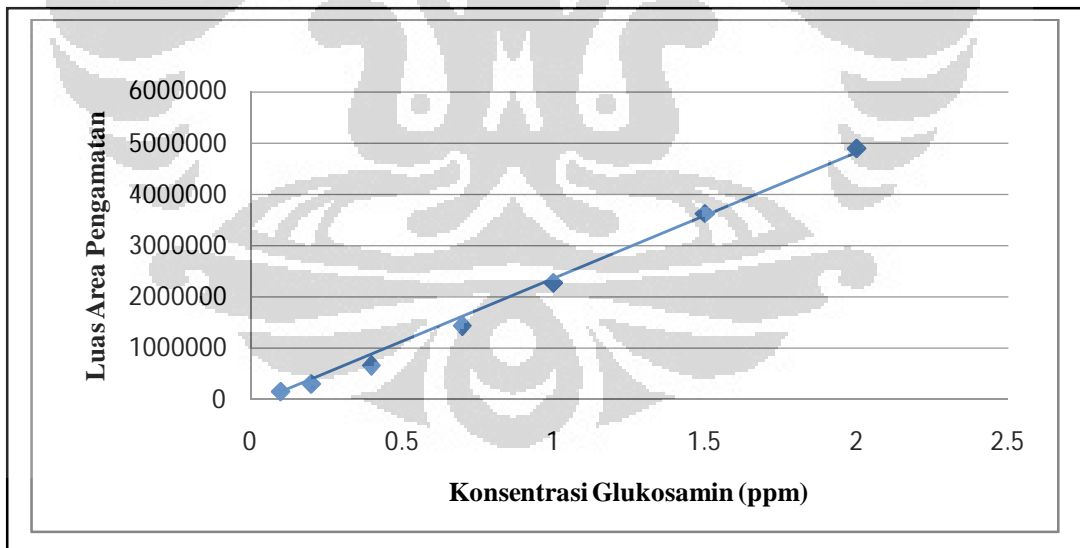


Gambar 4.13 Foto hasil pengamatan organoleptis nanoemulsi glukosamin sebelum dan setelah uji mekanik



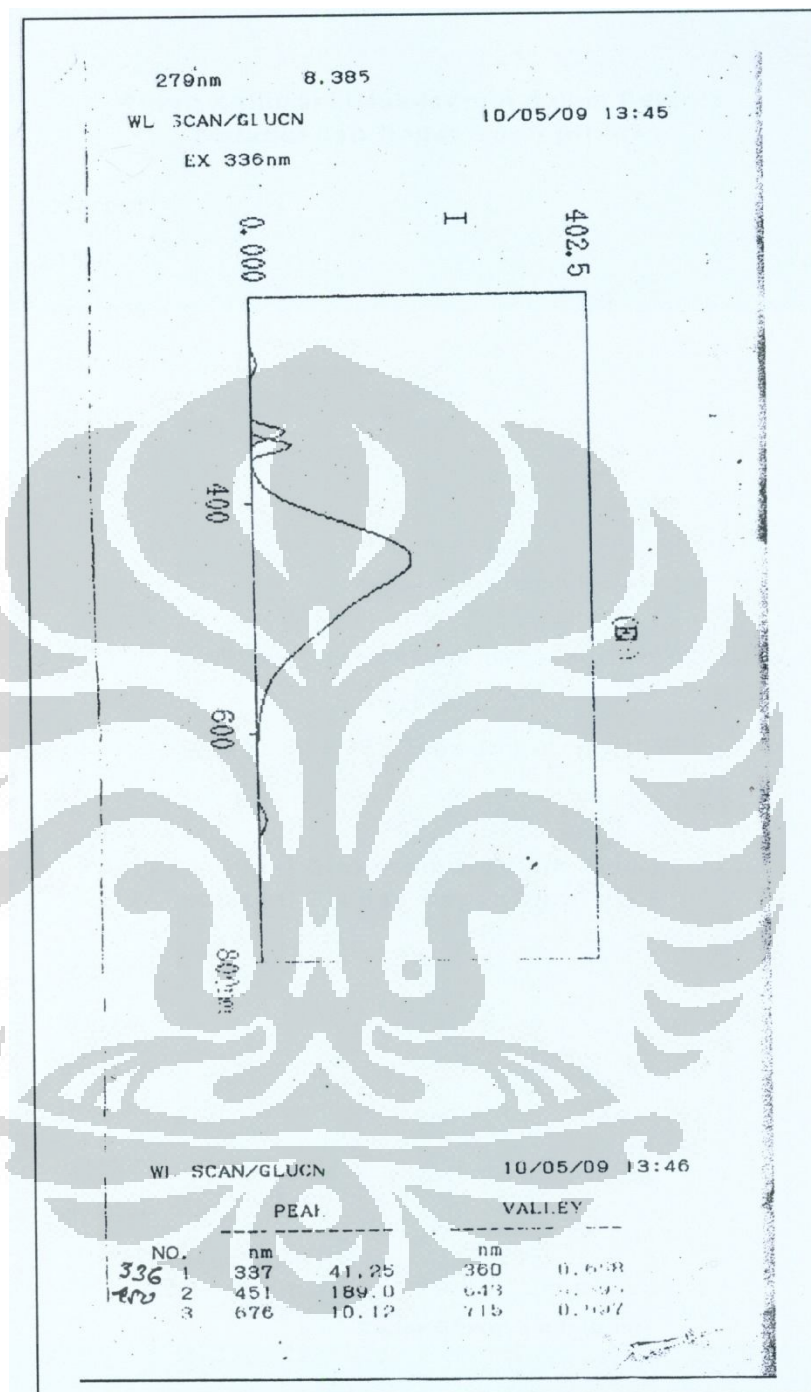
Gambar 4.14. Kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut metanol dan dapar borat pH 9,3

