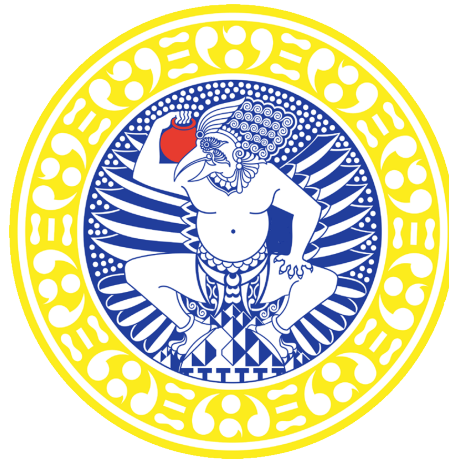


TESIS

**PENGEMBANGAN FORMULA MIKROSFER ALGINAT
UNTUK MENINGKATKAN EFEKTIVITAS DAN STABILITAS
GLUTATION**



**FITRIA NUGRAHAENI
051514153001**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2018**

TESIS

**PENGEMBANGAN FORMULA MIKROSFER ALGINAT
UNTUK MENINGKATKAN EFEKTIVITAS DAN STABILITAS
GLUTATION**



**FITRIA NUGRAHAENI
051514153001**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**PENGEMBANGAN FORMULA MIKROSFER ALGINAT
UNTUK MENINGKATKAN EFEKTIVITAS DAN STABILITAS
GLUTATION**

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Magister Ilmu Farmasi
pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Oleh:

**FITRIA NUGRAHAENI
051514153001**

**PROGRAM MAGISTER
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2017**

Lembar Pengesahan

**PENELITIAN TESIS YANG TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 29 JANUARI 2018**

Oleh
Pembimbing Utama



Dewi Melani H., S.Si., Apt., M.Phil., Ph.D.
NIP. 19780226 200212 2 001

Pembimbing Serta


Dr. Noorma Rosita., M.Si., Apt
NIP. 19651225 199102 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Farmasi


Prof. Dr. Bambang Pravogo E.W., M.S., Apt
NIP. 19561217 198503 1 004

Telah diuji pada :

Tanggal 4 Desember 2017

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Suko Hardjono, MS., Apt.

Anggota : Dewi Melani H, S.Si, M.Phil.,Ph.D., Apt

Dr. Noorma Rosita, M.Si., Apt

Dr. Retno Sari, M.Sc., Apt.

Mahardian Rahmadi, S.Si., M.Sc., Ph.D., Apt

PERNYATAAN ORISINALITAS KARYA ILMIAH

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah ide asli atau murni dari saya yang diarahkan oleh Komisi Pembimbing dan saya membuat proposal penelitian, melakukan penelitian, menulis laporan dalam bentuk naskah TESIS dengan pemikiran saya dan tangan saya sendiri dengan arahan sepenuhnya dari Komisi Pembimbing saya di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Jika dikemudian hari ternyata TESIS ini merupakan hasil plagiat atau menggunakan jasa orang lain secara komersil baik itu keseluruhan maupun sebagian aspek terpenting mulai dari pembuatan proposal, pelaksanaan penelitian, penulisan naskah TESIS saya bersedia menerima sanksi apapun sesuai dengan peraturan yang berlaku pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, termasuk pencabutan gelar magister yang saya peroleh dan jika kemudian hari kesalahan saya tidak terungkap oleh pihak Fakultas Farmasi Universitas Airlangga meskipun kesalahan itu benar terjadi, maka saya mempertanggungjawabkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa.

Surabaya, Januari 2018

Yang membuat pernyataan,



Fitria Nugrahaeni

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT karena atas ijinNya penulisan tesis dengan judul “Pengembangan Formula Mikrosfer Alginat Untuk Meningkatkan Efektivitas Dan Stabilitas Glutation” dapat diselesaikan dengan baik.

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan ucapan terimakasih kepada pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan naskah ini, antara lain:

1. Prof. Dr. Moh.Nasih, MT Ak Selaku rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan Program Magister di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2. Dr. Hj. Umi Athijah, Apt., MS selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
3. Prof. Dr. Bambang Prajogo E.W., MS., Apt.selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Farmasi yang telah menyediakan sarana dan prasarana serta kesempatan penulis atas bantuan dan dukungannya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
4. Dewi Melani Hariyadi, Ph.D., Apt selaku dosen pembimbing utama yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran meluangkan banyak waktu untuk membantu, membimbing, dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
5. Dr. Noorma Rosita, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing serta yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran meluangkan banyak waktu untuk membantu, membimbing, dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
6. Seluruh Staf Pengajar Program Magister Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya atas wawasan keilmuan yang diberikan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
7. Seluruh tenaga non kependidikan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga terutama di laboratorium Teknologi Farmasi (Bapak Dwi Laksono, Bapak Imam, Ibu Yayuk) yang telah membantu penulis dengan ikhlas dan penuh kesabaran untuk menyelesaikan tesis ini.

8. Abdul Aziz Fauzi suami terkasih, kedua orangtua tersayang, kakak penulis serta seluruh keluarga besar yang selalu mendoakan, memberikan semangat, dan motivasi selama penulis menyelesaikan tesis ini.
9. Rekan penelitian seperjuangan, Dita Nurlita, Raditya Weka N, M. Faturhman, Ida Rahmawati, dan Rahma yang telah bersama-sama mengerjakan tesis ini dari awal sampai akhir.
10. Seluruh rekan di Program Studi Magister Ilmu Farmasi Universitas Airlangga, terutama teman-teman minat Sistem Penghantaran Obat yang bersedia membagi ilmu dan memberikan dukungan bagi penulis.
11. Seluruh teman-teman seangkatan di Program Studi Ilmu Farmasi atas semangat, dukungan, dan motivasi dalam penyusunan tesis ini. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan tesis ini.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmatNya kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penyusunan tesis ini. Penulis juga berharap semoga tesis ini dapat bermanfaat.

