



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PREPARASI NANOGEL VERAPAMIL HIDROKLORIDA  
MENGUNAKAN METODE GELASI IONIK ANTARA  
KITOSAN – NATRIUM TRIPOLIFOSFAT SEBAGAI  
SEDIAAN ANTIHIPERTENSI**

**TESIS**

**RADITYA ISWANDANA**

**1006787104**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
JUNI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PREPARASI NANOGEL VERAPAMIL HIDROKLORIDA  
MENGUNAKAN METODE GELASI IONIK ANTARA  
KITOSAN – NATRIUM TRIPOLIFOSFAT SEBAGAI  
SEDIAAN ANTIHIPERTENSI**

**TESIS**

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

**RADITYA ISWANDANA**

**1006787104**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
JUNI 2012**

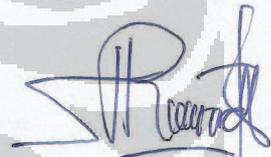
ii

## SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa tesis ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan tindakan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 26 Juni 2012

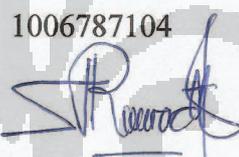


(Raditya Iswandana)

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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



Nama : Raditya Iswandana  
NPM : 1006787104  
Tanda Tangan :   
Tanggal : 26 Juni 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Raditya Iswandana

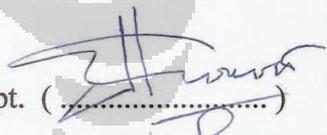
NPM : 1006787104

Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian

Judul : Preparasi Nanogel Verapamil Hidroklorida Menggunakan Metode Gelasi Ionik antara Kitosan – Natrium Tripolifosfat sebagai Sediaan Antihipertensi

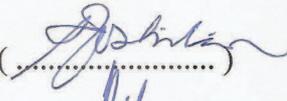
Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Effionora Anwar, MS., Apt. (  )

Pembimbing II : Dr. Mahdi Jufri, M.Si., Apt. (  )

Penguji I : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc., Apt. (  )

Penguji II : Pharm Dr. Joshita D., MS., Ph.D., Apt. (  )

Penguji III : Dr. Arry Yanuar, M.Si., Apt. (  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 26 Juni 2012

Bismillahirrahmanirrahim

(Dengan nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang)

“ Dan seandainya pohon-pohon di bumi menjadi pena dan laut (menjadi tinta), ditambahkan kepadanya tujuh laut (lagi) sesudah (kering)-nya, niscaya tidak akan habis-habisnya (dituliskan) kalimat Allah.

Sesungguhnya Allah Maha Perkasa lagi Maha Bijaksana.”

(QS. Luqman [31]: 27)



*Saat diriku menulis, ketika itu aku telah meyakini bahwa tanganku akan hancur sedangkan yang tersisa hanyalah tulisannya ...*

## KATA PENGANTAR

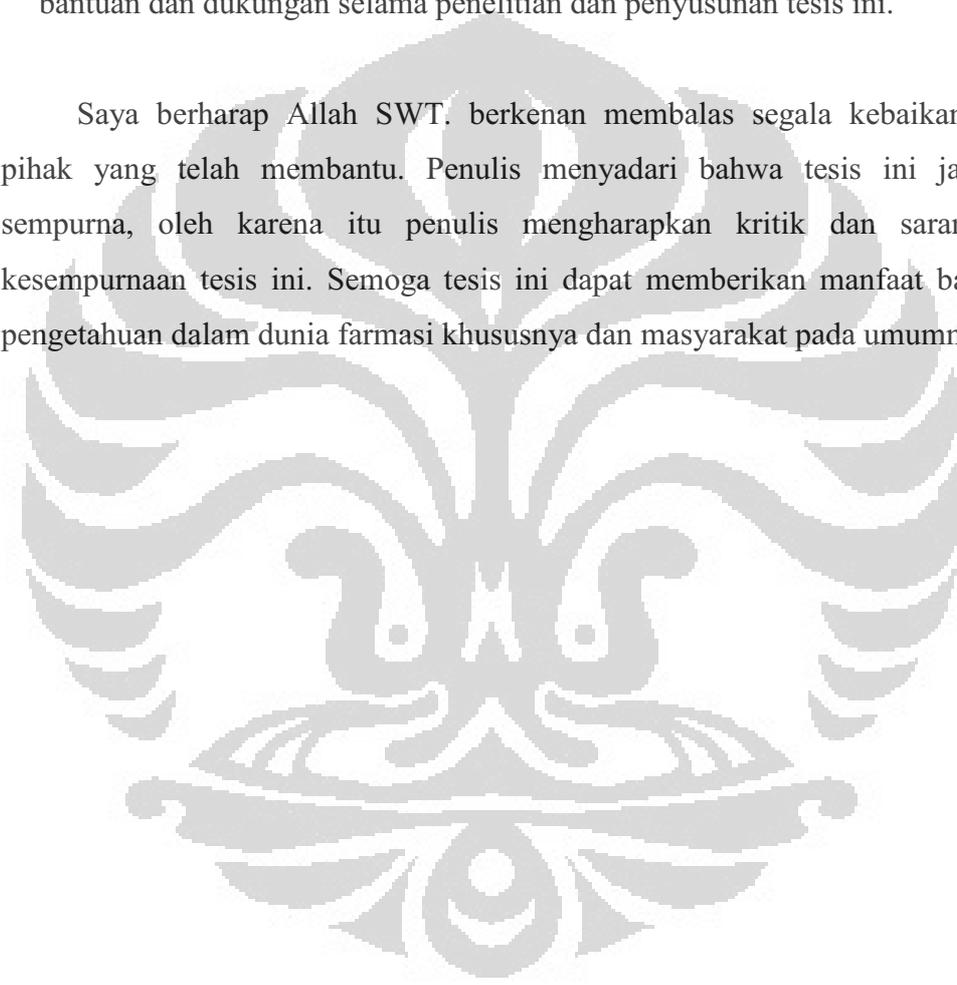
Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis.

Tesis ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak, kiranya sulit bagi penulis untuk menyelesaikan penulisan ini tepat pada waktunya. Pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati penulis menyampaikan terima kasih yang tulus kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Effionora Anwar, MS., Apt. sebagai Pembimbing I dan Bapak Dr. Mahdi Jufri, M.Si., Apt. sebagai Pembimbing II yang selalu sabar membimbing dan memberi saran selama penelitian berlangsung sampai tersusunnya tesis ini.
2. Ibu Prof. Dr. Effionora Anwar, MS., Apt. dan juga Bapak Dr. Iskandarsyah, MS., Apt. selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan perhatian dan bimbingan selama pendidikan Magister di Farmasi UI.
3. Ibu Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc., Apt., Bapak Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed., Apt., dan Ibu Santi Purna Sari, M.Si., Apt. atas saran dan masukan yang diberikan selama penelitian berlangsung.
4. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS. sebagai Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Seluruh Bapak dan Ibu Dosen Farmasi UI atas bimbingannya selama ini.
6. Bapak/Ibu laboran dan karyawan Departemen Farmasi UI atas semua bantuan yang diberikan saat penelitian berlangsung, terutama kepada Mba Devfanny, Pak Imih, dan Pak Surya.
7. Keluargaku tercinta, Papa, Mama, Bu Tuti, dan Kak Ratih, atas semua dukungan, kasih sayang, perhatian, kesabaran, dorongan semangat, dan do'a yang tidak henti-hentinya yang diberikan untuk penulis.

8. Teman-teman Magister Ilmu Kefarmasian terutama kepada Mba Kurnia dan Mba Fiana, serta adik-adik kelasku atas semua pertolongan, ukhuwah, persahabatan, dan kenangan indah bersama kalian selama ini.
9. Teman-teman penelitian di KBI Farmasetika dan Farmakologi, khususnya kepada Edi, Ajeng, Delly, Wenny, Jaka, dan Dita atas bantuan, dukungan dan kerja sama yang diberikan selama masa penelitian.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan bantuan dan dukungan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Saya berharap Allah SWT. berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari bahwa tesis ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk kesempurnaan tesis ini. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan dalam dunia farmasi khususnya dan masyarakat pada umumnya.



Penulis  
2012

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

---

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

Nama : Raditya Iswandana  
NPM : 1006787104  
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Tesis

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 :

Preparasi Nanogel Verapamil Hidroklorida Menggunakan Metode Gelasi Ionik antara Kitosan – Natrium Tripolifosfat sebagai Sediaan Antihipertensi

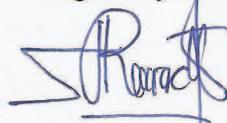
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 26 Juni 2012

Yang Menyatakan



(Raditya Iswandana)

## ABSTRAK

Nama : Raditya Iswandana  
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian  
Judul : Preparasi Nanogel Verapamil Hidroklorida Menggunakan Metode Gelasi Ionik antara Kitosan – Natrium Tripolifosfat sebagai Sediaan Antihipertensi

Pada penelitian ini nanopartikel verapamil hidroklorida dari kitosan dan natrium tripolifosfat melalui proses gelasi ionik dipreparasi, dikarakterisasi, dan dievaluasi secara *in vitro* dan *in vivo* untuk penghantaran transdermal sebagai sediaan antihipertensi. Hasil menunjukkan nanopartikel kitosan-tripolifosfat dapat digunakan. Formula D merupakan formula terpilih yang menghasilkan nanopartikel berukuran 62,8 nm, persen efisiensi penjerapan 59,15 %, potensial zeta +25,46 mV, sferis, dan dapat dikonfirmasi dengan FT-IR. Formula ini selanjutnya digunakan pada pembuatan sediaan. Uji penetrasi secara *in vitro* yang menggunakan sel difusi Franz menunjukkan sediaan gel nanopartikel dengan propilen glikol sebagai peningkat penetrasi memiliki daya penetrasi terbesar dibandingkan dengan gel nanopartikel tanpa peningkat penetrasi dan pembanding dengan fluks secara berturut-turut adalah  $148,33 \pm 1,17 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ ;  $121,88 \pm 0,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ ; dan  $60,93 \pm 0,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ . Uji tekanan darah secara *in vivo* menggunakan tikus jantan *Sprague Dawley* menunjukkan sediaan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi memiliki efektivitas penurunan tekanan darah sistolik tertinggi daripada gel nanopartikel secara berturut-turut adalah 14,89% dan 5,87%; efektivitas dalam menurunkan tekanan darah diastolik menunjukkan hasil efektivitas tertinggi pada gel nanopartikel saja sebesar 4,18%; dan efektivitas penurunan tekanan darah arteri rata-rata didapatkan hasil yang sama pada gel nanopartikel dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi yaitu sebesar 20,61%, semuanya dibandingkan dengan gel pembanding.

Kata Kunci : nanopartikel, gel, gelasi ionik, kitosan, natrium tripolifosfat, penetrasi, tekanan darah, transdermal, verapamil hidroklorida

xix + 120 hal. ; 25 gambar; 11 tabel; 7 rumus; 45 lampiran

Daftar Acuan : 56 (1958 – 2010)

## ABSTRACT

Name : Raditya Iswandana  
Study Program : Master of Pharmaceutical Science  
Title : Preparation of Verapamil Hydrochloride Nanogel Using Ionic Gelation Method between Chitosan – Sodium Tripolyphosphate as Antihypertension Dosage Form

In this research, verapamil hydrochloride nanoparticle from chitosan and sodium tripolyphosphate using ionic gelation method had been prepared, characterized, and evaluated in vitro and in vivo for antihypertensive transdermal delivery. The results showed that chitosan-tripolyphosphate nanoparticle could be used. The chosen formula was formula D which has 62.8 nm nanoparticles size, 59.15% entrapment efficiency, +25.46 mV zeta potential, spherical, and confirmed with FT-IR. This formula was made into gel dosage form. In vitro penetration test using Franz diffusion cell showed that nanogel with propylene glycol as an enhancer had the greatest penetration result compared to nanogel without enhancer and standard gel with flux were  $148.33 \pm 1.17 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{hours}$ ;  $121.88 \pm 0.37 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{hours}$ ; and  $60.93 \pm 0.47 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{hours}$ , respectively. In vivo blood pressure test using *Sprague Dawley* male rats showed nanogel with enhancer has the highest systolic blood pressure reduction than nanogel were 14.89% and 5.87%, respectively; in lowering diastolic blood pressure showed the highest effectiveness of nanogel amounting to 4.18%; and the same effectiveness of mean arterial blood pressure obtained on nanogel and nanogel with enhancer which equal to 20.61%, all compared to the standard gel.

Keywords : blood pressure, chitosan, gel, ionic gelation, nanoparticle, penetration, sodium tripolyphosphate, transdermal, verapamil hydrochloride

xix + 120 pages ; 25 pictures; 11 tables; 7 formulas, 45 appendixes

Bibliography : 56 (1958 – 2010)

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>viii</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR RUMUS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xviii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Kulit .....	4
2.1.1 Definisi .....	4
2.1.2 Struktur Kulit .....	4
2.1.3 Fungsi Kulit .....	6
2.2 Penetrasi Obat Melalui Kulit .....	8
2.3 Nanopartikel .....	11
2.3.1 Definisi .....	11
2.3.2 Nanopartikel Dalam Sediaan Transdermal .....	11
2.3.3 Nanopartikel Sambung Silang .....	12
2.3.4 Pembuatan Nanopartikel Sambung Silang Multi-ion Dengan Metode Gelasi Ionik .....	13
2.4 Hipertensi .....	14
2.4.1 Definisi .....	14
2.4.2 Etiologi .....	14
2.4.3 Patofisiologi Hipertensi .....	15
2.5 Uji Penetrasi Secara <i>In Vitro</i> Menggunakan Sel Difusi Franz .....	16
2.5 Verapamil Hidroklorida .....	17
2.6 Kitosan .....	18
2.7 Tripolifosfat .....	19
2.8 Propilenglikol .....	20

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>21</b>
3.1 Bahan .....	21
3.2 Alat .....	21
3.3 Cara Kerja .....	22
3.3.1 Nanopartikel Verapamil Hidroklorida .....	22
3.3.2 Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida ..	26
3.3.3 Uji Daya Penetrasi Perkutan Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida Dengan Pembandingnya Secara <i>In Vitro</i> .....	28
3.3.4 Uji Efektivitas Daya Anti-hipertensi Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida dan Pembandingnya Secara <i>In Vivo</i> .....	32
3.3.5 Analisis Data .....	35
3.3.6 Uji Histopatologis .....	35
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>36</b>
4.1 Optimasi Pembuatan Nanopartikel (Metode Gelasi Ionik) ..	36
4.1.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Verapamil Hidroklorida Dalam Pelarut Aqua Demineralisata Dengan Metode Spektrofotometri .....	38
4.1.2 Pengukuran Persen Efisiensi Penjerapan Verapamil Hidroklorida Dalam Suspensi Nanopartikel Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	38
4.1.3 Penetapan Distribusi Ukuran Partikel .....	39
4.1.4 Potensial Zeta .....	42
4.1.5 Mikroskop Transmisi Elektron ( <i>Transmission Electron Microscope</i> ) .....	43
4.1.6 Pengeringan Nanopartikel yang Dihasilkan .....	43
4.1.7 Morfologi Permukaan Serbuk Nanopartikel Dengan SEM .....	43
4.1.8 Analisis FT-IR ( <i>Fourier Transform Infra Red</i> ) .....	45
4.1.9 Penetapan Nanopartikel Verapamil Hidroklorida Terpilih .....	46
4.2 Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida .....	46
4.2.1 Pembuatan Eksiipien Kitosan - Natrium Tripolifosfat (Sebagai Basis Gel) .....	46
4.2.2 Pembuatan Sediaan Gel .....	48
4.2.3 Pengamatan Organoleptis .....	50
4.2.4 Pengukuran Derajat Keasaman (pH) .....	51
4.2.5 Pengukuran Viskositas .....	51
4.2.6 Distribusi Ukuran Partikel .....	51
4.3 Uji Daya Penetrasi Perkutan Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida dan Pembandingnya Secara <i>In Vitro</i> .....	52
4.3.1 Uji Perolehan Kembali (UPK) Kadar Verapamil Hidroklorida Dalam Sediaan .....	52
4.3.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Verapamil Hidroklorida Dalam Pelarut Dapar Fosfat pH 7,4 Dengan Metode	

Spektrofotometri .....	52
4.3.3 Uji Penetrasi Verapamil Hidroklorida .....	53
4.4 Uji Efektivitas Daya Anti-hipertensi Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida dan Perbandingannya Secara <i>In Vivo</i> .....	56
4.4.1 Uji Pendahuluan .....	56
4.4.2 Uji Efektivitas Daya Anti-Hipertensi Sediaan Gel Nanopartikel .....	63
4.4.3 Perhitungan Persen Efektivitas Penurunan Tekanan Darah .....	70
4.5 Analisis Data .....	70
4.6 Uji Histopatologis .....	71
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>73</b>
5.1 Kesimpulan .....	73
5.2 Saran .....	73
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>75</b>



## DAFTAR GAMBAR

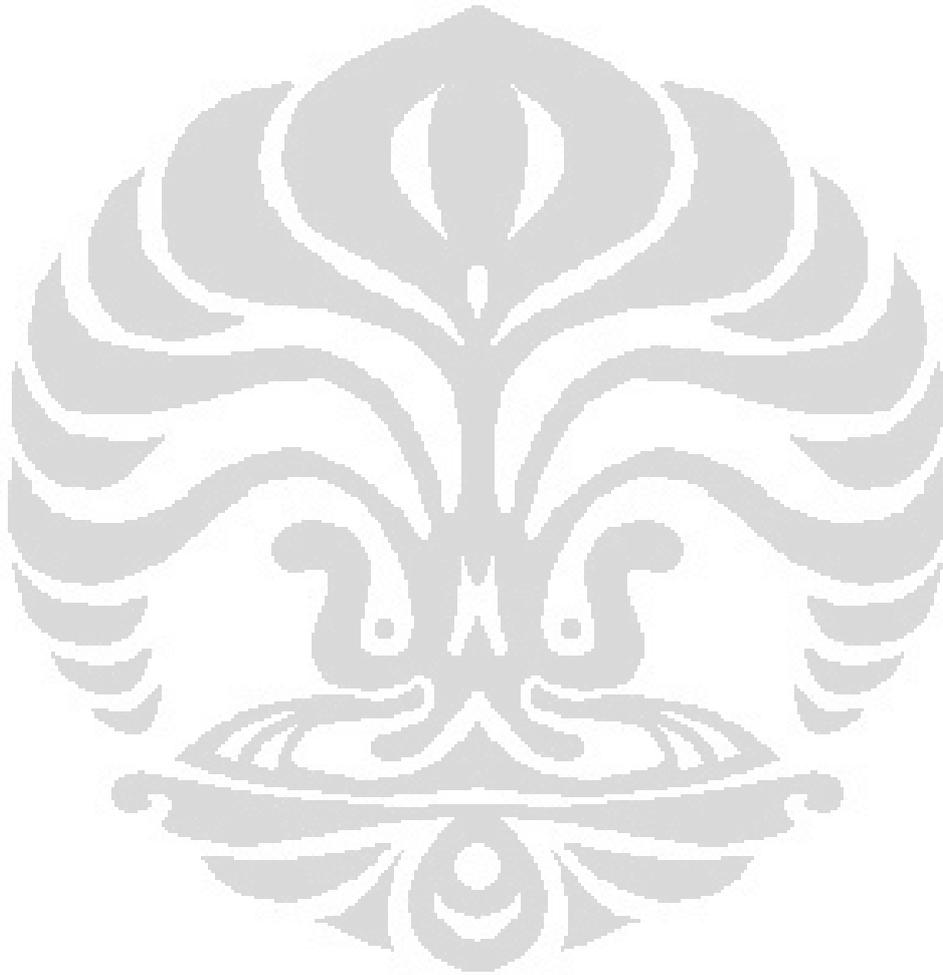
Gambar 2.1.	Struktur kulit dan rute penetrasi transdermal obat .....	4
Gambar 2.2.	Rute penetrasi obat .....	9
Gambar 2.3.	Interaksi kitosan dengan tripolifosfat melalui mekanisme sambung silang ionik .....	13
Gambar 2.4.	Sel difusi Franz .....	16
Gambar 2.5.	Struktur verapamil hidroklorida .....	17
Gambar 2.6.	Struktur kitosan yang tersusun dari kopolimer glukosamin (R=H) dan N-asetilglukosamin (R=COCH <sub>3</sub> ) .....	18
Gambar 2.7.	Struktur natrium tripolifosfat .....	19
Gambar 4.1.	Larutan suspensi nanopartikel .....	37
Gambar 4.2.	Diagram distribusi ukuran partikel antar formula .....	40
Gambar 4.3.	Hasil mikroskop transmisi elektron .....	44
Gambar 4.4.	Hasil pengeringan nanopartikel dengan menggunakan <i>freeze dryer</i> .....	44
Gambar 4.5.	Hasil SEM serbuk nanopartikel kering .....	45
Gambar 4.6.	Spektrum infra merah.....	47
Gambar 4.7.	Penampilan serbuk dan larutan kitosan – kitosan tripolifosfat	49
Gambar 4.8.	Pengamatan organoleptis .....	50
Gambar 4.9.	Jumlah kumulatif verapamil hidroklorida yang terpenetrasi per satuan luas membran .....	57
Gambar 4.10.	Fluks verapamil hidroklorida .....	58
Gambar 4.11.	Fluks sediaan verapamil hidroklorida .....	59
Gambar 4.12.	Jumlah kumulatif verapamil hidroklorida terpenetrasi .....	59
Gambar 4.13.	Fluks verapamil hidroklorida tiap waktu pengambilan .....	60
Gambar 4.14.	Rata-rata berat badan tikus pada setiap kelompok perlakuan .	67
Gambar 4.15.	Rata-rata tekanan darah sistolik tikus pada setiap kelompok perlakuan sebelum dan sesudah pemberian sediaan obat .....	68
Gambar 4.16.	Rata-rata tekanan darah diastolik tikus pada setiap kelompok perlakuan sebelum dan sesudah pemberian sediaan obat .....	69
Gambar 4.17.	Rata-rata tekanan darah arteri (TDAR) tikus pada setiap kelompok perlakuan sebelum dan sesudah pemberian sediaan obat .....	69
Gambar 4.18.	Sayatan melintang kulit tikus .....	71

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Formula nanopartikel sambung silang multi-ion .....	23
Tabel 3.2.	Formula sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida (500 gram) .....	27
Tabel 3.3.	Kelompok perlakuan hewan uji .....	34
Tabel 4.1.	Formula nanopartikel sambung silang multi-ion beserta metode yang digunakan .....	37
Tabel 4.2.	Formula sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida (500 gram) .....	39
Tabel 4.3.	Data distribusi ukuran dan indeks polidispersitas nanopartikel berbagai formula .....	40
Tabel 4.4.	Perbandingan karakteristik antar formula nanopartikel .....	46
Tabel 4.5.	Formula sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida (500 gram) .....	50
Tabel 4.6.	Perbandingan berat badan antar kelompok perlakuan .....	62
Tabel 4.7.	Perbandingan tekanan darah rata-rata antar kelompok perlakuan .....	63
Tabel 4.8.	Kelompok perlakuan hewan uji .....	65

## DAFTAR RUMUS

Rumus 3.1.	Persen efisiensi penyerapan .....	24
Rumus 3.2.	Jumlah kumulatif verapamil hidroklorida yang terpenetrasi per luas area difusi .....	31
Rumus 3.3.	Perhitungan fluks .....	31
Rumus 3.4.	Tekanan darah arteri rata-rata (TDAR) .....	33
Rumus 3.5.	Persen penurunan tekanan darah .....	35
Rumus 3.6.	Persen efektivitas penurunan tekanan darah .....	35
Rumus 4.1.	Federer .....	64



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Sel difusi Franz .....	82
Lampiran 2	Spektrum verapamil hidroklorida standar dalam aqua demineralisata pada $\lambda$ 279 nm .....	82
Lampiran 3	Kurva kalibrasi standar verapamil hidroklorida dalam aqua demineralisata pada $\lambda$ 279 nm .....	83
Lampiran 4	Kurva kalibrasi standar verapamil hidroklorida dalam dapar fosfat pH 7,4 pada $\lambda$ 279 nm .....	83
Lampiran 5	Data distribusi ukuran partikel formula A .....	84
Lampiran 6	Data distribusi ukuran partikel formula B .....	85
Lampiran 7	Data distribusi ukuran partikel formula C .....	86
Lampiran 8	Data distribusi ukuran partikel formula D .....	87
Lampiran 9	Data hasil analisis potensial zeta formula B .....	88
Lampiran 10	Data hasil analisis potensial zeta formula C .....	88
Lampiran 11	Data hasil analisis potensial zeta formula D .....	89
Lampiran 12	Data distribusi ukuran partikel gel nanopartikel .....	90
Lampiran 13	Data distribusi ukuran partikel gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi .....	91
Lampiran 14	Alat CODA® <i>non-invasive blood pressure analyzer</i> .....	92
Lampiran 15	Hasil perhitungan viskositas sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi .....	92
Lampiran 16	Serapan verapamil hidroklorida dengan pelarut aqua demineralisata dalam pembuatan kurva kalibrasi pada $\lambda$ 279 nm ....	93
Lampiran 17	Serapan verapamil hidroklorida dengan pelarut dapar fosfat pH 7,4 dalam pembuatan kurva kalibrasi pada $\lambda$ 279 nm .....	93
Lampiran 18	Uji perolehan kembali (UPK) kadar verapamil hidroklorida dalam sediaan .....	94
Lampiran 19	Hasil uji penetrasi verapamil hidroklorida dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 dari sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi .....	94
Lampiran 20	Hasil perhitungan fluks verapamil hidroklorida tiap waktu pengambilan dari sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi berdasarkan uji penetrasi selama 6 jam .....	95
Lampiran 21	Hasil Jumlah kumulatif verapamil hidroklorida yang terpenetrasi, persentase jumlah verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dan fluks verapamil hidroklorida dari sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi berdasarkan uji penetrasi selama 6 jam .....	96
Lampiran 22	Data berat badan tikus antar kelompok perlakuan selama 2 minggu	97
Lampiran 23	Data tekanan darah sistolik, diastolik, dan tekanan darah arteri rata-rata tiap kelompok perlakuan .....	98
Lampiran 24	Data persen penurunan tekanan darah sistolik, diastolik, dan tekanan darah arteri rata-rata tiap kelompok perlakuan .....	99
Lampiran 25	Data rata-rata persen penurunan tekanan darah sistolik, diastolik,	

	dan tekanan darah arteri rata-rata tiap kelompok perlakuan dan persen efektivitas .....	100
Lampiran 26	Contoh perhitungan persen efisiensi penyerapan verapamil hidroklorida .....	101
Lampiran 27	Contoh perhitungan uji perolehan kembali (UPK) kadar verapamil hidroklorida dari sediaan .....	102
Lampiran 28	Contoh perhitungan jumlah verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dari sediaan gel pembanding pada menit ke-10 .....	103
Lampiran 29	Contoh perhitungan jumlah verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dari sediaan gel pembanding pada menit ke-30 .....	104
Lampiran 30	Contoh perhitungan fluks verapamil hidroklorida dari sediaan gel pembanding .....	105
Lampiran 31	Contoh perhitungan persentase jumlah kumulatif kurkumin yang terpenetrasi dari sediaan gel .....	106
Lampiran 32	Uji normalitas menurut Shapiro-Wilk terhadap data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0) .	
Lampiran 33	Uji homogenitas varians menurut Levene terhadap data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0) .....	107
Lampiran 34	Uji analisis varian satu arah terhadap data pengukuran tekanan darah sistolik pada 5 kelompok perlakuan (SPSS 19.0) .....	108
Lampiran 35	Uji beda nyata terkecil terhadap data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0) .....	109
Lampiran 36	Uji normalitas menurut Shapiro-Wilk terhadap data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0) .....	110
Lampiran 37	Uji homogenitas varians menurut Levene terhadap data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0) .....	111
Lampiran 38	Uji analisis varian satu arah terhadap data pengukuran tekanan darah diastolik pada 5 kelompok perlakuan (SPSS 19.0) .....	112
Lampiran 39	Uji normalitas menurut Shapiro-Wilk terhadap data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0) .....	113
Lampiran 40	Uji homogenitas varians menurut Levene terhadap data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0) .....	114
Lampiran 41	Uji analisis varian satu arah terhadap data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada 5 kelompok perlakuan (SPSS 19.0) .....	115
Lampiran 42	Sertifikat analisis kitosan .....	116
Lampiran 43	Sertifikat analisis verapamil hidroklorida .....	117
Lampiran 44	Sertifikat analisis natrium hidroksida .....	118
Lampiran 45	Sertifikat hewan coba .....	119
		120

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Verapamil merupakan suatu obat yang digunakan sebagai antiaritmia dan antiangina. Selain itu, verapamil dapat juga digunakan pada penanganan hipertensi. Saat ini verapamil tersedia dalam bentuk verapamil hidroklorida sebagai tablet untuk penggunaan oral maupun dalam bentuk larutan untuk penggunaan injeksi intra vena (Shah, Tojo, dan Chien, 1992).

Bioavailabilitas dari verapamil yang diberikan secara oral sangat rendah yaitu hanya sekitar 10 sampai 23%, dikarenakan adanya metabolisme lintas pertama yang oleh hati dirombak menjadi metabolit dan dieksresi sebanyak 70% melalui urin dan 10% melalui tinja (Martindale, 1982). Hal itu mengakibatkan pemberian dosis verapamil menjadi besar dan juga pemberiaannya menjadi berkali-kali dalam sehari. Permasalahan ini dapat diatasi dengan menggunakan jalur pemberian lainnya yaitu secara transdermal (Shah, Tojo, dan Chien, 1992).

Sistem penghantaran secara transdermal memiliki keuntungan dalam menghindari jalur metabolisme lintas pertama, dapat memberikan sifat pemberian yang terkontrol pada periode waktu tertentu, dan meningkatkan kenyamanan pada pasien saat pemberian. Pengembangan sistem penghantaran secara transdermal untuk verapamil diharapkan dapat memfasilitasi penanganan hipertensi dengan meningkatkan bioavailabilitasnya, memungkinkan pemberian yang hanya satu kali sehari, dan juga dosis yang lebih kecil (Shah, Tojo, dan Chien, 1992).

Namun pada penghantaran produk obat dengan sistem transdermal, harus mendapatkan perhatian terutama dalam hal penetrasi yaitu bagaimana suatu obat dapat melewati sawar kulit terutama stratum korneum. Stratum korneum memiliki struktur seperti susunan batu bata yang menyulitkan obat berpenetrasi masuk menembus jaringan kulit. Susunan batu bata ini mengandung keratin korneosit yang saling melekat satu sama lain dengan adanya "semen", yaitu lipid bilayer yang terdiri dari kolesterol, ester kolesterol, asam lemak dan seramid, sehingga menyulitkan penetrasi obat melalui jalur ini (Barry, 2001).

Salah satu cara untuk mengatasi masalah penetrasi tersebut adalah dengan membuat partikel obat sekecil mungkin hingga berukuran nanometer.

Dalam penelitian ini dilakukan rancangan sediaan nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat. Kelebihan menggunakan nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat antara lain ukuran partikel dan karakteristik permukaan nanopartikel dapat dengan mudah dimanipulasi sesuai dengan target pengobatan, nanopartikel mengatur dan memperpanjang pelepasan obat selama proses transpor obat ke sasaran, dan sistem nanopartikel dapat diterapkan untuk berbagai sasaran pengobatan karena nanopartikel masuk ke dalam sistem peredaran darah dan dibawa oleh darah menuju target pengobatan (Mohanraj, 2006).

Dalam rangka meningkatkan daya penetrasi verapamil melalui stratum korneum, maka verapamil dibuat dalam bentuk nanopartikel. Nanopartikel didefinisikan sebagai partikel berbentuk padat dengan ukuran sekitar 10 – 1000 nm. Zat aktif dapat terlarut, terperangkap, terenkapsulasi, atau tertempel pada matriks nanopartikel (Mohanraj, 2006). Pembuatan nanopartikel dapat menggunakan beberapa metode seperti metode penguapan pelarut, metode emulsifikasi dan metode gelasi ionik (Mohanraj, 2006). Di antara metode-metode tersebut, metode gelasi ionik dinilai sebagai metode yang paling mudah dilakukan. Metode gelasi ionik melibatkan proses sambung silang antara polielektrolit dengan adanya pasangan ion multivalennya. Gelasi ionik seringkali diikuti dengan kompleksasi polielektrolit dengan polielektrolit yang berlawanan. Pembentukan ikatan sambung silang ini akan memperkuat kekuatan mekanis dari partikel yang terbentuk. Contoh pasangan polimer yang dapat digunakan untuk gelasi ionik ini antara lain kitosan dengan tripolifosfat (Swarbrick (ed.), 2007).

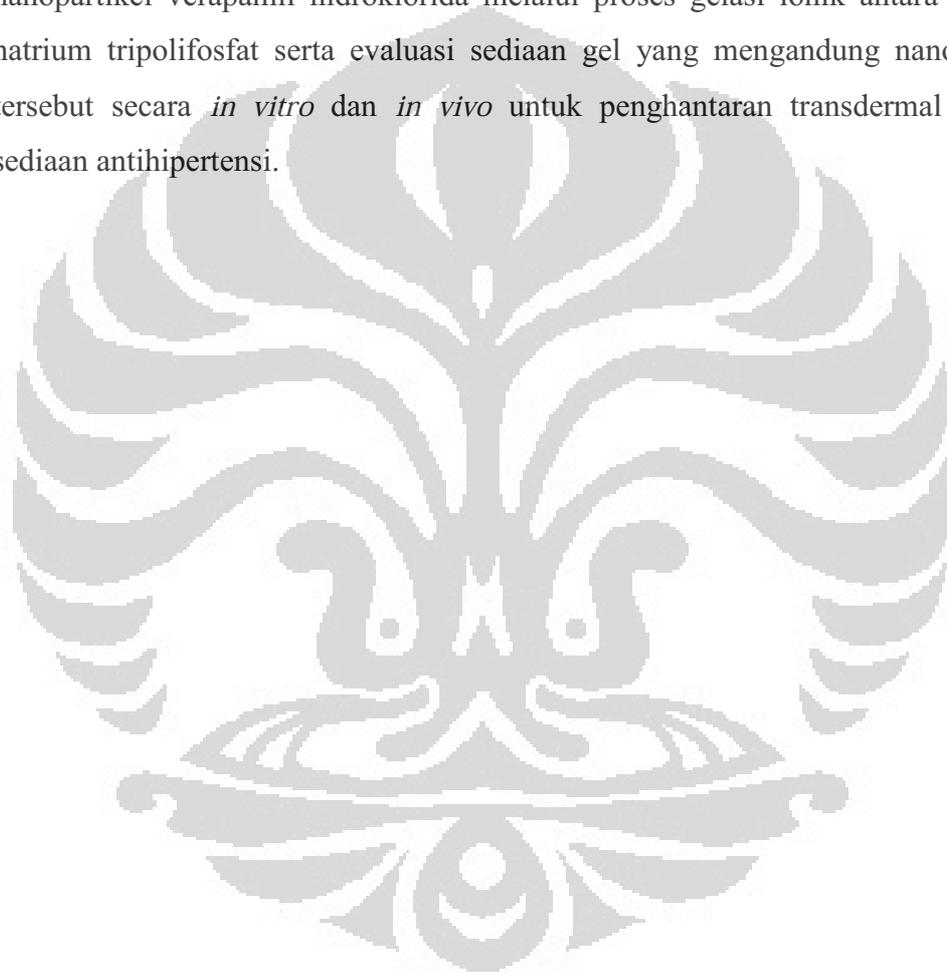
Kitosan merupakan polisakarida linear yang dihasilkan dari deasetilasi senyawa kitin yang terkandung dalam cangkang suku *crustaceae* seperti udang, lobster, kepiting dan sebagainya (Sakkinen, 2003). Dengan melihat kenyataan yang ada, penggunaan kitosan dari kulit udang bagi Indonesia yang memiliki wilayah perairan yang sangat luas dan sumber daya alam laut yang melimpah sangatlah menjanjikan. Dengan demikian penggunaan metode gelasi ionik antara kitosan dengan tripolifosfat pada pembuatan nanopartikel akan semakin meningkatkan penggunaan kitosan sebagai bahan baku industri farmasi.

Di samping itu, manfaat dari penelitian ini adalah membuat sediaan untuk antihipertensi dengan menggunakan zat aktif verapamil hidroklorida dalam

bentuk sediaan gel yang selanjutnya akan dibuat dalam bentuk sediaan *patch* transdermal. Penggunaan obat secara transdermal lebih mudah dan dapat digunakan selama dalam perjalanan karena tidak membutuhkan air dan mudah dalam pemakaiannya.

## 1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah melakukan preparasi dan karakterisasi nanopartikel verapamil hidroklorida melalui proses gelasi ionik antara kitosan-natrium tripolifosfat serta evaluasi sediaan gel yang mengandung nanopartikel tersebut secara *in vitro* dan *in vivo* untuk penghantaran transdermal sebagai sediaan antihipertensi.



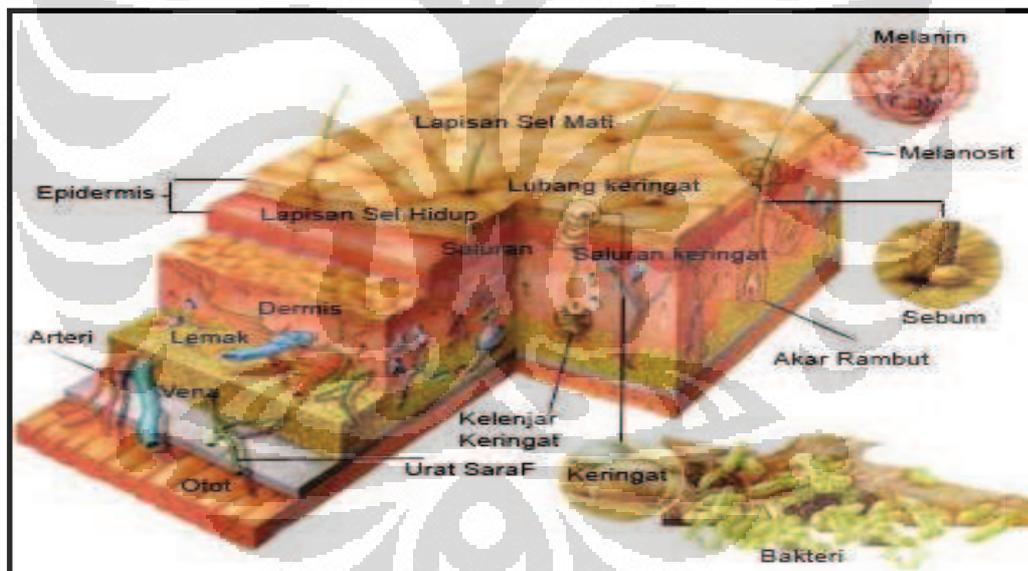
## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Kulit

#### 2.1.1. Definisi

Kulit merupakan bagian yang paling luar dari tubuh dan merupakan organ yang memiliki fungsi dan tugas sangat berat dalam mempertahankan integritasnya. Kulit mengalami perubahan-perubahan sesuai dengan masa dan umurnya. Luas permukaan kulit seluruhnya adalah  $\pm 2.500 \text{ cm}^2$  pada saat dilahirkan, sampai  $\pm 18.000 \text{ cm}^2$  ketika dewasa. Beratnya  $\pm 4,8 \text{ kg}$  pada pria dan  $\pm 3,2 \text{ kg}$  pada wanita (Mitsui (ed.), 1997).