$$y = 94820,10 + 259991,8x \text{ dengan } r = 0,9982$$

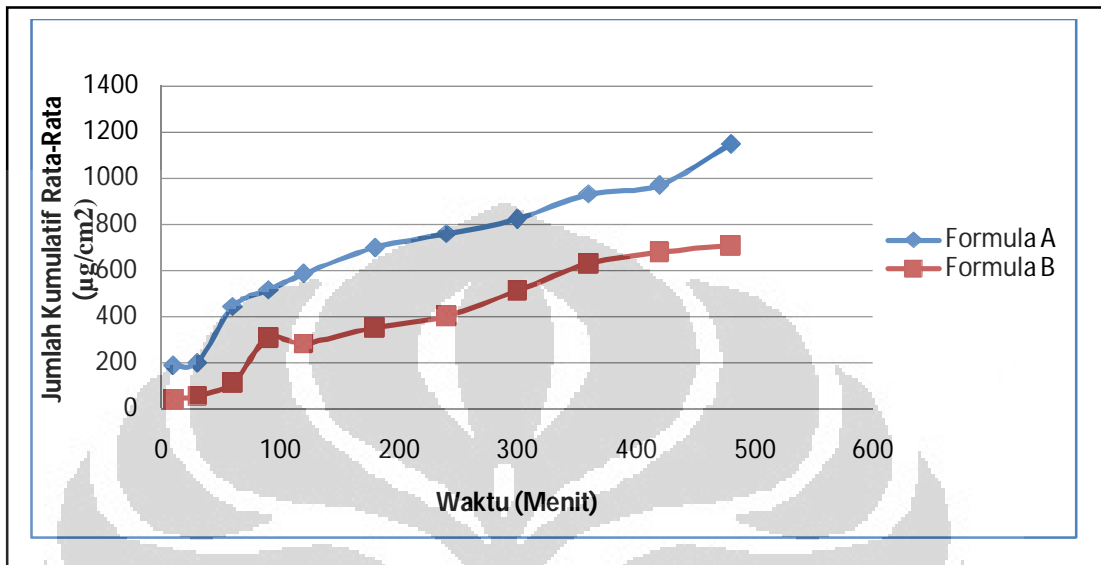


Gambar 4.15. Kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 dan dapar borat pH 9,3

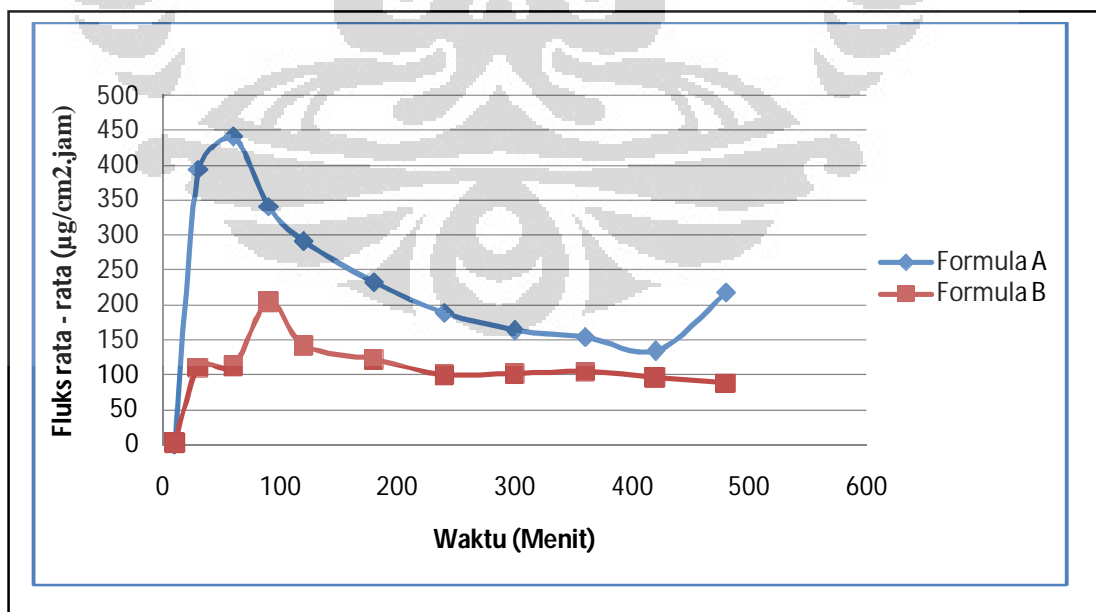
$$y = 231659,91 + 2548648,53x \text{ dengan } r = 0,9987$$