Akhir kata penulis menyadari bahwa tesis ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharap kritik dan saran sebagai upaya penyempurnaan tesis ini. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi perkembangan dunia kefarmasian

Surabaya, Januari 2018

Penulis,

Fitria Nugrahaeni

RINGKASAN

PENGEMBANGAN FORMULA MIKROSFER ALGINAT UNTUK MENINGKATKAN EFEKTIVITAS DAN STABILITAS GLUTATION

FITRIA NUGRAHAENI

Glutation merupakan kofaktor penting bagi banyak enzim dan terlibat dalam beberapa jalur metabolisme dan sinyal. Konsentrasi glutacion yang menurun seiring dengan bertambahnya usia menyebabkan gejala penuaan. Kekurangan glutacion akan menambah terjadinya kerusakan karena radikal bebas.

Glutation oral memiliki bioavailabilitas yang rendah disebabkan absorpsi yang rendah di saluran pencernaan akibat aksi enzim usus *γ-glutamyl transpeptidase* (GGT) yang menurunkan glutacion. Salah satu upaya untuk menghindari *first pass effect* adalah menggunakan rute topikal.

Glutation sebagai antioksidan akan bekerja pada lapisan epidermis dan dermis. Produk antiaging seperti glutacion bekerja pada lapisan dermis. Glutation diharapkan dapat melewati jalur interseluler dan transeluler sehingga dapat meningkatkan efektivitas dari penggunaan glutacion topikal. Agar dapat melalui jalur interseluler dan transeluler nilai log P yang optimal untuk penetrasi zat menembus stratum korneum adalah 2-3. Glutation mempunyai kemampuan penetrasi rendah di kulit. Hal ini disebabkan karena Glutation mempunyai mempunyai sifat yang sangat hidrofilik. Sehingga diperlukan upaya untuk meningkatkan lipofilisitas dari glutacion agar dapat menembus stratum korneum. Salah satu metode untuk mempengaruhi lipofilisitas obat dengan menggunakan surfaktan. Formulasi obat yang dapat meningkatkan laju permeasi melewati membran dipengaruhi oleh kondisi fisik dan konsentrasi surfaktan nonionik. Selama ini obat yang bersifat lipofilik ditingkatkan hidrofilitasnya dengan cara penambahan surfaktan.

Selain masalah lipofilisitas, problema glutacion yang lain adalah stabilitas, terutama dalam lingkungan netral atau basa. Dalam kondisi stres oksidatif, kelompok thiol glutacion dapat dengan mudah teroksidasi menjadi glutacion disulfida (GSSG), yang kehilangan aktivitas antioksidan berdasarkan aktivitas *radical scavenging*. Sehingga diperlukan sistem penghantaran glutacion yang tepat. Dengan menggunakan sistem mikrosfer dapat melindungi bahan yang sensitif terhadap kondisi lingkungan seperti oksigen, air, dan temperature. Polimer dalam sistem mikrosfer dapat melindungi bahan inti terhadap kondisi oksidatif, sehingga dapat meningkatkan stabilitas. Untuk itu dibuat sistem penghantaran mikrosfer agar glutacion dapat terjebak di dalamnya sehingga dapat meningkatkan stabilitas.

Dalam pembuatan mikrosfer glutacion dibutuhkan polimer yang dapat melingkupinya. Polimer yang paling sering digunakan untuk pembuatan mikrosfer di antaranya adalah alginat. Alginat merupakan polimer alam yang memiliki sifat

biokompatibel, biodegradabel, tidak toksik dan biaya yang relatif murah. Polimer alginat dapat membentuk mikrosfer dengan penambahan ion Ca^{2+} atau kation yang bervalensi dua lainnya. Pembentukan gelasi pada alginat melalui ikatan ion yang spesifik dapat menyebabkan perubahan konformasi struktur natrium alginat.

Kalsium Klorida (CaCl_2) merupakan bahan penyambung silang yang tidak toksik dan efektif dalam pembuatan mikrosfer alginat. Kalsium Klorida (CaCl_2) membentuk gel dengan interaksi antara gugus kalsium dengan ion negatif gugus karboksilat pada rantai alginat.

Metode pembuatan mikrosfer glutatation pada penelitian ini adalah metode gelasi ionotropik dengan teknik aerosolisasi. Metode ini sederhana, cepat, biaya relatif murah dan efektif. Metode pengeringan *freeze drying* dipilih dengan menambahkan *lyoprotectant* maltodekstrin karena dapat menjaga kestabilan mikrosfer.

Aplikasi mikrosfer secara topikal dibutuhkan basis pembawa. Gel merupakan salah satu basis pembawa dalam sediaan farmasi yang digunakan dalam produk kosmetik.

Glutation yang telah ditingkatkan lipofilisitasnya dengan surfaktan dan ditingkatkan stabilitasnya dalam sistem mikrosfer, selanjutnya ditentukan kemampuan penetrasinya. Kemampuan penetrasi glutatation ditentukan berdasarkan peningkatan jumlah kolagen di kulit. Dengan parameter berkurangnya kadar MMP-1.