#### 2.1.2. Struktur Kulit



[Sumber: Subowo, 1992, telah diolah kembali]

**Gambar 2.1.** Struktur kulit dan rute penetrasi transdermal obat

Kulit terdiri atas tiga bagian besar dengan fungsi yang berbeda-beda, yaitu (Mitsui, 1997, dan Wilkinson dan Moore, 1982) :

#### a. Epidermis

Lapisan ini terletak pada bagian paling luar atau paling atas, tipis (sekitar 0,001 inci) dan sebagian besar terdiri dari sel-sel mati. Lapisan epidermis terdiri

dari empat lapisan sel, yaitu dari luar ke dalam disebut lapisan tanduk (*stratum korneum*), lapisan bening (*stratum lucidum*), lapisan butir (*stratum granulosum*), lapisan tajuk (*stratum spinosum*), dan lapisan tunas (*stratum basale*).

1). Lapisan tanduk (*stratum korneum*)

Lapisan tanduk adalah suatu lapisan dengan tebal 75-150 mikron, terdiri dari 15-40 deretan sel-sel tanpa inti (sel mati) yang merupakan stratum terakhir dari sel-sel epidermis yang terkeratinisasi dan bersifat elastis. Lapisan ini terdiri dari sisik-sisik keratin yang tersusun tumpang tindih. Lapisan yang padat keratin ini disebut lapisan bening (*stratum lucidum*) yang kadang-kadang dianggap sebagai lapisan tersendiri.

2). Lapisan lucidum

Lapisan ini hanya terdapat pada kulit telapak tangan dan telapak kaki. Lapisan ini tidak mudah terdeteksi dengan pengamatan secara histologi biasa.

3). Lapisan butir (*stratum granulosum*)

Lapisan ini terdiri dari satu atau dua lapisan sel-sel mati (sel gepeng), memanjang secara horizontal dan mengandung substansi kecil yang disebut keratohialin.

4). Lapisan tajuk (*stratum spinosum*)

Lapisan ini terdiri dari sel-sel poligonal (mempunyai ruas-ruas yang menonjol) yang terdiri dari 4-10 deretan yang saling berhubungan dengan *desmosome*. Sel-sel tersebut dipisahkan oleh suatu celah yang sangat sempit, dimana cairan *lymph*a yang kaya nutrisi dapat mengalir. *Stratum spinosum* adalah stratum yang terdiri dari beberapa lapis sel dan merupakan lapisan yang terdalam dan tertebal pada epidermis.

5). Lapisan tunas (*stratum basale*)

Lapisan ini membatasi epidermis dan dermis, terdiri dari sel-sel hidup yang tersusun seperti agar, membelah terus-menerus dan merupakan pembaharu lapisan-lapisan di atasnya. Pada lapisan ini juga terdapat sel-sel melanosit yang akan menghasilkan pigmen melanin yang bertugas untuk melindungi kulit dari sinar matahari.

b. Dermis

Dermis adalah suatu lapisan yang terdiri dari jaringan ikat yang terletak di bawah epidermis dan berfungsi sebagai penopang struktur dan nutrisi. Lapisan ini lebih tebal dari lapisan epidermis. Yang menyusun lapisan ini adalah pembuluh darah, ujung syaraf, kelenjar keringat, akar rambut dan otot penegak rambut. Kesemuanya ini berfungsi dalam kelenturan kulit dan menentukan penampakan kulit, apakah licin, halus, mulus atau berkerut.

c. Hipodermis/subkutan

Lapisan ini terdiri atas jaringan konektif, pembuluh darah, dan sel-sel penyimpan lemak yang memisahkan dermis dengan otot, tulang dan struktur lain. Lapisan hipodermis berfungsi sebagai cadangan makanan dan bantalan untuk melindungi tubuh dari benturan-benturan fisik serta berperan pula dalam pengaturan suhu tubuh. Jumlah lemak dalam lapisan ini akan meningkat bila makanan berlebihan, sebaliknya bila tubuh memerlukan energi atau kalori ekstra maka lapisan ini akan memberikan energi atau kalori dengan cara memecah simpanan lemaknya.

### 2.1.3. Fungsi Kulit

Kulit mempunyai beberapa fungsi, diantaranya yaitu (Langley dan Lester, 1958):

a. Fungsi proteksi

Kulit melindungi bagian dalam tubuh manusia terhadap gangguan fisik maupun mekanik. Gangguan fisik misalnya tekanan, gesekan, tarikan, sedangkan gangguan kimiawi, seperti zat-zat kimia iritan (lisol, karbol, asam atau basa kuat lainnya). Gangguan fisik seperti panas atau dingin, gangguan sinar radiasi atau sinar ultraviolet, dan gangguan kuman, jamur, bakteri atau virus. Gangguan fisik dan mekanik ditanggulangi dengan adanya bantalan lemak subkutis, tebalnya lapisan kulit dan serabut penunjang yang berfungsi sebagai pelindung bagian luar tubuh. Gangguan sinar ultraviolet diatasi oleh sel melanin yang menyerap sebagian sinar tersebut. Gangguan kimia ditanggulangi dengan adanya lemak permukaan kulit yang berasal dari kelenjar palit kulit yang mempunyai pH 4,5-6,5.

b. Fungsi absorpsi

Kulit yang sehat tidak mudah menyerap air, larutan maupun benda padat. Tetapi cairan yang mudah menguap lebih mungkin mudah diserap kulit, begitu pula zat yang larut dalam minyak. Kemampuan absorpsi kulit dipengaruhi oleh tebal tipisnya kulit, hidrasi, kelembaban udara, metabolisme dan jenis pembawa zat yang menempel di kulit. Penyerapan dapat melalui celah antarsel, saluran kelenjar atau saluran keluar rambut.

c. Fungsi ekskresi

Kelenjar-kelenjar pada kulit mengeluarkan zat-zat yang tidak berguna atau sisa metabolisme dalam tubuh misalnya NaCl, urea, asam urat, ammonia, dan sedikit lemak. Sebum yang diproduksi kelenjar palit kulit melindungi kulit dan menahan penguapan yang berlebihan sehingga kulit tidak menjadi kering.

d. Fungsi pengindra (sensori)

Kulit mengandung ujung-ujung saraf sensorik di dermis dan subkutis. Badan Ruffini yang terletak di dermis, menerima rangsangan dingin dan rangsangan panas diperankan oleh badan Krause. Badan taktil Meissner yang terletak di papil dermis menerima rangsangan rabaan, demikian pula badan Merkel-Renvier yang terletak di epidermis.

e. Fungsi pengaturan suhu tubuh (termoregulasi)

Kulit melakukan peran ini dengan cara mengeluarkan keringat dan mengerutkan otot dinding pembuluh darah kulit. Pada suhu tubuh meningkat, kelenjar kulit mengeluarkan banyak keringat ke permukaan kulit dan dengan penguapan keringat tersebut terbuang pula panas tubuh. Mekanisme termoregulasi ini diatur oleh sistem saraf simpatis yang mengeluarkan zat perantara asetilkolin.

f. Fungsi pembentukan pigmen (*melanogenesis*)

Sel pembentuk pigmen kulit (melanosit) terletak di lapisan basal epidermis. Sel ini berasal dari rigi saraf, jumlahnya 1:10 dari sel basal. Jumlah melanosit serta jumlah dan besarnya melanin yang terbentuk menentukan warna kulit. Paparan sinar matahari mempengaruhi produksi melanin. Bila paparan bertambah produksi melanin akan meningkat.

g. Fungsi keratinisasi

Keratinisasi dimulai dari sel basal yang kuboid, bermitosis ke atas berubah bentuk lebih poligonal yaitu sel spinosum, terangkat ke atas menjadi lebih gepeng, dan bergranula menjadi sel granulosum. Kemudian sel tersebut terangkat ke atas lebih gepeng, dan granula serta intinya hilang menjadi sel spinosum dan akhirnya sampai di permukaan kulit menjadi sel yang mati, protoplasmanya mengering menjadi keras, gepeng, tanpa inti yang disebut sel tanduk. Proses ini berlangsung terus-menerus dan berguna untuk fungsi rehabilitasi kulit agar dapat melaksanakan fungsinya secara baik.

h. Fungsi produksi vitamin D

Kulit juga dapat membuat vitamin D dari bahan baku 7-dihidroksikolesterol dengan bantuan sinar matahari. Namun produksi ini masih lebih rendah dari kebutuhan tubuh akan vitamin D dari luar makanan.

## 2.2. Penetrasi Obat Melalui Kulit

Penetrasi melintasi stratum korneum dapat terjadi karena adanya proses difusi melalui dua mekanisme, yaitu (Lund, 1994; Walters, 1993):

a. Absorpsi transepidermal

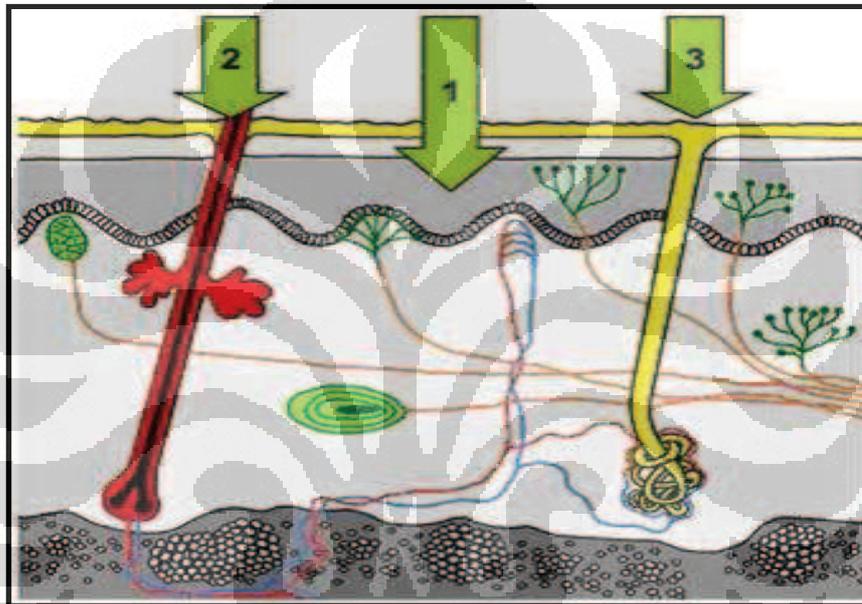
Jalur absorpsi transepidermal – yang melintasi epidermal – merupakan jalur utama bila dibandingkan dengan jalur melalui kelenjar-kelenjar lainnya karena luas permukaan epidermal 100 sampai 1000 kali lebih luas dari permukaan kelenjar-kelenjar tersebut. Lapisan penentu pada kulit yang menunjang absorpsi transepidermal adalah stratum korneum, yang telah dibuktikan bahwa apabila terjadi kerusakan atau perubahan pada lapisan ini akan memperbesar laju difusi suatu bahan obat, karena terjadi perubahan permeabilitas dari stratum korneum. Jalur absorpsi transepidermal merupakan jalur difusi melalui stratum korneum yang terjadi melalui dua jalur, yaitu jalur transelular yang berarti jalur melalui protein di dalam sel dan melewati daerah yang kaya akan lipid, dan jalur paraselular yang berarti jalur melalui ruang antar sel. Penetrasi transepidermal berlangsung melalui dua tahap. Pertama, pelepasan obat dari pembawa ke stratum korneum, tergantung koefisien partisi obat dalam pembawa dan stratum korneum.

Kedua, difusi melalui epidermis dan dermis dibantu oleh aliran pembuluh darah dalam lapisan dermis.

b. Absorpsi transappendageal

Jalur absorpsi transappendageal merupakan jalur masuknya obat melalui folikel rambut dan kelenjar keringat disebabkan karena adanya pori-pori di antaranya, sehingga memungkinkan obat berpenetrasi.

Penetrasi obat melalui jalur transepidermal lebih baik daripada jalur transappendageal, karena luas permukaan pada jalur transappendageal lebih kecil.



[Sumber: Walters, 1993, telah diolah kembali]

**Gambar 2.2.** Rute penetrasi obat (1. Rute transepidermal; 2&3. Rute transappendageal)

Faktor-faktor yang mempengaruhi absorpsi percutan adalah sifat-sifat fisikokimia dari obat, sifat pembawa yang digunakan, dan kondisi fisiologi kulit. Dari sifat-sifat tersebut, dapat diuraikan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi absorpsi percutan antara lain (Walters, 1993; Ansel, 1989):

- a. Harga koefisien partisi obat yang tergantung dari kelarutannya dalam minyak dan air.
- b. Kondisi pH akan mempengaruhi tingkat disosiasi serta kelarutan obat yang lipofil.
- c. Konsentrasi obat.

- d. Profil pelepasan obat dari pembawanya, bergantung pada afinitas zat aktif terhadap pembawa, kelarutan zat aktif dalam pembawa, dan pH pembawa.
- e. Komposisi sistem tempat pemberian obat, yang ditentukan dari permeabilitas stratum korneum yang disebabkan hidrasi dan perubahan struktur lipid.
- f. Peningkatan suhu kulit dapat menyebabkan perubahan difusi yang disebabkan oleh peningkatan kelarutan obat.
- g. Pembawa yang dapat meningkatkan kelembaban kulit akan mendorong terjadi absorpsi obat melalui kulit.
- h. Waktu kontak obat dengan kulit.
- i. Ketebalan kulit. Absorpsi perkutan lebih besar jika obat digunakan pada kulit dengan lapisan tanduk yang tipis daripada yang tebal.
- j. Bahan-bahan peningkat penetrasi (*enhancer*) dapat meningkatkan permeabilitas kulit dengan cara mengubah sifat fisikokimia stratum korneum sehingga mengurangi daya tahan difusi. Contohnya: DMSO, DMF, DMA, urea, dan lain-lain.
- k. Adanya sirkulasi darah *in situ* pada kulit akan meningkatkan absorpsi obat.

Pada permukaan kulit, molekul obat berkontak dengan debris sel, mikroorganisme, sebum, dan material lainnya dimana hal ini mempengaruhi penetrasi. Penetrasi memiliki tiga jalur potensial ke jaringan, pertama adalah melalui folikel rambut yang terasosiasi dengan kelenjar minyak, melalui kelenjar keringat, atau menembus secara kontinu stratum korneum diantara appendageal ini (Barry, 2001).

Area appendageal fraksional tersedia untuk transport hanya sekitar 0.1%; rute ini biasanya berkontribusi pada fluks obat pada keadaan tunak. Jalur ini penting untuk ion dan molekul polar besar yang berusaha melewati stratum korneum. Appendageal juga menyediakan jalur bolak-balik, penting pada waktu pendek untuk difusi keadaan tunak. Sebagai tambahan, polimer dan partikel koloidal dapat menuju folikel (Barry, 2001).

Stratum korneum yang utuh menyediakan barrier permanen, yang disebut sebagai struktur “*brick and mortar*” atau bata dan semen, yang dianalogikan seperti dinding. Korneosit dari keratin yang terhidrasi merupakan bata yang

digabungkan satu sama lain oleh semen. Semen ini memiliki komposisi berupa lapisan lipid bilayer dari seramid, asam lemak, kolesterol, dan ester kolesterol. *Bilayer* ini membentuk daerah-daerah semikristalin, gel, dan daerah kristal likuid. Kebanyakan molekul berpenetrasi melalui kulit melalui rute mikro intraselular dan kemudian diciptakan teknik dengan tujuan untuk mengganggu atau memindahkan arsitektur molekular unik dari stratum korneum ini (Barry, 2001).

Lapisan aktif memungkinkan obat untuk dimetabolisme, atau mengaktifkan *prodrug*. Lapisan papilar dari kulit juga kaya dengan kapiler dimana kebanyakan penetran dibersihkan dalam hitungan menit. Biasanya, kulit bagian lebih dalam tidak secara signifikan mempengaruhi absorpsi walaupun mereka mungkin mengikat beberapa jenis obat dan bertindak sebagai depo menghambat perpindahan sistemik dari obat (Barry, 2001).

### **2.3. Nanopartikel**

#### **2.3.1. Definisi**

Nanopartikel mengindikasikan berbagai tipe konsep partikel yang diantaranya adalah kapsul, agregat, serbuk, kristal, misel, emulsi, kompleks dan vesikel. Istilah ini digunakan untuk menggambarkan partikel yang ukurannya berada pada level submikron ( $< 1 \mu\text{m}$ ) (Thassu et al., 2007).

#### **2.3.2. Nanopartikel Dalam Sediaan Transdermal**

Sejalan dengan tujuan utama dari penggunaan nanopartikel yaitu untuk meningkatkan bioavailabilitas dengan meningkatkan luas permukaan kontak, maka hal tersebut menjadi alasan mendasar aplikasi nanopartikel pada penghantaran obat secara transdermal. Ukuran partikel yang semakin mengecil diharapkan akan meningkatkan luas kontak partikel dengan membran dan mempermudah partikel masuk menembus membran. Selain itu, dengan semakin meningkatnya partikel pembawa yang menembus membran maka diharapkan jumlah obat yang masuk ke sirkulasi sistemik akan meningkat dan bioavailabilitas zat aktif akan meningkat (Thassu et al., 2007).

Sampai saat ini, perkembangan nanopartikel untuk penghantaran obat transdermal masih banyak diteliti. Aplikasi yang sudah digunakan secara luas kebanyakan merupakan produk kosmetik, sehingga aplikasinya sebagai penghantaran obat masih dapat dikembangkan lebih banyak (Thassu et al., 2007).

Stratum korneum normal terdiri dari pori-pori dengan diameter  $< 10$  nm (mayoritas berukuran lebih kurang dari 5 nm). Hal ini lah yang menjadi alasan partikel berukuran nano berguna untuk penghantaran obat melalui sawar kulit (Cevc dan Vierl, 2010). Beberapa tipe dari polimer *biodegradable* dan *nondegradable* dapat digunakan sebagai bahan pembuatan sistem nano tersebut. Beberapa polimer yang telah digunakan sebagai sistem penghantaran obat secara topikal maupun transdermal antara lain poli(laktid-ko-glikolid), polimetakrilat, poli(butil sianoakrilat), poli( $\epsilon$ -kaprolakton), dan kitosan (Pathak dan Thassu, 2009).

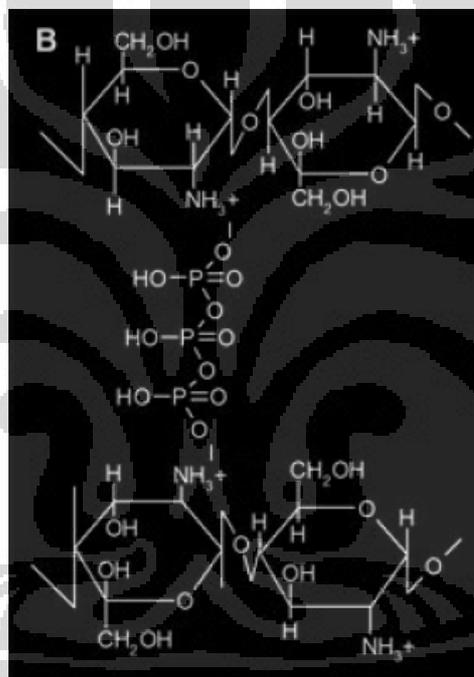
Penetrasi nanopartikel melalui kulit dibatasi oleh stratum korneum. Penetrasi melalui pori-pori tampaknya merupakan jalur transportasi utama bagi suatu partikel untuk berpenetrasi lebih dalam melalui kulit. Ukuran dan lamanya waktu penggunaan juga akan mempengaruhi akumulasi partikel pada daerah pori-pori. Beberapa penelitian menunjukkan nanopartikel dengan rentang ukuran antara 50-500 nm dapat berpenetrasi lebih dalam. Nanopartikel secara lambat akan dihilangkan dari pori-pori oleh ekskresi sebum dan migrasi partikel menuju sel disebelahnya, serta melalui sistem limfatik. Muatan permukaan pada nanopartikel juga mempengaruhi kemampuan permeasi melalui kulit. Nanopartikel dengan muatan permukaan yang lebih besar akan berinteraksi dengan muatan dari lipid kulit sehingga meningkatkan penetrasi nanopartikel ke dalam kulit (Pathak dan Thassu, 2009).

### 2.3.3. Nanopartikel Sambung Silang

Nanopartikel sambung silang merupakan nanopartikel yang terbentuk dari proses sambung silang antara elektrolit dengan pasangan ionnya. Ikatan sambung silang ini dapat terjadi secara ionik maupun kovalen. Pembuatan nanopartikel sambung silang dapat dilakukan dengan metode sambung silang konvensional menggunakan senyawa penyambung silang konvensional (misalnya

glutaraldehyd sebagai senyawa penyambung silang untuk kitosan) atau dengan menggunakan metode gelas ionik (Maskevich (ed.), 2007).

Metode sambung silang konvensional kurang disukai karena senyawa penyambung silang konvensional (misalnya glutaraldehyd) harus dihindari dengan alasan senyawa penyambung silang konvensional menyebabkan kerusakan struktur peptida dan juga toksisitas seluler. Oleh karena itu, metode gelas ionik lebih disukai karena menggunakan pasangan ion yang lebih sesuai untuk protein (tripolifosfat, dekstran sulfat) dan juga menghindari pengadukan berlebihan, panas tinggi dan penggunaan pelarut organik (Maskevich (ed.), 2007).



[Sumber: Bhumkar dan Pokharkar, 2006, telah diolah kembali]

**Gambar 2.3.** Interaksi kitosan dengan tripolifosfat melalui mekanisme sambung silang ionik

#### 2.3.4. Pembuatan Nanopartikel Sambung Silang Multi-ion Dengan Metode Gelas Ionik

Metode gelas ionik melibatkan proses sambung silang antara polielektrolit dengan adanya pasangan ion multivalennya. Gelas ionik seringkali diikuti dengan kompleksasi polielektrolit dengan polielektrolit yang berlawanan. Pembentukan ikatan sambung silang ini akan memperkuat kekuatan mekanis dari

**Universitas Indonesia**

partikel yang terbentuk. Contoh pasangan polimer yang dapat digunakan untuk gelasi ionik ini antara lain kitosan dengan tripolifosfat dan kitosan dengan karboksimetilselulosa (Swarbrick (ed.) 2007).

Kitosan yang merupakan polimer kationik dapat bereaksi dengan anion multivalen seperti tripolifosfat. Pembentukan nanopartikel dengan metode gelasi ionik dapat dilakukan antara lain dengan pengerasan tetesan cair yang didispersikan pada fase minyak atau organik. Prosedur sederhana tersebut meliputi pencampuran dua fase cair dimana fase yang satu mengandung kitosan dan fase yang satu mengandung anion multivalen (Abdelhamid, 2004).

## **2.4. Hipertensi**

### **2.4.1. Definisi**

Hipertensi merupakan suatu penyakit umum yang didefinisikan sebagai meningkatnya tekanan darah arteri secara persisten. Berdasarkan data dari *National Health and Nutrition Examination Survey* tahun 1999-2000, diindikasikan bahwa prevalensi hipertensi meningkat diantara jenis kelamin laki-laki, ras kulit hitam, dan seiring dengan bertambahnya usia. Kebanyakan hipertensi didiagnosis muncul pada dekade ketiga dan kelima dari hidup seseorang (Saseen, Joseph, Barry, 2002).

### **2.4.2. Etiologi**

Berdasarkan penyebabnya, hipertensi dibagi menjadi dua jenis, yaitu hipertensi primer atau yang dikenal sebagai hipertensi esensial dan hipertensi sekunder.

#### **2.4.2.1. Hipertensi Esensial**

Lebih dari 90% individu yang hipertensif memiliki hipertensi esensial (*primary hypertension*). Hipertensi sering menurun dalam keluarga, menunjukkan bahwa faktor genetik merupakan faktor penting dalam perkembangan hipertensi esensial. Kebanyakan gen-gen berkarakterisasi tertentu, mutasi genetik yang mengubah ekskresi kallikrein melalui urin, pelepasan nitrat oksida, ekskresi

aldosteron, steroid adrenal dan angiotensin memiliki pengaruh dalam keseimbangan natrium (Saseen, Joseph, Barry, 2002).

#### 2.4.2.2. Hipertensi Sekunder

Kurang dari 10% pasien menderita hipertensi sekunder, dimana meningkatnya tekanan darah disebabkan oleh penyakit ataupun suatu obat.

Penyakit yang menyebabkan hipertensi sekunder antara lain: penyakit ginjal kronik, sindroma *Cushing*, koarktasi aorta, *sleep apnea* obstruktif, penyakit paratiroid, feokromositoma, aldosteronisme primer, penyakit renovaskuler, penyakit tiroid.

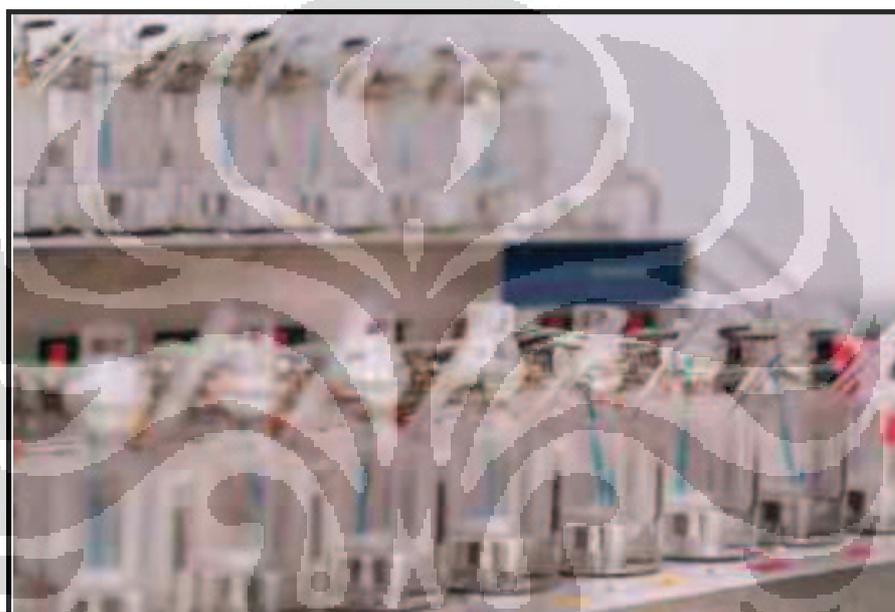
Sedangkan obat-obat dan senyawa yang dapat menyebabkan hipertensi sekunder antara lain: kortikosteroid, ACTH, estrogen, kontrasepsi oral, obat anti-inflamasi non steroid, *COX-2 inhibitor*, fenilpropanolamin dan analognya, siklospodin dan takrolimus, eritropoetin, sibutramin, antidepresan (terutama venlafaksin), bromokriptin, buspiron, karbamazepin, kldestulran, ketamin, metoklopramid, klonidin atau kombinasi  *$\beta$ -blocker*, kokain, ma huang, nikotin, anabolik steroid, metilfenidat, fensiklidin, ergotamin dan produk herbal yang mengandung ergot, *St. John's wort*, makanan yang mengandung tiramin apabila sedang mengonsumsi penghambat monoamin oksidase, senyawa kimia seperti timbal, merkuri, thallium dan logam berat lainnya, juga lithium (Saseen, Joseph, Barry, 2002)..

#### 2.4.3. Patofisiologi Hipertensi

Faktor-faktor multipel yang mengontrol tekanan darah merupakan komponen potensial dalam meningkatkan perkembangan hipertensi. Termasuk di dalamnya, malfungsi pada mekanisme humoral (misalnya sistem renin-angiotensin-aldosteron), mekanisme vasodepresor, mekanisme neuronal abnormal, cacat pada autoregulasi perifer, gangguan pada natrium, kalsium, dan hormon natriuretik (Saseen, Joseph, Barry, 2002)

### 2.5. Uji Penetrasi Secara *In Vitro* Menggunakan Sel Difusi Franz

Penelitian daya penetrasi dan pelepasan obat melalui kulit secara *in vitro* merupakan cara termudah dan hemat dalam mengarakterisasi absorpsi dan penetrasi obat melalui kulit. Selain itu, diperlukan saat pengembangan formulasi sediaan topikal untuk mengidentifikasi dan memilih formulasi yang baik. Formulasi yang baik akan memberikan pelepasan obat yang optimal dan deposisi obat menuju lapisan kulit yang diinginkan yaitu stratum korneum, epidermis, atau dermis (Krista dan Bucks, 2003).



[Sumber: Krista dan Bucks, 2003, telah diolah kembali]

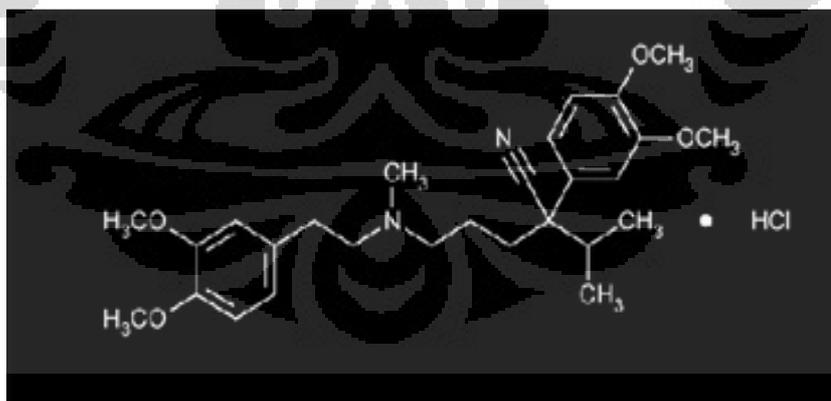
**Gambar 2.4.** Sel difusi Franz

Langkah pertama pada pengantaran obat secara topikal adalah pelepasan obat dari pembawanya. Kecepatan pelepasan tergantung pada aktivitas termodinamik obat terkait formulasi dan hal ini dapat dipastikan dengan menggunakan suatu sistem sel difusi yang biasa digunakan pada penelitian daya penetrasi obat pada kulit secara *in vitro*. Kecepatan pelepasan obat yang kecil berhubungan dengan rendahnya bioavailabilitas dari formula yang digunakan. Umumnya, konsentrasi formula obat yang kecil dengan kelarutan obat yang besar akan menahan obat pada permukaan kulit dan memiliki kecepatan pelepasan obat yang kecil. Oleh karena itu, karakterisasi dari pelepasan obat dari suatu formulasi

akan memberikan informasi berharga mengenai strategi dan pemilihan formula (Krista dan Bucks, 2003).

Studi penetrasi kulit secara *in vitro* berhubungan dengan mengukur kecepatan dan jumlah komponen yang menembus kulit dan jumlah komponen yang tertahan pada kulit. Salah satu cara untuk mengukur jumlah obat yang terpenetrasi melalui kulit yaitu dengan menggunakan sel difusi Franz. Sel difusi Franz terbagi atas dua komponen yaitu kompartemen donor dan kompartemen reseptor. Membran yang digunakan dapat berupa kulit manusia atau kulit hewan. Membran diletakkan di antara kedua kompartemen, dilengkapi dengan o-ring untuk menjaga letak membran. Kompartemen reseptor diisi dengan larutan penerima. Suhu pada sel dijaga dengan sirkulasi air menggunakan water jacket disekeliling kompartemen reseptor. Sediaan yang akan diuji diaplikasikan pada membran kulit. Pada interval waktu tertentu diambil beberapa mL cairan dari kompartemen reseptor dan jumlah obat yang terpenetrasi melalui kulit dapat dianalisis dengan metode analisis yang sesuai. Setiap diambil sampel cairan dari kompartemen reseptor harus selalu digantikan dengan cairan yang sama sejumlah volume yang diambil (Krista dan Bucks, 2008).

## 2.6. Verapamil Hidroklorida



[Sumber : USP 30-NF25, telah diolah kembali]

**Gambar 2.5.** Struktur verapamil hidroklorida

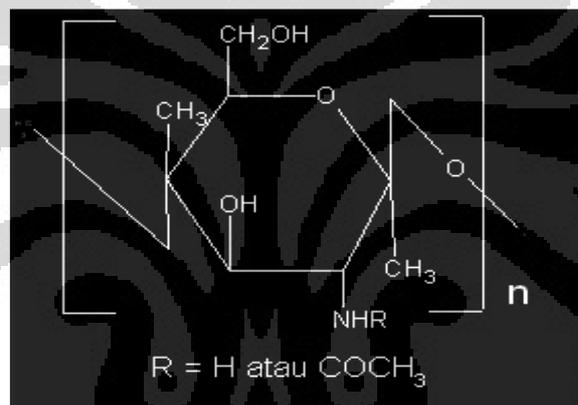
Verapamil hidroklorida memiliki nama kimia 5-[N-(3,4-dimetoksifenetil)metilamino]-2-(3,4-dimetoksifenil)-2-isopropilvaleronitril monohidroklorida dengan BM sebesar 491,07. Bentuk dari verapamil hidroklorida

**Universitas Indonesia**

berupa serbuk hablur, putih atau hampir putih, praktis tidak berbau dan rasa pahit. Verapamil hidroklorida larut dalam air, mudah larut dalam kloroform, agak sukar larut dalam etanol dan praktis tidak larut dalam eter (Depkes RI,1995).

Verapamil merupakan obat aritmia kelas IV yang merupakan penghambat kanal  $\text{Ca}^{2+}$ . Efek klinis penting dari antagonis  $\text{Ca}^{2+}$  untuk pengobatan aritmia adalah penekanan potensial aksi yang  $\text{Ca}^{2+}$  dependent dan perlambatan konduksi di nodus AV. Verapamil adalah satu-satunya penghambat kanal  $\text{Ca}^{2+}$  yang dewasa ini dipasarkan sebagai obat anti aritmia. Verapamil merupakan turunan papaverin yang bekerja dengan cara menyekat kanal  $\text{Ca}^{2+}$  di membran otot polos dan obat jantung (Farmakologi FK UI,1995).

## 2.7. Kitosan



[Sumber: Rowe, 2009, telah diolah kembali]

**Gambar 2.6.** Struktur kitosan yang tersusun dari kopolimer glukosamin (R=H) dan N-asetilglukosamin (R= $\text{COCH}_3$ )

Kitosan merupakan polisakarida yang terdiri dari kopolimer glukosamin dan N-asetilglukosamin dan merupakan produk deasetilasi parsial dari kitin. Istilah kitosan digunakan untuk produk deasetilasi kitin yang memiliki berbagai derajat deasetilasi dan depolimerisasi sehingga komposisi kimia pastinya tidak dapat dipastikan. Kitosan tersedia secara komersial dalam berbagai jenis dengan berat molekul 10.000-1.000.000 dan dengan derajat deasetilasi yang berbeda-beda (Rowe, 2009).

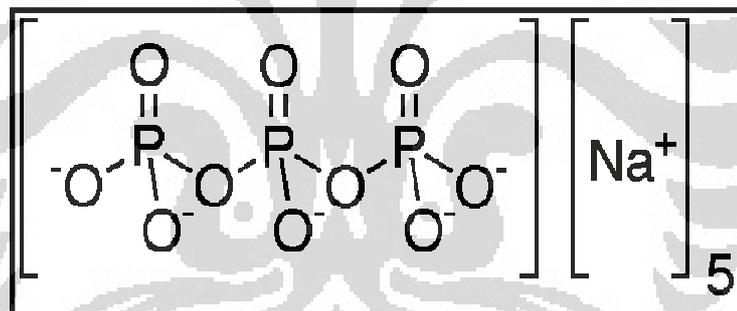
Kitosan memiliki bentuk serbuk atau serpihan berwarna putih atau putih pucat dan tidak berbau. Kitosan juga merupakan polimer biokompatibel dan

biodegradabel. Kitosan tidak larut dalam suasana basa dan netral akan tetapi dapat bereaksi dengan asam organik dalam suasana asam (Rowe, 2009).

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

Penggunaan kitosan sebagai eksipien dalam formulasi farmasetika telah diinvestigasi dalam berbagai macam penelitian. Contoh-contoh aplikasinya adalah untuk penghantaran obat terkendali, sebagai komponen sediaan mukoadesif dan untuk meningkatkan penghantaran protein. Kitosan yang merupakan polimer kationik dapat bereaksi dengan anion multivalen membentuk partikel dengan ikatan sambung silang. Ikatan sambung silang ini dilaporkan dapat meningkatkan kestabilan partikel secara mekanis (Yu et al., 2008; Rowe, 2009).

## 2.8. Tripolifosfat



[Sumber: Greenwood, 1997, telah diolah kembali]

**Gambar 2.7.** Struktur natrium tripolifosfat

Tripolifosfat (TPP) atau biasa disebut juga natrium tripolifosfat (*Natrium tripolyphosphate*/STPP) merupakan suatu serbuk atau granul berwarna putih dan bersifat sedikit higroskopis. Tripolifosfat bersifat mudah larut dalam air dan tidak larut dalam etanol. Tripolifosfat ada dalam bentuk garam natrium yang terdapat dalam bentuk anhidrat maupun heksahidratnya. Tripolifosfat bisa digunakan sebagai bahan tambahan antara lain sebagai senyawa pembentuk tekstur (FAO, 2006).

Tripolifosfat dalam nanopartikel sambung silang multi-ion digunakan sebagai pasangan ion dari kitosan. Alasan penggunaan tripolifosfat antara lain karena sifatnya sebagai anion multivalen yang dapat membentuk ikatan sambung silang dengan kitosan. Penelitian dari Yu et al. menyebutkan bahwa dengan digunakannya tripolifosfat sebagai salah satu pasangan ion kitosan, hasil nanopartikel yang didapat lebih stabil dan memiliki karakter penembusan membran yang lebih baik (Yu et al. 2008).

Pada nanopartikel sambung silang multi-ion, tripolifosfat berperan sebagai salah satu komponen anion multivalen yang nantinya akan membentuk ikatan sambung silang dengan kitosan yang bersifat kationik (Yu et al. 2008).

## 2.9. Propilen Glikol

Propilen glikol dengan rumus struktur  $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OH}$  adalah suatu cairan kental, jernih, tidak berwarna, dengan rasa yang manis. Propilen glikol digunakan sebagai humektan, pelarut, penstabil untuk vitamin, kosolven, *plasticizer*, desinfektan, pengawet, dan juga sebagai peningkat penetrasi. Propilen glikol merupakan pelarut yang lebih baik dibandingkan gliserin dan dapat melarutkan berbagai materi seperti kortikosteroid, fenol, sulfa, barbiturat, vitamin A dan D, alkaloid, obat-obat anestesi lokal. Aktivitas antiseptiknya setara dengan etanol dan dapat menghambat pertumbuhan jamur (Rowe, 2009).

## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kitosan (derajat asetilasi  $\pm 90\%$ ) (Biotech Surindo, Indonesia), natrium tripolifosfat (Wako, Jepang), verapamil hidroklorida (Ricordati, Italia), kalium hidrogen fosfat (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Merck, Jerman), kalium bromida (Indonesia), asam asetat glasial (Merck, Jerman), eter (Indonesia), natrium klorida (Indonesia), propilen glikol (Dow Chemical Pacific, Singapura), aqua demineralisata (Indonesia), larutan *saline* (Indonesia), hematoksilin-eosin (Indonesia), formalin (Indonesia), dan parafin (Indonesia).