Gambar 4.16. Spektrum serapan glukosamin setelah diderivatisasi dengan pereaksi OPA/2ME



Gambar 4.17. Profil jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari formula A dan formula B



Gambar 4.18. Profil fluks atau laju penetrasi glukosamin dari formula A dan formula



Tabel 4.1. Hasil pengamatan sediaan nanoemulsi pada minggu ke-0

Sediaan	Warna	Kejernihan	Bau	Gelembung udara	pH
Formula A	Kuning muda	Tidak	Tidak	Banyak terperangkap	4,71
Formula B	Kuning muda	Tidak	Khas lemak	Banyak terperangkap	4,62

Tabel 4.2. Hasil pengamatan organoleptis sediaan nanoemulsi pada suhu kamar ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) selama penyimpanan 6 minggu

Sediaan	Minggu ke -	Warna	Kejernihan	Bau	Gelembung Udara
Formula A	0	Kuning muda	Tidak	Tidak	Ada
	2	Kuning	Jernih	Tidak	Ada
	4	Kuning	Jernih	Tidak	Tidak ada
	6	Kuning	Jernih	Tidak	Tidak ada
Formula B	0	Kuning muda	Tidak	Khas lemak	Ada
	2	kuning	Tidak	Khas lemak	Ada
	4	Kuning	Tidak	Khas lemak	Ada
	6	Kuning	Sedikit	Khas lemak	Tidak ada

Tabel 4.3. Hasil pengamatan organoleptis sediaan nanoemulsi pada suhu hangat ($40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) selama penyimpanan 6 minggu

Sediaan	Minggu ke -	Warna	Kejernihan	Bau	Gelembung Udara
Formula A	0	Kuning muda	Tidak	Tidak	Ada
	2	Kuning	Jernih	Tidak	Sedikit
	4	Kuning	Jernih	Tidak	Tidak ada
	6	Kuning	Jernih	Tidak	Tidak ada
Formula B	0	Kuning muda	Tidak	Khas lemak	Ada
	2	Kuning	Tidak	Khas lemak	Ada
	4	Kuning	Sedikit	Khas lemak	Sedikit
	6	Kuning tua	Sedikit	Tidak	Tidak ada

Tabel 4.4. Hasil pengamatan organoleptis sediaan nanoemulsi pada suhu rendah ($4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) selama penyimpanan 6 minggu

Sediaan	Minggu ke -	Warna	Kejernihan	Bau	Gelembung Udara
Formula A	0	Kuning muda	Tidak	Tidak	Ada
	2	Kuning	Jernih	Tidak	Tidak ada
	4	Kuning	Jernih	Tidak	Tidak ada
	6	Kuning	Jernih	Tidak	Tidak ada
Formula B	0	Kuning muda	Tidak	Khas lemak	Ada
	2	Kuning	Tidak	Khas lemak	Ada
	4	Kuning	Jernih	Khas lemak	Ada
	6	Kuning	Jernih	Khas lemak	Ada

Tabel 4.5. Hasil pengukuran pH kedua formula nanoemulsi pada suhu kamar ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$)

Minggu ke-	pH Formula A	pH Formula B
0	4,71	4,62
2	4,53	4,58
4	4,50	4,27
6	4,22	4,04

Tabel 4.6. Hasil pengukuran pH kedua formula nanoemulsi pada suhu hangat ($40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$)