Hasil penentuan waktu kesetimbangan partisi glutatation adalah pada jam kelima. Selanjutnya dilakukan uji koefisien partisi didapatkan harga koefisien partisi yang optimal pada glutatation dengan peningkatan lipofilisitas HLB 7 sebesar $2,259 \pm 0,009$. Selanjutnya dilakukan peningkatan stabilitas dengan cara dibuat sediaan mikrosfer kemudian diuji karakteristiknya. Evaluasi distribusi ukuran mikrosfer dilakukan pada mikrosfer basah dengan menggunakan mikroskop optik sebanyak 300 partikel didapatkan hasil diameter rata-rata pada masing-masing formula yaitu F1 (glutatation_{+surfaktan}) $1,4 \mu\text{m}$ dan F2 (glutatation_{-surfaktan}) $1,58 \mu\text{m}$. Hasil indeks polidispersitas kedua formula sebesar 0,003.

Hasil pemeriksaan bentuk dan permukaan mikrosfer dilakukan dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Dalam perbesaran yang sama menunjukkan bahwa mikrosfer F1 memiliki bentuk permukaannya tidak rata, sedangkan pada mikrosfer F2 memiliki bentuk permukaannya halus dan rata. Dari hasil pemeriksaan spektra-IR kedua formula, serapan gugus spesifik glutatation masih terdapat di semua formula. Pada pemeriksaan serapan gugus spesifik Na-alginat, sidik jari guluronat menghilang pada semua formula dan serapan gugus garam karboksilat masih terdapat pada semua formula, namun satu dari dua serapannya yaitu 1614 cm^{-1} menghilang. Bilangan gelombang gugus garam karboksilat pada F1 dan F2 secara berurutan yaitu $1423,52 \text{ cm}^{-1}$; $1421,25 \text{ cm}^{-1}$. Data pemeriksaan kandungan glutatation dalam mikrosfer diperoleh hasil (dalam persen) F1 = $8,623 \pm 0,12$; F2 = $7,81 \pm 0,22$. Hasil pemeriksaan efisiensi penjejakan F1 = $54,46 \pm 2,40\%$; F2 = $48,49 \pm 2,37\%$. Hasil perhitungan perolehan kembali mikrosfer (yield) F1 = $94,03 \pm 3,07\%$; F2 = $93,34 \pm 3,65\%$.

Mikrosfer yang telah didapatkan kemudian dilakukan uji stabilitas. Hasil uji stabilitas diketahui glutatation mengikuti orde satu. Berdasarkan harga k masing-

masing bahan diketahui bahwa mikrosfer glutation $_{+surfaktan}$ lebih stabil daripada glutation $_{+surfaktan}$ dan mikrosfer glutation $_{-surfaktan}$ lebih stabil daripada glutation $_{-surfaktan}$. Mikrosfer yang didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam basis gel untuk dilakukan uji penetrasi yang dilihat dari penurunan kadar MMP-1. Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan *factorial design* didapatkan nilai *sig* yang diperoleh sebesar $0,000 < 0,05$ untuk perbandingan kelompok glutation $_{+surfaktan}$ dan glutation $_{-surfaktan}$ menunjukkan ada perbedaan bermakna. Sedangkan analisis pengaruh pembentukan mikrosfer terhadap penurunan ekspresi MMP-1 diperoleh nilai *sig* sebesar $0,000 < 0,05$ untuk perbandingan kelompok mikrosfer glutation $_{+surf}$ dan mikrosfer glutation $_{-surfaktan}$. Nilai *sig* sebesar $0,000 < 0,05$ untuk perbandingan kelompok mikrosfer glutation $_{+surfaktan}$ dan glutation $_{-surfaktan}$ menunjukkan ada perbedaan bermakna. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahan glutation $_{+surfaktan}$ lebih efektif daripada glutation $_{-surfaktan}$ dan mikrosfer glutation $_{+surfaktan}$ lebih efektif daripada mikrosfer glutation $_{-surfaktan}$. Selanjutnya dilakukan hasil analisis menggunakan DoE pada grafik pareto menggambarkan tidak ada interaksi antara penambahan surfaktan dengan pembentukan mikrosfer. Namun penambahan surfaktan paling mempengaruhi dalam penurunan ekspresi MMP-1, sedangkan pembentukan mikrosfer ada pengaruh terhadap penurunan ekspresi MMP-1. Hal tersebut menunjukkan penambahan surfaktan HLB 7 tanpa pembentukan mikrosfer dapat menurunkan ekspresi MMP-1, namun dari uji stabilitasnya didapatkan hasil yang tidak stabil. Sehingga perlu pembentukan mikrosfer untuk meningkatkan efektivitas glutation $_{+surfaktan}$.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF ALGINATE MICROSPHERES FORMULA FOR IMPROVING EFFECTIVENESS AND STABILITY GLUTATHIONE

FITRIA NUGRAHAENI

Glutathione is an essential cofactor for many enzymes and is involved in several metabolic and signal pathways. Glutathione concentrations that decline with age lead to the symptoms of aging. Lack of glutathione will increase the damage caused by free radicals.

Oral glutathione has low bioavailability due to low absorption in the digestive tract due to the action of the γ -glutamyl transpeptidase (GGT) intestinal enzyme that lowers glutathione. One attempt to avoid a first pass effect is to use a topical route.