Hewan coba: Tikus jantan galur *Sprague Dawley* dengan berat  $\pm 200$  gram berumur 8-10 bulan (untuk pengujian secara *in vitro* dan *in vivo*) (Institut Pertanian Bogor, Indonesia).

### 3.2. Alat

Peralatan yang digunakan: pengaduk magnetik (IKA, Jerman), *homogenizer* (Omni-Multimix Inc., Malaysia), timbangan analitik tipe 210-LC (Adam, Amerika Serikat), spektrofotometer UV-Vis 1601 (Shimadzu, Jepang), FT-IR (Shimadzu, Jepang), *zetasizer* (Delsa<sup>TM</sup> Nano&Malvern, Amerika Serikat), mikroskop transmisi elektron JEM-1400 (JEOL Ltd., Jepang), *freeze dryer*, mikroskop cahaya (Nikon model Eclipse E 200, Jepang), sentrifugator (Kubota 5100, Jepang), *CODA<sup>®</sup> Non-invasive Blood Pressure Analyzer* (Kent Scientific, Amerika Serikat), *particle size analyzer* (Delsa<sup>TM</sup> Nano, Amerika Serikat), *scanning electron microscope* JSM-5310 LV (JEOL Ltd., Jepang), *freeze dryer*, sel difusi Franz dengan diameter 1,77 cm dan volume kompartemen reseptor 14 cm (Bengkel Gelas ITB, Indonesia), pH meter tipe 510 (Eutech Instrument, Singapura), viskometer Brookfield (Brookfield, USA), oven (Mettler, Jerman), kamera digital (Canon Power Shot A470, Jepang), termostat (Polyscience model 9000, Amerika Serikat), spuit 0,5 mL (Terumo Corp., Filipina), jangka sorong (Vernier Caliper, Cina), peralatan bedah (Gold Cross, Australia), silet Goal<sup>®</sup> (The Gillette Company, Jerman), klem dan statif, dan peralatan laboratorium lain.

### 3.3. Cara Kerja

#### 3.3.1. Nanopartikel Verapamil Hidroklorida

##### 3.3.1.1. Pembuatan Larutan Pereaksi Dapar Fosfat pH 7,4

Ditimbang sebanyak 27,218 gr kalium hidrogen fosfat, lalu ditambahkan aquadest bebas karbondioksida sampai volume 1000 mL. Larutan tersebut diambil sebanyak 50 mL dan ditambahkan dengan natrium hidroksida (NaOH) 0,2 M sebanyak 39,1 mL. setelah itu, larutan tersebut diencerkan dengan aquadest bebas karbondioksida sampai volume 200 mL (Hartrianti, 2008).

##### 3.3.1.2. Preparasi Larutan Kitosan

Kitosan sebanyak 200 mg dilarutkan dalam 100 mL larutan asam asetat 1% dengan menggunakan pengaduk magnetik. Cara pembuatan asam asetat 1% adalah dengan mencampurkan 10,0 mL asam asetat glasial dalam aquadest hingga 1000,0 mL.

##### 3.3.1.3. Preparasi Larutan Natrium Tripolifosfat

Natrium tripolifosfat sebanyak 40 mg dilarutkan dalam 40 mL aqua demineralisata dengan menggunakan pengaduk magnetik.

##### 3.3.1.4. Optimasi Pembuatan Nanopartikel (Metode Gelasi Ionik) (Yu et al, 2008 dan M.R. de Moura et al., 2009)

###### a. Metode 1a

Verapamil hidroklorida ditimbang sebanyak 3 gram kemudian dilarutkan dalam larutan kitosan dengan menggunakan pengaduk magnetik. Selanjutnya larutan natrium tripolifosfat diteteskan tetes demi tetes dengan kecepatan tetap (0,75 mL/menit) ke dalam larutan campuran tersebut secara terus menerus di bawah putaran pengaduk magnetik dengan kecepatan 400 rpm pada temperatur kamar (25°C) hingga semua larutan natrium tripolifosfat habis dan terbentuk suspensi nanopartikel.

b. Metode 1b

Verapamil hidroklorida ditimbang sebanyak 5 gram kemudian dilarutkan dalam larutan kitosan dengan menggunakan pengaduk magnetik. Selanjutnya larutan natrium tripolifosfat diteteskan tetes demi tetes dengan kecepatan tetap (0,75 mL/menit) ke dalam larutan campuran tersebut secara terus menerus di bawah putaran pengaduk magnetik dengan kecepatan 400 rpm pada temperatur kamar (25°C) hingga semua larutan natrium tripolifosfat habis dan terbentuk suspensi nanopartikel.

c. Metode 2

Verapamil hidroklorida ditimbang sebanyak 5 gram kemudian dilarutkan dalam larutan kitosan dengan menggunakan pengaduk magnetik. Selanjutnya larutan natrium tripolifosfat diteteskan tetes demi tetes dengan kecepatan tetap (0,75 mL/menit) ke dalam larutan campuran tersebut secara terus menerus di bawah putaran pengaduk magnetik dengan kecepatan 400 rpm pada temperatur kamar (25°C) hingga semua larutan natrium tripolifosfat habis dan terbentuk suspensi nanopartikel. Selanjutnya suspensi nanopartikel yang terbentuk diaduk dengan homogenizer kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.

d. Metode 3

Verapamil hidroklorida ditimbang sebanyak 5 gram kemudian dilarutkan dalam larutan kitosan dengan menggunakan pengaduk magnetik. Selanjutnya larutan natrium tripolifosfat 40 mL dituang langsung ke dalam larutan campuran tersebut pada temperatur kamar (25°C) di bawah putaran homogenizer dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit hingga terbentuk suspensi nanopartikel.

**Tabel 3.1.** Formula nanopartikel sambung silang multi-ion

<b>Formula</b>	<b>Verapamil hidroklorida</b>	<b>Kitosan</b>	<b>Natrium tripolifosfat</b>	<b>Metode</b>
A	3 gr	200 mg/100 mL	40 mg/40 mL	1a
B	5 gr	200 mg/100 mL	40 mg/40 mL	1b
C	5 gr	200 mg/100 mL	40 mg/40 mL	2
D	5 gr	200 mg/100 mL	40 mg/40 mL	3

### 3.3.1.5. Pembuatan Kurva Kalibrasi Verapamil Hidroklorida Dalam Pelarut Aqua Demineralisata Dengan Metode Spektrofotometri

Verapamil hidroklorida ditimbang seksama sebanyak  $\pm 100,0$  mg, kemudian dilarutkan dalam aqua demineralisata pada labu tentukur sampai 100,0 mL. Didapat larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan tersebut, dipipet 25,0 mL, dan diencerkan dengan aqua demineralisata dan dicukupkan volumenya sampai 250,0 mL sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Dari larutan 100 ppm, dipipet masing-masing 20,0 mL; 25,0 mL; 30,0 mL; 35,0 mL; 40,0 mL, dan 45,0 mL kemudian diencerkan dalam aqua demineralisata masing-masing dalam labu tentukur sampai 100,0 mL, sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, dan 45 ppm. Pada larutan dengan konsentrasi 25 ppm diamati dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya. Panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum verapamil HCl dalam aqua demineralisata, ditentukan dengan melakukan *scanning* pada panjang gelombang antara 200 – 400 nm. Serapan larutan-larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum, kemudian dihitung persamaan regresi linearnya.

### 3.3.1.6. Pengukuran Persen Efisiensi Penjerapan Verapamil Hidroklorida Dalam Suspensi Nanopartikel Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Yaowalak, Mitrevej, dan Mueller, 2006)

5,0 mL suspensi ditambahkan 5,0 mL dapar alkali borat pH 9,7. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit, supernatan diambil 1,0 mL dan diencerkan dalam labu tentukur dengan menggunakan aqua demineralisata hingga 25,0 mL, kemudian 1,0 mL dari larutan sebelumnya diencerkan kembali dengan aqua demineralisata hingga 25,0 mL. Serapan larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan dihitung kadarnya dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi. Percobaan dilakukan sebanyak 3 kali. Hasil dihitung sebagai verapamil hidroklorida bebas.

$$\% \text{ Efisiensi penjerapan} = \frac{\text{total obat} - \text{obat bebas dalam supernatan}}{\text{total obat}} \times 100\% \quad (3.1)$$

### 3.3.1.7. Penetapan Distribusi Ukuran Partikel dan Potensial Zeta

Penentuan ukuran partikel, potensial zeta, dan indeks polidispersitas dilakukan dengan cara mendispersikan nanopartikel dengan aquadest pada suhu 25° C pada perbandingan 1/100 (v/v). Ketiga pengukuran tersebut dilakukan dengan menggunakan alat *Zetasizer* (Xiangrong et al, 2008).

### 3.3.1.8. Mikroskop Transmisi Elektron (*Transmission Electron Microscope*)

Mikroskop transmisi elektron digunakan untuk menguji morfologi nanopartikel dan ukuran partikel yang dihasilkan (Avadi, 2010).

### 3.3.1.9. Pengeringan Nanopartikel yang Dihasilkan

Nanopartikel yang didapatkan dibekukan dengan nitrogen cair dan diliofilisasi selama 12 jam untuk mendapatkan nanopartikel kitosan-natrium tripolifosfat kering dengan menggunakan alat *freeze dryer*.

### 3.3.1.10. Morfologi permukaan serbuk nanopartikel dengan SEM

*Scanning electron microscopy* digunakan untuk mempelajari morfologi permukaan serbuk nanopartikel yang mengandung verapamil hidroklorida dengan eksipien kitosan-tripolifosfat.

### 3.3.1.11. Analisis FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*)

Spektrum FT-IR dari kitosan dan nanopartikel kitosan-natrium tripolifosfat dilakukan pada daerah 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Spektrum FT-IR digunakan untuk menentukan keberadaan dari natrium tripolifosfat dan kitosan dalam nanopartikel kering. Serbuk disiapkan menggunakan KBr dibentuk *pellet* (M.R. de Moura et al., 2009).

### 3.3.1.12. Penetapan Nanopartikel Verapamil Hidroklorida Terpilih

Hasil karakterisasi dari keempat formula (A, B, C, dan D) dibandingkan untuk menetapkan nanopartikel terpilih guna dijadikan sebagai nanopartikel pada tahap selanjutnya (pembuatan sediaan gel nanopartikel). Karakter dari nanopartikel terpilih adalah memiliki ukuran partikel yang terkecil (berukuran

nano), memiliki potensial zeta yang terbesar, memiliki efisiensi penjerapan yang tinggi, memiliki morfologi yang baik, dan dapat diterima pada konfirmasi dengan FT-IR.

### 3.3.2. Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida

#### 3.3.2.1. Pembuatan Eksipien Kitosan - Natrium Tripolifosfat (Sebagai Basis Gel)

Larutan kitosan 3% (b/v) dibuat dengan cara melarutkan kitosan dalam asam asetat 1% yang diaduk dengan menggunakan pengaduk magnetik. Larutan natrium tripolifosfat 0,145% (b/v) dibuat dengan cara melarutkan natrium tripolifosfat dalam aquadest. Larutan natrium tripolifosfat ditambahkan ke dalam larutan kitosan dengan perbandingan larutan natrium tripolifosfat:kitosan (1:5) sambil diaduk dengan menggunakan homogenizer kecepatan 1500 rpm. Penambahan larutan natrium tripolifosfat ke dalam larutan kitosan dilakukan dengan kecepatan 5 mL/menit. Kemudian, larutan dituang di atas kaca hingga rata dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C (Lifeng et al., 2004).

#### 3.3.2.2. Pembuatan Sediaan Gel Perbandingan Verapamil Hidroklorida

Eksipien kitosan-natrium tripolifosfat dimasukkan ke dalam gelas piala kemudian ditambahkan larutan verapamil hidroklorida (perbandingan aqua demineralisata : asam asetat 1% 40:100) , aduk dengan homogenizer kecepatan 1500 rpm hingga mengental. Sediaan gel ini selanjutnya akan digunakan sebagai gel perbandingan.

#### 3.3.2.3. Pembuatan Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida

Eksipien kitosan-natrium tripolifosfat dimasukkan ke dalam gelas piala kemudian ditambahkan suspensi nanopartikel verapamil hidroklorida (formula terpilih) aduk dengan *homogenizer*, aduk dengan homogenizer kecepatan 1500 rpm hingga mengental dan terbentuk sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida yang homogen.

### 3.3.2.4. Pembuatan Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida Dengan Penambahan *Enhancer*

Eksipien kitosan-natrium tripolifosfat dimasukkan ke dalam gelas piala kemudian ditambahkan suspensi nanopartikel verapamil hidroklorida (formula terpilih), aduk dengan homogenizer kecepatan 1500 rpm hingga mengental. Selanjutnya ke dalam massa gel tersebut ditambahkan propilen glikol aduk kembali dengan homogenizer kecepatan 1000 rpm hingga terbentuk sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida dengan penambahan *enhancer* yang homogen.

Formula yang digunakan dalam pembuatan sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida sesuai dengan Tabel 3.2 di bawah ini.

**Tabel 3.2.** Formula sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida (500 gram)

Formula	Suspensi nanopartikel verapamil hidroklorida (mL)	Serbuk kitosan-natrium tripolifosfat (g)	Propilen glikol (g)	Larutan Aqua demineralisata: As. Asetat 1% (40:100)
Nanopartikel	X	25	-	ad. 500 gram
Nanopartikel + <i>Enhancer</i>	X	25	25	ad. 500 gram

Keterangan: “X” adalah banyaknya suspensi nanopartikel verapamil hidroklorida yang akan ditambahkan sesuai dengan dosis dari verapamil hidroklorida untuk sediaan transdermal, mengacu pada penjerapan verapamil hidroklorida yang dikandung dalam suspensi nanopartikel yang dibuat.

### 3.3.2.5. Pengamatan Organoleptis

Sediaan gel nanopartikel diamati secara organoleptis yang meliputi warna dan bau.

### 3.3.2.6. Pengukuran Derajat Keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan dapar standar pH 4 dan pH 7. Kemudian elektroda dicelupkan ke dalam sediaan dan dicatat nilai pH yang tertera pada layar.

### 3.3.2.7. Pengukuran Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer Brookfield. Cara pengujian yaitu sediaan gel dimasukkan ke dalam wadah berupa gelas piala 250 mL, spindle yang sesuai diturunkan hingga batas poros tercelup ke dalam gel. Viskositas didapatkan dengan mengambil nilai viskositas pada ukuran poros dan kecepatan putar (rpm) tertentu.

### 3.3.2.8. Distribusi Ukuran Partikel

Penentuan ukuran dan potensial zeta dilakukan dengan cara mendispersikan gel nanopartikel dengan larutan asam asetat 1% pada suhu 25° C pada perbandingan 1/100 (v/v). Masing-masing pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali. Pengukuran tersebut dilakukan dengan menggunakan alat *Zetasizer*.

### 3.3.3. Uji Daya Penetrasi Perkutan Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida dan Pembandingnya Secara *In Vitro*

#### 3.3.3.1. Uji Perolehan Kembali (UPK) Kadar Verapamil Hidroklorida Dalam Sediaan

##### a. Gel Pembanding

Gel pembanding ditimbang secara seksama sebanyak  $\pm 1,0$  g, kemudian dilarutkan dengan aqua demineralisata dalam labu tentukur sampai 100,0 ml. Larutan tersebut disaring secara kuantitatif dengan menggunakan kertas saring. Kertas saring pertama kali dijenuhkan terlebih dahulu dengan aqua demineralisata, kemudian larutan sampel disaring dan 2-3 ml filtrat pertama dibuang. Filtrat yang dihasilkan dipipet sebanyak 1,0 ml dan diencerkan dalam labu tentukur sampai 10,0 ml dengan aqua demineralisata. Serapan larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum verapamil hidroklorida, dan dihitung kadarnya dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi. Percobaan dilakukan sebanyak 3 kali.

b. Gel Nanopartikel

Gel nanopartikel ditimbang secara seksama sebanyak  $\pm 1,0$  g, kemudian dilarutkan dengan aqua demineralisata dalam labu tentukur sampai 100,0 ml. Larutan tersebut disaring secara kuantitatif dengan menggunakan kertas saring. Kertas saring pertama kali dijenuhkan terlebih dahulu dengan aqua demineralisata, kemudian larutan sampel disaring dan 2-3 ml filtrat pertama dibuang. Filtrat yang dihasilkan dipipet sebanyak 1,0 ml dan diencerkan dalam labu tentukur sampai 10,0 ml dengan aqua demineralisata. Serapan larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum verapamil hidroklorida, dan dihitung kadarnya dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi. Percobaan dilakukan sebanyak 3 kali.

c. Gel Nanopartikel Dengan *Enhancer*

Gel nanopartikel dengan *enhancer* ditimbang secara seksama sebanyak  $\pm 1,0$  g, kemudian dilarutkan dengan aqua demineralisata dalam labu tentukur sampai 100,0 ml. Larutan tersebut disaring secara kuantitatif dengan menggunakan kertas saring. Kertas saring pertama kali dijenuhkan terlebih dahulu dengan aqua demineralisata, kemudian larutan sampel disaring dan 2-3 ml filtrat pertama dibuang. Filtrat yang dihasilkan dipipet sebanyak 1,0 ml dan diencerkan dalam labu tentukur sampai 10,0 ml dengan aqua demineralisata. Serapan larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum verapamil hidroklorida, dan dihitung kadarnya dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi. Percobaan dilakukan sebanyak 3 kali.

3.3.3.2. Pembuatan Kurva Kalibrasi Verapamil Hidroklorida Dalam Pelarut Dapar Fosfat pH 7,4 Dengan Metode Spektrofotometri

Verapamil hidroklorida ditimbang seksama sebanyak  $\pm 100,0$  mg, kemudian dilarutkan dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 pada labu tentukur sampai 100,0 mL. Didapat larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan tersebut, dipipet 25,0 mL, dan diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,4 dan dicukupkan volumenya sampai 250,0 mL sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Dari larutan 100 ppm, dipipet masing-masing 20,0 mL; 25,0 mL; 30,0 mL;

35,0 mL; 40,0 mL, dan 45,0 mL, kemudian diencerkan dalam dapar fosfat pH 7,4 masing-masing dalam labu tentukur sampai 100,0 mL, sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, dan 45 ppm. Pada larutan dengan konsentrasi 25 ppm diamati dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya. Panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum verapamil hidroklorida dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4, ditentukan dengan melakukan *scanning* pada panjang gelombang antara 200 – 400 nm. Serapan larutan-larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum, kemudian dihitung persamaan regresi linearnya.

#### 3.3.3.3. Uji Penetrasi Verapamil Hidroklorida (Angel, 2008 dan Anggraeni, 2008)

Membran yang digunakan adalah membran abdomen kulit tikus jantan *Sprague-Dawley* usia 8 – 10 bulan dengan berat  $\pm$  200 gram. Pertama-tama tikus dibius dengan eter hingga mati kemudian bulu tikus dicukur dengan hati-hati. Setelah itu kulit tikus disayat pada bagian perut dengan ketebalan  $0,6 \pm 0,1$  mm. Kemudian kulit tikus direndam dalam medium yang akan digunakan (dapar fosfat pH 7,4) selama 30 menit setelah itu disimpan dalam suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Kulit dapat digunakan pada rentang waktu 24 jam. Uji penetrasi dilakukan menggunakan sel difusi Franz dengan luas area difusi  $1,77\text{ cm}^2$  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 300 rpm. Kulit abdomen tikus kemudian diletakkan di antara 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, 300, 360 diambil sampel sebanyak 0,5 ml dari kompartemen reseptor menggunakan syringe dan segera digantikan dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 sejumlah volume yang sama. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam labu tentukur 5,0 ml untuk sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan *enhancer*. Kemudian dicukupkan volumenya dengan pelarut dapar fosfat pH 7,4 yang digunakan. Sampel diukur

serapannya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali.

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

$$Q = \frac{\{C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C \cdot S\}}{A} \quad (3.2)$$

Keterangan:

- Q = Jumlah kumulatif verapamil hidroklorida yang terpenetrasi per luas area difusi ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
- $C_n$  = Konsentrasi verapamil hidroklorida ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pada sampling menit ke-n
- V = Volume sel difusi Franz (14,0 ml)
- $\sum_{i=1}^{n-1} C$  = Jumlah konsentrasi verapamil hidroklorida ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pada sampling pertama (menit ke-10) hingga sebelum menit ke-n
- S = Volume sampling (0,5 ml)
- A = Luas area membran ( $1,77 \text{ cm}^2$ )

Kemudian dilakukan perhitungan fluks (kecepatan penetrasi tiap satuan waktu) obat berdasarkan hukum Fick I:

$$J = \frac{M}{S \times t} \quad (3.3)$$

Keterangan:

- J = Fluks ( $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ jam}^{-1}$ )
- M = Jumlah kumulatif verapamil hidroklorida yang melalui membran ( $\mu\text{g}$ )
- S = Luas area difusi ( $\text{cm}^2$ )
- t = Waktu (jam)

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

### 3.3.4. Uji Efektivitas Daya Antihipertensi Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida dan Pembandingnya Secara *In Vivo*

#### 3.3.4.1. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan ini dilakukan untuk mendapatkan dosis NaCl yang tepat sebagai induktor hipertensi. Pada uji ini dibandingkan tingkat efektivitas untuk menghasilkan tekanan darah tinggi pada hewan coba, antara pemberian NaCl 2% sebagai air minum (*ad libitum*) dibandingkan dengan pemberian larutan NaCl dosis 3 g/KgBB hewan coba. Pemberian induktor dilakukan selama 2 minggu.

a. Penyiapan induktor hipertensi (larutan NaCl 2% dan larutan stok NaCl dosis 3 g/200 g BB hewan coba )

Larutan NaCl 2% didapatkan dengan menimbang sebanyak 60 g NaCl (p), lalu dilarutkan ke dalam aqua demineralisata hingga volume 3000 mL, sedangkan larutan stok NaCl dosis 3 g/200 g BB hewan coba didapatkan dengan menimbang 40 g NaCl (p), lalu dilarutkan ke dalam aqua demineralisata hingga volume 200 mL (diestimasi larutan diberikan sebanyak 3 mL untuk hewan coba dengan berat badan 200 g).

b. Penyiapan hewan coba

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* sebanyak 6 ekor, kemudian dibagi menjadi 3 kelompok yang masing-masing terdiri dari 2 ekor tikus. Sebelum prosedur dilakukan tikus terlebih dahulu diaklimatisasi selama 1 minggu. Tikus kelompok pertama diperlakukan sebagai kelompok kontrol (normal), tikus kelompok kedua diberikan 50 mL larutan NaCl 2% sebagai air minum (*ad libitum*) untuk masing-masing tikus per hari, tikus kelompok ketiga diberikan larutan NaCl dosis 3 g/KgBB dengan cara disondekan sekali sehari. Banyaknya larutan NaCl yang disondekan bergantung

pada berat badan dari hewan coba. Prosedur ini dilakukan selama 2 minggu. Selama prosedur berlangsung tikus tetap diberi pakan seperti biasa dan berat badan tikus ditimbang pada awal dan akhir prosedur. Selanjutnya diukur tekanan darah pada masing-masing tikus.

c. Prosedur Pengukuran Tekanan Darah

Tekanan darah diukur dengan menggunakan alat *CODA<sup>®</sup> Non Invasive Blood Pressure Analyzer*. Tekanan darah yang diukur adalah tekanan darah sistolik, tekanan darah diastolik, dan tekanan darah arteri rata-rata (TDAR) yang memiliki rumus:

$$\text{TDAR} = 1/3 \text{ tekanan sistolik} + 2/3 \text{ tekanan diastolik} \quad (3.4)$$

3.3.4.2. Uji Efektivitas Daya Antihipertensi Sediaan Gel Nanopartikel

a. Penyiapan Induktor Hipertensi

Induktor hipertensi disiapkan dengan terlebih dahulu melihat hasil dari uji pendahuluan yang telah dilakukan sebelumnya.

b. Penyiapan Hewan Coba

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* sebanyak 30 ekor, kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus. Sebelum prosedur dilakukan tikus terlebih dahulu diaklimatisasi selama 1 minggu. Tikus kelompok pertama diperlakukan sebagai kelompok normal dengan hanya diberikan air minum biasa, tikus kelompok kedua diperlakukan sebagai kelompok kontrol negatif, tikus kelompok ketiga diperlakukan sebagai kelompok pembanding, tikus kelompok keempat diperlakukan sebagai kelompok uji I, dan tikus kelompok kelima diperlakukan sebagai kelompok uji II. Masing-masing tikus pada kelompok kedua hingga kelima diberikan induktor hipertensi terpilih. Waktu awal memulai prosedur dari tiap kelompok dibedakan berselang satu hari. Prosedur ini dilakukan selama 2 minggu. Selama prosedur berlangsung tikus tetap diberi pakan seperti biasa dan berat badan tikus ditimbang pada awal dan akhir prosedur.

c. **Prosedur Pengujian Daya Antihipertensi**

Pada hari pengujian dari masing-masing kelompok, terlebih dahulu diukur tekanan darah dari masing-masing tikus. Selanjutnya tikus dianestesi dengan menggunakan uap eter hingga pingsan dan dicukur bulunya pada bagian abdomen hingga tersisa lapisan kulit permukaan, kemudian diberikan sediaan gel secara topikal sebanyak 1 gram (untuk tikus dengan berat badan 200 gram) dengan menggunakan *o-ring* yang memiliki luas tertentu sesuai dengan kelompoknya pada bagian kulit yang telah dicukur tersebut dan direkatkan dengan isolasi. Tikus kelompok pertama tidak diberikan sediaan gel, tikus kelompok kedua diberikan sediaan gel namun tidak mengandung zat aktif, tikus kelompok ketiga diberikan sediaan gel verapamil hidroklorida biasa, tikus kelompok keempat diberikan sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida, dan tikus kelompok kelima diberikan sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida dengan penambahan *enhancer*. Setelah 1 jam, tikus diukur tekanan darahnya dan dibandingkan penurunan tekanan darah yang terjadi antara sebelum pengujian dengan setelah pengujian. Tekanan darah diukur dengan menggunakan alat *CODA<sup>®</sup> Non Invasive Blood Pressure Analyzer*.

**Tabel 3.3.** Kelompok perlakuan hewan uji

Kelompok	Perlakuan		Ket.
	Pemberian Induktor Hipertensi Terpilih	Pemberian Sediaan	
I	Tidak	Tidak	Normal
II	Ya	Gel tanpa zat aktif	Kontrol negatif
III	Ya	Gel verapamil hidroklorida	Pembanding
IV	Ya	Gel nanopartikel verapamil hidroklorida	Uji I
V	Ya	Gel nanopartikel verapamil hidroklorida dengan <i>enhancer</i>	Uji II

3.3.4.3. **Perhitungan Persen Efektivitas Penurunan Tekanan Darah**

Persen penurunan tekanan darah dapat dihitung dengan rumus di bawah ini:

**Universitas Indonesia**

$$\text{Persen penurunan tekanan darah} = \frac{P_0 - P_t}{P_0} \times 100\% \quad (3.5)$$

Dimana:  $P_t$  = Tekanan darah tikus pada waktu 1 jam setelah pemberian

$P_0$  = Tekanan darah tikus sebelum perlakuan

Persen efektivitas penurunan tekanan darah dapat dihitung dengan rumus di bawah ini:

$$\text{Persen efektivitas penurunan tekanan darah} = \frac{b - a}{a} \times 100\% \quad (3.6)$$

Dimana:  $a$  = Persen penurunan tekanan darah rata-rata kelompok pembanding

$b$  = Persen penurunan tekanan darah rata-rata kelompok uji

### 3.3.5. Analisis Data

Data yang didapatkan pada uji *in vivo* dianalisis secara statistik dengan ANOVA, signifikansi statistik diterima pada tingkat kepercayaan  $P < 0,05$  untuk melihat hubungan antar kelompok perlakuan. Bila terdapat pengaruh nyata, maka untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

### 3.3.6. Uji Histopatologis

Kulit tikus yang digunakan dalam uji dipotong dengan ukuran 0,5 cm x 1,5 cm, lalu dicuci dengan larutan *saline*. Dipisahkan dan disimpan dalam 10% formalin selama sekurangnya 24 jam sebelum digunakan, kemudian ditanamkan dalam parafin blok dan dipotong dengan ketebalan 3  $\mu\text{m}$ . Sayatan diletakkan di atas kaca objek dan diwarnai dengan hematoksilin-eosin, lalu diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya. Uji ini dilakukan untuk melihat perubahan morfologi dari kulit tikus yang mungkin terjadi akibat dari pemberian sediaan.

## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1. Optimasi Pembuatan Nanopartikel (Metode Gelasi Ionik)**

Nanopartikel sambung silang merupakan nanopartikel yang terbentuk dari proses sambung silang antara elektrolit dengan pasangan ionnya. Pembuatan nanopartikel sambung silang dapat dilakukan dengan menggunakan metode gelasi ionik (Maskevich (ed.), 2007).

Metode gelasi ionik melibatkan proses sambung silang antara polielektrolit dengan adanya pasangan ion multivalennya. Gelasi ionik seringkali diikuti dengan kompleksasi polielektrolit dengan polielektrolit yang berlawanan. Pembentukan ikatan sambung silang ini akan memperkuat kekuatan mekanis dari partikel yang terbentuk. Dalam penelitian ini digunakan kitosan dan tripolifosfat sebagai bahan pembentuk nanopartikel. Kitosan yang merupakan polimer kationik dapat bereaksi dengan anion multivalen seperti tripolifosfat. Prosedur sederhana tersebut meliputi pencampuran dua fase cair dimana fase yang satu mengandung kitosan dan fase yang satu mengandung anion multivalen yaitu tripolifosfat (Abdelhamid, 2004).

Fase cair pertama adalah larutan kitosan yang didapatkan dengan melarutkan kitosan sebanyak 200 mg dalam 100 mL larutan asam asetat 1% dengan menggunakan pengaduk magnetik. Cara pembuatan asam asetat 1% adalah dengan mencampurkan 10,0 mL asam asetat glasial dalam aquadest hingga 1000,0 mL. Larutan ini memiliki warna sedikit kekuningan, agak kental, dan beraroma khas asam asetat. Fase cair kedua adalah larutan tripolifosfat yang didapatkan dengan melarutkan natrium tripolifosfat sebanyak 40 mg dalam 40 mL aqua demineralisata dengan menggunakan pengaduk magnetik. Larutan ini tidak memiliki warna dan bau.

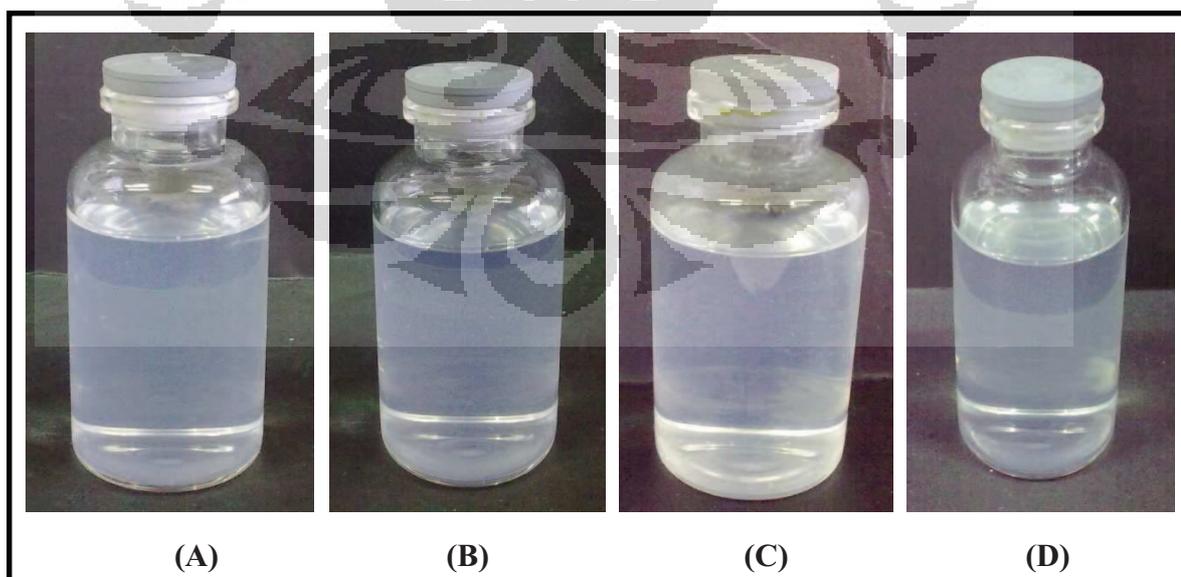
Selanjutnya kedua cairan tersebut dicampurkan dengan menggunakan empat metode pencampuran yang berbeda. Perbedaan yang ada adalah pada saat mencampurkan larutan tripolifosfat ke dalam larutan kitosan (tetesan dengan kecepatan tetap 0,75 mL/menit atau dituang langsung), banyaknya jumlah

verapamil hidroklorida yang digunakan (3 gram atau 5 gram), dan penggunaan *homogenizer* dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit atau tidak.

Perbedaan metode ini dimaksudkan untuk melihat perbedaan karakter pada nanopartikel sambung silang yang dihasilkan. Secara singkat perbedaan yang ada pada proses pembuatan nanopartikel verapamil hidroklorida dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan hasil pembuatan nanopartikel verapamil hidroklorida dapat dilihat pada Gambar 4.1.

**Tabel 4.1.** Formula nanopartikel sambung silang multi-ion beserta metode yang digunakan

Formula	Verapamil hidroklorida	Kitosan	Natrium tripolifosfat	Metode
A	3 gr	200 mg/100 mL	40 mg/40 mL	1a (ditetaskan)
B	5 gr	200 mg/100 mL	40 mg/40 mL	1b (ditetaskan)
C	5 gr	200 mg/100 mL	40 mg/40 mL	2 (ditetaskan lalu di <i>homogenizer</i> )
D	5 gr	200 mg/100 mL	40 mg/40 mL	3 (dituang langsung lalu di <i>homogenizer</i> )



**Gambar 4.1.** Larutan suspensi nanopartikel: formula A (A), formula B (B), formula C (C) dan formula D (D)

#### 4.1.1. Pembuatan Kurva Kalibrasi Verapamil Hidroklorida Dalam Pelarut Aqua Demineralisata Dengan Metode Spektrofotometri

Kurva serapan verapamil hidroklorida 25 ppm dalam pelarut aqua demineralisata menunjukkan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum pada dua titik yang berbeda yaitu pada 229 nm dan 279 nm. Panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah pada 279 nm. Spektrum serapan verapamil hidroklorida ditunjukkan pada Lampiran 2, sedangkan kurva serapan verapamil hidroklorida 25 ppm dalam aqua demineralisata dapat dilihat pada lampiran 3 dan 16. Persamaan regresi yang diperoleh yaitu:

$$y = 0,0115x + 0,0057 \text{ dengan } r = 0,9996$$

#### 4.1.2. Pengukuran Persen Efisiensi Penjerapan Verapamil Hidroklorida Dalam Suspensi Nanopartikel Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Suspensi nanopartikel yang dihasilkan perlu diukur pejerapannya untuk mengetahui jumlah verapamil hidroklorida yang terjerap di dalamnya. Jumlah verapamil hidroklorida yang terjerap dihitung berdasarkan metode yang digunakan Yaowalak, Mitrevej, dan Mueller, 2006. Pada metode ini digunakan dapar alkali borat pH 9,7 yang ditambahkan kepada suspensi nanopartikel. Dapar alkali borat pH 9,7 diharapkan dapat membuat nanopartikel kitosan-tripolifosfat mengkerut akibat interaksi pH, sehingga diasumsikan pada keadaan ini tidak ada verapamil hidroklorida yang terlepas atau keluar. Selanjutnya, suspensi disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 30 menit untuk mengendapkan nanopartikel yang mengkerut. Supernatan diambil, kemudian dihitung kadarnya. Hasil yang didapatkan merupakan verapamil hidroklorida bebas.

Persen efisiensi penjerapan rata-rata verapamil hidroklorida di dalam nanopartikel yang didapat dari perhitungan adalah sebesar  $57,02 \pm 1,58\%$  untuk formula B,  $55,71 \pm 0,28\%$  untuk formula C, dan  $60,25 \pm 1,55\%$  untuk formula D. Data uji pengukuran persen efisiensi penjerapan secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Dari data yang diperoleh, didapatkan bahwa efisiensi penjerapan dari verapamil hidroklorida pada pembuatan nanopartikel dengan menggunakan metode gelasi ionik masih cukup rendah. Hal ini kemungkinan diakibatkan dari

penggunaan zat aktif yang berupa verapamil hidroklorida memiliki sifat polar, sedangkan dari beberapa penelitian yang pernah dilakukan dengan menggunakan metode gelasi ionik ini lebih ditujukan untuk zat aktif yang memiliki sifat non-polar. Hasil efisiensi penjerapan yang didapatkan pada penelitian-penelitian tersebut cukup tinggi jika dibandingkan dengan penggunaan verapamil hidroklorida pada penelitian ini. Di samping itu, persen efisiensi penjerapan yang rendah pada penelitian ini diakibatkan karena tidak adanya pengaturan tingkat keasaman (pH) pada saat pembentukan nanopartikel dilakukan, sehingga tingkat disosiasi antara molekul obat, polimer, dan bahan penaut silang yang digunakan tidak diatur. Hal ini akan berdampak pada pembentukan gugus ionik antara obat, polimer, dan bahan penaut silang yang memungkinkan terjadinya ikatan menjadi sedikit, sehingga efisiensi penjerapan menjadi rendah.