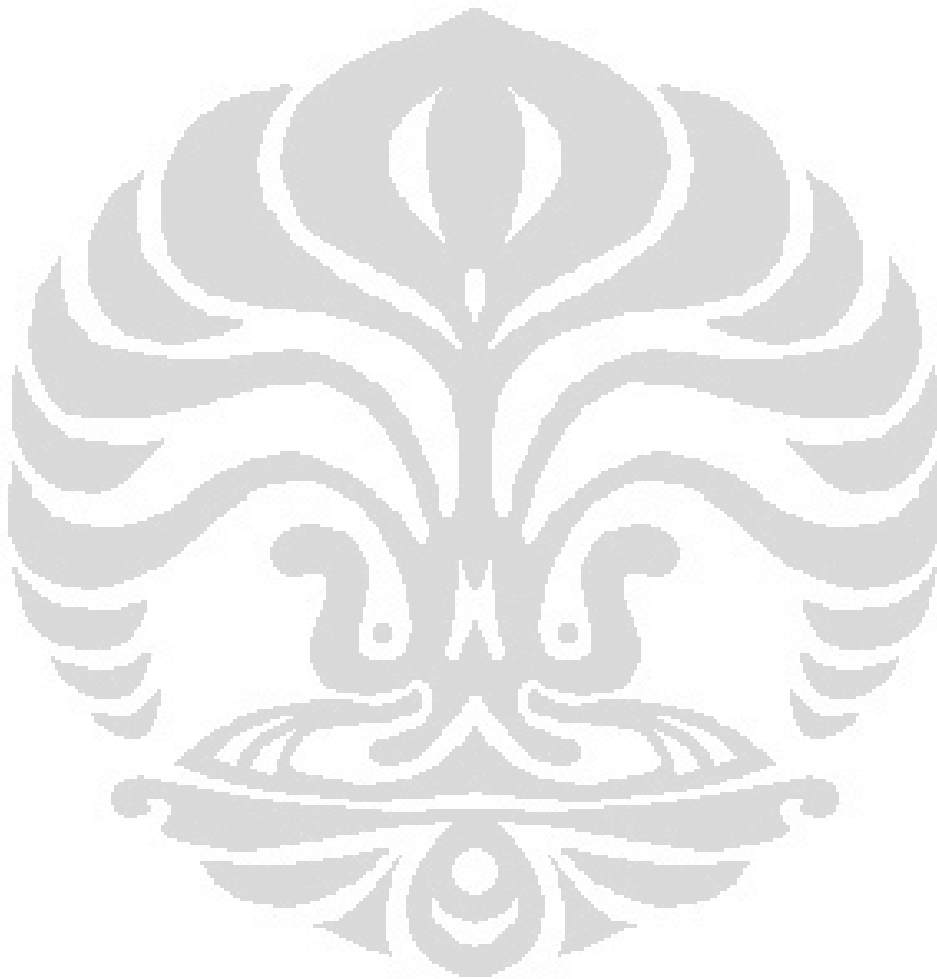
Minggu ke	pH Formula A	pH Formula B
0	4,71	4,62
2	4,28	4,28
4	4,24	4,12
6	4,16	3,93

Tabel 4.7. Hasil pengukuran pH kedua formula nanoemulsi pada suhu rendah ($4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$)

Minggu ke	pH Formula A	pH Formula B
0	4,71	4,62
2	4,70	4,34
4	4,69	4,29
6	4,65	4,27

Tabel 4.8 Hasil pengamatan organoleptis dan pH formula A dan B setelah dilakukan *cycling test*

Sediaan	Warna	Kejernihan	Bau	Gelembung udara	pH
Formula A	Kuning	Jernih	Tidak	Tidak ada	4,34
Formula B	Kuning	Jernih	Khas lemak	Ada	4,56



Tabel 4.9. Hasil pengukuran viskositas formulasi A pada minggu ke-0

Spindel 2	Kecepatan (rpm)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas $n = dr \times f$ (mPa.s)	Shearing stress (F/A) $dr \times 7.187$	Rate of share (dv/dr) $F/A \times 1/n$
	2	3.5	400	1400	25.155	0.017968
	2.5	4	320	1280	28.748	0.022459
	5	7	160	1120	50.309	0.044919
	10	14	80	1120	100.618	0.089837
	20	27.5	40	1100	197.643	0.179675
	20	28	40	1120	201.236	0.179675
	10	15	80	1200	107.805	0.089837
	5	8	160	1280	57.496	0.044919
	2.5	4.5	320	1440	32.342	0.022459
	2	3.5	400	1400	25.155	0.017968

Tabel 4.10. Hasil pengukuran viskositas formulasi A pada minggu ke-6

Spindel 2	Kecepatan (rpm)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas $n = dr \times f$	Shearing stress (F/A) $dr \times 7.187$	Rate of share (dv/dr) $F/A \times 1/n$
	2	5	400	2000	35.935	0.017968
	2.5	6.5	320	2080	46.716	0.022459
	5	13.	160	2080	93.431	0.044918
	10	26	80	2080	186.862	0.089837
	20	54	40	2160	388.098	0.179675
	20	54	40	2160	388.098	0.179675
	10	26.5	80	2120	190.456	0.089837
	5	13.5	160	2160	97.025	0.044919
	2.5	6.5	320	2080	46.716	0.022459
	2	5.5	400	2200	39.529	0.017968