Glutathione as an antioxidant will work on the epidermal layer and dermis. Antiaging products such as glutathione work on the dermis layer. Glutathione is expected to pass through intercellular and transcellular pathways to increase the effectiveness of topical glutathione use. To pass through the intercellular and transcellular lines the optimal P log value for penetrating the substance through the stratum corneum is 2-3. Glutathione has a low penetration ability in the skin. This is because Glutathione has very hydrophilic properties. So it takes an effort to increase the lipophilicity of glutathione to penetrate stratum corneum. One method to influence the lipophilicity of drugs by using surfactants. Drug formulations that can improve the permeation rate across the membrane are affected by the physical condition and the concentration of the nonionic surfactant. Adding surfactants will enhance the lipophilicity of the drugs.

Besides the problem of lipophilicity, another glutathione problem is stability, especially in neutral or alkaline environments. Under conditions of oxidative stress, thiol glutathione groups can readily oxidize into glutathione disulfide (GSSG), which loses its antioxidant activity based on radical scavenging activity. So it takes a proper glutathione delivery system. Using a microsphere system can protect materials that are sensitive to environmental conditions such as oxygen, water, and temperature. Polymers in the microsphere system can protect the core material against oxidative conditions, thereby enhancing stability. For that made microsphere delivery system so that glutathione can be trapped in it to improve stability.

In the manufacture of glutathione microspheres, a polymer may be enclosed. The most commonly used polymers for the manufacture of microspheres include alginates. Alginate is a natural polymer that has biocompatible, biodegradable, non-toxic and relatively cheap cost. Alginate polymers can form microspheres by the addition of Ca^{2+} ions or other valential cations. Formation of gelation in alginate through specific ionic bonds can cause changes in the structure conformation of sodium alginate.

Calcium Chloride (CaCl_2) is a non-toxic crosslinking agent and is useful in the manufacture of alginate microspheres. Calcium Chloride (CaCl_2) forms a gel with an interaction between the calcium group and the negative ion of the carboxylate group in the alginate chain.

The method of making glutathione microspheres in this research is ionotropic gelation method with aerosolization technique. This technique is simple, fast, relatively efficient cost. The freeze-drying method is chosen by adding lyoprotectant maltodextrin as it can maintain the stability of the microspheres.

Topical microspheric applications require a carrier basis. The gel is one of the carrier bases in pharmaceutical preparations used in cosmetic products. Glutathione which has enhanced its lipophilicity with surfactant and enhanced its stability in the microsphere system then determined its penetration ability. Glutathione penetration ability is determined by increasing the amount of collagen in the skin. With the reduced parameter of MMP-1.

The result of the equilibrium determination of the partition of glutathione is at the fifth hour. Furthermore, the partition coefficient test obtained the optimal coefficient of partition price on glutathione with the increased of HLB 7 lipofilisitas $2,259 \pm 0,009$. The stability enhancement by microspheres was then tested for its characteristics. The evaluation of microsphere size distribution was done on wet microspheres by using optical microscope of 300 particles obtained by average diameter result on each formula that is F1 (glutathione + surfactant) $1,4 \mu\text{m}$ and F2 (glutathione-surfactant) $1,58 \mu\text{m}$. The result of polydispersity index all formula is 0.003. The results of examination of the shape and surface of the microsphere is done by using Scanning Electron Microscope (SEM). In the same magnification shows that the F1 microsphere has an uneven surface shape, whereas in the F2 microsphere has a smooth and flat surface shape. From the results of the second IR-spectra inspection formula, the absorption of glutathione-specific groups is present in all the formulas. On examination of specific N-alginate group uptake, guluronat fingerprints disappear in all formulas and carboxylic salt group uptake is present in all formulas, but one of the two absorptions of 1614 cm^{-1} disappears. The waves of the carboxylic salt group in F1 and F2 are respectively 1423.52 cm^{-1} ; $1421,25 \text{ cm}^{-1}$. The examination data of drug loading glutathione in microspheres obtained results (in percent) F1 = 8.623 ± 0.12 ; F2 = 7.81 ± 0.22 . Entrapment efficiency test results F1 = $54.46 \pm 2.40\%$; F2 = $48.49 \pm 2.37\%$. The results of microspher recovery (yield) F1 = $94.03 \pm 3.07\%$; F2 = $93.34 \pm 3.65\%$. Microspheres that have been obtained are then tested for stability. The result of stability test is known to follow the first order of glutathione. Based on the price of each material it is known that the glutathione + surfactant microsphere is more stable than glutathione + surfactant and glutathione microspheres -surfactant is more stable than glutathione -surfactant. The resulting microspheres then fed into the gel base for penetration testing seen from the decrease in MMP-1 levels. Based on the results of statistical analysis using the factorial design obtained sig value obtained by $0.000 < 0.05$ for the comparison of glutathione group + surfactant and glutathione -surfactant showed significant difference. While the analysis of the effect of microsphere formation on the decrease of

MMP-1 expression obtained sig value of 0.000 <0,05 for comparison of glutathione + surfactant glutathione group and glutathione-surfactant microspheres. The sig value of 0.000 <0.05 for the comparison of glutathione + surfactant and glutathione-surfactant groups showed significant difference. Based on these results it can be seen that glutathione +surfactant is more effective than glutathione -surfactant and glutathione +surfactant microspheres more effective than glutathione -surfactant microspheres. Furthermore, the results of the analysis using DoE on the pareto chart illustrates no interaction between the addition of surfactants with the formation of microspheres. However, the addition of surfactant most influences in decreasing MMP-1 expression, whereas microsphere formation has an effect on decreasing MMP-1 expression. It shows that the addition of HLB 7 surfactant without microspheres formation can decrease MMP-1 expression, but from the stability test there is an unstable result. So it is necessary to form a microsphere to increase the effectiveness of glutathione + surfactant.