**Tabel 4.2.** Efisiensi penjerapan verapamil hidroklorida dari masing-masing formula

Formula	Konsentrasi (ppm)	Serapan (A)	% Efisiensi penjerapan	% Efisiensi penjerapan rata-rata
<b>B</b>	1,371	0.0125	55,90	57,02 ± 1,58
	1,371	0,0123	58,13	
<b>C</b>	1,371	0.0126	55,51	55,71 ± 0,28
	1,371	0,0125	55,90	
<b>D</b>	1,371	0.0120	59,15	60,25 ± 1,55
	1,371	0,0118	61,34	

#### 4.1.3. Penetapan Distribusi Ukuran Partikel

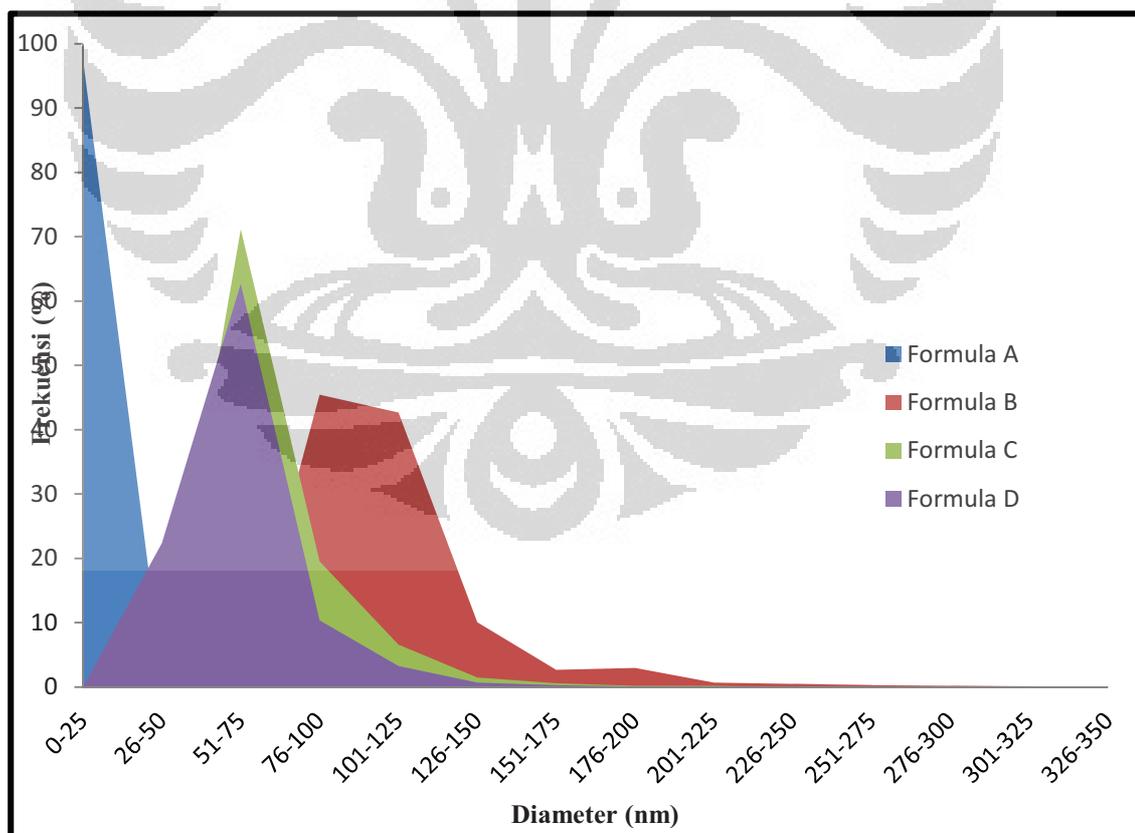
Ukuran dan distribusi ukuran partikel merupakan karakteristik yang paling penting di dalam suatu sistem nanopartikel. Banyak penelitian yang menunjukkan bahwa partikel dengan ukuran nano memiliki sejumlah kelebihan dibandingkan mikropartikel sebagai sistem penghantaran obat. Umumnya nanopartikel memiliki serapan intraseluler yang relatif lebih tinggi dan sasaran biologis yang lebih luas daripada mikropartikel (Jahanshahi, Monsen dan Zahra Babaei, 2008).

Distribusi ukuran partikel dinyatakan dalam indeks polidispersitas. Rentang indeks polidispersitas berada diantara 0 sampai dengan 1. Nilai indeks

polidispersitas mendekati 0 menunjukkan dispersi yang homogen. Sedangkan indeks polidispersitas dengan nilai lebih dari 0,5 menunjukkan heterogenitas yang tinggi (Avadi, et al., 2010).

**Tabel 4.3.** Data distribusi ukuran dan indeks polidispersitas nanopartikel berbagai formula

Formula	Distribusi Ukuran Partikel	Indeks polidispersitas
A	D(10%) = 10,9 nm; D(50%) = 12,4 nm; D(90%) = 17,5 nm	0,475
B	D(10%) = 81,1 nm; D(50%) = 96,5 nm; D(90%) = 141,6 nm	0,322
C	D(10%) = 52 nm; D(50%) = 61,8 nm; D(90%) = 90,6 nm	0,279
D	D(10%) = 46,1 nm; D(50%) = 54,9 nm; D(90%) = 80,2 nm	0,252



**Gambar 4.2.** Diagram distribusi ukuran partikel antar formula

Ukuran partikel ketiga formula diukur dengan menggunakan alat *zetasizer*. Semua metode pembuatan sudah menunjukkan hasil ukuran dalam rentang nanopartikel dimana nanopartikel dengan formula A menghasilkan ukuran sebesar 14,2 nm dengan indeks polidispersitas 0,475, formula B menghasilkan ukuran sebesar 110,8 nm dengan indeks polidispersitas 0,322, formula C sebesar 70,8 nm dengan indeks polidispersitas 0,279, dan formula D sebesar 62,8 nm dengan indeks polidispersitas 0,252. Pada pembuatan nanopartikel dengan metode gelasi ionik, ukuran nanopartikel dapat dipengaruhi oleh konsentrasi polimer yang digunakan, konsentrasi zat aktif yang digunakan, kecepatan tetesan agen penaut silang, dan kecepatan putaran pada saat pembuatan. Hasil ini dapat dilihat pada Lampiran 5-8, Tabel 4.3, dan Gambar 4.2.

Keempat metode pembuatan nanopartikel pada penelitian ini menggunakan jumlah polimer yang sama namun dengan jumlah konsentrasi zat aktif yang berbeda dan kecepatan putaran yang berbeda. Formula A menggunakan konsentrasi zat aktif yang lebih sedikit dibandingkan dengan formula B, C, dan D, dan kecepatan putaran 400 rpm dengan kecepatan tetesan 0,75 mL per menit. Formula B menggunakan kecepatan putaran yang sama dengan formula A namun dengan jumlah konsentrasi zat aktif yang lebih banyak dibandingkan dengan formula A. Formula C menggunakan metode yang sama dengan formula C namun setelah agen penaut silang (natrium tripolifosfat) habis ditambahkan, suspensi yang terbentuk langsung di-*homogenizer* dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Formula D agen penaut silang langsung dituang ke dalam larutan kitosan dan langsung di-*homogenizer* dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.

Hasil yang diperoleh menunjukkan formula A memiliki ukuran yang lebih kecil dari formula B, C, dan D karena konsentrasi zat aktif yang ditambahkan lebih kecil, namun pada pengukuran zeta potensial yang dilakukan terhadap suspensi nanopartikel dengan formula A tidak mendapatkan hasil. Kemungkinan hal ini terjadi karena konsentrasi zat aktif yang digunakan terlalu kecil. Oleh karena itu, variasi zat aktif pada formula B, C, dan D ditingkatkan agar mendapatkan hasil pada pengukuran zeta potensial. Hasil nanopartikel dengan formula B memiliki ukuran partikel yang lebih besar dibandingkan dengan nanopartikel dengan formula C dan D, karena pada metode ini kecepatan yang

digunakan pada saat pembuatan nanopartikel lebih rendah dari formula C dan D. Pada formula C menunjukkan ukuran yang lebih kecil dari formula B, namun lebih besar dari formula D, hal ini terjadi karena kemungkinan partikel yang terbentuk akibat proses penetasan mengalami pengecilan ukuran kembali akibat putaran *homogenizer* dengan kecepatan 3000 rpm yang digunakan. Pada formula D, pada saat pencampuran langsung di-*homogenizer* dengan kecepatan 3000 rpm sehingga interaksi antara gugus amin dari kitosan dengan ion negatif tripolifosfat membentuk nanopartikel dengan ukuran yang lebih kecil namun tidak terlalu signifikan jika dibandingkan dengan formula C. Penggunaan formula D memiliki keunggulan dibandingkan dengan formula C, yaitu waktu pembuatan lebih cepat karena larutan natrium tripolifosfat langsung dituangkan bukan melalui proses penetasan. Namun perlu untuk diperhatikan bahwa kecepatan putaran dapat menyebabkan terjadinya gelembung udara pada saat pembuatan nanopartikel yang dapat mempengaruhi proses interaksi antara gugus amin dari kitosan dengan ion negatif tripolifosfat sehingga mengganggu proses pembentukan nanopartikel.

#### 4.1.4. Potensial Zeta

Selain ukuran partikel, potensial zeta merupakan salah satu karakteristik nanopartikel yang penting. Alasan utama melakukan pengujian zeta potensial adalah untuk memprediksi kestabilan larutan koloid. Interaksi antara partikel memegang peranan penting dalam kestabilan larutan koloid. Potensial zeta adalah nilai yang menunjukkan gaya tolak-menolak antara partikel-partikel. Sistem larutan koloid distabilkan oleh adanya gaya tolak-menolak elektrostatis. Semakin besar gaya tolak menolak antar partikel, akan menyebabkan partikel akan sulit berdekatan untuk membentuk agregat. Nanopartikel dengan potensial zeta (+/-) 30 mV menunjukkan suspensi yang stabil (Jahanshahi, Monsen dan Zahra Babaei, 2008).

Pada hasil pengujian potensial zeta, suspensi nanopartikel dengan metode A tidak dapat terukur. Hal ini kemungkinan karena konsentrasi zat aktif yang ada di dalamnya terlalu kecil sehingga tidak dapat terukur. Potensial zeta suspensi nanopartikel dengan metode lainnya menunjukkan memiliki muatan positif. Hal ini berhubungan dengan tipe mekanisme pembentukan nanopartikel secara gelasi

ionik, dimana muatan positif dari gugus amin kitosan dinetralisasi melalui interaksi dengan muatan negatif dari polianion natrium tripolifosfat. Residual gugus amin dari kitosan yang bermuatan positif menimbulkan nilai potensial zeta yang positif (Avadi et al, 2010). Formula B menunjukkan nilai potensial zeta sebesar +15,73 mV, formula C menunjukkan potensial zeta sebesar +21,82 mV, dan formula D menunjukkan potensial zeta sebesar +25,46 mV. Nilai tersebut menunjukkan bahwa nanopartikel dengan formula C dan D sebagai suspensi koloid yang mendekati stabil karena sudah mendekati nilai 30 mV. Hasil ini dapat dilihat pada Lampiran 9-11.

#### 4.1.5. Mikroskop Transmisi Elektron (*Transmission Electron Microscope*)

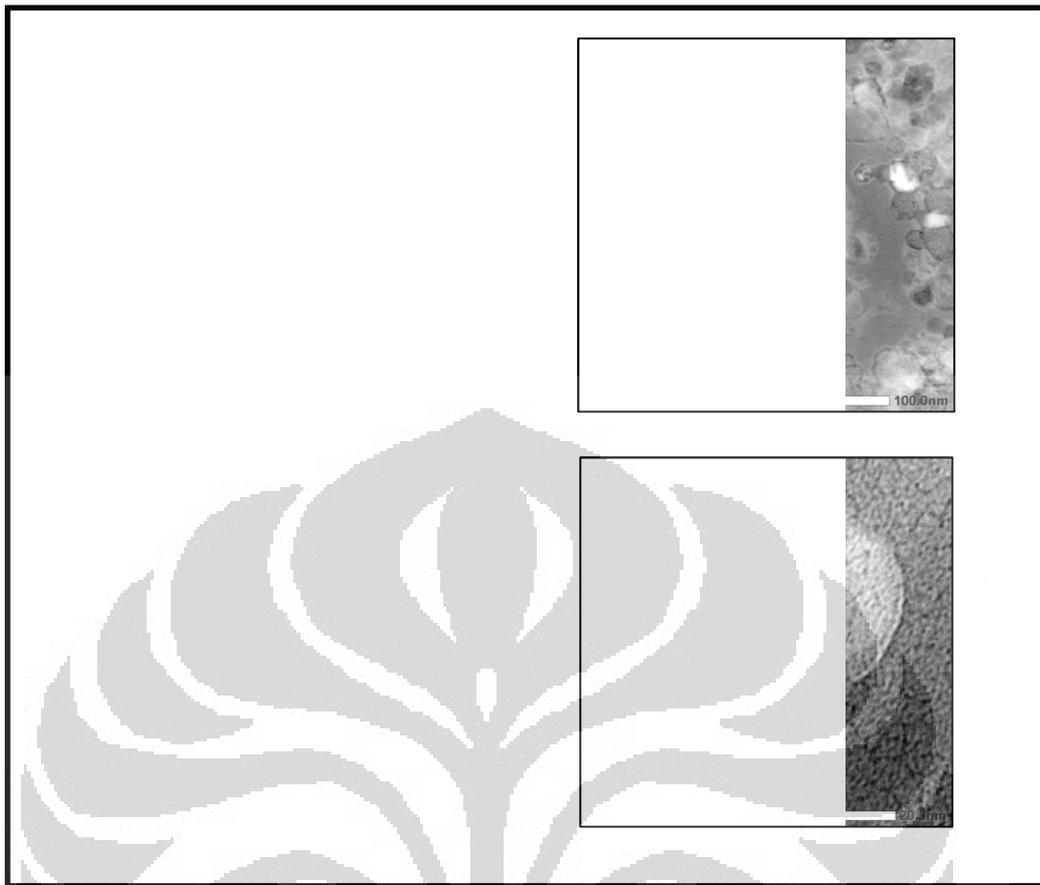
Mikroskop transmisi elektron digunakan untuk menguji morfologi nanopartikel dan konfirmasi ukuran partikel yang dihasilkan dari pengukuran distribusi ukuran partikel (Avadi, 2010). Pada pembuatan nanopartikel dengan menggunakan formula A dan B nanopartikel yang dihasilkan belum cukup sferis. Sedangkan pada penggunaan formula C dan D menghasilkan nanopartikel yang sferis. Hasil ini dapat dilihat pada Gambar 4.3.

#### 4.1.6. Pengeringan Nanopartikel yang Dihasilkan

Nanopartikel yang didapatkan dibekukan dengan nitrogen cair dan diliofilisasi selama 12 jam untuk mendapatkan nanopartikel kitosan-natrium tripolifosfat kering dengan menggunakan alat *freeze dryer*. Hasil ini dapat dilihat pada Gambar 4.4.

#### 4.1.7. Morfologi Permukaan Serbuk Nanopartikel Dengan SEM

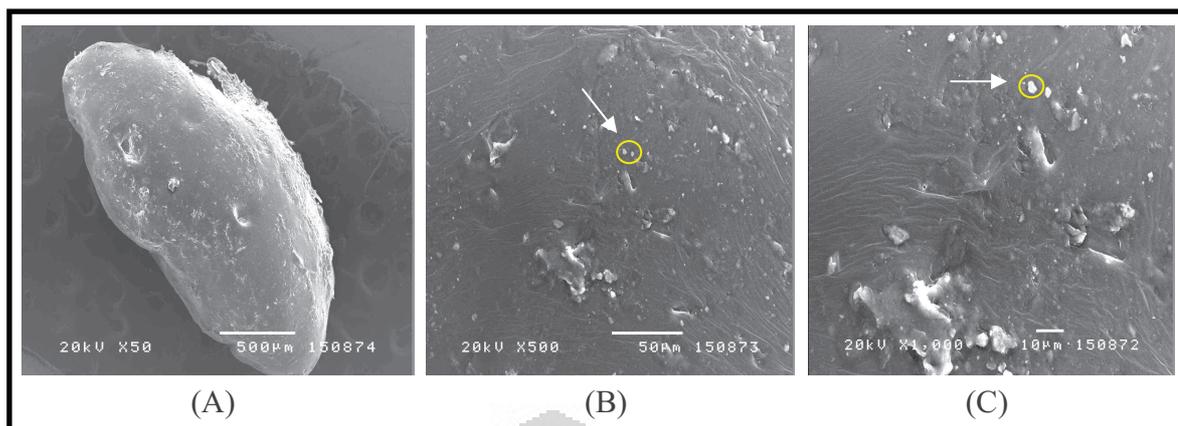
*Scanning electron microscopy* digunakan untuk mempelajari morfologi serbuk nanopartikel yang mengandung verapamil hidroklorida dengan eksipien kitosan-tripolifosfat. Hasil ini dapat dilihat pada Gambar 4.5.



**Gambar 4.3.** Hasil mikroskop transmisi elektron: (A) formula A, (B) formula B, (C) formula C, (D) formula D



**Gambar 4.4.** Hasil pengeringan nanopartikel dengan menggunakan *freeze dryer*



**Gambar 4.5.** Hasil SEM serbuk nanopartikel kering; (A) perbesaran 50x, (B) perbesaran 500x, dan (C) perbesaran 1000x

#### 4.1.8. Analisis FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*)

Spektrum FT-IR dari kitosan dan nanopartikel kitosan-natrium tripolifosfat dilakukan pada daerah  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ . Spektrum FT-IR digunakan untuk menentukan keberadaan dari natrium tripolifosfat dan kitosan dalam nanopartikel kering. Serbuk disiapkan menggunakan KBr dibentuk *pellet* (M.R. de Moura et al., 2009).

Hasil analisis FT-IR dapat dilihat pada Gambar 4.6 untuk kitosan normal dan kitosan – tripolifosfat. Dari gambar, dapat dilihat bahwa kitosan mempunyai bilangan gelombang  $1585\text{ cm}^{-1}$  menandakan adanya gugus N–H untuk amin primer,  $1655\text{ cm}^{-1}$  untuk gugus C=O amida dan  $1421\text{ cm}^{-1}$  C-N amida. Pada bilangan gelombang  $3000 - 3400\text{ cm}^{-1}$  terdapat puncak daerah serapan yang menunjukkan adanya gugus -OH- pada struktur glukosamin. Puncak – puncak daerah serapan tersebut merupakan karakteristik dari struktur polisakarida pada kitosan.

Bilangan gelombang pada  $3449\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya *stretching* vibrasi dari gugus  $-\text{NH}_2$  dan  $-\text{OH}$ . Pada spektrum FT-IR dari kitosan yang tertaut silang, puncak pada bilangan gelombang  $1655\text{ cm}^{-1}$  menghilang dan muncul 2 puncak baru pada  $1645\text{ cm}^{-1}$  dan  $1554\text{ cm}^{-1}$ . Hilangnya bilangan gelombang tersebut kemungkinan diakibatkan terjadinya ikatan antara ion fosfor dan amonium. Kitosan yang mengalami tautan silang juga menunjukkan puncak untuk P=O pada bilangan gelombang  $1155\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.1.9. Penetapan Nanopartikel Verapamil Hidroklorida Terpilih

Hasil karakterisasi dari keempat formula (A, B, C, dan D) dibandingkan untuk menetapkan nanopartikel terpilih guna dijadikan sebagai sediaan pada tahap selanjutnya (pembuatan sediaan gel nanopartikel). Karakter dari formula nanopartikel terpilih adalah memiliki ukuran partikel yang terkecil (berukuran nano), memiliki potensial zeta yang terbesar, memiliki efisiensi penjerapan yang tinggi, memiliki morfologi yang baik, dan dapat diterima pada konfirmasi dengan FT-IR. Berdasarkan hasil karakterisasi tersebut menunjukkan bahwa formula D adalah yang terbaik dengan hasil ukuran partikel 62,8 nm, potensial zeta +25,46 mV, memiliki efisiensi penjerapan sebesar  $60,25 \pm 1,55\%$  memiliki morfologi yang sferis (baik), serta pada konfirmasi dengan FT-IR menunjukkan terjadinya tautan silang. Selanjutnya formula D pada pembuatan nanopartikel verapamil hidroklorida ini diaplikasikan pada tahapan pembuatan sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida. Hasil perbandingan karakteristik nanopartikel masing-masing formula dapat dilihat pada Tabel 4.4.

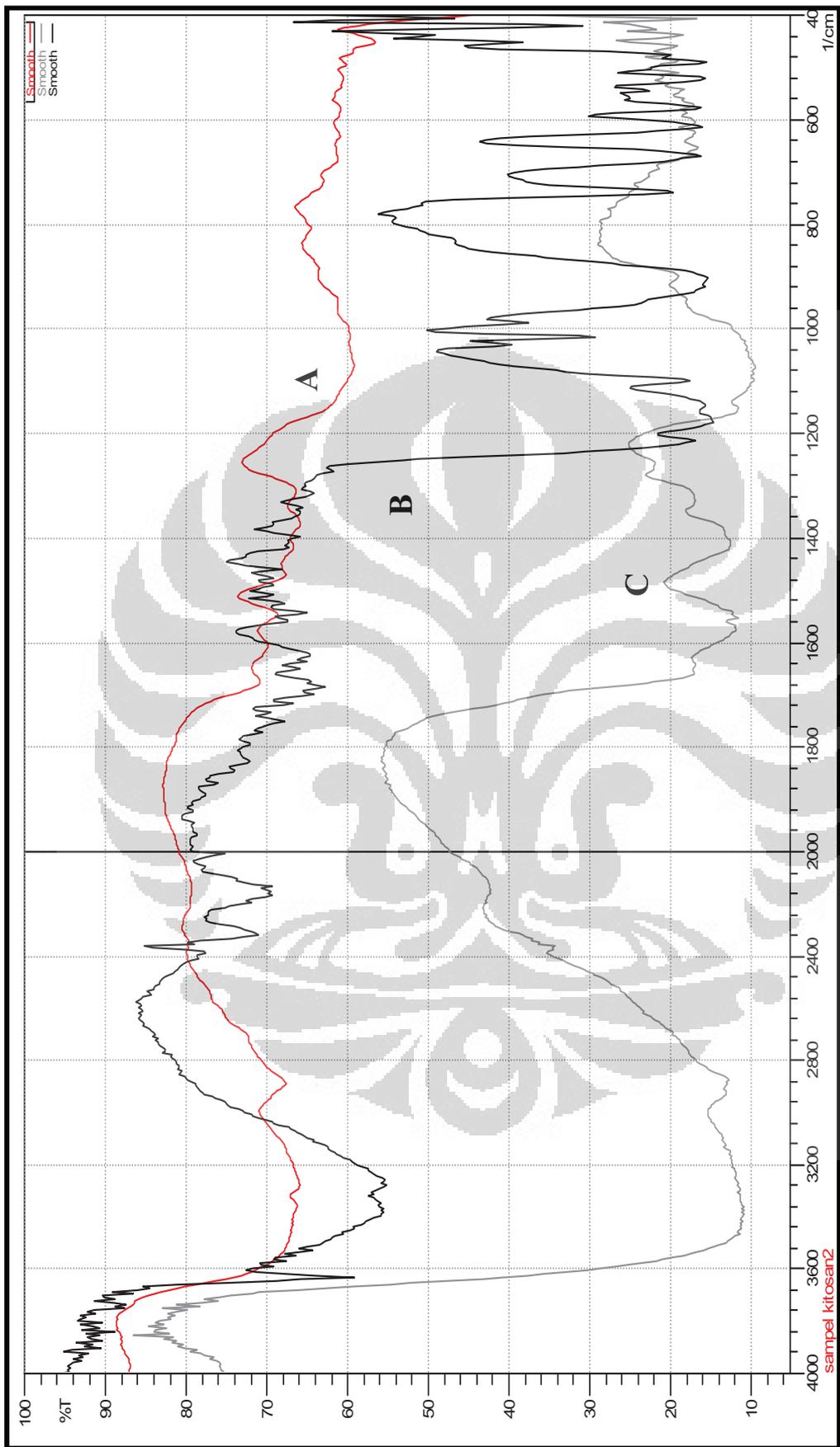
**Tabel 4.4.** Perbandingan karakteristik antar formula nanopartikel

<b>Formula</b>	<b>Ukuran Partikel</b>	<b>Potensial Zeta</b>	<b>% Efisiensi Penjerapan</b>	<b>Morfologi</b>	<b>Konfirmasi FT-IR</b>
A	14,2 nm	NA	-	Kurang sferis	OK
B	110,8 nm	+15,73 mV	$57,02 \pm 1,58\%$	Kurang sferis	OK
C	70,8 nm	+21,82 mV	$55,71 \pm 0,28\%$	Sferis	OK
D	62,8 nm	+25,46 mV	$60,25 \pm 1,55\%$	Sferis	OK

## 4.2. Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida

### 4.2.1. Pembuatan Eksiipien Kitosan - Natrium Tripolifosfat (Sebagai Basis Gel)

Pada penelitian ini eksiipien yang digunakan untuk pembuatan gel adalah kitosan tripolifosfat. Pemilihan penggunaan kitosan tripolifosfat sebagai bahan eksiipien pembentuk gel dimaksudkan untuk menyamakan bahan seperti yang digunakan pada pembuatan nanopartikel verapamil hidroklorida itu sendiri.



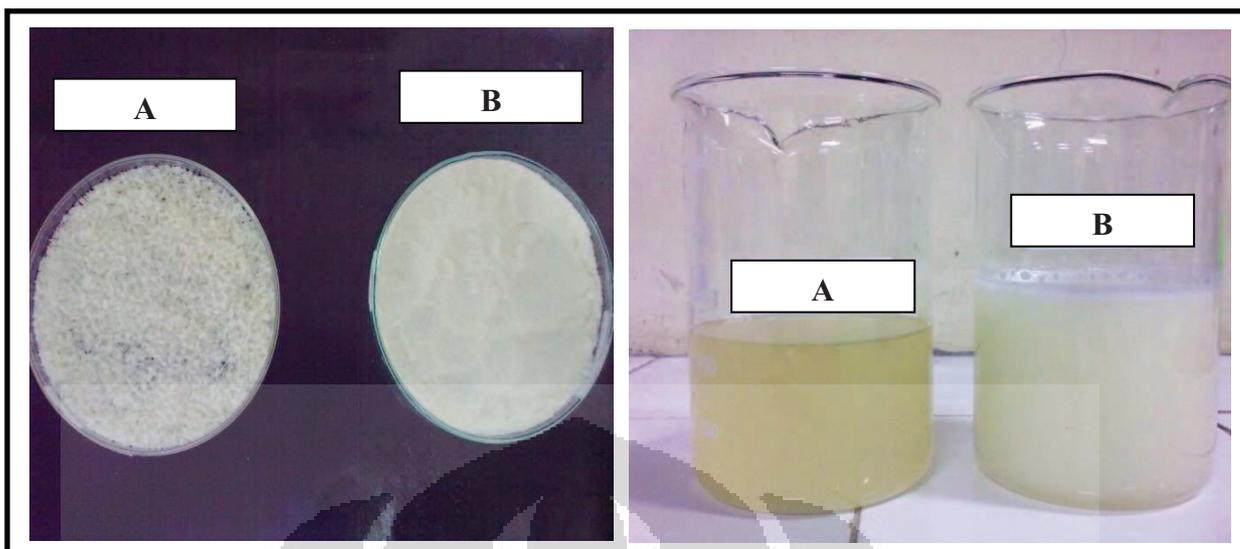
**Gambar 4.6.** Spektrum infra merah: (A) kitosan, (B) natrium tripolifosfat, dan (C) kitosan – tripolifosfat

Pembuatan kitosan tripolifosfat dilakukan dengan menggunakan metode yang sama dengan pembuatan nanopartikel yaitu metode taut silang ionik, dimana akan terjadi reaksi antara gugus  $\text{NH}_3^+$  dari kitosan dengan gugus  $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  dari natrium tripolifosfat. Pada proses pembuatan kitosan tripolifosfat pH larutan natrium tripolifosfat yang digunakan adalah 9,08. Pada derajat keasaman tersebut natrium tripolifosfat terdisosiasi menjadi ion hidroksil dan tripolifosfat, dan keduanya dapat berkompetisi untuk dapat berinteraksi dengan  $\text{NH}_3^+$  dari kitosan. Hal tersebut menyebabkan berkurangnya ion tripolifosfat yang berinteraksi dengan  $\text{NH}_3^+$  dari kitosan sehingga dihasilkan kitosan derajat taut silang kecil, dimana peningkatan derajat taut silang menghasilkan penurunan daya mengembang (Bhumkar, Devika, dan Pokharkar, 2006). Untuk penelitian ini, dipilih hasil sintesis dengan derajat taut silang yang kecil agar didapatkan hasil eksipien yang dapat mengembang untuk dapat dijadikan sebagai basis pada sediaan gel.

Setelah dilakukan sintesis, diperoleh hasil larutan kitosan tripolifosfat yang berwarna putih kekuningan dimana sebelumnya larutan kitosan berwarna kuning. Selain itu terjadi perubahan pH dari 3,0 menjadi 4,1. Hal itu disebabkan terjadi peningkatan pH saat penambahan natrium tripolifosfat yang mempunyai pH 9,0. Selanjutnya larutan tersebut dikeringkan dalam oven dengan suhu  $50^\circ\text{C}$ . Pemilihan suhu ini dimaksudkan agar kitosan tripolifosfat yang dihasilkan mengering secara perlahan dan tidak hangus.

#### 4.2.2 Pembuatan Sediaan Gel

Pada penelitian ini dibuat sediaan gel dengan menggunakan eksipien kitosan tripolifosfat. Agar diperoleh sediaan gel yang terbaik dilakukan optimasi konsentrasi eksipien kitosan tripolifosfat yang akan digunakan. Variasi konsentrasi yang dilakukan adalah 3,5%, 4% dan 5%. Dari hasil optimasi tersebut, konsentrasi 3,5% dan 4% ternyata memiliki kekentalan yang belum baik, sedangkan konsentrasi 5% sudah memiliki kekentalan yang cukup baik, oleh sebab itu pada konsentrasi 5%, eksipien kitosan tripolifosfat digunakan sebagai eksipien pembuatan gel. Konsentrasi 5% eksipien kitosan tripolifosfat digunakan untuk pembuatan gel.



**Gambar 4.7.** Penampilan serbuk dan larutan kitosan – kitosan tripolifosfat;  
Kiri: (A) serbuk kitosan, (B) serbuk kitosan tripolifosfat hasil sintesis;  
Kanan: (A) larutan kitosan, (B) larutan kitosan tripolifosfat hasil sintesis

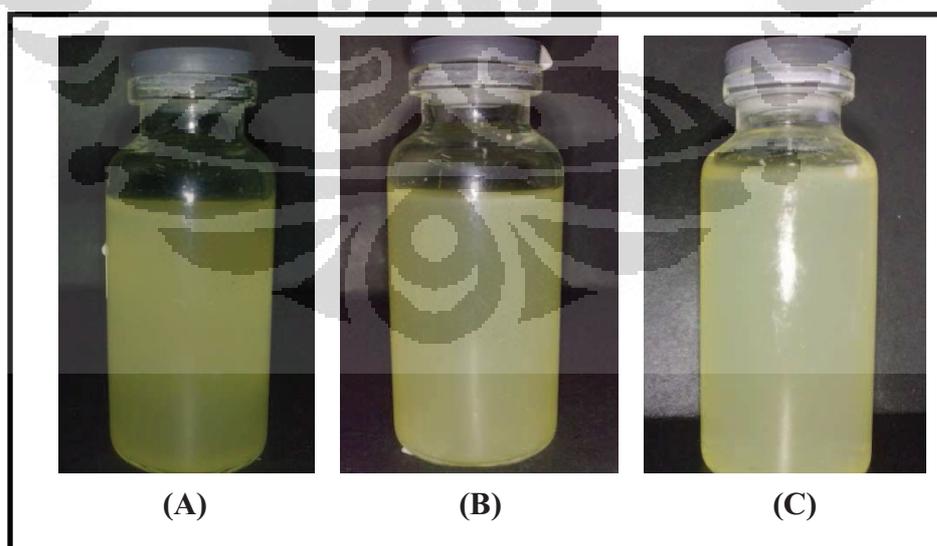
Formula gel yang dibuat dibagi menjadi 3 (tiga) yaitu pembandingan yang menggunakan verapamil hidroklorida (tanpa dibuat nanopartikel), formula gel yang menggunakan suspensi nanopartikel verapamil hidroklorida, dan yang menggunakan suspensi nanopartikel verapamil hidroklorida dengan penambahan propilen glikol sebagai peningkat penetrasi (*enhancer*). Konsentrasi propilen glikol yang ditambahkan adalah 5% karena setelah dilakukan optimasi penambahan propilen glikol ternyata meningkatkan konsistensi sediaan gel sehingga hanya digunakan sebesar 5% dimana peningkatan konsistensi tidak terlalu besar dan konsentrasi propilen glikol yang digunakan masih dalam kisaran penggunaan sebagai peningkat penetrasi. Pembuatan ketiga formula dimaksudkan untuk membandingkan tingkat efektivitas pada pengujian secara *in vitro* dan *in vivo* berikutnya. Selanjutnya dibandingkan pengaruh nanopartikel dalam sediaan dan pengaruh peningkat penetrasi yang digunakan terhadap sediaan gel verapamil hidroklorida biasa. Formula yang digunakan dalam pembuatan sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida dapat dilihat pada Tabel 4.4.

**Tabel 4.5.** Formula sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida (500 gram)

Formula	Suspensi nanopartikel verapamil hidroklorida (mL)	Serbuk kitosan-natrium tripolifosfat (g)	Propilen glikol (g)	Larutan Aqua demineralisata: As. Asetat 1% (40:100)
Nanopartikel	140	25	-	ad. 500 gram
Nanopartikel + <i>Enhancer</i>	140	25	25	ad. 500 gram

#### 4.2.3. Pengamatan Organoleptis

Dari hasil pengamatan ketiga sediaan gel memiliki karakteristik berupa warna kuning muda, berbau lemah asam asetat, dan tampak homogen. Adapun warna kuning muda berasal dari eksipien kitosan tripolifosfat yang berwarna kuning. Bau lemah asam asetat yang timbul karena adanya pelarut asam asetat yang digunakan. Ketiga sediaan tidak menunjukkan adanya gelembung udara, walaupun pada saat pembuatan dihasilkan gelembung udara akibat pengadukan namun gelembung udara akan hilang setelah dilakukan penyimpanan sediaan. Hasil pengamatan organoleptis dapat dilihat pada Gambar 4.8.



**Gambar 4.8.** Pengamatan organoleptis (A) gel pembanding, (B) gel nanopartikel, (C) gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi (*enhancer*)

#### 4.2.4. Pengukuran Derajat Keasaman (pH)

pH sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi secara berturut-turut adalah 5,04, 5,10, dan 5,30.

#### 4.2.5.. Pengukuran Viskositas

Pada pengukuran viskositas menunjukkan adanya perbedaan viskositas dari ketiga sediaan. Pada sediaan gel pembanding dengan sediaan gel nanopartikel tidak memiliki perbedaan yang cukup besar dimana sediaan gel nanopartikel memiliki nilai viskositas yang lebih besar yaitu 38.000 cps sementara sediaan gel nanopartikel hanya memiliki viskositas sebesar 36.000 cps. Hal tersebut terjadi karena pada sediaan gel nanopartikel zat aktif yang digunakan adalah suspensi nanopartikel verapamil hidroklorida yang pada pembuatannya menggunakan kitosan dan natrium tripolifosfat sebagai polimer pembentuk nanopartikel. Sedangkan pada sediaan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi terjadi perbedaan yang cukup besar dimana viskositas sediaan adalah 48.000 cps. Hal ini terjadi karena adanya propilen glikol yang digunakan sebagai peningkat penetrasi. Propilen glikol juga dapat berfungsi sebagai *plastisizer* sehingga menyebabkan adanya peningkatan kekentalan sediaan jika dibandingkan dengan formula gel tanpa penambahan propilen glikol. Selain itu dengan adanya propilen glikol juga mengurangi penambahan air pada formula gel sehingga meningkatkan viskositas sediaan gel. Pengukuran nilai viskositas ini dilakukan dengan menggunakan poros nomer 6 dan dengan kecepatan putar sebesar 5 rpm. Hasil ini dapat dilihat pada Lampiran 15.

#### 4.2.6. Distribusi Ukuran Partikel

Pengukuran terhadap distribusi ukuran partikel dilakukan kembali pada saat nanopartikel telah dimasukkan ke dalam sediaan gel. Hal ini perlu dilakukan untuk mengetahui tingkat pembesaran yang terjadi dari nanopartikel setelah dibuat dalam bentuk sediaan gel. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pembesaran terjadi sebesar 6,7 kali dari ukuran awal untuk nanopartikel di dalam sediaan gel nanopartikel (menjadi 418,7 nm), sedangkan pada sediaan gel nanopartikel

dengan peningkatan penetrasi pembesaran terjadi sebesar 8,2 kali dari ukuran awal (menjadi 512,6 nm). Nilai tersebut masih memenuhi kriteria sebagai sediaan nanopartikel berdasarkan ketentuan yang berlaku. Hasil ini dapat dilihat pada lampiran 12-13.

#### **4.3. Uji Daya Penetrasi Perkutan Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida dan Pembandingnya Secara *In Vitro***

##### **4.3.1. Uji Perolehan Kembali (UPK) Kadar Verapamil Hidroklorida Dalam Sediaan**

Pada uji perolehan kembali ini digunakan pelarut aqua demineralisata karena verapamil hidroklorida mudah larut dalam air. Dilakukan juga proses penyaringan dan pencucian karena adanya basis gel yang tidak larut dalam aquadest. Larutan sampel diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum verapamil hidroklorida yaitu 279 nm. Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil kadar yang diperoleh dengan kadar yang sebenarnya. Kadar perolehan kembali verapamil hidroklorida untuk sediaan gel pembanding sebesar 99,9%, gel nanopartikel sebesar 100,8%, dan gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi sebesar 100,04%. Hasil ini dapat dilihat pada Lampiran 18.

##### **4.3.2. Pembuatan Kurva Kalibrasi Verapamil Hidroklorida Dalam Pelarut Dapar Fosfat pH 7,4 Dengan Metode Spektrofotometri**

Kurva serapan verapamil hidroklorida 25 ppm dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4 menunjukkan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum pada dua titik yang berbeda yaitu pada 229 nm dan 279 nm. Kurva serapan ini dapat dilihat pada Lampiran 4. Panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah pada 279 nm. Kurva kalibrasi ditunjukkan pada gambar. Persamaan regresi yang diperoleh yaitu:

$$y = 0,0106x + 0,0016 \text{ dengan } r = 0,9998$$

#### 4.3.3. Uji Penetrasi Verapamil Hidroklorida

Uji penetrasi dapat dilakukan baik secara *in vivo* maupun secara *in vitro*. Dalam penelitian ini, dilakukan uji penetrasi secara *in vitro* dengan menggunakan sel difusi Franz. Gambar skematik sel difusi Franz dapat dilihat pada Lampiran 1. Pengujian dilakukan untuk mengetahui jumlah verapamil hidroklorida yang dapat berpenetrasi melalui kulit selama interval waktu tertentu. Membran yang digunakan yaitu kulit bagian abdomen tikus jantan dari galur Sprague-Dawley yang berumur 8-10 minggu, dengan berat  $\pm 150$  gram dengan ketebalan membran  $0,6 \pm 0,1$  mm dan luas membran  $1,77 \text{ cm}^2$ . Kulit hewan sering digunakan secara luas untuk menggantikan kulit manusia terutama dikarenakan sulitnya untuk mendapatkan kulit manusia, walaupun memang terdapat beberapa variabilitas di antara keduanya. Alasan penggunaan kulit tikus sebagai membran karena cukup mudah didapat dan telah dilaporkan bahwa permeabilitas kulit tikus yang telah dicukur bulunya mirip dengan permeabilitas kulit manusia. Kulit manusia memiliki koefisien permeabilitas sebesar  $92,27 \text{ cm/jam} \times 10^5$ , sedangkan kulit tikus yang sudah dicukur bulunya memiliki koefisien permeabilitas sebesar  $103,08 \text{ cm/jam} \times 10^5$  (Wester dan Maibach, 1990).