Tabel 4.11. Hasil pengukuran viskositas formulasi B pada minggu ke-0

Spindel 3	Kecepatan (rpm)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas $n = dr \times f$	Shearing stress (F/A) $dr \times 7.187$	Rate of share (dv/dr) $F/A \times 1/n$
	2	15	1000	15000	107.805	0.007187
	2.5	17	800	13600	122,179	0.008984
	5	19	400	7600	136.553	0.017968
	10	24.5	200	4900	176.082	0.035935
	20	31.5	100	3150	226.391	0.071870
	20	33	100	3300	237.171	0.071870
	10	26.5	200	5300	190.455	0.035935
	5	28.5	400	8200	147.335	0.017967
	2.5	15.5	800	12400	111.399	0.008988
	2	14	1000	14000	100.618	0.007187

Tabel 4.12. Hasil pengukuran viskositas formulasi B pada minggu ke-6

Spindel 3	Kecepatan (rpm)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas $n = dr \times f$	Shearing stress (F/A) $dr \times 7.187$	Rate of share (dv/dr) $F/A \times 1/n$
	2	7.5	1000	7500	53.906	0.007187
	2.5	8	800	6400	57.496	0.008984
	5	12	400	4800	86.244	0.017967
	10	16.5	200	3300	118.586	0.035935
	20	25	100	2500	179.675	0.07187
	20	25	100	2500	179.675	0.07187
	10	17	200	3400	122.179	0.035935
	5	11	400	3400	79.057	0.017967
	2.5	7	800	5600	50.309	0.008938
	2	6	1000	6000	43,122	0.007187

Tabel 4.13. Data kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut metanol dan dapar borat pH 9,3

Kadar Glukosamin (ppm)	Luas puncak Pengamatan (A)
0,50	209945
1,00	365920
1,50	497892
2,00	614795
2,50	735487

Tabel 4.14. Data kurva kalibrasi glukosamin dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 dan dapar borat pH 9,3

Kadar Glukosamin (ppm)	Luas Puncak Pengamatan (A)
0,10	168946
0,20	313031
0,40	673282
0,70	1445819
1,00	2279179
1,50	3630807
2,00	4904343

Tabel 4.15. Jumlah kumulatif hasil uji penetrasi glukosamin dalam dapar fosfat pH 7,4 dari formulasi A dan formulasi B

Waktu (menit)	Jumlah kumulatif ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
	Formula A	Formula B
10	186,44 \pm 0,08	40,41 \pm 0,51
30	196,85 \pm 2,77	55,19 \pm 1,39
60	441,6 \pm 6,44	113,64 \pm 1,68
90	512,35 \pm 6,24	307,45 \pm 4,55
120	584,14 \pm 8,13	284,02 \pm 4,06
180	698,8 \pm 10,19	352,21 \pm 5,18
240	756,93 \pm 11,17	402,29 \pm 5,91
300	823,38 \pm 11,89	511,94 \pm 7,51
360	929,60 \pm 13,61	630,45 \pm 9,26
420	969,31 \pm 14,11	679,89 \pm 9,96
480	1147,30 \pm 27,45	708,72 \pm 10,35

Tabel 4.16 Hasil perhitungan fluks atau laju penetrasi glukosamin dari formula A dan formula B

Waktu (menit)	Fluks ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$)	
	Formula A	Formula B
10	$1,1254 \pm 0,56$	$3,05 \pm 3,05$
30	$393,68 \pm 0,67$	$110,33 \pm 1,56$
60	$441,26 \pm 0,31$	$113,64 \pm 1,54$
90	$341,56 \pm 0,10$	$204,97 \pm 2,03$
120	$292,07 \pm 1,07$	$142,01 \pm 1,34$
180	$232,93 \pm 0,37$	$122,40 \pm 1,20$
240	$189,178 \pm 1,4$	$100,57 \pm 3,5$
300	$164,67 \pm 2,05$	$102,38 \pm 2,31$
360	$154,93 \pm 2,08$	$105,07 \pm 1,67$
420	$134,90 \pm 2,66$	$97,13 \pm 3,06$
480	$218,41 \pm 2,68$	$88,59 \pm 2,23$



Lampiran 1. Contoh perhitungan jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi dari sediaan formula A pada menit ke- 10

Persamaan regresi : $y = 231659,91 + 254864,53x$

Faktor pengenceran = volume labu ukur : volume *sampling*

$$= 5,0 : 5,0 = 10$$

Konsentrasi terpenetrasi = $x \times 10$

Jumlah kumulatif glukosamin yang terpenetrasi =

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

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

V = Volume sel difusi Franz (14,0 ml)

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

S = Volume *sampling* (0,5 ml)

A = Luas area membran ($1,88692 \text{ cm}^2$)

Data 1 Luas puncak = 276303

Konsentrasi diperoleh = 3,4401 ppm

Konsentrasi terpenetrasi = 34,401 ppm

$$\text{Jumlah kumulatif} = \frac{\{(34,401 \times 12,7) + (0 \times 0,5)\}}{1,88692} = 234,9 \mu\text{g/cm}^2$$