ABSTRACT

Glutathione (GSH) is a broad antioxidant of the thiol-tripeptide group, highly hydrophilic, that made it is not possible for topical preparations. A lipophilic surfactant is used to enhance the glutathione partition coefficient. The purpose of this study was to determine the apparent partition coefficient (APC log) of glutathione; glutathione with addition of surfactant at HLB 4.3; 5.5; 7; 11; 13 to formulate and evaluate characteristics, the stability of the glutathione and dried glutathione surfactant HLB 7 loaded alginate microspheres, and to measure effectivity using an MMP-1 parameter.

. The study was conducted by dissolving glutathione in water and addition of HLB surfactants. Determination method of partition coefficient was done by shake flash method. Microspheres were characterized for the morphology and size, drug loading, entrapment efficiency, yield, accelerated stability, and effectivity using the MMP-1 parameter on mouse skin. The results showed that partition coefficient of glutathione increased and enhanced their lipophilicity. In addition, the stability increased by forming glutathione in the microspheres compared to without microspheres. To conclude both dried glutathione surfactant HLB 7 loaded alginate microspheres and glutathione surfactant HLB 7 demonstrated potential for topical delivery system.

Keywords: microspheres, alginate, aerosolization, glutathione, expression MMP-1

DAFTAR ISI

	HALAMAN
Halaman Sampul Depan	i
Halaman Sampul Dalam	iii
Lembar Pengesahan	iv
Halaman Penetapan Panitia Penguji	v
Kata Pengantar	vi
Ringkasan	viii
Abstract	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL.....	xix
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxi
DAFTAR SINGKATAN.....	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.4 Manfaat Penelitian	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Antioksidan	10
2.1.1 .Definisi	10
2.1.2 .Antioksidan & Efek Perlindungannya	10
2.2 Radikal Bebas.....	12
2.2.1 .Definisi	12
2.2.2 .Pembentukan Radikal Bebas	14
2.2.3 .Patogenesis Terjadi Photoaging.....	17
2.3 Glutation	20
2.4 Kulit	22
2.4.1 .Anatomi Kulit.....	22
2.4.2 .Fisiologi Kulit	24

2.4.3 .Fibroblas	27
2.4.4 .Matriks Metalloproteinase.....	28
2.5Sistem Transpor Obat	29
2.5.1 .Pelepasan Obat.	30
2.5.2 .Penetrasi Pekutan..	32
2.5.3 .Penetrasi Obat Melalui Kulit	35
2.6Hubungan Lipofilisitas dan Koefisien Partisi.....	37
2.6.1 .Lipofilisitas.....	37
2.6.2 .Koefisien Partisi	38
2.7Tinjauan Tentang Mikroenkapsulasi	45
2.7.1 .Definisi Mikroenkapsulasi.....	45
2.7.2 .Tujuan Mikroenkapsulasi	46
2.7.3 .Metode Mikroenkapsulasi	46
2.7.4 .Tinjauan tentang Karakteristik Mikrosfer.....	50
2.7.5 .Faktor-Faktor yang Memengaruhi Karakteristik Mikrosfer.....	51
2.8Tinjauan Tentang Polimer	52
2.8.1 .Polimer Secara Umum.....	52
2.8.2 .Tinjauan Tentang Alginat	54
2.9Tinjauan Tentang Kalsium Klorida.....	55
2.10Tinjauan Tentang Freeze Drying.....	55
2.11 Tinjauan Tentang Lyoprotectant	57
2.11.1 Pengertian Lyoprotectant.....	57
2.11.2 Jenis Lyoprotectant Gula	57
2.11.3 Tinjauan Tentang Maltodekstrin	57
2.12 Reaksi Sambung Silang Na Alginat dengan CaCl_2	58
2.13 Gel...../.....	59
2.14 Formulasi Gel	60
2.15 Stabilitas Obat	62
2.15.1 Pengertian Stabilitas Obat	62
2.15.2 Orde reaksi-reaksi kimia	63
2.15.3 Metode Penentuan Orde Reaksi	64

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Uraian Kerangka Konseptual	67
3.2 Skema Kerangka Konseptual.....	71
3.3 Hipotesis.....	72

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	73
4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	74
4.2.1 Variabel Bebas.....	74
4.2.2.. Variabel Tergantung.....	74
4.2.3.. Variabel Kendali.....	74
4.2.4.. Definisi Operasional.....	74
4.3 Bahan Penelitian	75
4.4 Alat Penelitian.....	76
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	76
4.6 Prosedur Pengumpulan Data.....	77
4.6.1 . Tahapan Penelitian	77
4.6.2 . Analisis Kualitatif Bahan Baku	78
4.6.2.1 Organoleptis	79
4.6.2.2 Identifikasi Glutation	79
4.6.2.3 Identifikasi Natrium Alginat	79
4.6.2.4 Identifikasi Maltodextrin.....	80
4.6.2.5 Identifikasi Kalsium Klorida (CaCl ₂)	81
4.7 Peningkatan Lipofilisitas Glutation	81
4.8 Penentuan Kurva Baku Glutation	82
4.8.1 . Pembuatan Larutan Dapar Fosfat	82
4.8.2 . Pembuatan Larutan Baku Induk Glutation	83
4.8.3 . Pembuatan Larutan Baku Kerja.....	83
4.8.4 . Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Glutation.....	84
4.8.5 . Penentuan Kurva Baku	84
4.9 Penentuan Koefisien Partisi.....	84
4.9.1 . Penjenuhan	84
4.9.2 . Penentuan Koefisien Partisi Apparent.....	85