Terlebih dahulu rambut tikus dicukur karena dikhawatirkan bahan kimia yang diaplikasikan dapat menempel pada keratin rambut sehingga akan mengurangi jumlah zat aktif yang akan mencapai stratum korneum. Rambut tikus dicukur dengan hati-hati agar kulit tidak terluka karena kulit yang luka akan berpengaruh pada penetrasi zat aktif. Lemak subkutan harus dihilangkan terlebih dahulu agar tidak mengganggu penetrasi obat masuk ke dalam kulit. Kulit dapat disimpan dalam lemari pendingin sebelum digunakan tetapi sebaiknya digunakan kulit yang masih segar, kulit dapat digunakan dalam rentang waktu tidak lebih dari 24 jam. Selanjutnya kulit dihidrasi dengan menggunakan larutan medium dapar fosfat pH 7,4 dengan tujuan untuk mengembalikan kulit ke kondisi semula sebelum disimpan dalam lemari pendingin. Hal penting lainnya yang perlu diperhatikan adalah zat aktif dalam hal ini verapamil hidroklorida harus larut dalam cairan kompartemen reseptor yang digunakan. Dapar fosfat pH 7,4 dipilih sebagai simulasi kondisi pH cairan tubuh manusia. Pengadukan pada kompartemen reseptor berfungsi untuk homogenisasi yang dapat mempercepat

proses pelarutan zat yang terpenetrasi. Pengadukan dilakukan dengan menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan konstan. Suhu dijaga dengan menggunakan *water jacket* pada  $37^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  dengan menggunakan air yang dialirkan dari termostat. Suhu  $37^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  ini menggambarkan suhu tubuh manusia. Suhu harus tetap dijaga karena suhu juga berpengaruh pada banyaknya zat aktif yang dapat terdifusi masuk ke dalam kulit. Semakin tinggi suhu, maka akan semakin banyak zat aktif yang larut dalam kompartemen reseptor sehingga nilai serapan yang diukur akan semakin besar (Ansel, 1989). Membran harus kontak dengan cairan reseptor agar sediaan yang diaplikasikan pada membran dapat berpenetrasi langsung menembus kulit menuju cairan reseptor.

Banyaknya hal-hal secara teknis yang harus diperhatikan dalam uji penetrasi, maka setiap perbedaan perlakuan dapat memberikan hasil yang berbeda. Oleh karena itu, dalam penelitian ini diusahakan untuk mengeliminasi segala kemungkinan-kemungkinan yang dapat mengganggu uji penetrasi dengan cara mengkondisikan perlakuan yang sama pada ketiga sediaan tersebut. Kecepatan pengadukan dan pengambilan sampel juga dapat mempengaruhi hasil uji penetrasi. Makin besar kecepatan pengadukan maka obat dalam kompartemen reseptor akan menjadi semakin homogen sehingga diusahakan menggunakan kecepatan yang sama yaitu 300 rpm pada setiap perlakuan. Tempat dan alat pengambilan sampel juga mempengaruhi hasil uji penetrasi. Adanya variasi dalam ketebalan kulit dapat juga memberikan hasil yang berbeda tetapi sedapat mungkin diusahakan ketebalan kulit yang digunakan kurang lebih sama yaitu sekitar 0,6 mm.

Pengujian dilakukan selama 6 jam dan pengambilan sampel dilakukan sebanyak 9 kali yaitu pada menit ke-10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, dan 360. Sampel setiap kali diambil sebanyak 0,5 ml dan diencerkan dalam labu ukur 5,0 ml. Berarti telah dilakukan pengenceran sebanyak 10 kali. Setiap kali dilakukan pengambilan sampel larutan kompartemen reseptor diganti kembali sebanyak yang diambil menggunakan larutan dapar fosfat pH 7,4 untuk menjaga volume cairan reseptor tetap konstan selama percobaan. Dalam percobaan difusi, larutan dari kompartemen reseptor dipindahkan dan diganti terus-menerus dengan pelarut baru untuk menjaga konsentrasi selalu rendah. Keadaan ini disebut sebagai suatu

keadaan "sink", dimana kompartemen donor sebagai sumber dan kompartemen reseptor sebagai "sink" (Martin, 1993). Dengan demikian dalam perhitungan digunakan faktor koreksi akibat adanya proses pengenceran yang dilakukan. Selanjutnya dilakukan pengukuran serapan sampel dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum verapamil hidroklorida dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 yaitu pada 279 nm. Panjang gelombang maksimum didapatkan dari hasil pembuatan kurva serapan. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis karena prosesnya lebih cepat dan mudah, walaupun selektivitas dan spesifisitasnya kurang baik. Untuk setiap formula, uji penetrasi dilakukan sebanyak tiga kali dengan menggunakan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi yang juga disiapkan sebanyak tiga kali.

Hasil pengujian penetrasi melalui membran kulit tikus dari sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi secara berturut-turut adalah  $518,70 \pm 2,86 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;  $819,71 \pm 2,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; dan  $984,76 \pm 7,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Berdasarkan jumlah verapamil hidroklorida terpenetrasi dapat dihitung persentase jumlah verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dari dosis yang diaplikasikan. Persen verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dari sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi secara berturut-turut yaitu  $7,21 \pm 0,04\%$ ;  $11,40 \pm 0,04\%$ ; dan  $13,69 \pm 0,12\%$ . Kemudian fluks diperoleh pada keadaan *steady state* dengan mengikuti kaidah hukum Fick. Adapun fluks dari ketiga sediaan, yaitu sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi secara berturut-turut adalah  $60,93 \pm 0,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ ;  $121,88 \pm 0,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ ; dan  $148,33 \pm 1,17 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ . Berdasarkan hasil tersebut dapat dilihat bahwa sediaan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi memiliki kecepatan penetrasi obat yang paling tinggi jika dibandingkan dengan gel pembanding dan gel nanopartikel saja tanpa adanya bahan peningkat penetrasi. Hasil jumlah verapamil hidroklorida terpenetrasi dapat dilihat pada Gambar 4.8, sedangkan fluks dari ketiga sediaan dapat dilihat pada Gambar 4.10.

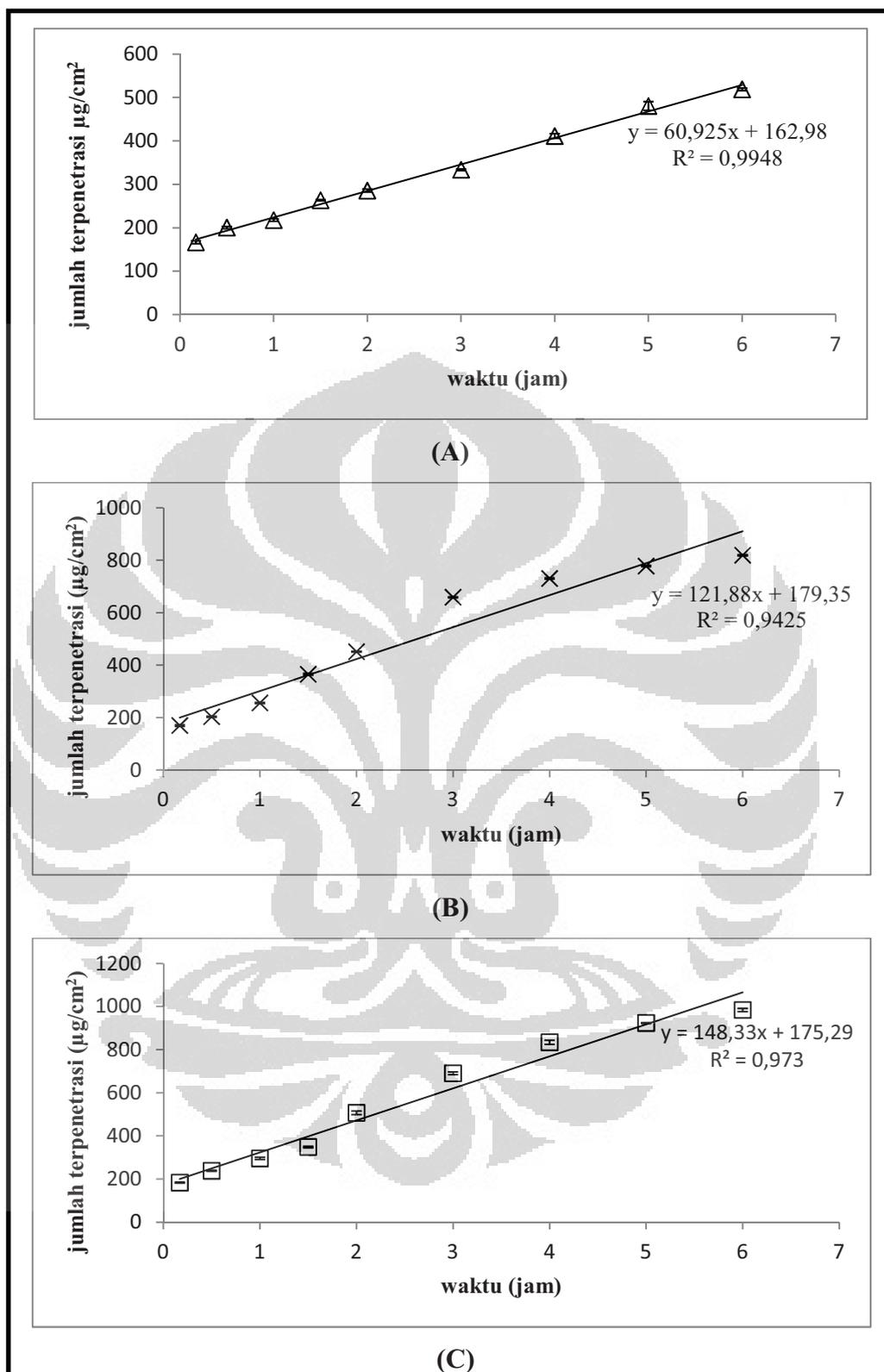
Dari hasil pengujian tersebut ternyata bentuk sediaan yang menggunakan zat aktif dalam bentuk nanopartikel memiliki kecepatan penetrasi yang lebih besar

jika dibandingkan dengan sediaan gel yang tidak menggunakan nanopartikel. Nanopartikel disini dapat meningkatkan penetrasi obat melalui kulit. Tingginya tingkat penetrasi pada gel nanopartikel dimungkinkan karena ukurannya yang kecil dan dapat membawa zat aktif yang lebih banyak dalam bentuk vesikel. Selain itu dengan adanya peningkat penetrasi juga dapat meningkatkan penetrasi obat. Namun hasil yang didapatkan antara sediaan gel nanopartikel dan sediaan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi tidak begitu jauh berbeda, hal ini mungkin disebabkan karena penambahan bahan peningkat penetrasi yang berupa propilen glikol mempengaruhi kekentalan (viskositas) dari sediaan sehingga mempengaruhi penetrasi. Hal ini didukung pula oleh data pengukuran nilai viskositas dimana sediaan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi yang mengandung propilen glikol memiliki kekentalan yang lebih besar dari pada sediaan gel pembanding dan sediaan gel nanopartikel. Untuk itu perlu diperhatikan penambahan zat yang berfungsi sebagai peningkat penetrasi agar tidak mempengaruhi kekentalan dari sediaan.

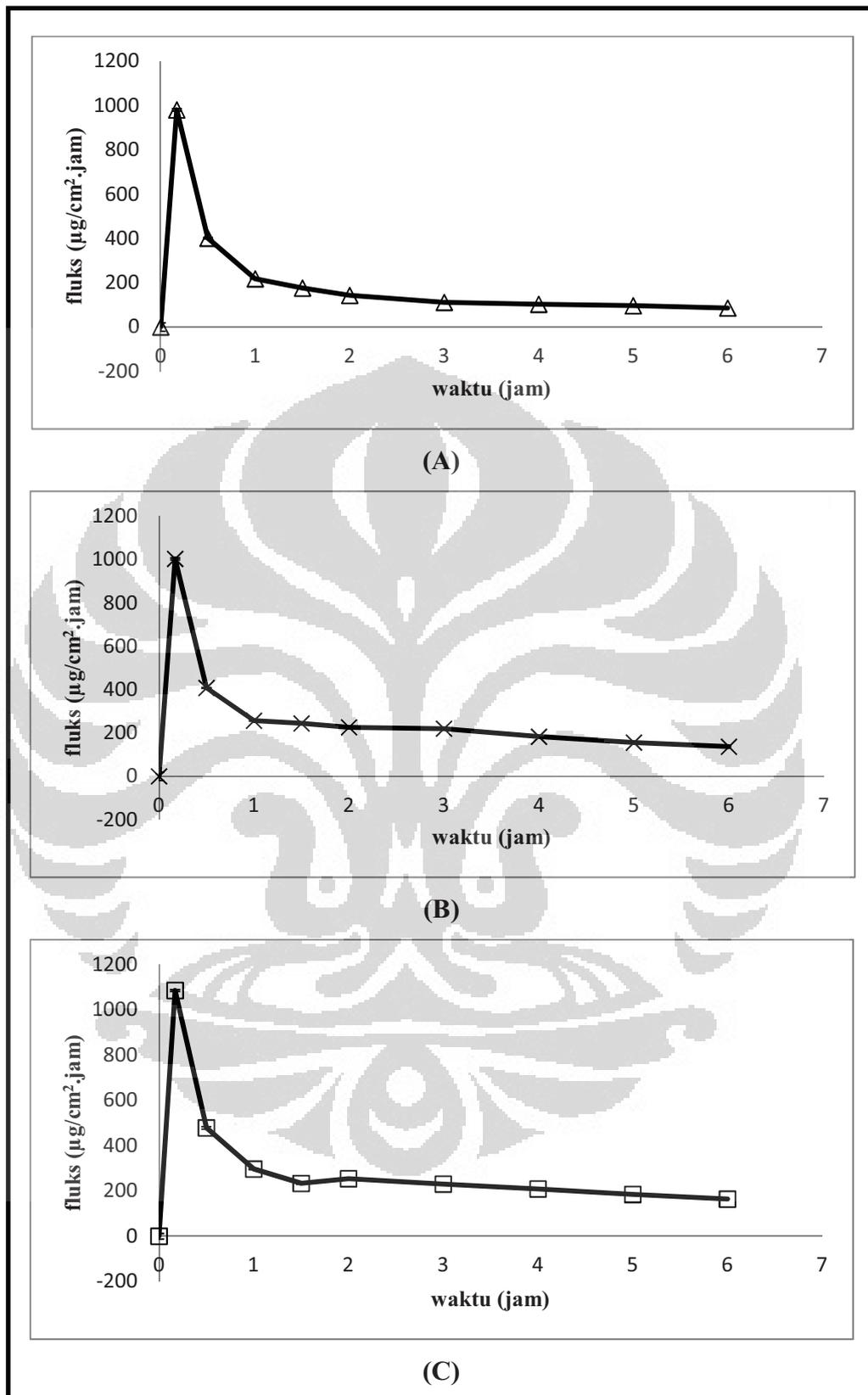
#### **4.4. Uji Efektivitas Daya Anti-hipertensi Sediaan Gel Nanopartikel Verapamil Hidroklorida dan Pembandingnya Secara *In Vivo***

##### **4.4.1. Uji Pendahuluan**

Uji pendahuluan ini dilakukan untuk mendapatkan dosis NaCl yang tepat sebagai induktor hipertensi. Pada uji ini dibandingkan tingkat efektivitas untuk menghasilkan tekanan darah tinggi pada hewan coba, antara pemberian NaCl 2% sebagai air minum (*ad libitum*) dibandingkan dengan pemberian larutan NaCl dosis 3 g/KgBB hewan coba. Pemberian induktor dilakukan selama 2 minggu yang dianggap dapat membuat tikus menjadi hipertensi.

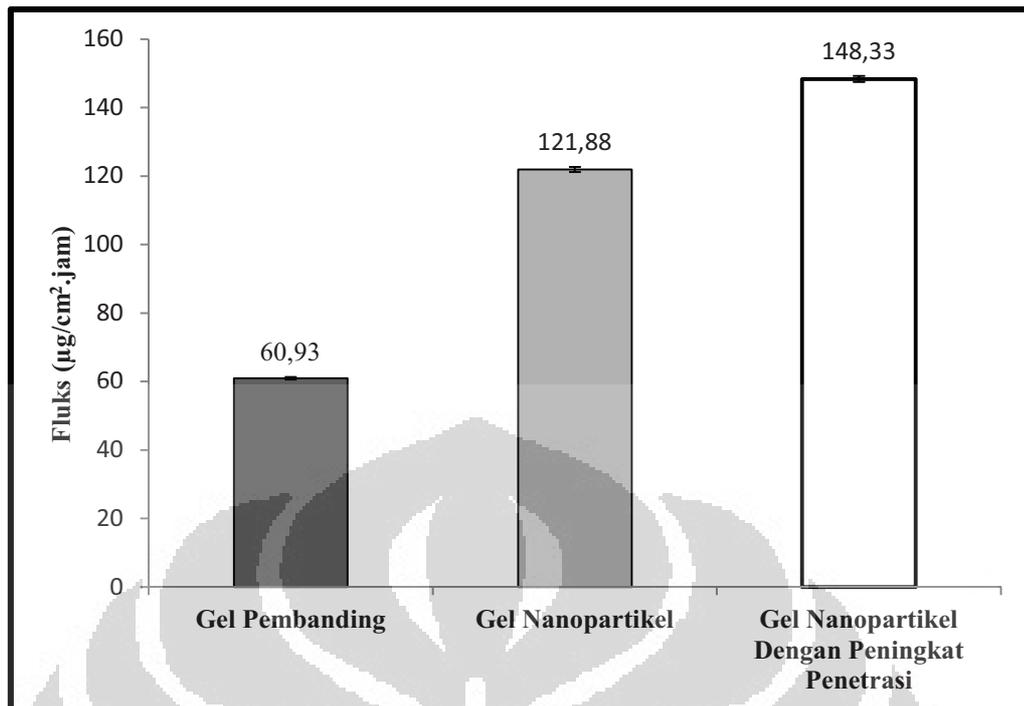


**Gambar 4.9.** Jumlah kumulatif verapamil hidroklorida yang terpenetrasi per satuan luas membran: (A) gel pembanding (B) gel nanopartikel (C) gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi

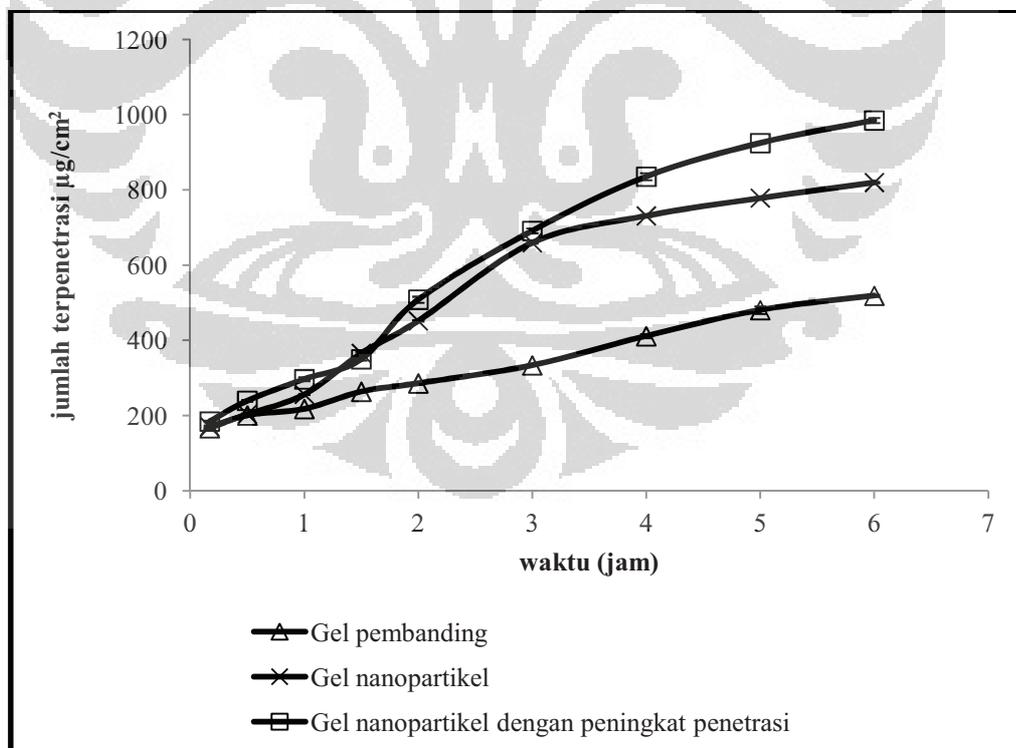


**Gambar 4.10.** Fluks verapamil hidroklorida: (A) gel pembanding (B) gel nanopartikel (C) gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi

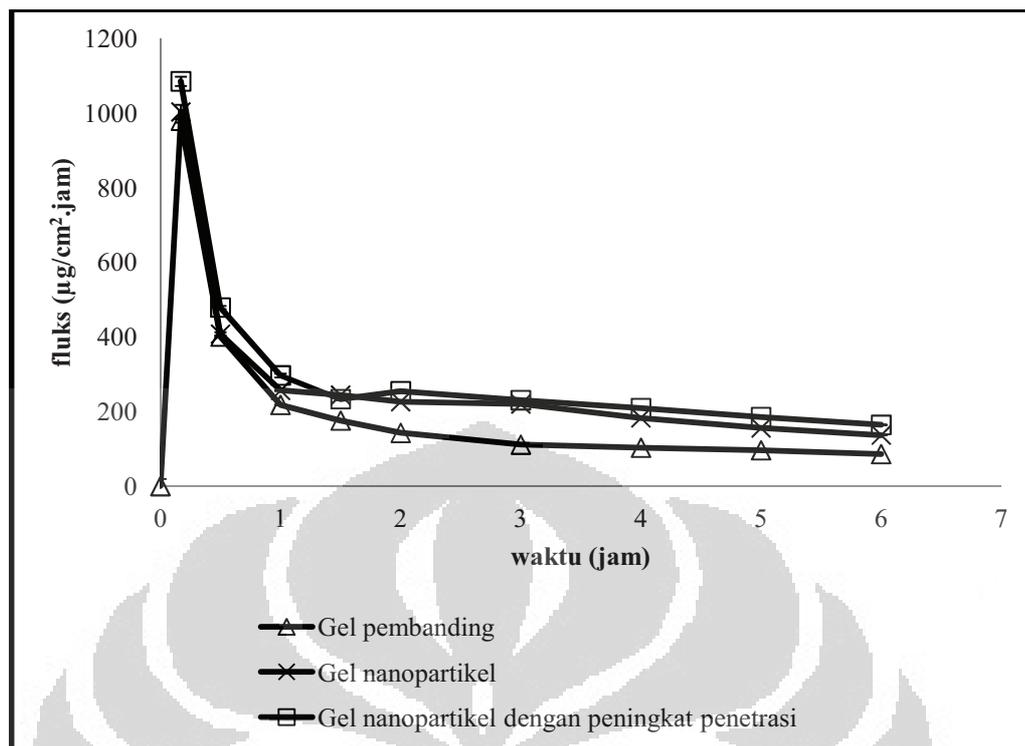
Universitas Indonesia



**Gambar 4.11.** Fluks sediaan verapamil hidroklorida



**Gambar 4.12.** Jumlah kumulatif verapamil hidroklorida terpenetrasi



**Gambar 4.13.** Fluks verapamil hidroklorida tiap waktu pengambilan

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* sebanyak 6 ekor, kemudian dibagi menjadi 3 kelompok yang masing-masing terdiri dari 2 ekor tikus. Sebelum prosedur dilakukan tikus terlebih dahulu diaklimatisasi selama 1 minggu. Tikus kelompok pertama diperlakukan sebagai kelompok kontrol (normal), tikus kelompok kedua diberikan 50 mL larutan NaCl 2% sebagai air minum (*ad libitum*) untuk masing-masing tikus per hari, tikus kelompok ketiga diberikan larutan NaCl dosis 3 g/KgBB dengan cara disondekan sekali sehari. Banyaknya larutan NaCl yang disondekan bergantung pada berat badan dari hewan coba. Prosedur ini dilakukan selama 2 minggu. Selama prosedur berlangsung tikus tetap diberi pakan seperti biasa dan berat badan tikus ditimbang pada awal dan akhir prosedur. Selanjutnya diukur tekanan darah pada masing-masing tikus.

Hasil dari uji pendahuluan ini menunjukkan bahwa tikus yang diberikan NaCl 2% sebagai air minum (*ad libitum*) dapat lebih efektif membuat tikus menjadi hipertensi dibandingkan dengan pemberian larutan NaCl dosis 3 g/KgBB

hewan coba dengan jalan disondekan. NaCl 2% sebagai air minum (*ad libitum*) digunakan sebagai metode induksi pada tahapan pengujian selanjutnya (uji efektivitas gel). Hasil ini dapat dilihat pada Tabel 4.5 dan Tabel 4.6.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* yang berusia 3-4 bulan dengan berat badan  $\pm 200$  gram. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan, dimaksudkan untuk mengurangi pengaruh hormonal pada hewan coba betina. Tikus putih jantan usia 3-4 bulan diperkirakan memiliki aktivitas fisiologis yang optimal karena pada usia tersebut tikus dianggap cukup dewasa. Faktor usia berperan dalam meningkatnya prevalensi hipertensi. Berat badan  $\pm 200$  gram tikus dianggap optimal untuk percobaan pengukuran tekanan darah karena hewan coba akan mengalami penurunan berat badan yang cukup banyak selama proses induksi hipertensi.

Sebelum memulai percobaan, tikus diaklimatisasi dengan lingkungan percobaan selama 2 minggu agar dapat beradaptasi dengan lingkungan barunya. Tikus yang digunakan dipilih secara acak lengkap dengan anggapan bahwa tikus memiliki galur, jenis kelamin, berat badan, makanan dan lingkungan yang sama. Namun demikian, tikus yang dipilih hanya tikus yang dianggap sehat dengan ciri-ciri tingkah laku normal, aktif, mata jernih, dan bulu yang bersih.

Percobaan ini menggunakan larutan natrium klorida dalam induksi hipertensi dikarenakan faktor ekonomis, mudah diperoleh, non-invasif dan praktis dalam meningkatkan tekanan darah tikus. Hormon natriuretik yang diproduksi di ginjal merupakan faktor kunci dari patogenesis hipertensi. Hormon ini dikatakan memiliki aksi secara tidak langsung melalui pengaturan konsentrasi natrium dan kalsium intraseluler. Kalsium disebutkan memiliki efek protektif terhadap hipertensi. Hipotesis natrium menerangkan hubungan kenaikan tekanan darah dengan jumlah asupan natrium. Dengan meningkatnya jumlah asupan natrium, maka produksi hormon natriuretik akan meningkat, menurunkan transport ion natrium pada sel dan meningkatkan jumlah ion intraseluler, meningkatkan jumlah ion kalsium intraseluler, yang kemudian akan menyebabkan meningkatnya kontraktilitas vaskuler dan meningkatnya resistensi pembuluh darah sehingga menyebabkan tekanan darah akan meningkat (Flowers et al., 1990).

**Universitas Indonesia**

Setelah pemberian natrium klorida selama beberapa hari, tikus akan mengalami perubahan fisik yang ditandai dengan bulu yang berdiri dan kotor (berwarna kecoklatan), mudah rontok, berbau tidak sedap, berat badan dan nafsu makan yang menurun dan volume urin yang bertambah. Setelah pemberian induksi, tikus mengalami perubahan tingkah laku menjadi lebih agresif dari sebelumnya.

**Tabel 4.6.** Perbandingan berat badan antar kelompok perlakuan

Tikus	Berat Badan (gram)		Keterangan
	Minggu 0	Minggu 2	
I	198,5	214,7	Normal
II	160,8	199,3	
III	205,6	159,1	NaCl 2% <i>ad libitum</i>
IV	210,5	164,7	
V	213,5	190,4	Sonde 3 g/KgBB
VI	224,6	215,8	

Tekanan darah diukur dengan menggunakan alat *CODA<sup>®</sup> Non Invasive Blood Pressure Analyzer*. Pengukuran tekanan darah ini merupakan pengukuran tekanan darah dengan metode tidak langsung. Penggunaan alat *CODA<sup>®</sup> Non Invasive Blood Pressure Analyzer* merupakan penggunaan metode *tail cuff plethysmography* menggunakan manset pompa khusus dan detektor denyut nadi. Keduanya dipasang pada ekor tikus dan dihubungkan dengan rekorder tekanan darah. Tikus dipanaskan pada alas panas 37° C (tanpa pemanasan denyut nadi tikus tidak dapat dideteksi oleh rekorder). Manset pompa ditekan pada ekor tikus dan diikuti dengan pemasangan detektor dengan tepat. Denyut nadi pertama diperiksa, dan jika baik, denyut nadi tersebut direkam. Pompa akan memompa secara otomatis sampai aliran darah tikus berhenti dan tidak dapat dideteksi lagi. Tekanan yang diperoleh sebanding dengan tekanan darah sistolik dan diastolik (Waynforth, 1980).

Tabel 4.7. Perbandingan tekanan darah rata-rata antar kelompok perlakuan

Tikus	Rata-rata tekanan darah sistolik (mmHg)	SD (n=6)	Rata-rata tekanan darah diastolik (mmHg)	SD (n=6)	Tekanan darah arteri rata-rata (mmHg)	Rata-rata tekanan darah sistolik/diastolik/TDAR (mmHg)	Ket.
I	142	6,01	106	5,24	118	147,5 / 110,5 / 123	Normal
II	153	11,78	115	9,47	127		
III	162	5,67	118	13,67	132	166,5 / 118 / 134	NaCl 2% ( <i>ad libitum</i> )
IV	171	8,25	118	18,97	135		
V	141	15,56	101	20,65	114	143,5 / 104,5 / 117	Sonde 3 g/KgBB
VI	146	6,25	108	4,34	120		

Kelebihan metode tidak langsung antara lain adalah tidak invasif dan tidak memerlukan pembedahan, dapat digunakan untuk memperoleh pengukuran berulang dari tekanan darah sistolik dan diastolik pada hewan coba yang sadar selama studi untuk waktu yang singkat maupun lama, lebih mudah dalam mengoperasikannya, selain itu juga dapat digunakan untuk menapis hipertensi sistolik atau perbedaan mendasar pada tekanan darah sistolik pada sejumlah besar hewan coba. Kekurangan metode tidak langsung antara lain adalah hanya dapat mengukur tekanan darah dalam sampel siklus jantung yang sangat kecil, menimbulkan *stress* yang signifikan dan mengganggu multipel aspek pada sistem kardiovaskular, tingkat akurasi pengukuran tekanan darah secara tidak langsung pada hewan coba sering dipertanyakan, dan keterbatasan utama metode ini antara lain tidak cocok untuk mengukur tekanan diastolik (Kurtz et al., 2005).

#### 4.4.2. Uji Efektivitas Daya Antihipertensi Sediaan Gel Nanopartikel

##### 4.4.2.1. Penyiapan Induktor Hipertensi

Induktor hipertensi yang digunakan adalah NaCl 2% sebagai air minum (*ad libitum*). Pemberian induktor tersebut, berdasarkan hasil pada uji pendahuluan

dapat lebih efektif membuat tikus menjadi hipertensi dibandingkan dengan pemberian larutan NaCl dosis 3 g/KgBB hewan coba dengan jalan disondekan.

#### 4.4.2.2. Penyiapan Hewan Coba

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* sebanyak 30 ekor, kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus. Banyaknya jumlah tikus yang digunakan dihitung berdasarkan rumus Federer, yaitu:

$$(n-1)(t-1) > 15 \quad (4.1)$$

Dimana  $t$  = jumlah perlakuan; dan  $n$  = jumlah ulangan dari tiap perlakuan. Tikus dibagi atas 5 kelompok.

$$(n-1)(5-1) > 15$$

$$n > 4$$

Berdasarkan rumus tersebut dibuat lima perlakuan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus, sehingga dibutuhkan sebanyak 25 ekor tikus. Adapun pembagian tikus ke dalam kelompok-kelompok dilakukan secara acak dengan anggapan bahwa unit hewan uji tersebut bersifat homogen, sehat, dan bersih.

Sebelum prosedur dilakukan tikus terlebih dahulu diaklimatisasi selama 1 minggu. Tikus kelompok pertama diperlakukan sebagai kelompok normal dengan hanya diberikan air minum biasa, tikus kelompok kedua diperlakukan sebagai kelompok kontrol negatif, tikus kelompok ketiga diperlakukan sebagai kelompok pembandingan, tikus kelompok keempat diperlakukan sebagai kelompok uji I, dan tikus kelompok kelima diperlakukan sebagai kelompok uji II. Masing-masing tikus pada kelompok kedua hingga kelima diberikan induktor hipertensi terpilih. Waktu awal memulai prosedur dari tiap kelompok dibedakan berselang satu hari. Prosedur ini dilakukan selama 2 minggu. Selama prosedur berlangsung tikus tetap diberi pakan seperti biasa dan berat badan tikus ditimbang pada awal dan akhir prosedur.

#### 4.4.2.3. Prosedur Pengujian Daya Antihipertensi

Pada hari pengujian dari masing-masing kelompok, terlebih dahulu diukur tekanan darah dari masing-masing tikus. Selanjutnya tikus dianestesi

dengan menggunakan uap eter hingga pingsan dan dicukur bulunya pada bagian abdomen hingga tersisa lapisan kulit permukaan, kemudian diberikan sediaan gel secara topikal sebanyak 1 gram (untuk tikus dengan berat badan 200 gram) dengan menggunakan *o-ring* yang memiliki luas tertentu sesuai dengan kelompoknya pada bagian kulit yang telah dicukur tersebut dan direkatkan dengan isolasi. Tikus kelompok pertama tidak diberikan sediaan gel, tikus kelompok kedua diberikan sediaan gel namun tidak mengandung zat aktif, tikus kelompok ketiga diberikan sediaan gel verapamil hidroklorida biasa, tikus kelompok keempat diberikan sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida, dan tikus kelompok kelima diberikan sediaan gel nanopartikel verapamil hidroklorida dengan penambahan *enhancer*. Pembagian kelompok ini secara ringkas dapat dilihat pada Tabel 4.7. Setelah 1 jam, tikus diukur tekanan darahnya dan dibandingkan penurunan tekanan darah yang terjadi antara sebelum pengujian dengan setelah pengujian. Tekanan darah diukur dengan menggunakan alat CODA<sup>®</sup> Non Invasive Blood Pressure Analyzer (lihat Lampiran 14).

**Tabel 4.8.** Kelompok perlakuan hewan uji

Kelompok	Perlakuan		Ket.
	Pemberian Induktor Hipertensi Terpilih	Pemberian Sediaan	
I	Tidak	Tidak	Normal
II	Ya	Gel tanpa zat aktif	Kontrol negatif
III	Ya	Gel verapamil hidroklorida	Pembanding
IV	Ya	Gel nanopartikel verapamil hidroklorida	Uji I
V	Ya	Gel nanopartikel verapamil hidroklorida dengan <i>enhancer</i>	Uji II

Banyaknya jumlah penggunaan gel disesuaikan dengan berat badan tikus yang ujikan. Diasumsikan bahwa tikus dewasa umumnya memiliki berat badan rata-rata adalah 200 gram. Kepada tikus tersebut diberikan gel verapamil hidroklorida sebanyak 1 gram dengan dosis verapamil hidroklorida sebanyak 10 mg. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada hewan coba secara *in vivo*,

**Universitas Indonesia**

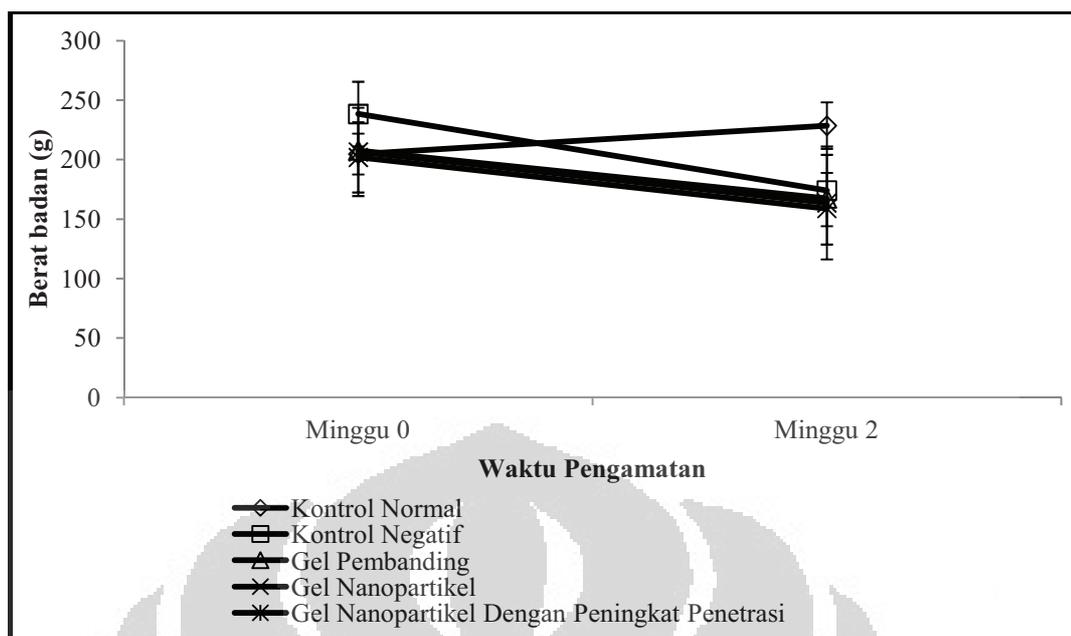
dosis obat yang digunakan adalah  $1/5$  dari dosis oral obat tersebut pada manusia, sehingga dosis verapamil hidroklorida yang digunakan pada penelitian ini merupakan  $1/5$  dari jumlah dosis oral verapamil hidroklorida.

Penggunaan *o-ring* yang direkatkan dengan isolasi dimaksudkan untuk mempermudah dalam pemberian gel, sehingga pemberian gel terfokus pada daerah dan luas permukaan tertentu dari bagian abdomen tikus uji. Luas *o-ring* yang digunakan adalah seluas  $1,39 \text{ cm}^2$ , hal ini sama dengan luas penampang pada sel difusi franz yang digunakan pada percobaan *in vitro*, sehingga diharapkan hasil yang didapatkan dapat dibandingkan.

Pengukuran tekanan darah dilakukan pada saat 1 jam setelah pemberian sediaan uji. Hal ini dilakukan karena mengacu pada fluks verapamil hidroklorida terpenetrasi terbesar terjadi pada rentang waktu kurang dari 1 jam sebelum akhirnya mencapai kondisi *steady state* di atas waktu 1 jam pada pengujian secara *in vitro*. Dengan demikian, diharapkan pengukuran tekanan darah pada waktu 1 jam setelah penggunaan akan didapatkan data yang sudah menunjukkan penurunan tekanan darah pada hewan coba yang diberikan sediaan verapamil hidroklorida.

Kelompok kontrol negatif dalam pengujian ini yang berupa kelompok tikus yang hanya diberikan sediaan gel tanpa zat aktif diharapkan dapat menjadi kontrol terhadap bias yang mungkin terjadi diakibatkan oleh eksipien yang digunakan. Di samping itu, kelompok kontrol negatif dijadikan sebagai kelompok pembandingan dalam perhitungan tingkat efektivitas dari sediaan uji yang diberikan. Tikus dibagi ke dalam beberapa kelompok agar dapat dilakukan perbandingan antara kelompok perlakuan yang satu dengan yang lain.