Data 2 Luas puncak = 342676

Konsentrasi diperoleh = 4,8702 ppm

Konsentrasi terpenetrasi = 48,702 ppm

$$\text{Jumlah kumulatif} = \frac{\{(48,702 \times 12,7) + (0 \times 0,5)\}}{1,88692} = 327,8 \mu\text{g/cm}^2$$

Data 3 Luas puncak = 309061

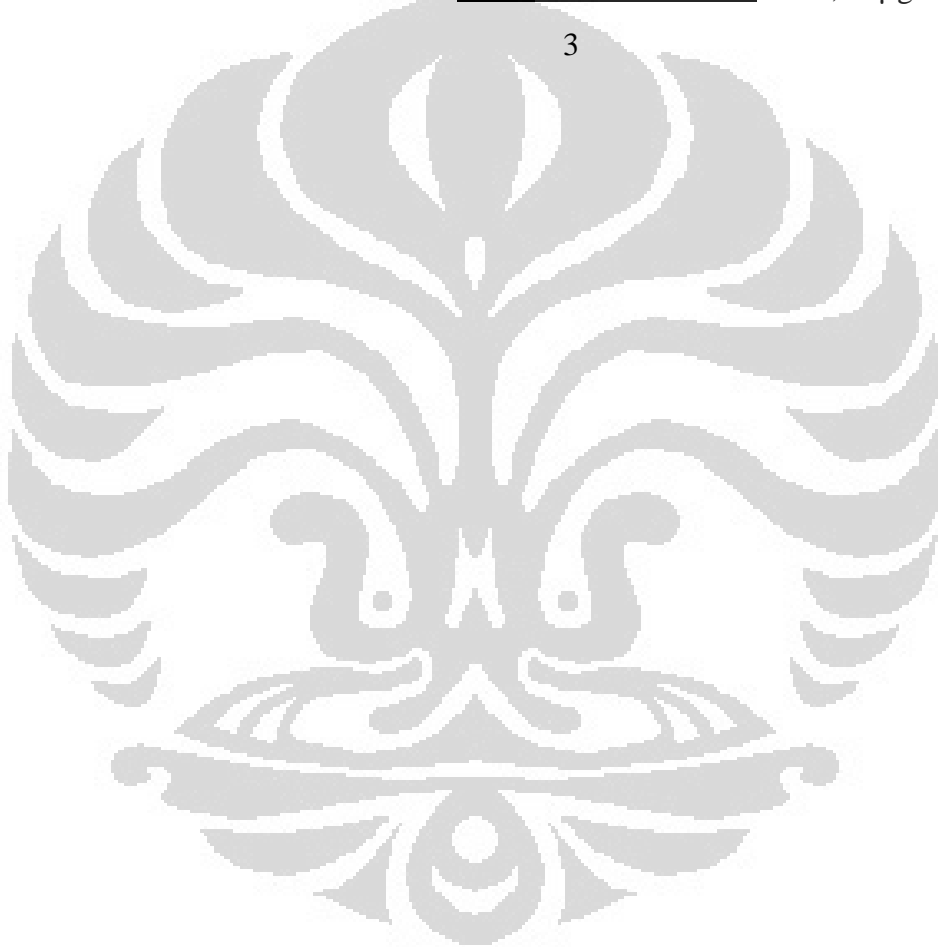
Konsentrasi diperoleh = 0,0000 ppm

Konsentrasi terpenetrasi = 0,0000 ppm

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

$$\text{Jumlah kumulatif rata – rata} = \frac{234,9 + 3278 + 0,0000}{3} = 186,44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

3



Lampiran 2. Contoh perhitungan fluks atau laju penetrasi glukosamin dari sediaan formulasi A pada menit ke- 60

Laju penetrasi di hitung dengan menggunakan rumus :

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

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

Q = Jumlah kumulatif glukosamin yang melalui membran(μg)

t = Waktu (jam)

Data 1 Q = 445,78 $\mu\text{g/cm}^2$

$$J = \frac{445,78 \mu\text{g/cm}^2}{1 \text{ jam}} = 445,78 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

1 jam

Data 2 Q = 524,2 $\mu\text{g/cm}^2$

$$J = \frac{524,2 \mu\text{g/cm}^2}{1 \text{ jam}} = 524,2 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