4.10 Rancangan Formula Mikrosfer Glutation – Alginat.....	86
4.10.1 Pembuatan Mikrosfer Glutation – Alginat	86
4.10.2 Karakteristik Mikrosfer Glutation – Alginat	88
4.10.2.1 Pemeriksaan Distribusi Ukuran Partikel	88
4.10.2.2 Pemeriksaan Bentuk dan Permukaan Mikrosfer	89
4.10.2.3 Pemeriksaan Spektrum Inframerah	89
4.10.2.4 Penentuan Kandungan glutation dalam mikrosfer	90
4.10.2.5 Penentuan Efisiensi Penjebakan Glutation	90
4.10.2.6 Penentuan Perolehan Kembali	90
4.10.2.7 Evaluasi Mikrosfer Glutation-Ca Alginat	91
4.11 Pembuatan Sediaan Gel	92
4.12 Uji Stabilitas Glutation.....	94
4.13 Uji Penetrasi	94
4.14 Analisis Data	98
4.14.1 Penentuan Koefisien Apparent	98
4.14.2 Penentuan Stabilitas Glutation	99
4.14.3 Penentuan Efektivitas Glutation Krim.....	99
BAB 5 HASIL PENELITIAN	
5.1 Hasil Pemeriksaan Kualitatif Bahan.....	100
5.1.1. Glutation	100
5.1.2. Natrium Alginat.....	100
5.1.3. Kalsium Klorida (CaCl ₂)	101
5.1.4. Maltodekstrin	101
5.2 Penentuan Koefisien Partisi.....	102
5.2.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	102
5.2.2.. Penentuan Kurva Baku	102
5.2.3.. Penentuan Koefisien Apparent GSH Hasil Freeze Dry	103
5.2.3.1. Penentuan Waktu Kesetimbangan	103
5.2.3.2. Penentuan Koefisien Partisi	104
5.3 Pemeriksaan Spektrum Infamerah Formula Mikrosfer	106
5.3.1. Formula Mikrosfer F1.....	106
5.3.2. Formula Mikrosfer F2.....	107

5.4.... Hasil Pemeriksaan Fisik Mikrosfer	108
5.4.1 Hasil Pemeriksaan Morfologi Mikrosfer dengan mikroskop optik ...	108
5.4.2. Hasil Pemeriksaan Morfologi Mikrosfer dengan SEM.....	108
5.4.3. Hasil Pemeriksaan Distribusi Ukuran Partikel.....	109
5.5.... Hasil Pemeriksaan Kandungan Obat, Efisiensi Penjebakan dan Perolehan Kembali.....	110
5.5.1.. Kurva Baku Glutation dalam Larutan Na-Sitrat.....	110
5.5.2.. Pemeriksaan Kandungan Glutation dalam Mikrosfer.....	111
5.5.3.. Pemeriksaan Efisien Penjebakan Glutation dalam Mikrosfer.....	112
5.5.4.. Perhitungan Perolehan Kembali (Yield).....	113
5.5.5.. Pengujian Stabilitas Mikrosfer.....	114
5.5.6.. Hasil Uji Efektivitas Glutation.....	116
BAB 6 PEMBAHASAN.....	120
BAB 7 PENUTUP.....	131
7.1 Kesimpulan.....	131
7.2 Saran.....	131
DAFTAR PUSTAKA.....	133

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Harga HLB	82
Tabel 4.2 Formula Mikrosfer	86
Tabel 4.3 Formula Gel	93
Tabel 5.1 Pemeriksaan Kualitatif Glutation.....	100
Tabel 5.2 Pemeriksaan Kualitatif Natrium Alginat.....	100
Tabel 5.3 Pemeriksaan Kualitatif Kalsium Klorida.....	101
Tabel 5.4 Pemeriksaan Kualitatif Maltodextrin.....	101
Tabel 5.5 Hubungan konsentrasi glutacion dengan absorban.....	103
Tabel 5.6 Kadar Glutation dan Koefisien Partisi	105
Tabel 5.7 Hasil Spektra IR Formula F1	106
Tabel 5.8 Hasil Spektra IR Formula F2	107
Tabel 5.9 Distribusi ukuran partikel mikrosfer glutacion-Ca Alginat.....	109
Tabel 5.10 Hubungan konsentrasi glutacion dengan absorban.....	110
Tabel 5.11 Hasil Pemeriksaan Kandungan Glutation dalam Mikrosfer.....	111
Tabel 5.12 Hasil Pemeriksaan Efisiensi Penjebakan Glutation.....	112
Tabel 5.13 Hasil Perhitungan Perolehan Kembali Mikrosfer.....	113
Tabel 5.14 Kadar Rata-rata Glutation yang Tersisa Setelah Penyimpanan.....	114
Tabel 5.15 Harga Log Ct Vs t Glutation.....	114
Tabel 5.16 Linieritas Kurva Stabilitas Orde 0 dan Orde 1.....	115
Tabel 5.17 Penentuan Nilai k pada Orde 1.....	115
Tabel 5.18 Hasil Uji Ekspresi MMP-1.....	117
Tabel 5.19 Nilai sig analisis pengaruh surfaktan	117