Perubahan berat badan tikus setiap kelompok perlakuan didapatkan hasil bahwa berat badan tikus pada kelompok yang diberikan larutan induksi mengalami penurunan berat badan, sedangkan pada kelompok kontrol tidak mengalami penurunan berat badan. Hasil ini sesuai dengan teori yang ada bahwa tikus yang diberikan larutan NaCl akan mengalami penurunan berat badan yang cukup signifikan. Hal ini diakibatkan dari menurunnya nafsu makan pada kelompok tersebut. Hasil ini dapat dilihat pada Gambar 4.14.

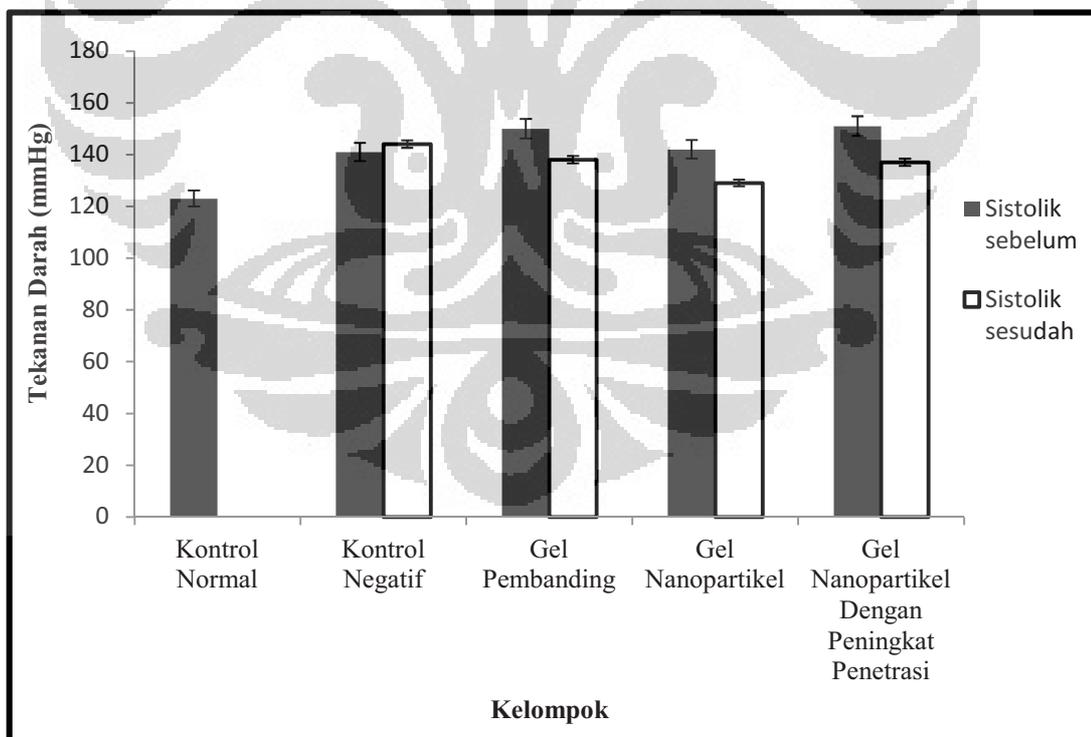


**Gambar 4.14.** Rata-rata berat badan tikus pada setiap kelompok perlakuan

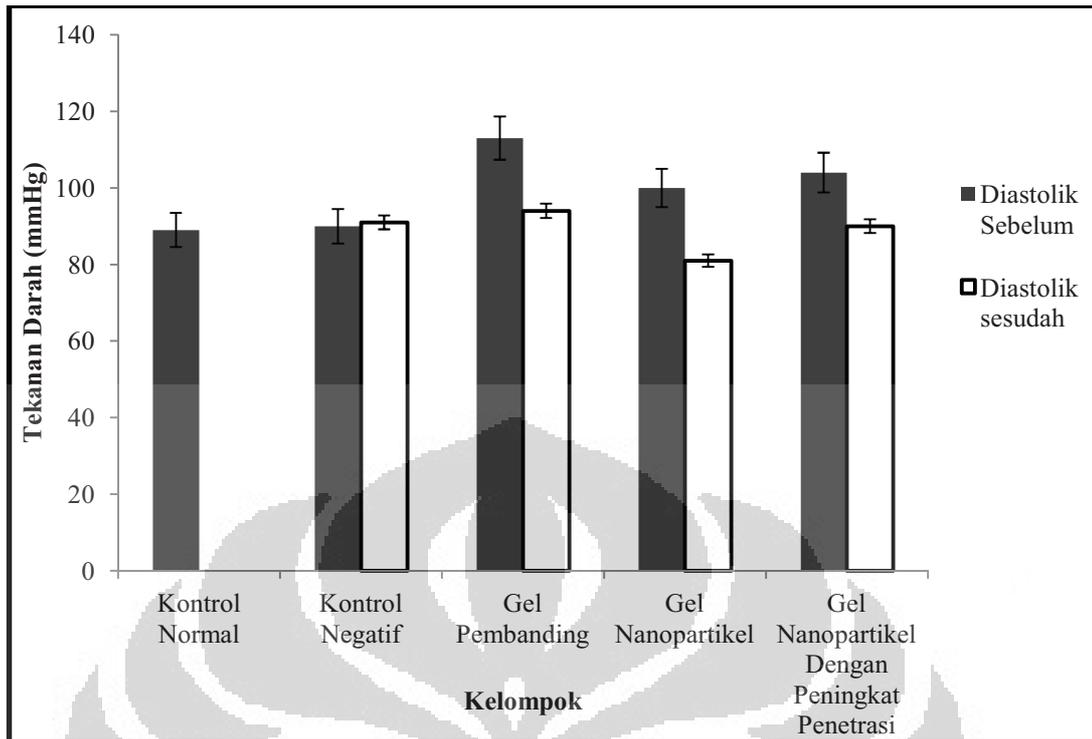
Berdasarkan data yang diperoleh dari percobaan, tampak bahwa tikus kelompok uji yang diberikan sediaan gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi (kelompok V) merupakan kelompok yang memiliki persentase penurunan tekanan darah sistolik terbesar yaitu sebesar  $9,54 \pm 8,81\%$  dibandingkan dengan persentase penurunan tekanan darah sistolik dari kelompok uji yang diberikan sediaan gel pembeding (gel verapamil hidroklorida saja tanpa dibuat nanopartikel) maupun kelompok uji yang diberikan sediaan gel nanopartikel saja, secara berturut-turut yaitu  $8,34 \pm 10,01\%$  dan  $8,86 \pm 2,79\%$ . Di sisi lain, persentase penurunan tekanan darah diastolik terbesar didapatkan pada kelompok uji yang diberikan sediaan gel nanopartikel saja yaitu sebesar  $18,20 \pm 11,43\%$  dibandingkan dengan persentase penurunan tekanan diastolik dari kelompok uji yang diberikan sediaan gel pembeding (gel verapamil hidroklorida saja tanpa dibuat nanopartikel) maupun kelompok uji yang diberikan sediaan gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi, secara berturut-turut yaitu  $17,47 \pm 12,10\%$  dan  $14,05 \pm 4,77\%$ . Menurut perhitungan tekanan darah arteri rata-rata didapatkan hasil yang sama pada persentase penurunan tekanan darah arteri rata-rata antara gel nanopartikel dan gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi, secara berturut-turut yaitu  $12,64 \pm 8,53\%$  dan  $12,64 \pm 4,79\%$ . Sedangkan persen penurunan tekanan darah arteri rata-rata pada gel pembeding memberikan hasil

yang lebih kecil, yaitu  $10,48 \pm 5,25\%$ . Hasil ini dapat dilihat pada Gambar 4.15, Gambar 4.16, dan Gambar 4.17.

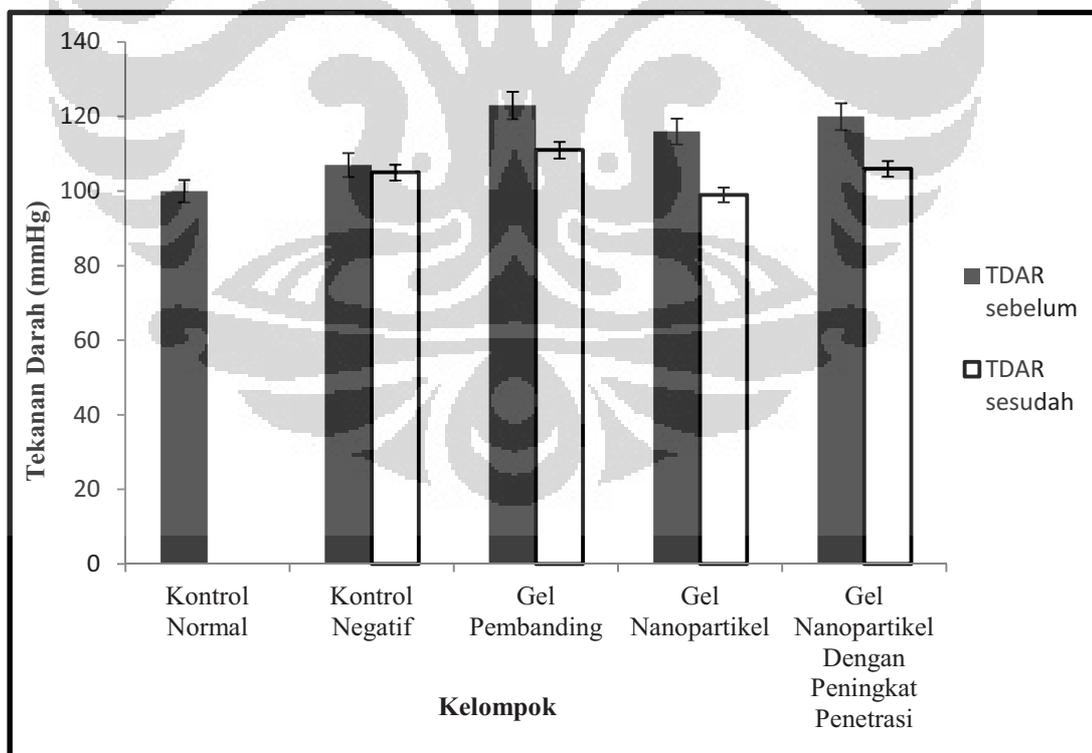
Dari data tersebut didapatkan ternyata perbandingan besar penurunan tekanan darah sistolik secara *in vivo* sesuai dengan perbandingan banyaknya verapamil hidroklorida yang terpenetrasi pada percobaan secara *in vitro*, dimana persen verapamil hidroklorida yang terpenetrasi paling banyak adalah sediaan gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi, lalu diikuti oleh sediaan gel nanopartikel, dan yang terkecil adalah sediaan gel pembanding. Pada penurunan tekanan darah diastolik didapatkan sedikit penyimpangan dimana persen penurunan tekanan darah diastolik terbesar ada pada kelompok yang diberikan sediaan gel nanopartikel saja. Hal ini terjadi mungkin diakibatkan adanya variasi respons pada tikus uji yang digunakan, dan di samping itu terkait pula dengan keterbatasan utama pada metode pengukuran tekanan darah secara tidak langsung dengan menggunakan *tail cuff plethysmography*, yaitu tidak cocok untuk mengukur tekanan darah diastolik (Kurtz et al., 2005).



**Gambar 4.15.** Rata-rata tekanan darah sistolik tikus pada setiap kelompok perlakuan sebelum dan sesudah pemberian sediaan obat



**Gambar 4.16.** Rata-rata tekanan darah diastolik tikus pada setiap kelompok perlakuan sebelum dan sesudah pemberian sediaan obat



**Gambar 4.17.** Rata-rata tekanan darah arteri (TDAR) tikus pada setiap kelompok perlakuan sebelum dan sesudah pemberian sediaan obat

#### 4.4.3. Perhitungan Persen Efektivitas Penurunan Tekanan Darah

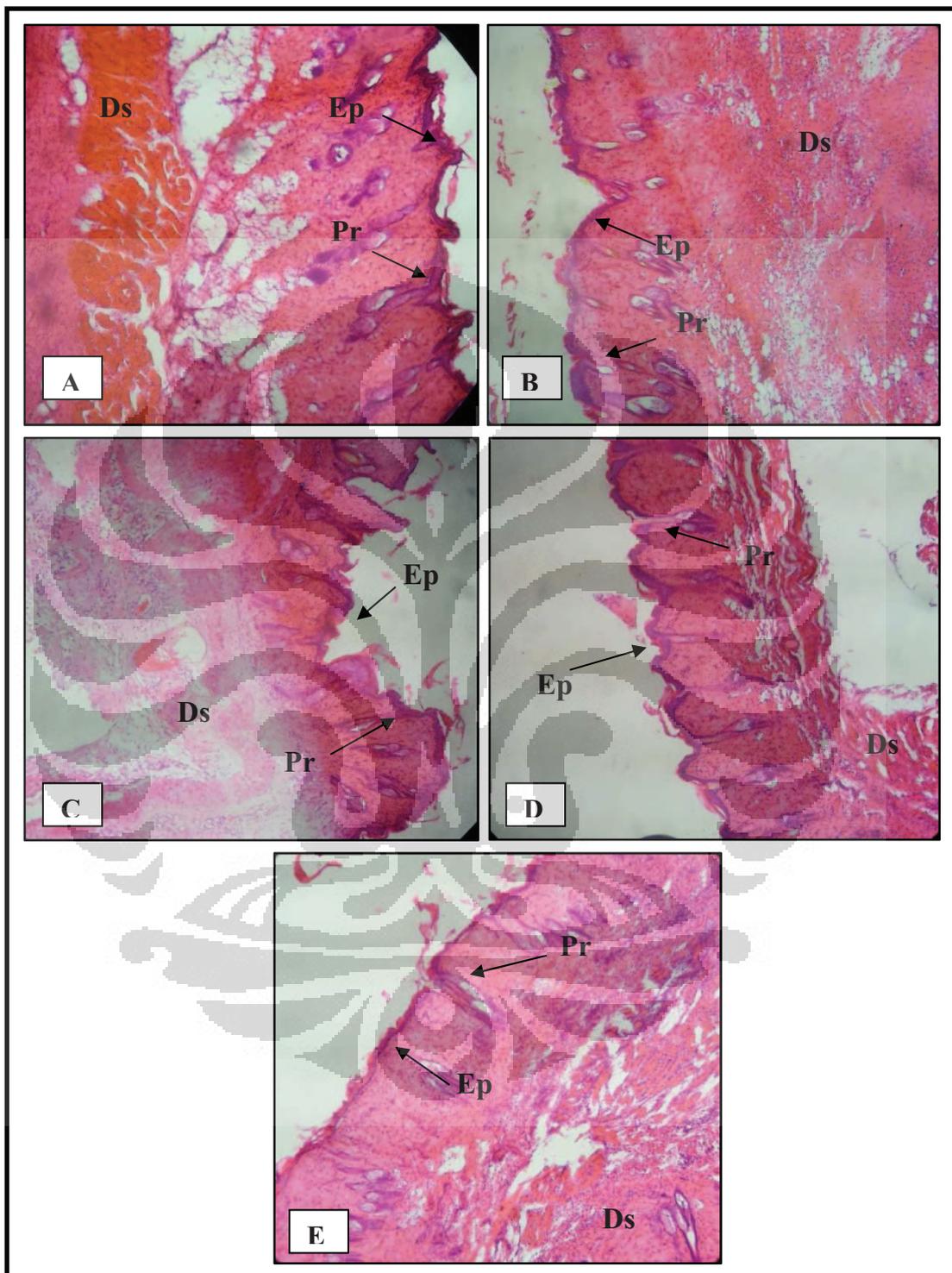
Berdasarkan data yang diperoleh dari percobaan, tampak bahwa tikus kelompok uji yang diberikan sediaan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi (kelompok V) merupakan kelompok yang memiliki persen efektivitas penurunan tekanan darah sistolik tertinggi dibandingkan dengan kelompok uji yang diberikan gel nanopartikel saja, secara berturut-turut yaitu sebesar 14,89% dan 5,87% dibandingkan dengan gel pembanding. Pada persen efektivitas penurunan tekanan darah diastolik menunjukkan hasil efektivitas tertinggi pada gel nanopartikel saja sebesar 4,18%, sedangkan pada gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi tidak menunjukkan efektivitas dibandingkan dengan gel pembanding. Pada persen efektivitas penurunan tekanan darah arteri rata-rata didapatkan hasil yang sama pada gel nanopartikel dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi yaitu sebesar 20,61% dibandingkan dengan gel pembanding. Hasil ini dapat dilihat pada Lampiran 25.

#### 4.5. Analisis Data

Pada analisis statistik data uji *in vivo*, uji normalitas menurut *Shapiro-Wilk* menunjukkan data penurunan tekanan darah sistolik, diastolik, dan tekanan darah arteri rata-rata tiap kelompok perlakuan terdistribusi normal, bervariasi homogen berdasarkan uji homogenitas menurut *Levene*, dan pada uji berdasarkan analisis varians (*One Way Anova*) ada perbedaan secara bermakna pada data penurunan tekanan darah sistolik, namun tidak ada perbedaan secara bermakna pada data penurunan tekanan darah diastolik dan tekanan darah arteri rata-rata ( $P < 0,05$ ). Data lengkap dapat dilihat pada Lampiran 32-41.

#### 4.6. Uji Histopatologis

Hasil uji histopatologis dapat dilihat pada Gambar 4.18.



Keterangan: Ep = epidermis, Ds = dermis, Pr = pori-pori (Perbesaran 10x)

**Gambar 4.18.** Sayatan melintang kulit tikus: (A) normal, (B) kontrol negatif, (C) gel pembanding, (D) gel nanopartikel, (E) gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi

Universitas Indonesia

Uji ini dilakukan untuk melihat perubahan morfologi dari kulit tikus yang mungkin terjadi akibat dari pemberian sediaan. Hasil pengujian histopatologis menunjukkan adanya perbedaan yang terjadi pada lapisan epidermis dari kulit hewan coba setelah pemberian sediaan yang diujikan. Pada tikus yang tidak diberikan perlakuan (normal) terlihat bahwa lapisan epidermis masih berada dalam keadaan normal dengan morfologi yang tebal dan utuh (Gambar 4.17A). Pada tikus yang diberikan sediaan gel tanpa zat aktif terlihat tidak berbeda dengan tikus pada kelompok normal (Gambar 4.17B). Pada tikus yang diberikan sediaan gel pembanding terlihat sedikit perbedaan, di mana tampak adanya sisa jejak jalur penetrasi obat melalui pori-pori kulit dengan morfologi tebalnya epidermis yang tidak berbeda dengan normal (Gambar 4.17C). Pada tikus yang diberikan sediaan gel nanopartikel terlihat jalur penetrasi obat yang lebih jelas pada permukaan kulit, dari hasil ini menunjukkan kemungkinan verapamil hidroklorida yang berada dalam bentuk nanopartikel masuk terpenetrasi melalui mekanisme transappendageal (Gambar 4.17D). Pada tikus yang diberikan sediaan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi menunjukkan terjadinya penipisan lapisan epidermis dan terlihat juga jalur penetrasi obat (Gambar 4.17E). Hal ini kemungkinan diakibatkan karena adanya bahan peningkat penetrasi yang digunakan pada formula gel tersebut. Bahan peningkat penetrasi yang digunakan, memiliki mekanisme menipiskan lapisan epidermis. Selain itu karena dalam sediaan tersebut mengandung verapamil hidroklorida yang dibuat nanopartikel, sehingga kemungkinan obat terpenetrasi dengan menggunakan mekanisme melalui jalur transepidermal dan juga transappendageal.

## BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

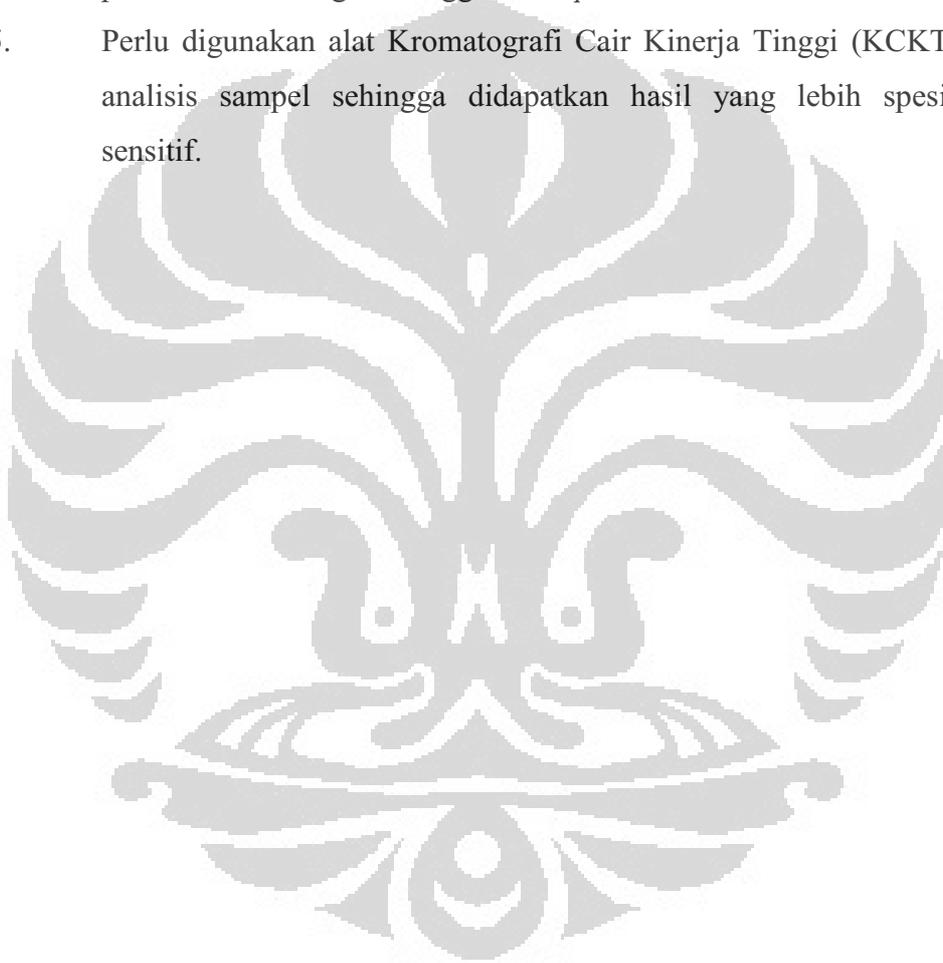
Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut :

1. Kitosan – tripolifosfat dapat dijadikan bahan pembentuk nanopartikel metode gelasi ionik dengan formula D merupakan formula terbaik yang menghasilkan nanopartikel berukuran 62,8 nm, persen efisiensi penjerapan sebesar  $60,25 \pm 1,55\%$ , potensial zeta sebesar +25,46 mV, morfologi sferis, dan dapat diterima dengan konfirmasi FT-IR.
2. Pada uji *in vitro*, sediaan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi memiliki daya penetrasi terbesar dibandingkan dengan gel nanopartikel dan gel pembanding dengan persen verapamil hidroklorida terpenetrasi secara berturut-turut adalah  $13,69 \pm 0,12\%$ ;  $11,40 \pm 0,04\%$ ; dan  $7,21 \pm 0,04\%$  dengan fluks secara berturut-turut adalah  $148,33 \pm 1,17 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ ;  $121,88 \pm 0,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ ; dan  $60,93 \pm 0,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ .
3. Pada uji *in vivo*, sediaan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi memiliki efektivitas penurunan tekanan darah sistolik tertinggi daripada gel nanopartikel, secara berturut-turut adalah 14,89% dan 5,87% dibandingkan dengan gel pembanding yang berbeda secara bermakna ( $P < 0,05$ ), efektivitas dalam menurunkan tekanan darah diastolik menunjukkan hasil efektivitas tertinggi pada gel nanopartikel saja sebesar 4,18% dibandingkan dengan gel pembanding, dan efektivitas penurunan tekanan darah arteri rata-rata didapatkan hasil yang sama pada gel nanopartikel dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi yaitu sebesar 20,61% dibandingkan dengan gel pembanding.

### 5.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya untuk mendapatkan nanopartikel dengan penjerapan yang lebih baik.

2. Perlu dilakukan optimasi formulasi sediaan gel nanopartikel metode gelasi ionik dengan menggunakan nanopartikel yang telah dimurnikan guna mendapatkan hasil yang lebih baik, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.
3. Perlu dilakukan pengujian pengukuran kadar di dalam darah pada hewan coba untuk mengetahui bioavailabilitasnya di dalam tubuh.
4. Perlu dilakukan penelitian tahap selanjutnya seperti pengujian klinik pada manusia dengan menggunakan *patch* transdermal.
5. Perlu digunakan alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dalam analisis sampel sehingga didapatkan hasil yang lebih spesifik dan sensitif.



## DAFTAR ACUAN

- Ansel, H. C. (1989). *Introduction to pharmaceutical dosage form*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Avadi, M. R., Assal, M. M. S., Nasser, M., Saideh, A., Fatemeh, A., Rassoul, D., & Morteza, R. (2010). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6, 58–63.
- Barry, B. W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 14, 101–114.
- Bhumkar, D. R., & Pokharkar, V. B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS PharmSciTech*, 7 (2), 50.
- British pharmacopoeia 2007* (ver.11.0). (2007). Index+ for windows v.1.16c win32 release build. System Simulation Ltd.
- Codex Alimentarius Team. (2006). *Food chemical codex. FAO*. Diunduh dari <http://www.fao.org/ag/agn/jecfaadditives/specs/Monograph1/Additive-307.pdf>.
- Cevc, G., & Vierl, U. (2010). Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release*, 141, 277–299.
- De Moura, M., Auada, F. A., Bustillos, R. J. A., McHugh, T. H., Krochta, J. M., & Mattoso, L. H. C. (2009). Improves barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible film with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 92, 448-453.
- Ellaisari, A. (2004). *Colloidal biomolecules, biomaterials, and biomedical applications*. New York: Marcel Dekker Inc..
- Farmakope Indonesia* (Ed. III). (1979). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Farmakope Indonesia* (Ed. IV). (1995). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Flowers, S. W., Jamal, I. A., Bogden, J., Thanki, K., & Ballester, H. (1990). Hypertension induction in dahl rats. *Journal of National Medical Association*, 82 (12), 837-840.
- Girish, K. J., Sharma, A. K., & Agrawal, S. S. (1996). Transdermal controlled administration of verapamil – enhancement of skin permeability. *International Journal of Pharmaceutics*, 130, 169-177.
- Greenwood, N. N., & Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the elements* (2nd ed.). Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Hartanto, M. S. (2008). Efek antihipertensi ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* Benth.) dan ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura Procumbens* (Lour.) Merr.) pada tikus putih jantan yang dibuat hipertensi. *Skripsi Sarjana Farmasi*. Depok: FMIPA UI.
- Hartrianti, P. (2008). Pembuatan niosom transdermal dengan natrium diklofenak sebagai model obat. *Skripsi Sarjana Farmasi*. Depok: FMIPA UI.
- Iswandana, R. (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*. Depok: FMIPA UI
- Jahanshahi, M., & Babaei, Z. (2008). Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. *African Journal of Biotechnology*, 7, 4926-4934.
- Jain, H. (2001). In vitro release of diclofenac natrium from different topical vehicles. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 26-29.
- Jellinek, J. S. (1970). *Formulation and function of cosmetic*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Kumaresh, S. S., Tejraj, M. A., Anandrao, R. K., & Walter, E. R. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70, 1-20.

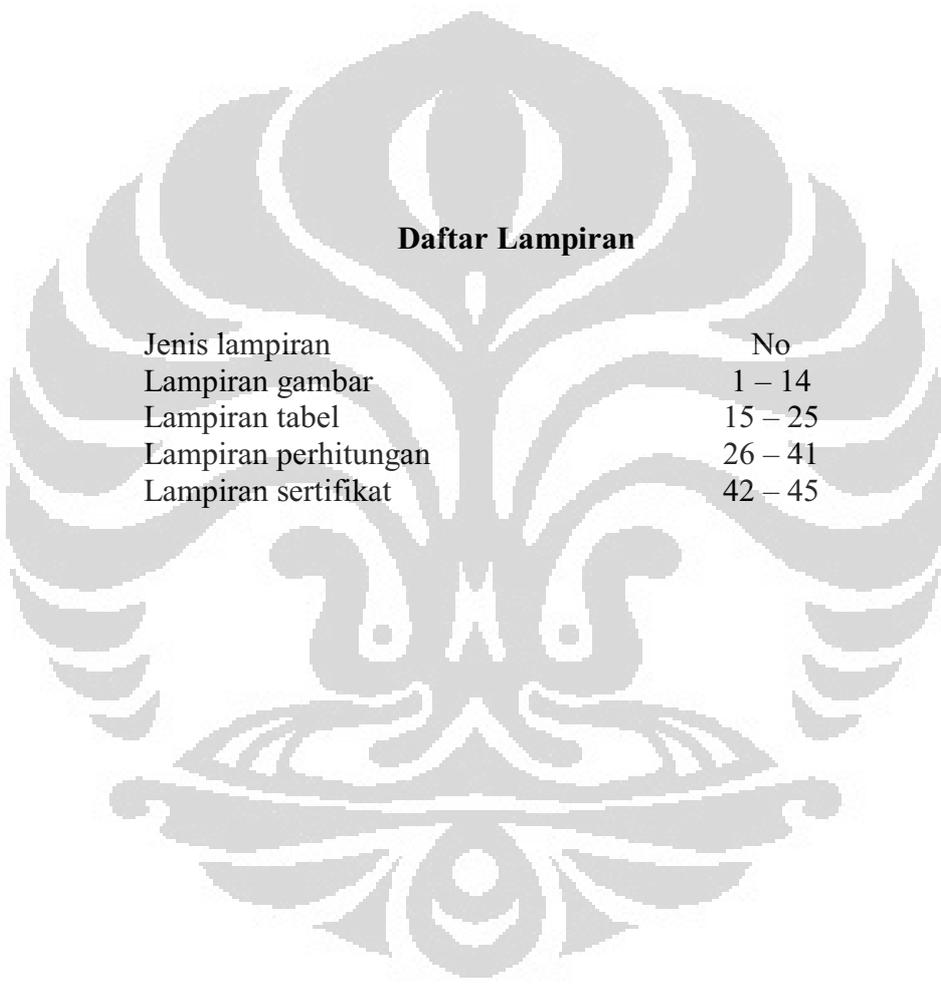
- Kurtz, T. W., Karen, A. G., Anil, K. B., Robin, L. D., & John, E. H. (2005). Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals part 2. Dalam Blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the american heart association council on high blood pressure research. *Hypertension*, 45, 299-310.
- Langley, L. L.. (1958). *Dynamic anatomy and physiology*. USA: Mc Graww Hill Inc.
- Lifeng, Q., Zirong, X., Xia, J., Caihong, H., & Xiangfei, Z. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693-2700.
- Lund, W. (1994). *The pharmaceutical codex* (12th ed.). London: The Pharmaceutical Press.
- Mansjoer, S. (1997). Efek antiradang minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoria* Rosc.). *Media Farmasi Indonesia*, 8 (1), 35-36.
- Martin, A. (1993). *Physical pharmacy: Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Martindale the extra pharmacopeia* (28th ed.) (1982). London: The Pharmaceutical Press.
- Maskevich, B. O. (Ed). (2007). *Drug delivery research advances*. New York: Nova Science Publishers Inc.
- Mitsui, T. (ed). (1997). *New cosmetic science*. Amsterdam: Elsevier Science BV.
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 561-573.
- Pathak, Y., & Thassu, D. (2009). *Drug delivery nanoparticles formulation and characterization*. New York: Informa Healthcare USA Inc.
- Ramesh, R. (2003). Lecithin vesicles for topical delivery of diclofenac. *European Journal Pharmaceutical Science*. 56, 389-392.

- Raja, N. R. A., Pillai, G. K., Udupa, N., & Chandrasekar, G. (1994). Antiinflammatory activity of niosome encapsulated diclofenac sodium in arthritic rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 26, 46-48.
- Rowe, R. C. (ed). (2009). *Handbook of pharmaceutical excipient* (6th ed.). London: The Pharmaceutical Press.
- Sakkinen, M. (2003). Biopharmaceutical evaluation of microcrystalline chitosan as release rate controlling hydrophilic polymer in granules for gastroretentive drug delivery. *Academic Dissertation Faculty of Science of the University of Helsinki*.
- Saseen, J. L., & Barry, L. C. (2002). Hypertention. Dalam DiPiro, J. T., *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach* (6th ed., vol. I). USA: Mc.Graw Hill.
- Sevast'yanov, V. I. (2002). Transdermal insulin delivery system, *Journal of Biomedical Engineering*, 37, 90-94.
- Shah, H. S., Kakuji, T., & Yie, W. C. (1992). Transdermal controlled delivery of verapamil: Characterization of in vitro skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 86, 167-173.
- Shah, H. S., Kakuji, T., & Yie, W. C. (1992). Transdermal controlled delivery of verapamil: Determination of in vitro/in vivo relationship. *Journal of Controlled Release*, 22, 133-140.
- Sheng, F. S., Chen, H. C., Chao, F. K., & Jin, D. H. (2003). In vitro and in vivo comparison of two diclofenac sodium sustained release oral formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 260, 39-46.
- Soon, Y., Chul, Y. K. O., Yong, I. K., Jong, O. K., Bong, K. Y., Jong, D. R., Kang, C. L., Dae, D. K., Young, J. P., Chong, K. K., & Han, G. C. (2005). Physicochemical characterization and in vivo evaluation of poloxamer-based solid suppository containing diclofenac sodium in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 301, 54-61.
- Subowo. (1992). *Histologi umum* (Ed. I). Jakarta: Bumi aksara.
- Sunil, A. A., Nadagouda, N. M., & Tejjraj, M. A. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100, 5-28.

- Swarbrick, J. (ed). (2007). *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (3rd ed., vol. 4). New York: Informa Healthcare USA Inc.
- Sweetman, S. C. (ed). (2009). *Martindale: The complete drug reference* (36th ed.). London: Pharmaceutical Press.
- Thassu, D. (ed). (2007). *Nanoparticulate drug delivery systems*. New York: Informa Healthcare USA Inc.
- Tsai, S. P. (2007). Gamma-poly-(glutamic acid)/chitosan composite scaffolds for tissue engineering applications. *Material Science Forums*, 8, 539-54.
- United States pharmacopoeia* (30th ed.). (2007). USA: The Official Compendia of Standards.
- Walters, K.A., & Jonathan, H. (1993). *Pharmaceutical skin penetration enhancement*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Waynforth. (1980). *Experimental and surgical technique in the rat*. London: Academic Press.
- Wester, R. C., & Maibach, H. I. (1990) In vitro testing of topical pharmaceutical formulations. Dalam *Topical drug delivery formulations*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Wilkinson, J. B., & Moore, R. J. (1982). *Harry cosmeticology* (7th ed.). New York: Chemical Publishing Company Inc.
- Xiangrong, S., Yu, Z., Wenbin, W., Yueqi, B., Zheng, C., QiuHong, C., Yuanbo, L., & Shixiang, H.. (2008). PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *International Journal of Pharmaceutics*, 350, 320-329.
- Yaowalak, B., Mitrevej A., & Mueller, B. W. (2006). Chitosan drug binding by ionic interaction. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62, 267-274.
- Yu, H. L., Kiran, S., Kurt, M. L., Jyuhn, H. J., Fwu, L. M., Han, W. Y., & Hsing, W. S. (2008). Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *Journal of Controlled Release*, 132, 141-149.