1 jam

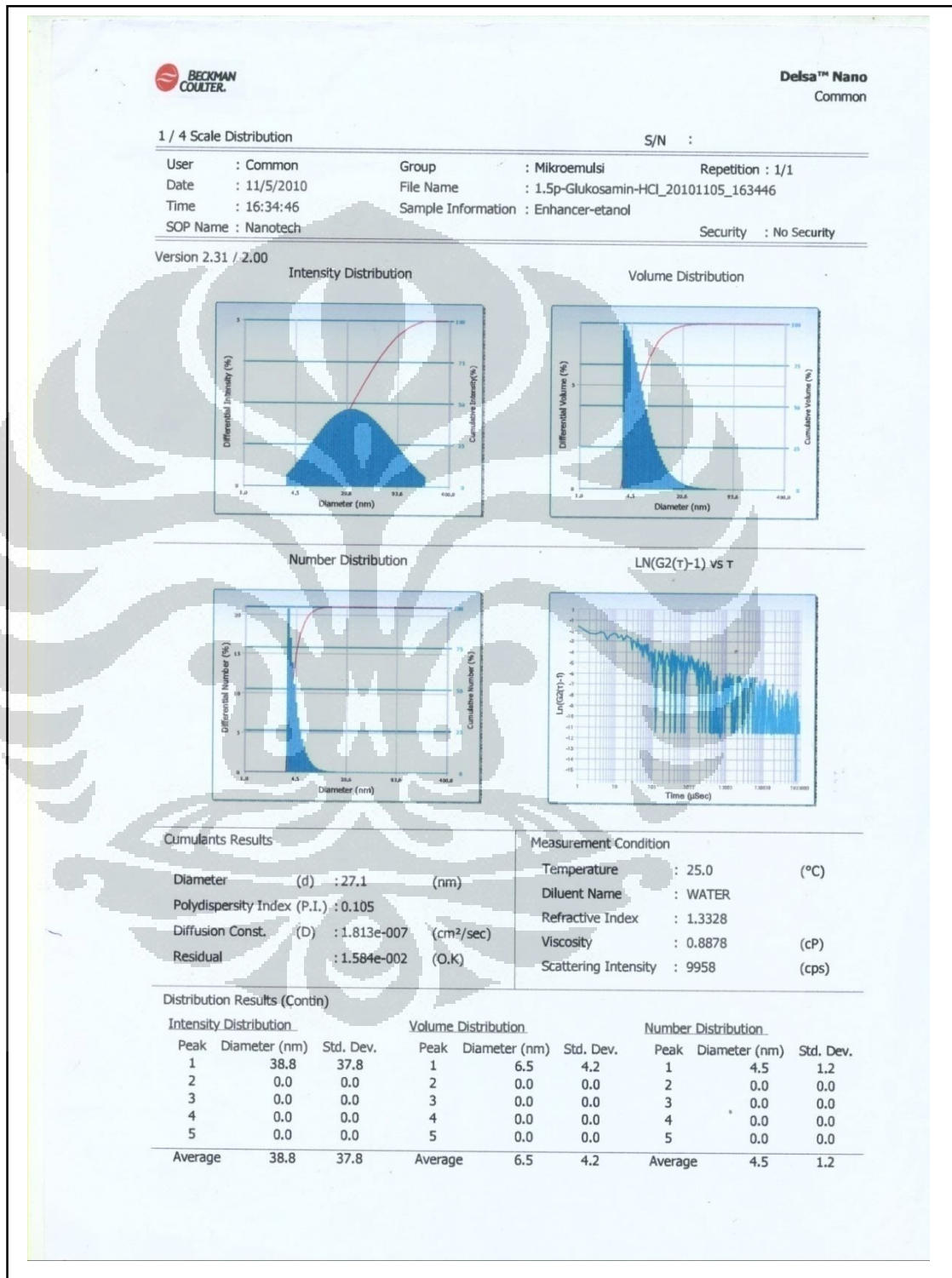
Data 3 Q = 363 $\mu\text{g/cm}^2$

$$J = \frac{363 \mu\text{g/cm}^2}{1 \text{ jam}} = 363 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