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Siklus Redoks Glutation.....	20
Gambar 2.2 Glutation.....	22
Gambar 2.3 Gambar Struktur Kulit	24
Gambar 2.4 Mekanisme penetrasi percutan.....	34
Gambar 2.5 Skema Metode <i>Iontropic Gelation</i> Teknik Aerosolisasi.....	47
Gambar 2.6 Skema Metode <i>Solvent Evaporation / Extraction</i>	48
Gambar 2.7 Skema Metode <i>Spray drying</i>	49
Gambar 2.8 Struktur Alginat	54
Gambar 2.9 Struktur Maltodekstrin	58
Gambar 2.10 Reaksi Sambung Silang	59
Gambar 2.11 Grafik Orde Reaksi	65
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual	71
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian	79
Gambar 4.2 Skema Penentuan Koefisien Partisi	82
Gambar 4.3 Skema Pembuatan Mikrosfer Glutation-Ca alginat	88
Gambar 4.4 Skema Pembuatan Mikrosfer	93
Gambar 5.1 Profil Serapan Larutan Baku.....	102
Gambar 5.2 Glutation Dalam Larutan Dapar Fosfat.....	103
Gambar 5.3 Grafik Waktu Kesetimbangan Glutation	104
Gambar 5.4 Grafik Koefisien Partisi Glutation	106
Gambar 5.5 Spektrum IR Mikrosfer	108
Gambar 5.6 Morfologi dari mikrosfer glutation-Alginat	108
Gambar 5.7 Morfologi bentuk dan permukaan dari mikrosfer.....	109
Gambar 5.8 Perbandingan ukuran partikel mikrosfer.....	110
Gambar 5.9 Kurva Baku Glutation Dalam Larutan Na-Sitrat.....	111
Gambar 5.10 Kandungan Glutation Dalam Mikrosfer pada F1 dan FII.....	112
Gambar 5.11 Efisiensi Penjebakan Glutation dalam Mikrosfer.....	112
Gambar 5.12 Perolehan Kembali (Yield) Mikrosfer.....	113
Gambar 5.13 Kurva Hubungan Log Ct Vs t.....	115
Gambar 5.14 Ekspresi MMP-1 Jaringan Dermis Mencit.....	118

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Analisis Glutation.....	143
Lampiran 2. Sertifikat Analisis Na-Alginat.....	144
Lampiran 3. Sertifikat Analisis CaCl ₂	145
Lampiran 4. Sertifikat Analisis Maltodekstrin.....	146
Lampiran 5. Analisis Termogram DSC Glutation.....	147
Lampiran 6. Analisis Termogram DTA Cacl ₂	148
Lampiran 7. Analisis Termogram DTA Na Alginat.....	149
Lampiran 8. Analisis Termogram DTA Maltodekstrin.....	150
Lampiran 9. Penentuan Waktu Keseimbangan.....	151
Lampiran 10. Penentuan Koefisien Partisi Glutation.....	152
Lampiran 11. Pemeriksaan Distribusi Ukuran Mikrosfer.....	153
Lampiran 12. Penentuan Kandungan Glutation dalam Mikrosfer.....	155
Lampiran 13. Penetapan Efisiensi Penjebakan Glutation dalam Mikrosfer.....	156
Lampiran 14. Penetapan Perolehan Kembali (Yield) dalam Mikrosfer.....	157
Lampiran 15. Perhitungan Stabilitas Glutation.....	158
Lampiran 16. Grafik Stabilitas Glutation.....	160
Lampiran 17. Data Pengamatan Akurasi dan Presisi.....	163
Lampiran 18. Sertifikat Uji Etik	164
Lampiran 19. Surat Keterangan Hewan Uji.....	165
Lampiran 20. Hasil Uji MMP-1.....	166
Lampiran 21. Hasil Uji Statistik.....	168

DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	: Analisis of Varian
AP-1	: Activator Protein-1
b/b	: berat/berat
C	: <i>Celcius</i>
Cm	: <i>Centimeter</i>
COA	: <i>Certificate of Analysis</i>
cPs	: <i>Centipoise</i>
DoE	: <i>Design of Experiment</i>
DL	: <i>Drug loading</i>
DSC	: <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EE	: <i>Entrapment Efficiency</i>
FTIR	: <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
G	: gram
GRAS	: <i>Generally recognized as safe</i>
GSH	: Glutation
Glut _{+surf}	: Glutation dengan surfaktan HLB 7
Glut _{-surf}	: Glutation tanpa surfaktan HLB 7
GGT	: Gamma Glutamil Transpeptidase
HLB	: <i>Hydrophile Lipophile Balance</i>
HPH	: <i>High Pressure Homogenization</i>
IL-1	: Interleukin -1
KV	: Koefisien Variasi
Log P	: Log partisi
mg	: milligram
mJ	: miliJoule
mL	: mililiter
µm	: mikrometer
Mm	: millimeter

MMP-1	: Matriks Metaloproteinase-1
Ppm	: part per million ($\mu\text{g/ml}$)
PI	: <i>Polidispersity index</i>
RH	: <i>Relative humidity</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
Rpm	: <i>Revolutions Per Minute</i>
SD	: simpangan deviasi
SEM	: <i>Scanning electron microscopy</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Radiasi UV memiliki banyak efek negatif terhadap kulit, baik secara langsung maupun tidak langsung. Kerusakan akibat sinar UV diperkirakan terjadi sekitar 50% karena pembentukan radikal bebas. Akibat dari pembentukan radikal bebas akan menurunkan jumlah kolagen dan peningkatan kadar *matrix metalloproteinase-1* (MMP-1). Ada dua mekanisme yang bertanggungjawab pada proses pembentukan radikal bebas yaitu adalah induksi *activator protein-1* (AP-1) dan penurunan regulasi *transforming growth factor- β* (TGF- β) tipe II (Rabe *et al.*, 2006; Rhein dan Santiago, 2010).