# LAMPIRAN

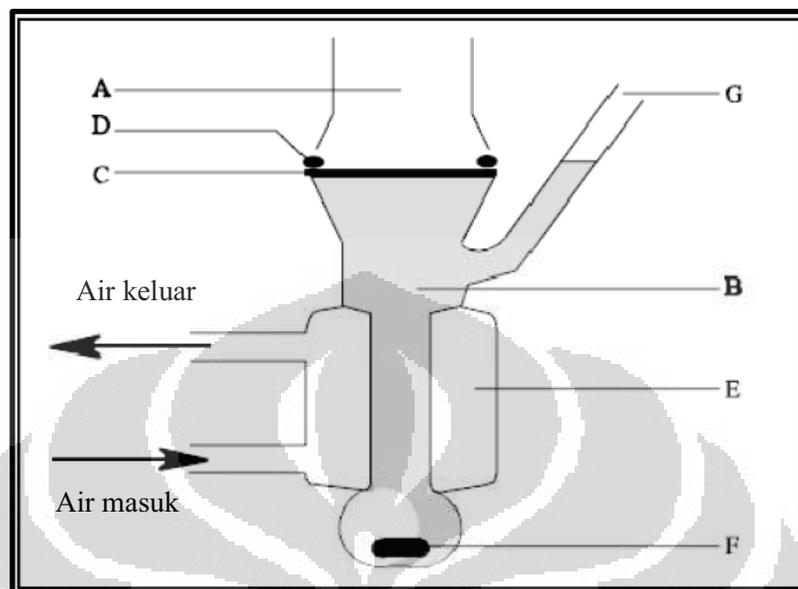


## Daftar Lampiran

Jenis lampiran	No
Lampiran gambar	1 – 14
Lampiran tabel	15 – 25
Lampiran perhitungan	26 – 41
Lampiran sertifikat	42 – 45

## Lampiran 1

### Sel difusi Franz

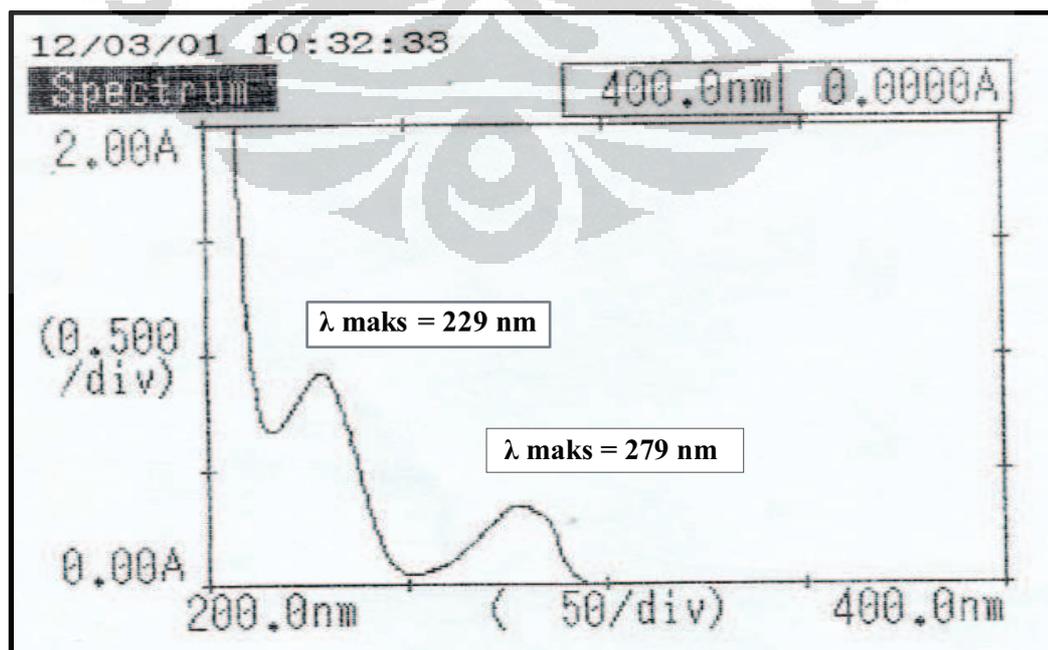


Keterangan: A: Kompartemen donor, B: Kompartemen reseptor, C: Membran, D: Cincin O, E Jaket air, F: Batang pengaduk, G: Tempat pengambilan sampel

[Sumber : Angel, 2008]

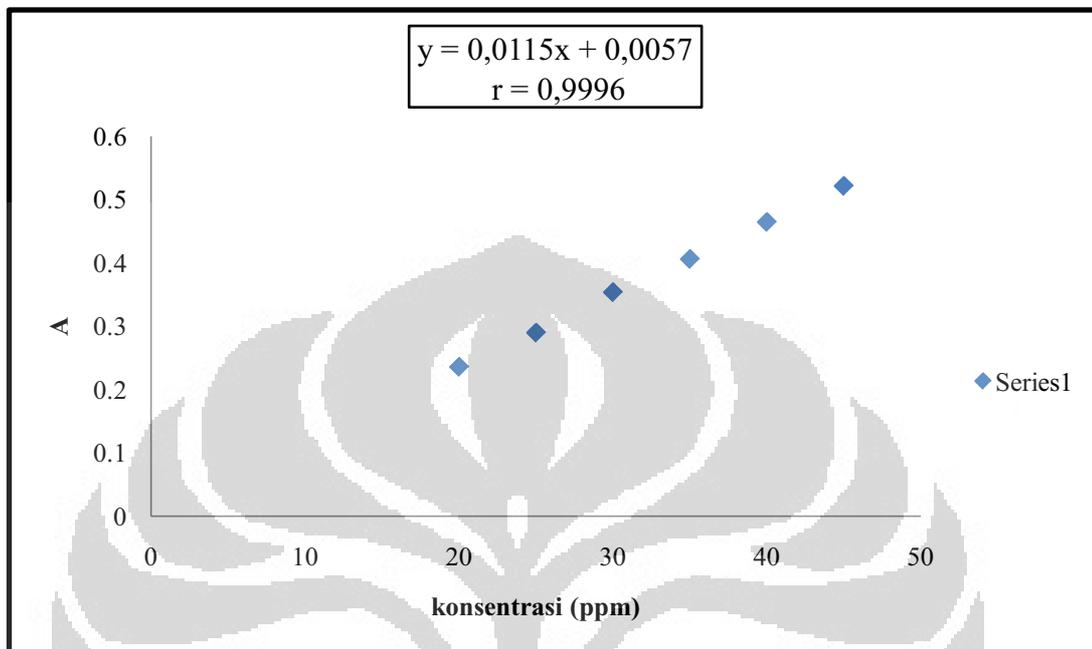
## Lampiran 2

### Spektrum verapamil hidroklorida standar dalam aqua demineralisata pada $\lambda$ 279 nm

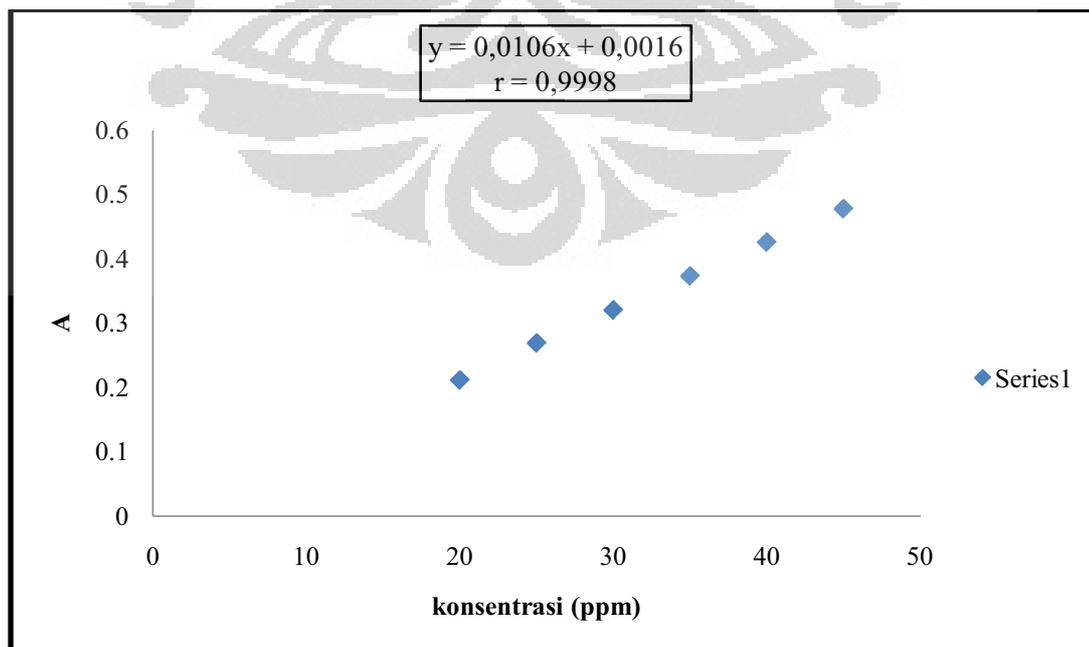


**Lampiran 3**

**Kurva kalibrasi standar verapamil hidroklorida dalam aqua demineralisata pada  $\lambda$  279 nm**

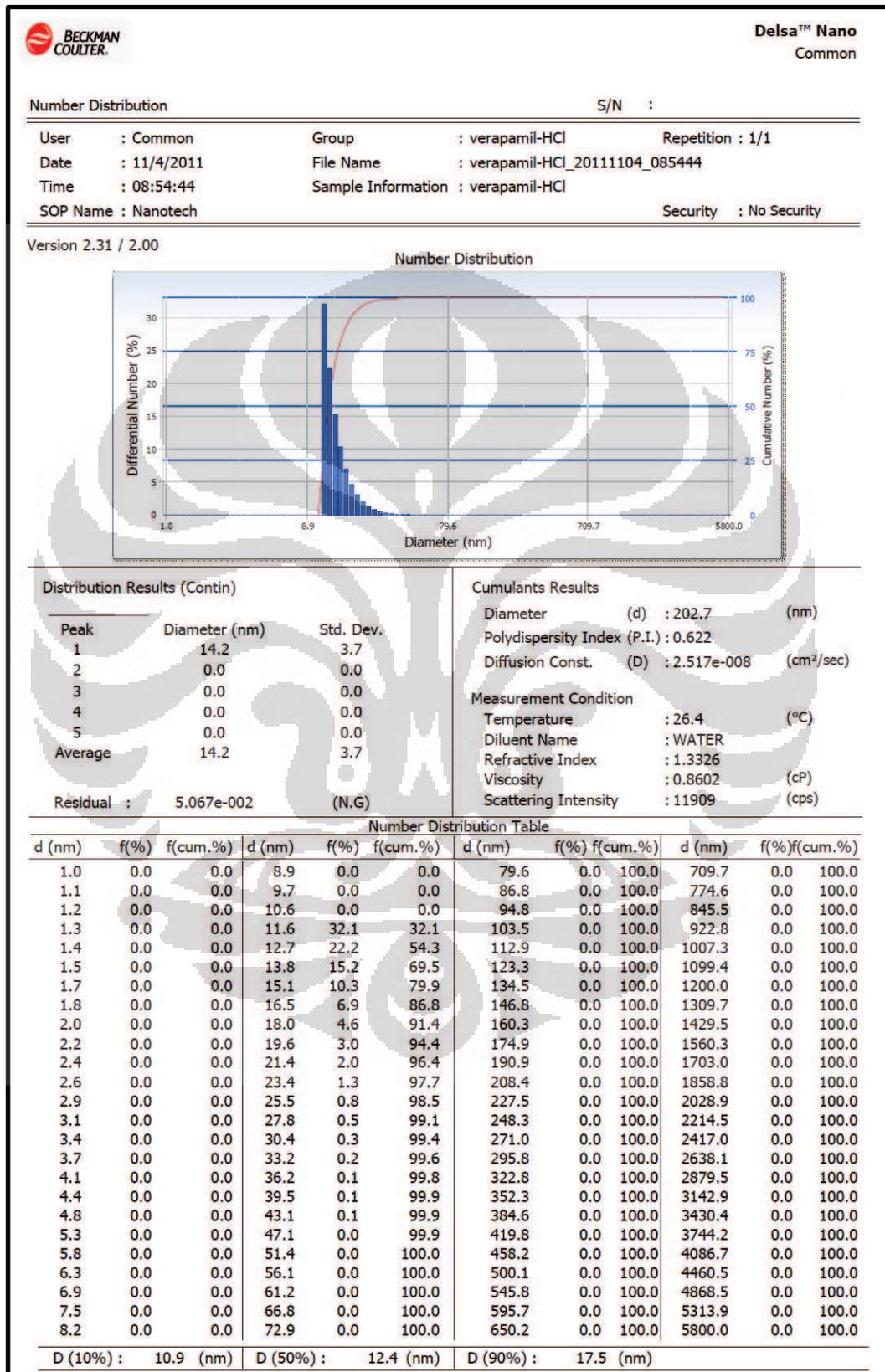
**Lampiran 4**

**Kurva kalibrasi standar verapamil hidroklorida dalam dapar fosfat pH 7,4 pada  $\lambda$  279 nm**



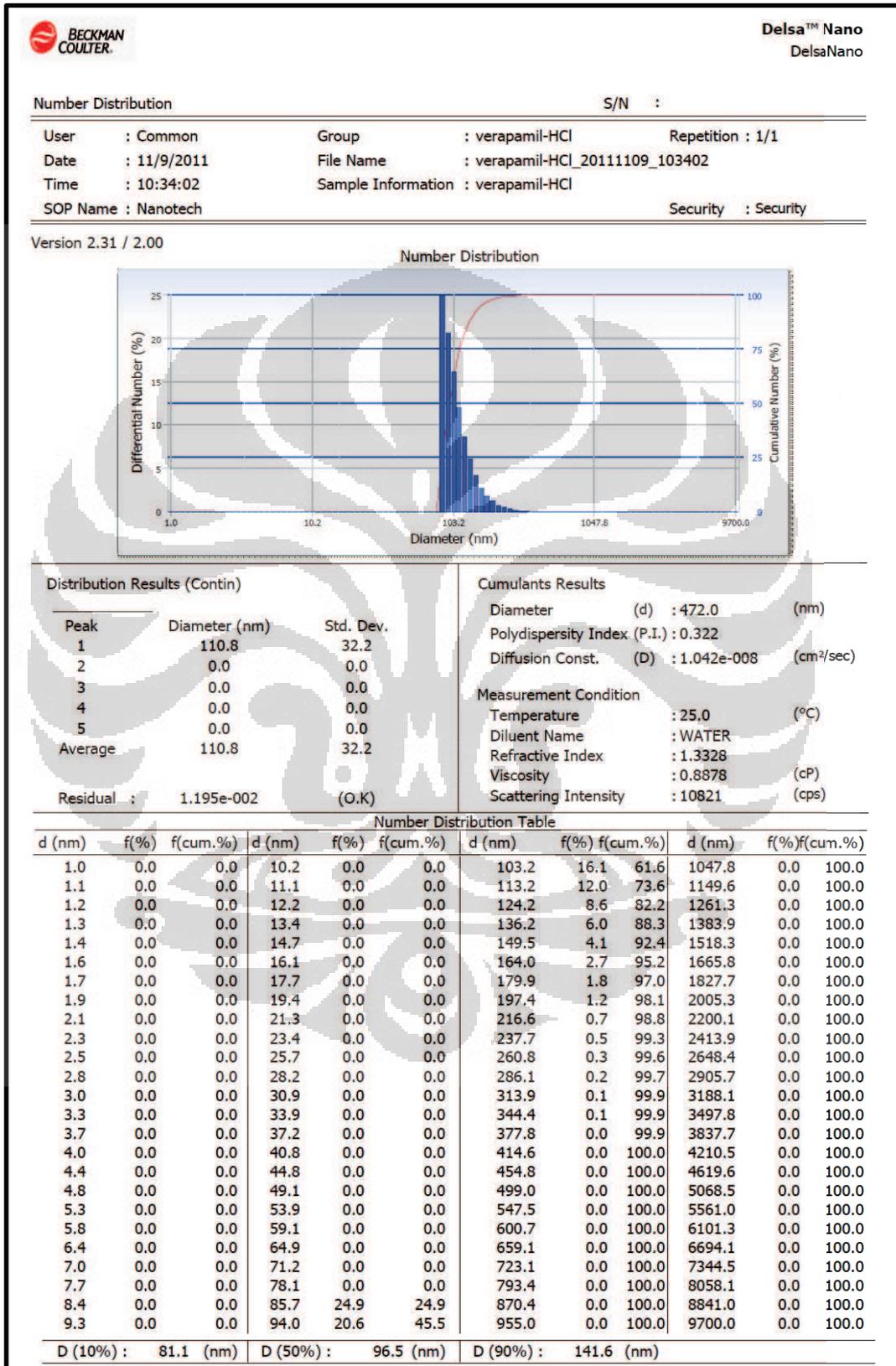
Lampiran 5

Data distribusi ukuran partikel formula A



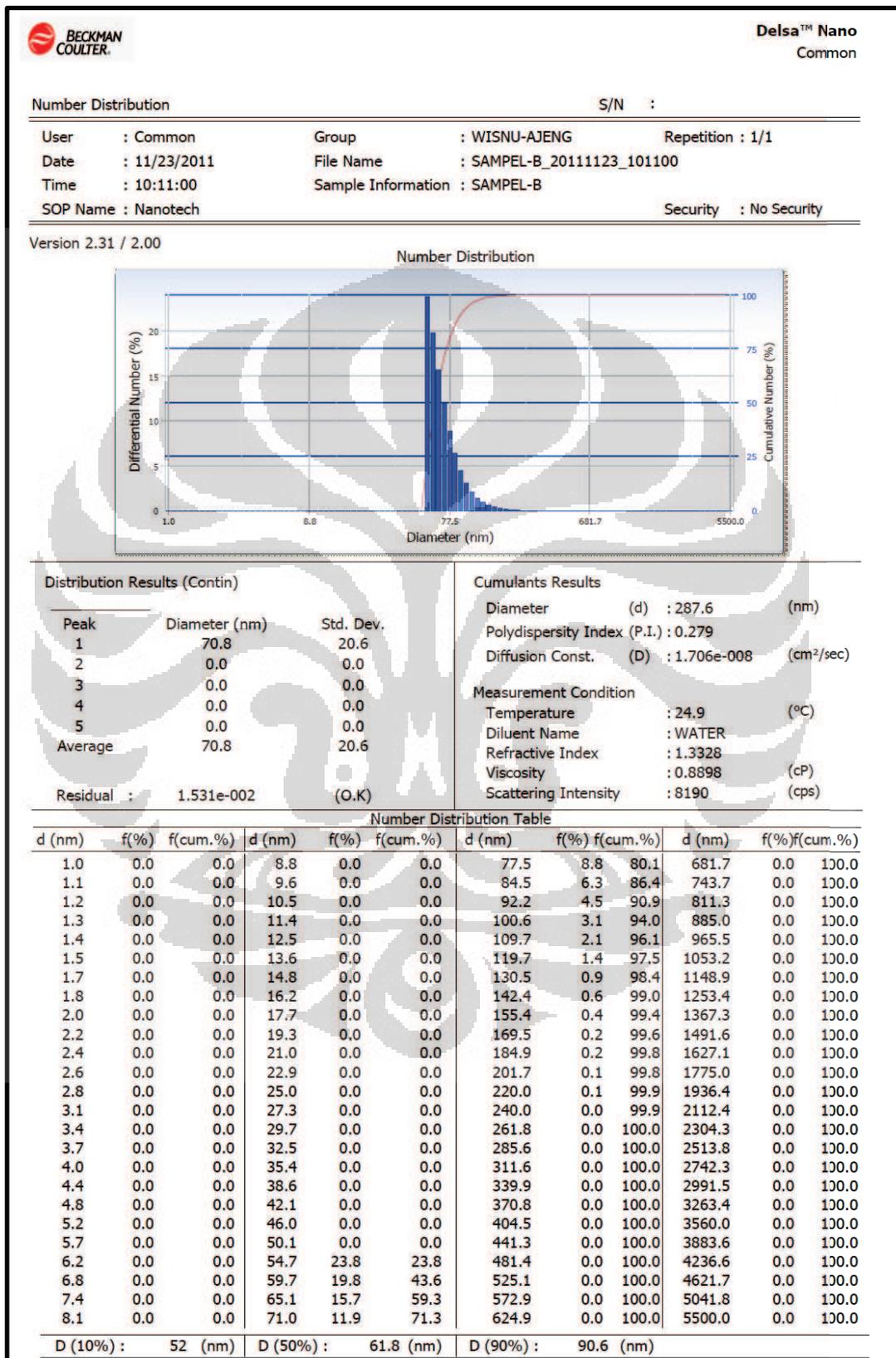
Lampiran 6

Data distribusi ukuran partikel formula B



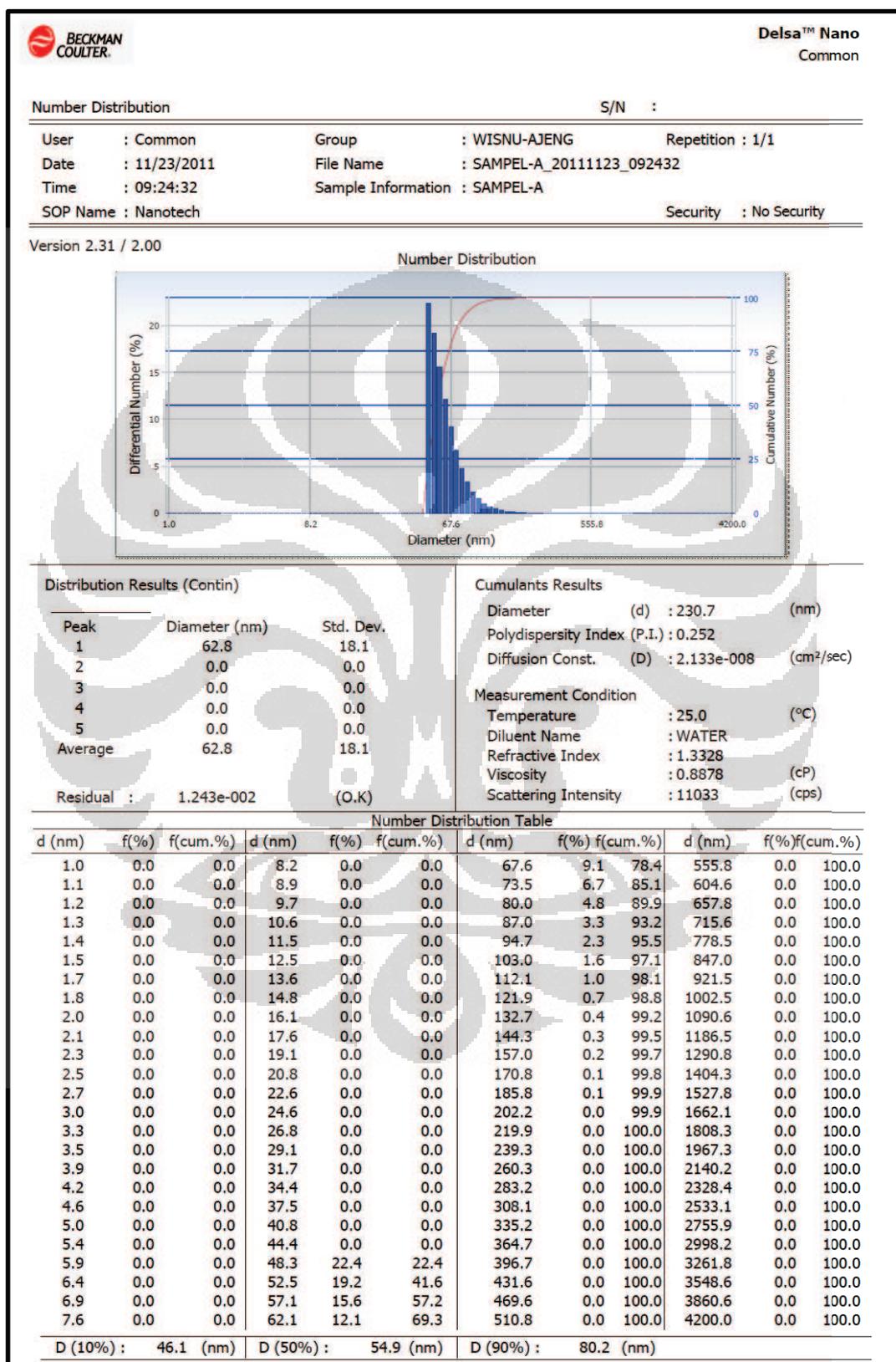
Lampiran 7

Data distribusi ukuran partikel formula C



## Lampiran 8

## Data distribusi ukuran partikel formula D



## Lampiran 9

### Data hasil analisis potensial zeta formula B

BECKMAN COULTER		Delsa™ Nano Common	
Peak Value Table		S/N :	
User	: Common	Group	: WISNU-AJENG-2
Date	: 12/15/2011	File Name	: WISNU-AJENG-2_20111215_143428
Time	: 14:34:28	Sample Information	: WISNU-AJENG-2
SOP Name	: Nanotech	Security	: No Security
Version 2.31 / 2.00			
	Mobility (cm <sup>2</sup> /Vs)	Zeta Potential (mV)	Electric Field (V/cm)
Peak Value	1.227e-004	15.73	15.40
No.	Cell Position	Mobility (cm <sup>2</sup> /Vs)	Zeta Potential (mV)
1	0.7 (6.765mm)	4.602e-005	5.90
2	0.35 (6.59mm)	2.472e-004	31.69
3	0 (6.415mm)	2.852e-004	36.57
4	-0.35 (6.24mm)	2.401e-004	30.79
5	-0.7 (6.065mm)	1.398e-004	17.93

## Lampiran 10

### Data hasil analisis potensial zeta formula C

BECKMAN COULTER		Delsa™ Nano Common	
Peak Value Table		S/N :	
User	: Common	Group	: VERAPAMIL-HCl
Date	: 2/7/2012	File Name	: F2_20120207_103858
Time	: 10:38:58	Sample Information	: F2
SOP Name	: Nanotech	Security	: No Security
Version 2.31 / 2.00			
	Mobility (cm <sup>2</sup> /Vs)	Zeta Potential (mV)	Electric Field (V/cm)
Peak Value	1.702e-004	21.82	15.62
No.	Cell Position	Mobility (cm <sup>2</sup> /Vs)	Zeta Potential (mV)
1	0.7 (6.645mm)	1.081e-004	13.87
2	0.35 (6.47mm)	2.201e-004	28.22
3	0 (6.295mm)	2.967e-004	38.05
4	-0.35 (6.12mm)	2.984e-004	38.27
5	-0.7 (5.945mm)	1.883e-004	24.15

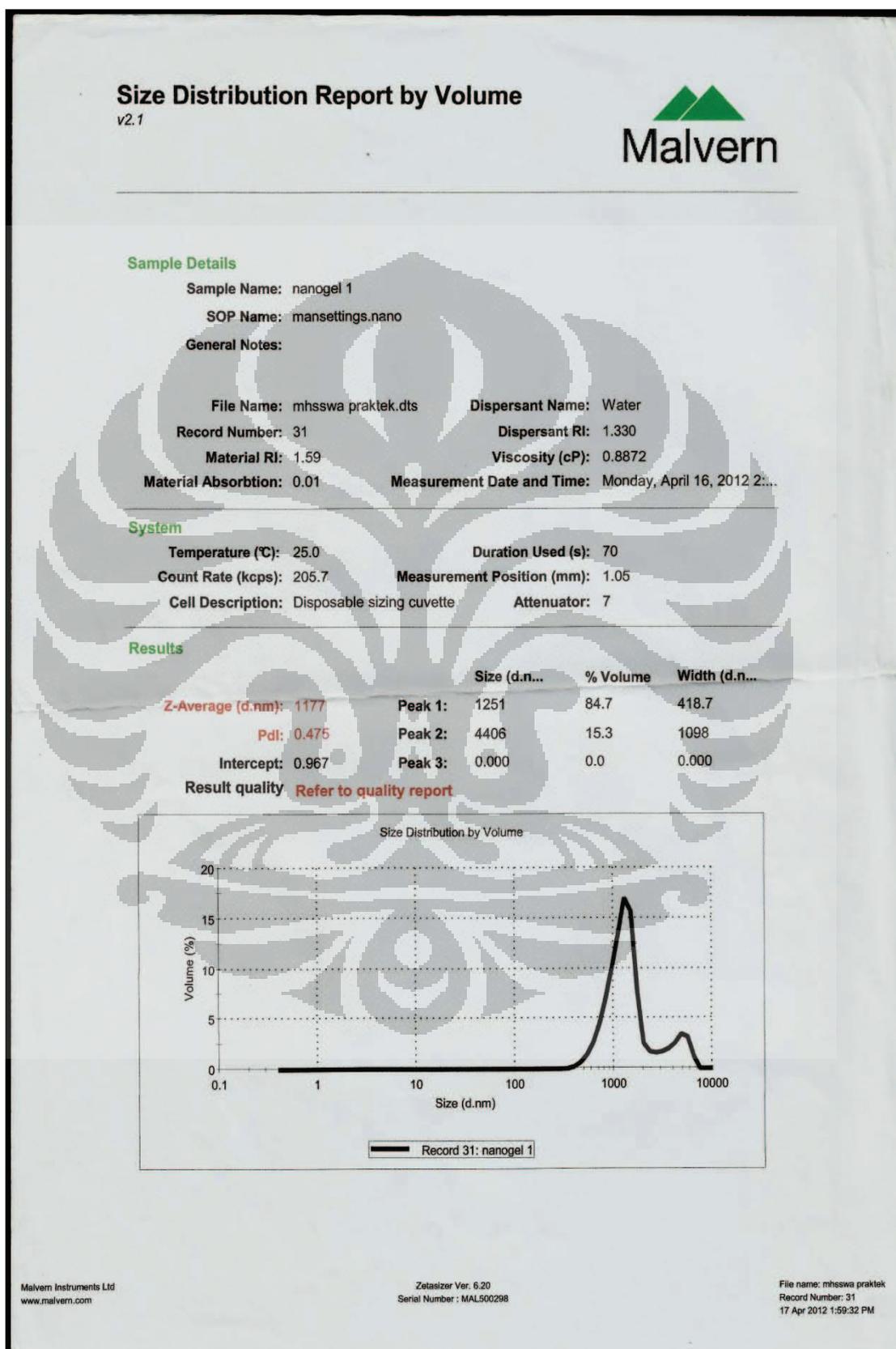
## Lampiran 11

## Data hasil analisis potensial zeta formula D

BECKMAN COULTER.		Delsa™ Nano Common	
Peak Value Table		S/N :	
User	: Common	Group	: VERAPAMIL-HCL Repetition : 2/3
Date	: 2/3/2012	File Name	: FORMULA-1_20120203_133458
Time	: 13:34:58	Sample Information	: FORMULA-1
SOP Name	: Nanotech	Security	: No Security
Version 2.31 / 2.00			
	Mobility (cm <sup>2</sup> /Vs)	Zeta Potential (mV)	Electric Field (V/cm)
Peak Value	1.985e-004	25.46	15.54
No.	Cell Position	Mobility (cm <sup>2</sup> /Vs)	Zeta Potential (mV)
1	0.7 (6.755mm)	6.806e-005	8.73
2	0.35 (6.58mm)	2.295e-004	29.43
3	0 (6.405mm)	3.086e-004	39.57
4	-0.35 (6.23mm)	3.397e-004	43.55
5	-0.7 (6.055mm)	2.866e-004	36.75

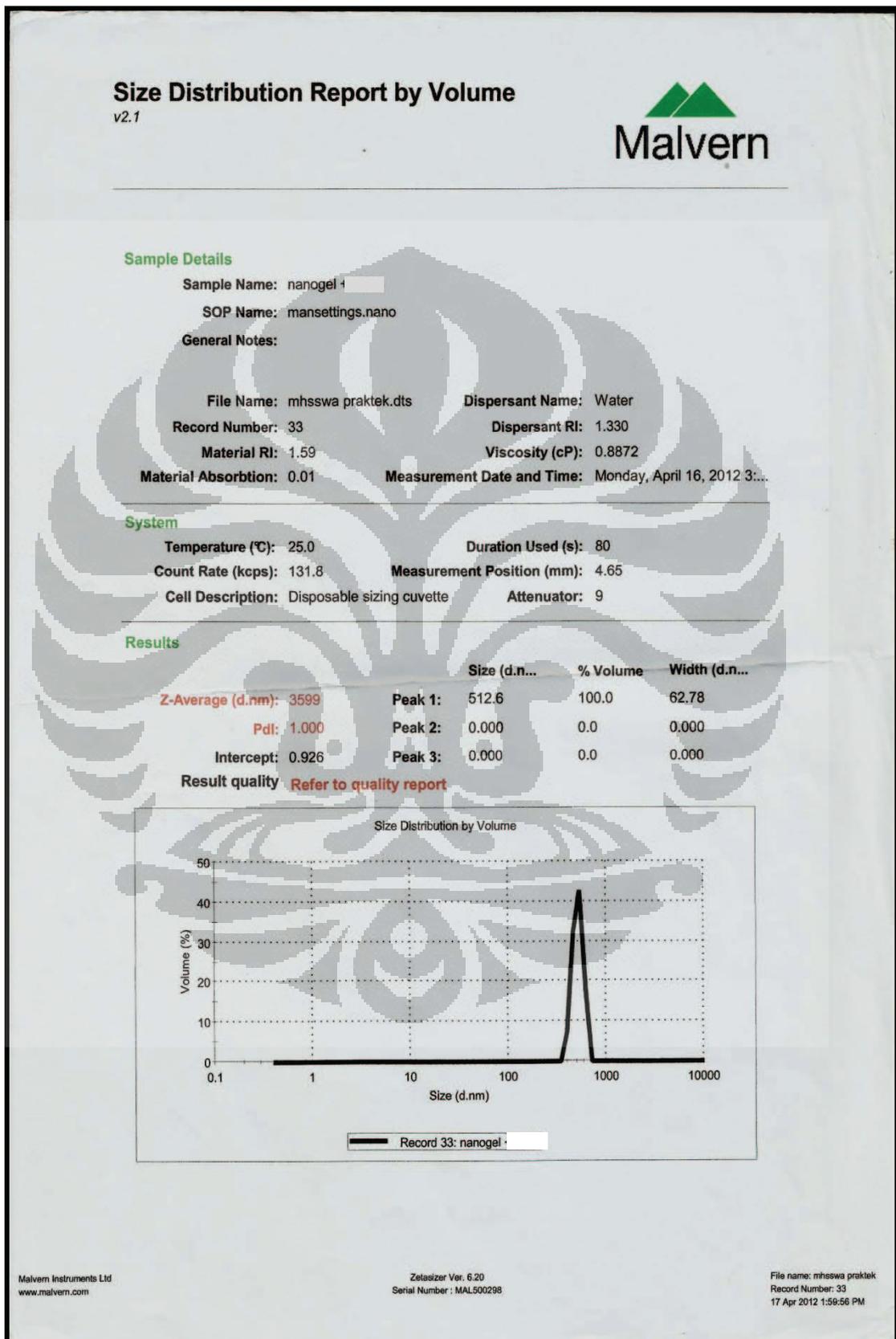
## Lampiran 12

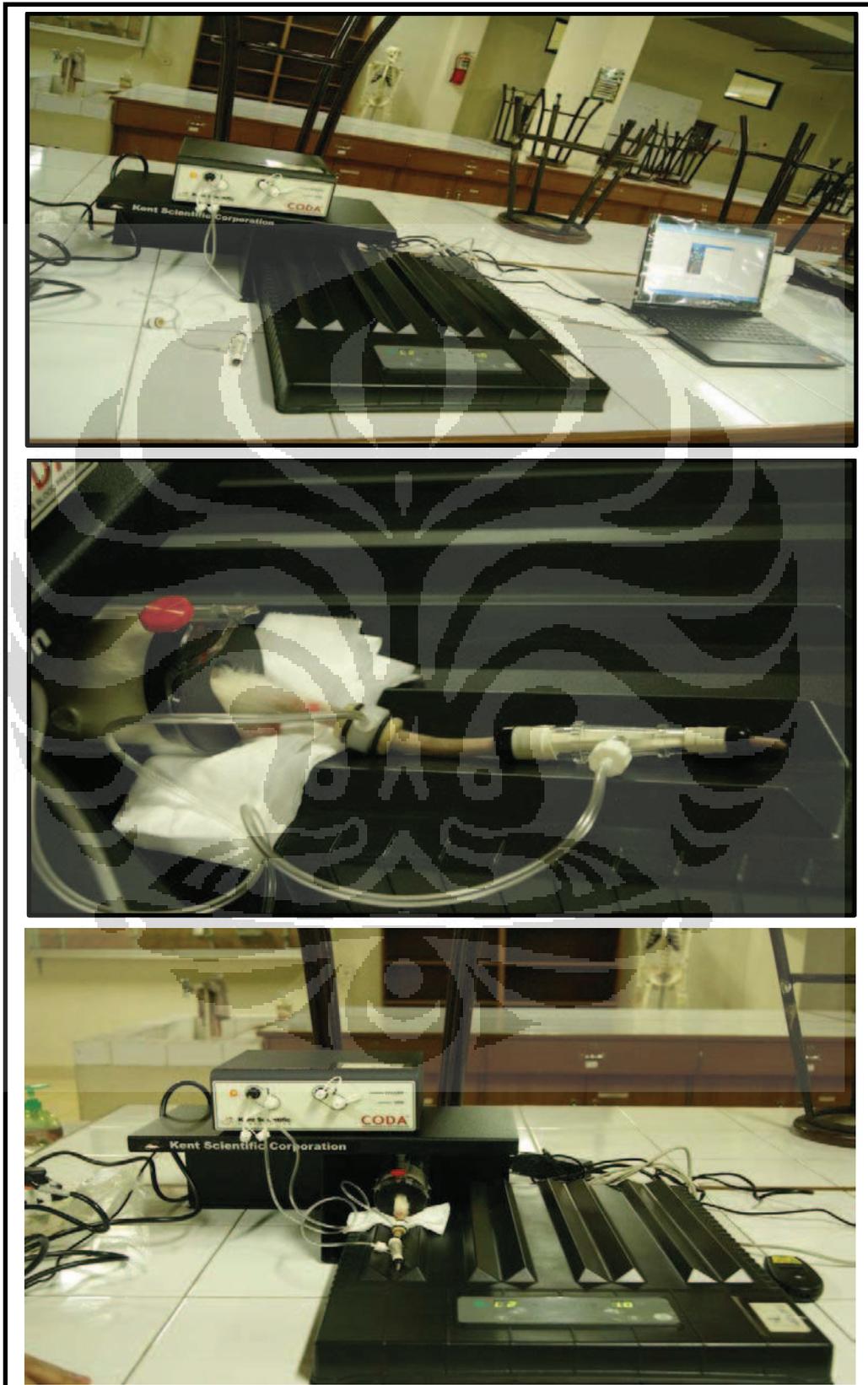
## Data distribusi ukuran partikel gel nanopartikel



## Lampiran 13

## Data didtribusi ukuran partikel gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi



**Lampiran 14****Alat CODA<sup>®</sup> non-invasive blood pressure analyzer**

## Lampiran 15

**Hasil perhitungan viskositas sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi**

Gel	Spindel	Kecepatan (rpm)	Deal Reading (dr)	Faktor Koreksi (f)	Viskositas $\eta = dr \times f$ (cps)	Shearing Stres $F/A = dr \times 7,187$ (dyne/cm <sup>2</sup> )	Rate of Share $Dv/dr = F/A \times 1/\eta$
Pembanding	6	0.5	1.5	40000	60000	10.7805	0.0001796
		1	2.4	20000	48000	17.2488	0.0003593
		2	3	10000	30000	21.561	0.0007187
		2.5	4.5	8000	36000	32.3415	0.0008983
		5	9	4000	36000	64.683	0.0017967
		10	17.5	2000	35000	125.772	0.0035935
		20	33.5	1000	33500	240.764	0.007187
		20	34	1000	34000	244.358	0.007187
		10	19	2000	38000	136.553	0.0035935
		5	10.5	4000	42000	75.4635	0.0017967
		2.5	5.5	8000	44000	39.5285	0.0008983
		2	3.5	10000	35000	25.1545	0.0007187
		1	3	20000	60000	21.561	0.0003593
		0.5	1.7	40000	68000	12.2179	0.0001796
		Nanopartikel	6	0.5	2	40000	80000
1	2.5			20000	50000	17.9675	0.0003594
2	3.75			10000	37500	26.95125	0.0007187
2.5	4.2			8000	33600	30.1854	0.0008984
5	9.7			4000	38800	69.7139	0.0017968
10	20.5			2000	41000	147.3335	0.0035935
20	35			1000	35000	251.545	0.007187
20	36			1000	36000	258.732	0.007187
10	22			2000	44000	158.114	0.0035935
5	12			4000	48000	86.244	0.00179675
2.5	6.5			8000	52000	46.7155	0.00089838
2	5			10000	50000	35.935	0.0007187
1	4			20000	80000	28.748	0.00035935
0.5	2.5			40000	100000	17.9675	0.00017968
Nanopartikel dengan peningkat penetrasi	6			0.5	2	40000	80000
		1	3.25	20000	65000	23.35775	0.00035935
		2	4	10000	40000	28.748	0.0007187
		2.5	5.2	8000	41600	37.3724	0.00089838
		5	12	4000	48000	86.244	0.00179675
		10	26	2000	52000	186.862	0.0035935
		20	44	1000	44000	316.228	0.007187

(lanjutan)

20	45.5	1000	45500	327.0085	0.007187
10	28	2000	56000	201.236	0.0035935
5	14	4000	56000	100.618	0.00179675
2.5	7	8000	56000	50.309	0.00089838
2	5.2	10000	52000	37.3724	0.0007187
1	4	20000	80000	28.748	0.00035935
0.5	3	40000	120000	21.561	0.00017968

**Lampiran 16**

**Serapan verapamil hidroklorida dengan pelarut aqua demineralisata dalam pembuatan kurva kalibrasi pada  $\lambda$  279 nm**

<b>Konsentrasi (ppm)</b>	<b>Serapan (A)</b>
20	0.2358
25	0.2900
30	0.3540
35	0.4065
40	0.4651
45	0.5222

**Lampiran 17**

**Serapan verapamil hidroklorida dengan pelarut dapar fosfat pH 7,4 dalam pembuatan kurva kalibrasi pada  $\lambda$  279 nm**

<b>Konsentrasi (ppm)</b>	<b>Serapan (A)</b>
20	0.2115
25	0.2692
30	0.3206
35	0.3735
40	0.4261
45	0.4782