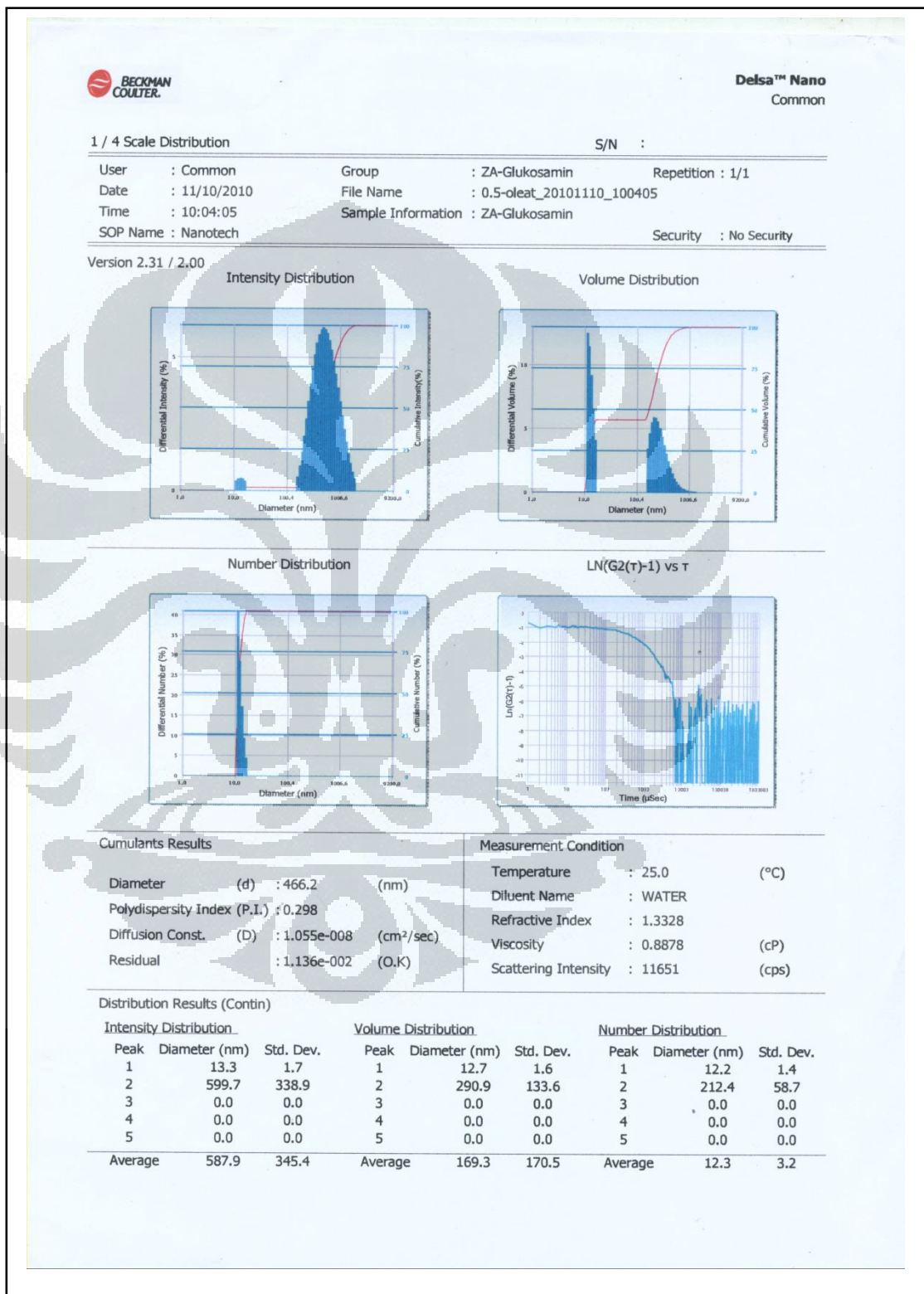
1 jam

$$\text{Fluks rata – rata} = \frac{445,78 + 524,2 + 363}{3} = 441,26 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$$

Lampiran 3. Hasil ukuran partikel nanoemulsi glukosamin yang mengandung senyawa peningkat penetrasi etanol



Lampiran 4. Hasil ukuran partikel nanoemulsi glukosamin yang mengandung senyawa peningkat penetrasi asam oleat



Lampiran 5. Serifikat analisis glukosamin HCl

江苏九寿堂生物制品有限公司
JIANGSU JIUSHOUTANG ORGANISMS-MANUFACTURES CO., LTD
成品检验报告书 1516/B/B/VII/09
Certificate of Analysis

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

Lampiran 6. Sertifikat analisis etanol

MERCK

Certificate of Analysis

<http://certificates.merck.de>

Date of print: 08.12.2009

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

Batch K40282183

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

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0 Page 1 of 2

(Lanjutan)

MERCK

Certificate of Analysis

<http://certificates.merck.de>

Date of print: 08.12.2009


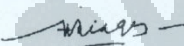
1.00983.2500 Ethanol absolute for analysis EMSURE™
ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Batch K40282183

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

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0 Page 1 of 2

Lampiran 7. Sertifikat analisis tikus *Rattus norvegicus*

<p>ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN LABORATORIUM NON RUMINANSIA DAN SATWA HARAPAN</p>	 <p>FAKULTAS PETERNAKAN IPB</p>
	<p>Lantai 3, Wing 9 No. 301. Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680 Tel/Fax. 0251-624774</p>
<p><u>SURAT KETERANGAN</u></p>	
<p>Yang bertanda tangan di bawah ini:</p>	
Nama	: Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS
Jabatan	: Kepala Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan
Alamat	: Jl. Agatis kampus IPB Darmaga-Bogor Telp. 0251-8624774, Fax. 0251-8624774
<p>Menyatakan bahwa Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang dikembangkan di-Lab. Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Fakultas Peternakan IPB, adalah Tikus yang telah memenuhi standar untuk digunakan sebagai hewan penelitian.</p>	
<p>Demikian surat keterangan ini dibuat dengan sebenar-benarnya.</p>	
<p>Kepala Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan Fakultas Peternakan IPB</p>	
	
<p>Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS NIP. 130 674 521</p>	