### Lampiran 18

#### Uji perolehan kembali (UPK) kadar verapamil hidroklorida dalam sediaan

Sediaan	Konsentrasi (ppm)	Serapan (A)	Kadar perolehan kembali (%)	Kadar perolehan kembali rata-rata (%)
Gel pembanding	10,02	0,1190	98,3	99,90 ± 1,97
	10,02	0,1201	99,3	
	10,04	0,1236	102,1	
Gel nanopartikel	10,04	0,1242	102,6	100,80 ± 3,29
	10,06	0,1246	102,8	
	10,02	0,1174	97,0	
Gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi	10,00	0,1202	99,54	100,04 ± 0,49
	10,00	0,1214	100,51	
	10,00	0,1209	100,07	

### Lampiran 19

#### Hasil uji penetrasi verapamil hidroklorida dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 dari sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi

Waktu (menit)	Jumlah verapamil hidroklorida terpenetrasi ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (n=3)		
	Gel pembanding	Gel nanopartikel	Gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi
10	166,63 ± 3,25	170,58 ± 3,25	184,56 ± 2,07
30	200,53 ± 2,54	203,88 ± 2,36	239,39 ± 2,27
60	217,76 ± 2,87	256,56 ± 1,65	296,75 ± 5,09
90	263,56 ± 1,59	365,97 ± 3,21	349,79 ± 3,62
120	285,71 ± 3,57	452,08 ± 1,89	508,24 ± 8,34
180	333,63 ± 1,77	659,70 ± 2,14	691,19 ± 6,37
240	411,42 ± 5,40	731,11 ± 2,62	835,25 ± 9,56
300	480,53 ± 10,03	778,41 ± 2,87	924,58 ± 1,47
360	518,7 ± 2,86	819,71 ± 2,23	984,76 ± 7,04

### Lampiran 20

Hasil perhitungan fluks verapamil hidroklorida tiap waktu pengambilan dari sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi berdasarkan uji penetrasi selama 6 jam

Waktu (menit)	Fluks verapamil hidroklorida ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{jam}$ ) (n=3)		
	Gel pembanding	Gel nanopartikel	Gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi
10	980,17 $\pm$ 19,12	1003,43 $\pm$ 19,12	1085,63 $\pm$ 12,21
30	401,05 $\pm$ 5,08	407,77 $\pm$ 4,74	478,79 $\pm$ 4,54
60	217,75 $\pm$ 2,88	256,56 $\pm$ 1,65	296,75 $\pm$ 5,08
90	175,71 $\pm$ 1,06	243,97 $\pm$ 2,13	233,19 $\pm$ 2,41
120	142,85 $\pm$ 1,78	226,04 $\pm$ 0,95	254,12 $\pm$ 4,17
180	111,21 $\pm$ 0,59	219,91 $\pm$ 0,71	230,39 $\pm$ 2,12
240	102,86 $\pm$ 1,35	182,77 $\pm$ 0,65	208,82 $\pm$ 2,39
300	96,1 $\pm$ 2,00	155,68 $\pm$ 0,58	184,91 $\pm$ 0,3
360	85,8 $\pm$ 0,47	136,61 $\pm$ 0,37	164,13 $\pm$ 1,17

### Lampiran 21

Hasil Jumlah kumulatif verapamil hidroklorida yang terpenetrasi, persentase jumlah verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dan fluks verapamil hidroklorida dari sediaan gel pembanding, gel nanopartikel, dan gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi berdasarkan uji penetrasi selama 6 jam

Gel	Jumlah Kumulatif Verapamil HCl yang terpenetrasi ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (n=3)	% Jumlah Kumulatif Verapamil HCl yang terpenetrasi (n=3)	Fluks ( $\mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$ ) (n=3)
Pembanding	518,7 $\pm$ 2,86	7,21 $\pm$ 0,04	60,93 $\pm$ 0,47
Nanopartikel	819,71 $\pm$ 2,23	11,40 $\pm$ 0,04	121,88 $\pm$ 0,37
Gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi	984,76 $\pm$ 7,04	13,69 $\pm$ 0,12	148,33 $\pm$ 1,17

## Lampiran 22

### Data berat badan tikus antar kelompok perlakuan selama 2 minggu

Kelompok	Tikus	Berat Badan (gram)		Keterangan
		Minggu 0	Minggu 2	
I	1	213,5	237,1	Normal
	2	221,4	249,4	
	3	195,0	208,8	
	4	214,3	240,8	
	5	179,4	206,7	
II	1	236,8	156,2	Kontrol negatif (Gel tanpa zat aktif)
	2	281,6	208,4	
	3	213,9	132,3	
	4	242,6	182,5	
	5	217,0	190,9	
III	1	189,7	161,7	Pembeding
	2	215,3	202,8	
	3	183,1	145,3	
	4	269,4	223,5	
	5	180,9	103,6	
IV	1	204,2	143,5	Uji I (Gel nanopartikel)
	2	215,3	183,2	
	3	183,2	129,2	
	4	210,5	149,8	
	5	219,5	212,2	
V	1	238,6	191,6	Uji II (Gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi)
	2	181,8	141,2	
	3	223,2	188,7	
	4	166,2	123,1	
	5	199,6	149,4	

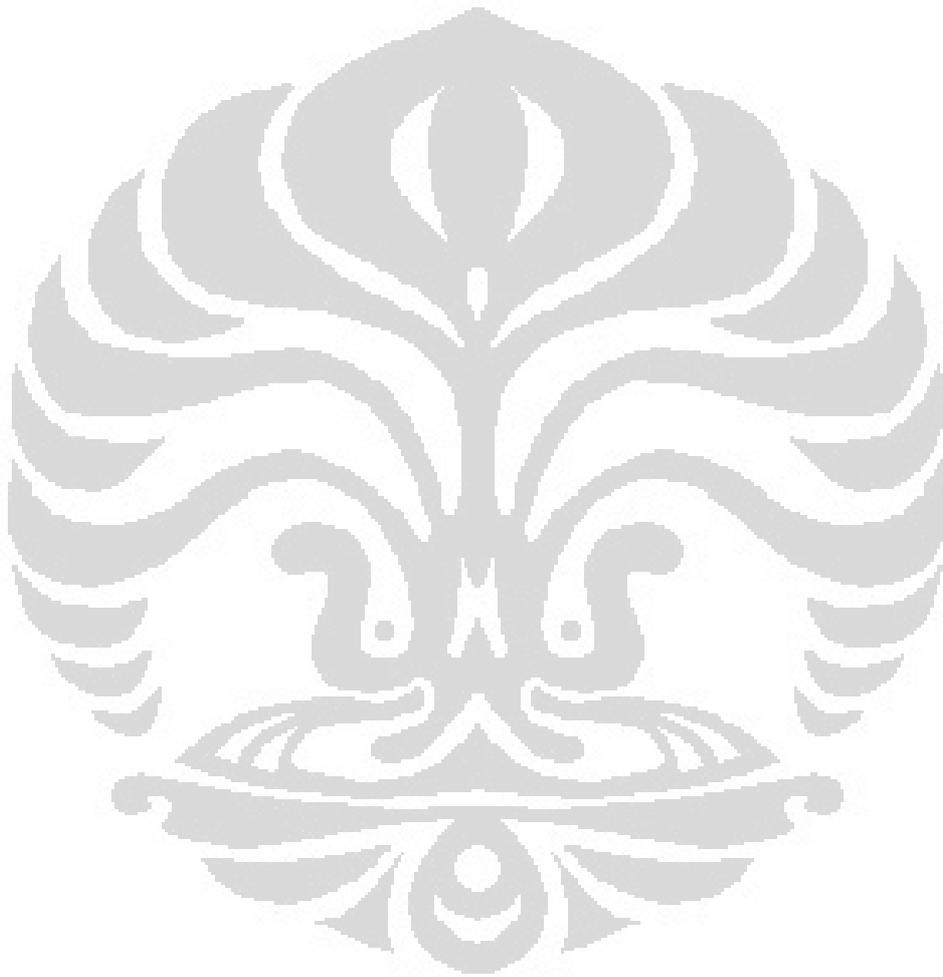
## Lampiran 23

Data tekanan darah sistolik, diastolik, dan tekanan darah arteri rata-rata tiap kelompok perlakuan

Kel.	Tikus	Rata-rata tekanan darah sistolik (mmHg)	SD (n=6)	Rata-rata tekanan darah diastolik (mmHg)	SD (n=6)	TDAR	Rata-rata sistolik/diastolik /TDAR	Ket.
I	1	120	6,94	72	10,89	88	123 / 89 / 100	Normal
	2	119	6,68	82	14,12	94		
	3	121	4,73	93	7,55	102		
	4	123	5,23	93	3,66	103		
	5	133	5,93	105	3,56	114		
II	1	136	2,00	92	5,13	107	141 / 90 / 107	Kontrol negatif (Gel tanpa zat aktif)
	2	147	1,15	112	8,33	123		
	3	138	2,00	74	11,00	95		
	4	155	1,58	102	1,14	120		
	5	130	1,48	70	6,26	90		
III	1	143	3,05	111	3,85	118	150 / 113 / 123	Pembanding
	2	143	1,00	106	1,54	139		
	3	162	3,90	128	3,03	134		
	4	157	1,30	123	5,26	114		
	5	147	1,67	98	4,39	109		
IV	1	132	2,41	98	1,34	96	150 / 113 / 123	Uji I (Gel nanopartikel)
	2	126	4,24	81	3,53	121		
	3	148	9,87	107	5,51	114		
	4	146	2,70	98	3,35	131		
	5	156	4,30	118	7,76	118		
V	1	135	0,58	92	2,08	106	150 / 113 / 123	Uji II (Gel
	2	158	2,99	100	7,36	119		

3	137	2,08	88	2,31	104	nanopartikel dengan peningkat penetrasi)
4	177	1,73	129	3,02	145	
5	149	5,55	112	1,09	124	

---



## Lampiran 24

Data persen penurunan tekanan darah sistolik, diastolik, dan tekanan darah arteri rata-rata tiap kelompok perlakuan

Kel.	Tikus	Rata-rata tekanan darah sistolik (mmHg)		% penurunan tekanan darah	Rata-rata tekanan darah diastolik (mmHg)		% penurunan tekanan darah	TDAR (mmHg)		% penurunan tekanan darah	Ket.
		Sebelum	Sesudah		Sebelum	Sesudah		Sebelum	Sesudah		
II	1	136	138	-1,47	92	89	3,26	107	105	-13,44	Kontrol negatif (Gel tanpa zat aktif)
	2	147	147	0	112	108	3,57	123	121	13,75	
	3	138	138	0	74	91	-22,97	95	107	-33,92	
	4	155	167	-7,74	102	108	-5,88	120	127	30,36	
	5	130	132	-1,54	70	59	15,71	90	83	5,56	
III	1	143	107	25,17	111	74	33,33	118	85	3,94	Pembanding
	2	143	143	0	106	99	6,60	139	114	5,98	
	3	162	153	5,55	128	120	6,25	134	131	12,41	
	4	157	143	8,92	123	105	14,63	114	118	16,03	
	5	147	144	2,04	98	72	26,53	109	96	14,02	
IV	1	132	124	6,06	98	79	19,39	96	94	2,43	Uji I

(lanjutan)

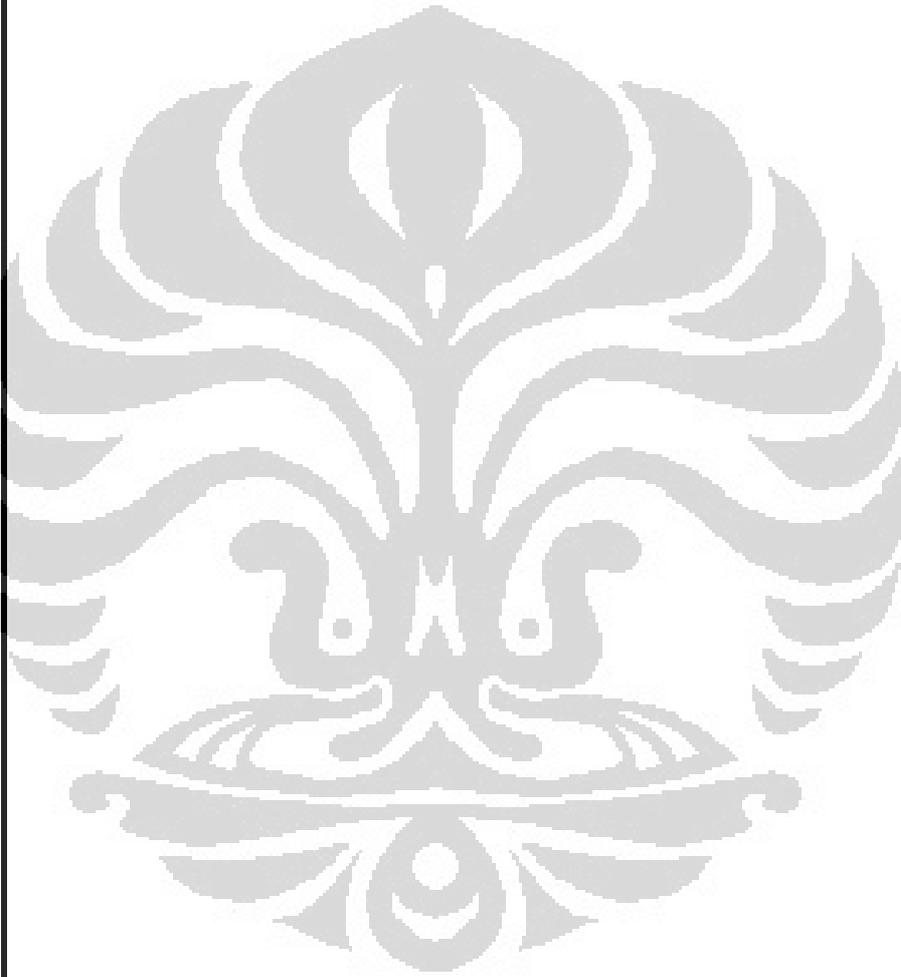
	119	5,56	81	81	81	0	121	94	21,55	(Gel nanopartikel)
3	148	132	10,81	107	76	28,97	114	95	19,88	
4	146	130	10,96	98	72	26,53	131	91	14,03	
5	156	139	10,90	118	99	16,10	118	112	5,33	
1	135	134	0,74	92	84	8,70	106	101	14,80	Uji II
2	158	135	14,56	100	85	15	119	102	10,22	(Gel
3	137	133	2,92	88	74	15,91	104	94	8,97	nanopartikel
4	177	164	7,34	129	116	10,08	145	132	21,18	dengan
5	149	116	22,15	112	89	20,54	124	98	13,43	peningkat
										penetrasi)

### Lampiran 25

Data rata-rata persen penurunan tekanan darah sistolik, diastolik, dan tekanan darah arteri rata-rata tiap kelompok perlakuan dan persen efektivitas

Kelompok	% penurunan tekanan darah sistolik ± SD (n=5)	% penurunan tekanan darah diastolik ± SD (n=5)	% penurunan tekanan darah arteri rata-rata ± SD (n=5)	% efektivitas terhadap gel pembanding	Keterangan
II	0,25 ± 3,21	3,57 ± 14,36	0,46 ± 24,86	-	Kontrol negatif
III	8,34 ± 10,01	17,47 ± 12,10	10,48 ± 5,25	-	Pembanding
IV	8,86 ± 2,79	18,20 ± 11,43	12,64 ± 8,53	5,87 / 4,18 / 20,61	Uji I

V	9,54 ± 8,81	14,05 ± 4,77	12,64 ± 4,79	14,89 / - / 20,61	Uji II
---	-------------	--------------	--------------	-------------------	--------



## Lampiran 26

### Contoh perhitungan persen efisiensi penjerapan verapamil hidroklorida

Persamaan regresi:  $y = 0,0115x + 0,0057$

Banyaknya suspensi nanopartikel verapamil hidroklorida yang diambil =  $\pm 5,0$  mL  
(mengandung verapamil hidroklorida  $\pm 8,571$  mg)

suspensi ditambahkan dapar alkali borat pH 9,7 5,0 ml  
total larutan 10,0 mL = 857,1 ppm



larutan tersebut disentrifugasi 3500 rpm selama 30 menit



1,0 mL supernatan yang dihasilkan dipipet dan diencerkan dalam labu tentukur  
sampai 25,0 ml dengan aqua demineralisata = 34,284 ppm



1,0 mL supernatan yang dihasilkan dipipet dan diencerkan dalam labu tentukur  
sampai 25,0 ml dengan aqua demineralisata = 1,371 ppm

#### Data 1:

Konsentrasi verapamil hidroklorida total = 1,371 ppm

Serapan yang terukur ( $y$ ) = 0,0125

Konsentrasi verapamil hidroklorida dalam supernatan = 0,605 ppm

% efisiensi penjerapan =  $\frac{1,371 - 0,605}{1,371} \times 100\% = 55,90\%$

#### Data 2:

Konsentrasi verapamil hidroklorida total = 1,371 ppm

Serapan yang terukur ( $y$ ) = 0,0123

Konsentrasi verapamil hidroklorida dalam supernatan = 0,574 ppm

% efisiensi penjerapan =  $\frac{1,371 - 0,574}{1,371} \times 100\% = 58,13\%$

Jadi efisiensi penjerapan kembali verapamil hidroklorida dalam nanopartikel formula B adalah  $57,02 \pm 1,58\%$

## Lampiran 27

### Contoh perhitungan uji perolehan kembali (UPK) kadar verapamil hidroklorida dari sediaan

Persamaan regresi:  $y = 0,0115x + 0,0057$

Banyaknya gel pembanding verapamil hidroklorida yang diambil =  $\pm 1,0$  g  
(mengandung verapamil hidroklorida  $\pm 10,0$  mg)

gel dicukupkan volumenya dalam labu tentukur 100,0 ml  
dengan aqua demineralisata = 100,0 ppm

↓  
Larutan tersebut disaring secara kuantitatif dengan menggunakan kertas saring.  
Kertas saring pertama kali dijenuhkan terlebih dahulu dengan aqua demineralisata,  
kemudian larutan sampel disaring dan 2-3 ml filtrat pertama dibuang

↓  
Filtrat yang dihasilkan dipipet sebanyak 1,0 ml dan diencerkan dalam labu tentukur  
sampai 10,0 ml dengan aqua demineralisata = 10,0 ppm

#### Data 1

Konsentrasi verapamil hidroklorida seharusnya = 10,02 ppm  
Serapan yang terukur ( $y$ ) = 0,1190  
Konsentrasi verapamil hidroklorida perolehan kembali = 9,85 ppm  
Kadar perolehan kembali verapamil hidroklorida dalam gel = 98,3%

#### Data 2

Konsentrasi verapamil hidroklorida seharusnya = 10,02 ppm  
Serapan yang terukur ( $y$ ) = 0,1201  
Konsentrasi verapamil hidroklorida perolehan kembali = 9,95 ppm  
Kadar perolehan kembali verapamil hidroklorida dalam gel = 99,3%

#### Data 3

Konsentrasi verapamil hidroklorida seharusnya = 10,04 ppm  
Serapan yang terukur ( $y$ ) = 0,1236  
Konsentrasi verapamil hidroklorida perolehan kembali = 10,25 ppm  
Kadar perolehan kembali verapamil hidroklorida dalam gel = 102,1%

Kadar perolehan kembali verapamil hidroklorida rata-rata dalam gel pembanding =  
 $\frac{(98,3 + 99,3 + 102,1)\%}{3} = 99,9\%$

3

Jadi kadar perolehan kembali verapamil hidroklorida rata-rata dalam gel pembanding adalah 99,9%

## Lampiran 28

**Contoh perhitungan jumlah verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dari sediaan gel pembeding pada menit ke-10**

Serapan ( $y$ ) = 0,0226

$y = 0,0106x + 0,0016$

$x = 1,9811$

Faktor pengenceran (FP) = volume labu tentukur : volume sampling  
 = 5 ml : 0,5 ml = 10x

Konsentrasi terpenetrasi =  $\chi \times \text{FP}$   
 = 1,9811 x 10  
 = 19,811  $\mu\text{g/ml}$

Rumus jumlah kumulatif yang terpenetrasi :

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

$C_n$  = Konsentrasi verapamil ( $\mu\text{g/ml}$ ) pada sampling menit ke-10 = 19,811  $\mu\text{g/ml}$

$V$  = Volume sel difusi Franz = 14,0 ml

$\sum_{i=1}^{n-1} C$  = Nilainya 0 untuk *sampling* pertama (menit ke-10)

$S$  = Volume *sampling* = 0,5 ml

$A$  = Luas area membran = 1,77  $\text{cm}^2$

$$Q = \frac{(19,811 \mu\text{g/ml} \times 14 \text{ ml}) + (0 \times 0,5 \text{ ml})}{1,77 \text{ cm}^2} = 156,70 \mu\text{g/cm}^2$$

Jadi, jumlah verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dari sediaan gel pembeding pada menit ke-10 adalah 156,70  $\mu\text{g/cm}^2$

### Lampiran 29

**Contoh perhitungan jumlah verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dari sediaan gel pembeding pada menit ke-30**

Serapan ( $y$ ) = 0,0256

$y = 0,0106x + 0,0016$

$x = 2,2641$

Faktor pengenceran (FP) = volume labu tentukur : volume sampling  
 = 5 ml : 0,5 ml = 10x

Konsentrasi terpenetrasi =  $\chi \times \text{FP}$   
 = 2,2641 x 10  
 = 22,642  $\mu\text{g/ml}$

Rumus jumlah kumulatif yang terpenetrasi :

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

$C_n$  = Konsentrasi verapamil ( $\mu\text{g/ml}$ ) pada sampling menit ke-10 = 19,811  $\mu\text{g/ml}$

$V$  = Volume sel difusi Franz = 14,0 ml

$\sum_{i=1}^{n-1} C$  = Konsentrasi terpenetrasi pada *sampling* menit sebelumnya (menit ke-30)  
 = 19,811  $\mu\text{g/ml}$

$S$  = Volume *sampling* = 0,5 ml

$A$  = Luas area membran = 1,77  $\text{cm}^2$

$$Q = \frac{(22,642 \mu\text{g/ml} \times 14 \text{ ml}) + (19,811 \times 0,5 \text{ ml})}{1,77 \text{ cm}^2} = 184,686 \mu\text{g/cm}^2$$

Jadi, jumlah verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dari sediaan gel pembeding pada menit ke-10 adalah 184,686  $\mu\text{g/cm}^2$

### Lampiran 30

#### Contoh perhitungan fluks verapamil hidroklorida dari sediaan gel pembeding

Kecepatan penetrasi verapamil (fluks;  $J$ ,  $\mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$ ) dihitung dengan rumus:

$$J = M/(S \times t)$$

Dimana:

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

$M$  = Jumlah kumulatif kurkumin yang melalui membran ( $\mu\text{g}$ )

$S$  = Luas area difusi ( $\text{cm}^2$ )

$t$  = Waktu (jam)

Diketahui:  $M / S = 518,7 \pm 2,86 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

$(M / S)_1 = 514,83 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

$(M / S)_2 = 519,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

$(M / S)_3 = 521,64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

$J_1 = \frac{514,83}{6} = 85,805 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$

$J_2 = \frac{519,63}{6} = 86,605 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$

$J_3 = \frac{521,64}{6} = 86,940 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$

$J$  rata-rata =  $85,8 \pm 0,47 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$

Jumlah fluks verapamil dari sediaan gel pembeding adalah  $85,8 \pm 0,47 \mu\text{g cm}^{-2} \text{jam}^{-1}$

### Lampiran 31

#### Contoh perhitungan persentase jumlah kumulatif kurkumin yang terpenetrasi dari sediaan gel

$$\% \text{ jumlah verapamil terpenetrasi} = \frac{\Sigma \text{ kumulatif terpenetrasi} \times \text{luas membran}}{\text{berat verapamil}} \times 100\%$$

Jumlah verapamil dalam 1 g sampel adalah 5 g

Sampel yang diaplikasikan pada kulit sebanyak 1 g

Dalam 1 g sampel mengandung kurkumin sebanyak 0,05 g = 50.000 µg

Data 1

$$\begin{aligned} \% \text{ jumlah kumulatif terpenetrasi} &= \frac{28,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 1,77 \text{ cm}^2}{50.000 \mu\text{g}} \times 100\% \\ &= 0,08\% \end{aligned}$$

Data 2

$$\begin{aligned} \% \text{ jumlah kumulatif terpenetrasi} &= \frac{31,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 1,77 \text{ cm}^2}{50.000 \mu\text{g}} \times 100\% \\ &= 0,09\% \end{aligned}$$

Data 3

$$\begin{aligned} \% \text{ jumlah kumulatif terpenetrasi} &= \frac{37,36 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 1,77 \text{ cm}^2}{50.000 \mu\text{g}} \times 100\% \\ &= 0,10\% \end{aligned}$$

Jadi % jumlah kumulatif verapamil hidroklorida yang terpenetrasi dari sediaan gel pembanding adalah  $7,21 \pm 0,04\%$

### Lampiran 32

#### Uji normalitas menurut Shapiro-Wilk terhadap data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0)

Tujuan : untuk mengetahui apakah data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan terdistribusi normal

Hipotesa :

Ho : data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan terdistribusi normal

Ha : data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan tidak terdistribusi normal

Pengambilan keputusan:

Jika nilai signifikansi  $\geq 0,05$  maka Ho diterima

Jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka Ho ditolak

#### Tes Normalitas

Kelompok uji	Shapiro-Wilk		
	Statistik	Derajat kebebasan	Signifikansi
Normal	0,781	5	0,056
Kontrol Negatif	0,960	5	0,809
Gel pembanding	0,856	5	0,216
Gel nanopartikel	0,939	5	0,660
Gel nanopartikel dengan peningkat penetrasi	0,921	5	0,539

Kesimpulan: Data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan terdistribusi normal

### Lampiran 33

#### Uji homogenitas varians menurut Levene terhadap data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0)

Tujuan : untuk melihat apakah data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan homogen atau tidak

Hipotesa :

Ho : data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan bervariasi homogen

Ha : data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan tidak bervariasi homogen

Pengambilan keputusan:

Jika nilai signifikansi  $\geq 0,05$  maka Ho diterima

Jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka Ho ditolak

<b>Tes Homogenitas Varians</b>			
Statistik Levene	Derajat kebebasan antar kelompok	Derajat kebebasan dalam kelompok	Signifikansi
1,944	4	20	0,142

Kesimpulan: Data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan bervariasi homogen

### Lampiran 34

#### Uji analisis varian satu arah terhadap data pengukuran tekanan darah sistolik pada 5 kelompok perlakuan (SPSS 19.0)

Tujuan : untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan data pengukuran tekanan darah sistolik pada 5 kelompok perlakuan

Hipotesa :

Ho : data pengukuran tekanan darah sistolik pada 5 kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

Ha : data pengukuran tekanan darah sistolik pada 5 kelompok perlakuan berbeda secara bermakna

Pengambilan keputusan:

Jika nilai signifikansi  $\geq 0,05$  maka Ho diterima

Jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka Ho ditolak

#### ANOVA

Sumber keragaman	Jumlah kuadrat	Derajat kebebasan	Rata-rata jumlah kuadrat	F hitung	Signifikansi
Antar kelompok	2541,440	4	635,360	4,890	0,006
Dalam kelompok	2598,800	20	129,940		
Jumlah	5140,240	24			

Kesimpulan: Data pengukuran tekanan darah sistolik pada 5 kelompok perlakuan berbeda secara bermakna

### Lampiran 35

#### Uji beda nyata terkecil terhadap data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0)

Tujuan : untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan

Hipotesa :

Ho : data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

Ha : data pengukuran tekanan darah sistolik pada tiap kelompok perlakuan berbeda secara bermakna

Pengambilan keputusan:

Jika nilai signifikansi  $\geq 0,05$  maka Ho diterima

Jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka Ho ditolak

Kelompok	Signifikan				
	1	2	3	4	5
1	-	0,021*	0,001*	0,019*	0,001*
2	0,021*	-	0,217	0,956	0,181
3	0,001*	0,217	-	0,236	0,913
4	0,019*	0,956	0,236	-	0,198
5	0,001*	0,181	0,913	0,198	-

Keterangan: \* = terdapat perbedaan yang bermakna pada  $\alpha$  0,05;

1 = kelompok normal

2 = kelompok kontrol negatif

3 = kelompok gel pembanding

4 = kelompok gel nanopartikel

5 = kelompok gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi

### Lampiran 36

#### Uji normalitas menurut Shapiro-Wilk terhadap data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0)

Tujuan : untuk mengetahui apakah data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan terdistribusi normal

Hipotesa :

Ho : data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan terdistribusi normal

Ha : data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan tidak terdistribusi normal

Pengambilan keputusan:

Jika nilai signifikansi  $\geq 0,05$  maka Ho diterima

Jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka Ho ditolak

#### Tes Normalitas

Kelompok uji	Shapiro-Wilk		
	Statistik	Derajat kebebasan	Signifikansi
Normal	0,966	5	0,847
Kontrol Negatif	0,933	5	0,620
Gel pembanding	0,959	5	0,800
Gel nanopartikel	0,966	5	0,852
Gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi	0,931	5	0,606

Kesimpulan: Data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan terdistribusi normal

### Lampiran 37

#### Uji homogenitas varians menurut Levene terhadap data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0)

Tujuan : untuk melihat apakah data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan homogen atau tidak

Hipotesa :

Ho : data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan bervariasi homogen

Ha : data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan tidak bervariasi homogen

Pengambilan keputusan:

Jika nilai signifikansi  $\geq 0,05$  maka Ho diterima

Jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka Ho ditolak

Tes Homogenitas Varians			
Statistik Levene	Derajat kebebasan antar kelompok	Derajat kebebasan dalam kelompok	Signifikansi
0,477	4	20	0,752

Kesimpulan: Data pengukuran tekanan darah diastolik pada tiap kelompok perlakuan bervariasi homogen

### Lampiran 38

#### Uji analisis varian satu arah terhadap data pengukuran tekanan darah diastolik pada 5 kelompok perlakuan (SPSS 19.0)

Tujuan : untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan data pengukuran tekanan darah diastolik pada 5 kelompok perlakuan

Hipotesa :

Ho : data pengukuran tekanan darah diastolik pada 5 kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

Ha : data pengukuran tekanan darah diastolik pada 5 kelompok perlakuan berbeda secara bermakna

Pengambilan keputusan:

Jika nilai signifikansi  $\geq 0,05$  maka Ho diterima

Jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka Ho ditolak

#### ANOVA

Sumber keragaman	Jumlah kuadrat	Derajat kebebasan	Rata-rata jumlah kuadrat	F hitung	Signifikansi
Antar kelompok	2054,960	4	513,740	2,355	0.089
Dalam kelompok	4362,800	20	218,140		
Jumlah	6417,760	24			

Kesimpulan: Data pengukuran tekanan darah sistolik pada 5 kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

### Lampiran 39

#### Uji normalitas menurut Shapiro-Wilk terhadap data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0)

Tujuan : untuk mengetahui apakah data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan terdistribusi normal

Hipotesa :

Ho : data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan terdistribusi normal

Ha : data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan tidak terdistribusi normal

Pengambilan keputusan:

Jika nilai signifikansi  $\geq 0,05$  maka Ho diterima

Jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka Ho ditolak

#### Tes Normalitas

Kelompok uji	Shapiro-Wilk		
	Statistik	Derajat kebebasan	Signifikansi
Normal	0,973	5	0,896
Kontrol Negatif	0,912	5	0,477
Gel pembanding	0,904	5	0,430
Gel nanopartikel	0,946	5	0,710
Gel nanopartikel dengan peningkatan penetrasi	0,991	5	0,982

Kesimpulan: Data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan terdistribusi normal

#### Lampiran 40

#### Uji homogenitas varians menurut Levene terhadap data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan (SPSS 19.0)

Tujuan : untuk melihat apakah data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan homogen atau tidak

Hipotesa :

Ho : data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan bervariasi homogen

Ha : data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan tidak bervariasi homogen

Pengambilan keputusan:

Jika nilai signifikansi  $\geq 0,05$  maka  $H_0$  diterima

Jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka  $H_0$  ditolak

#### Tes Homogenitas Varians

Statistik Levene	Derajat kebebasan antar kelompok	Derajat kebebasan dalam kelompok	Signifikansi
0,374	4	20	0,824

Kesimpulan: Data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada tiap kelompok perlakuan bervariasi homogen

### Lampiran 41

#### Uji analisis varian satu arah terhadap data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada 5 kelompok perlakuan (SPSS 19.0)

Tujuan : untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada 5 kelompok perlakuan

Hipotesa :

Ho : data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada 5 kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

Ha : data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada 5 kelompok perlakuan berbeda secara bermakna

Pengambilan keputusan:

Jika nilai signifikansi  $\geq 0,05$  maka Ho diterima

Jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka Ho ditolak

#### ANOVA

Sumber keragaman	Jumlah kuadrat	Derajat kebebasan	Rata-rata jumlah kuadrat	F hitung	Signifikansi
Antar kelompok	1741,840	4	435,460	2,369	0.087
Dalam kelompok	3676,800	20	183,840		
Jumlah	5418,640	24			

Kesimpulan: Data pengukuran tekanan darah arteri rata-rata pada 5 kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

## Lampiran 42

## Sertifikat analisis kitosan

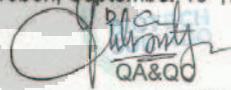


## Certificate of Analysis

Invoice No. : -  
 Product Name : Chitosan Medical/Food Grade  
 Batch No. : 07A0911.M.HM.CHC  
 Quantity : 1 Kg  
 Analysis Date : May 26<sup>th</sup>, 2011

Items	Test Result
Appearance	Off White
Particle Size	#20-30
Degree of Deacetylation	89.60 %
Viscosity	36 cps
Moisture Content	6.89 %
Ash Content	1.10 %
Protein Content	≤ 0.5 %
pH (1%)	7 - 8
Insoluble	< 1 %

Cirebon, September, 16<sup>th</sup>, 2011

  
QA&QC  
CIREBON - INDONESIA

Bin No.1 Cirebon-45113, Indonesia P. 0231 - 224 1001 F. 0231 - 224 1011  
 Komp. Pelabuhan Perikanan Kelawaran, Jl. Pelabuhan Perikanan

## Lampiran 43

## Sertifikat analisis verapamil hidroklorida

TANGGAL BERLAKU : 31 JULI 2003			
Plant Bandung			
<b>LAPORAN ANALISA BAHAN BAKU</b>			
Nama Bahan Baku : VERAPAMIL HCl	No. Batch :11100125 Exp. Date :01-03-2016	Kode :F-SS-BB-00259/1/0 Tgl. Berlaku :31 Juli 2003	
Kode Bahan :3012158 Origin :Recordati-Italy No. LA :B110488 No. SP :P113165	Supplier :PT.Menjangan Sakti Tgl. Sampling :25-05-2011 Tgl. Selesai :30-05-2011	Jumlah :25 kg Pemeriksa :Bambang No. BTBS :B110488	
NO	PEMERIKSAAN	PERSYARATAN	HASIL
1	Pemerian (R)	Serbuk hablur warna putih atau hampir putih, praktis tidak berbau dan rasa pahit.	Serbuk hablur, warna putih, tidak berbau
2	Identifikasi (R)	a. Terbentuk endapan putih yang tidak larut dalam HNO <sub>3</sub> , tetapi larut dalam NH <sub>4</sub> OH 6 N sedikit berlebih b. Panjang gelombang maksimum 229 nm dan 278 nm, rasio absorban pada Panjang gelombang 278 nm dan 229 nm adalah antara 0,35 dan 0,39	Sesuai Sesuai
3	Kelarutan	Larut dalam air; Mudah larut dalam kloroform; Agak sukar larut dalam; etanol praktis tidak larut dalam eter	Sesuai
4	Kejernihan dan warna larutan	Jernih dan tidak berwarna	Sesuai
5	pH 5 %	Antara 4,5 dan 6,5	4,52
6	Jarak lebur	Antara 140° dan 144 ° C	142,0 °C – 143,9 °C
7	Logam berat	Tidak lebih dari 10 bpj	Sesuai
8	Susut pengeringan (R)	Tidak lebih dari 0,5%	0,02%
9	Sisa pemijaran	Tidak lebih dari 0,1%	0,02%
10	Kadar (R)	99,0% - 100,5%, terhadap berat kering	99,62%
Pustaka : USP 23, BP 93, FI IV			
Kesimpulan : Memenuhi Syarat			
Penanggung Jawab : MPM  (Dra. Titin Supiamah)		Bandung, 01 Juni 2011 AMPM  (Dra. Endang Widiastuti)	
Halaman 1 dari 1			
<small>D:\SPBB\ILA Bahan Baku\LA save BB\2011 format lama\Verapamil Hidrochloridum - 00259 (0), LA BB110423.doc</small>			
Jl. Pajajaran No. 29 - 31 Bandung 40171 Indonesia Telp. (022) 4204043, 4204044 Fax. (022) 4237079			

## Lampiran 44

## Sertifikat analisis natrium hidroksida



## Specification

---

1.06498.1000 Sodium hydroxide pellets for analysis EMSURE® ISO

---

	Spec. Values	
Assay (acidimetric, NaOH)	≥ 99	%
Carbonate (as Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	≤ 1	%
Chloride (Cl)	≤ 0.0005	%
Phosphate (PO <sub>4</sub> )	≤ 0.0005	%
Silicate (SiO <sub>2</sub> )	≤ 0.001	%
Sulphate (SO <sub>4</sub> )	≤ 0.0005	%
Total nitrogen (N)	≤ 0.0003	%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.0005	%
Al (Aluminium)	≤ 0.0005	%
As (Arsenic)	≤ 0.0001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.0005	%
Cu (Copper)	≤ 0.0002	%
Fe (Iron)	≤ 0.0005	%
K (Potassium)	≤ 0.05	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.0005	%
Ni (Nickel)	≤ 0.00025	%
Pb (Lead)	≤ 0.0005	%
Zn (Zinc)	≤ 0.001	%

**Dr. Andreas Lang**

---

responsible laboratory manager quality control

*This document has been produced electronically and is valid without a signature*

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0  
SA-7 1106498000/000000 V. 927 Date: 27.10.2011

Page 1 of 1

## Lampiran 45

## Sertifikat hewan coba



**BAGIAN PRODUKSI TERNAK DAGING KERJA DAN ANEKA TERNAK  
DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN  
FAKULTAS PETERNAKAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

---

Sekretariat : Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680  
Telepon : (0251) 8624774, Fax. (0251) 8624774

---

**SURAT KETERANGAN**

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dr. Ir. Asnath M Fuah, MS

Jabatan : Kepala Bagian Produksi Ternak Daging Kerja dan Aneka Ternak

Alamat : Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga-Bogor

Telp. 0251-8624774, Fax. 0251-8624774

Menyatakan bahwa tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *sprague dawley* (SD) yang dikembangkan di Laboratorium Aneka Ternak, Fakultas Peternakan IPB, Telah memenuhi syarat sebagai hewan uji untuk penelitian atau kegiatan praktikum.

Demikian surat keterangan ini dibuat dengan sebenar-benarnya.

Bogor 12 maret 2012

Kepala Bagian  
Produksi Ternak Daging, Kerja dan Aneka Ternak



Dr. Ir. Asnath M. Fuah, MS  
NIP. 195410151979032001