Penelitian *in vitro* yang dilakukan Rabe, dkk (2006) mengatakan bahwa radiasi UV memicu pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang akan menurunkan enzim *protein-tyrosine phosphatase*. Penurunan enzim ini akan menyebabkan *up regulation* reseptor *growth factor* dan mengaktivasi AP-1 pada dermis akan menghasilkan degradasi kolagen, hambatan sintesis kolagen, inflamasi dan stres oksidatif, serta penurunan kemampuan sel hingga akhirnya terjadi proses apoptosis (Cunningham *et al.*, 2005; Rabe *et al.*, 2006). Proses pembentukan ROS diatas dapat dicegah dengan antioksidan (Wiraguna, 2013). Salah satu antioksidan di dalam tubuh yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah penurunan enzim *protein-tyrosine phosphatase* adalah *L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine* (glutathione).

Glutation di dalam tubuh berada dalam bentuk tereduksi. Glutation bersifat antioksidan karena mempunyai grup SH pada asam amino sistein (Murray, 2009). Konsentrasi glutacion yang menurun seiring dengan bertambahnya usia menyebabkan gejala penuaan. Kekurangan glutacion, akan menyebabkan *stress oxidative* pada sel karena radikal bebas. Glutation juga dapat berfungsi sebagai agen depigmentasi. Glutation merupakan kofaktor penting bagi banyak enzim dan terlibat dalam beberapa jalur metabolisme dan sinyal. Glutation juga penting untuk regenerasi antioksidan lain seperti tokoferol dan askorbat (Meister, 1976).

Glutation memiliki bioavailabilitas oral yang rendah karena absorpsi yang rendah di saluran pencernaan akibat aksi enzim usus *γ-glutamyl transpeptidase* (GGT) yang menurunkan glutacion (Shin, *et al.*, 2010). Efek samping yang potensial terjadi saat pemberian glutacion intravena dalam sirkulasi darah (Park *et al.*, 2014). Salah satu upaya untuk menghindari *first pass effect* adalah menggunakan rute topikal (Strober *et al.*, 2008).

Selain itu karena glutacion mempunyai nilai log P sebesar -1,4 dan hidrofilik sehingga perlu upaya peningkatan lipofilisitas dari glutacion untuk digunakan secara topikal. Kelebihan penggunaan topikal antara lain memiliki efek lokal, dan efek samping sistemik yang minimal (Strober *et al.*, 2008). Selain masalah lipofilisitas, problema glutacion yang lain adalah stabilitas, terutama dalam lingkungan netral atau basa (Camera *et al.*, 2002).

Glutation sebagai antioksidan akan bekerja pada lapisan epidermis dan dermis (Shindo *et al.*, 1994). Berdasarkan penelitian bahwa glutacion yang diaplikasikan secara topikal ke dalam kulit dengan menggunakan emulsi minyak

dalam air biasa atau dalam bentuk gel konvensional tidak mampu berpenetrasi melalui stratum korneum sehingga tidak efektif dalam menghambat UVB (Montenegro, Bonina, Rigand, Giogill, 1995). Stratum korneum kulit adalah penghalang penetrasi utama untuk semua zat, terdiri dari lapisan tanduk. Lapisan tanduk merupakan bagian dari lapisan epidermis bersifat selektif dalam memilih senyawa-senyawa tertentu untuk dapat masuk ke lapisan lebih dalam atau lapisan dermis, sehingga tidak semua bahan aktif perawatan wajah memiliki senyawa yang mampu menembus lapisan tersebut (Gadri *et al.*, 2012). Ada dua jalur utama obat berpenetrasi menembus stratum korneum, antara lain jalur transepidermal dan jalur pori. Produk *antiaging* seperti glutathione bekerja pada lapisan dermis (Tosato *et al.*, 2007). Jika glutathione dapat melewati jalur interseluler dan transepidermal maka dapat meningkatkan efektivitas dari penggunaan glutathione topikal. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kemampuan penetrasi melalui jalur interseluler dan transepidermal adalah harga koefisien partisipasinya ($\log P$). Nilai $\log P$ yang optimal untuk penetrasi zat menembus stratum korneum adalah 2-3 (Benson dan Watkinson, 2012). Glutathione mempunyai kemampuan penetrasi rendah di kulit. Hal ini disebabkan karena Glutathione mempunyai nilai $\log P$ sebesar -1.4 dan sangat hidrofilik (Bronaugh dan Maibach, 2005). Sehingga diperlukan glutathione yang dapat melewati stratum korneum hingga ke lapisan dermis dengan cara meningkatkan lipofilisitas glutathione.

Salah satu metode untuk meningkatkan lipofilisitas obat dengan menggunakan surfaktan (Martin *et al.*, 1993). Selama ini obat yang bersifat lipofilik diturunkan lipofilisitasnya dengan penambahan surfaktan. Indometasin

dengan tween 80 dan sodium lauryl sulfate (SLS) mengalami peningkatan disolusi secara bermakna (Honary *et al.*, 2007). Megestrol asetat dapat ditingkatkan solubilitasnya dan bioavailibilitasnya menggunakan surfaktan yang baru disintesis yaitu Rofam 70 dan *rapeseed* methyl ester etoksilat (Lachowicz *et al.*, 2016). Piroksikam dan surfaktan polioksietilen dapat meningkatkan absorpsi percutan daripada piroksikam tanpa diberi surfaktan (Park *et al.*, 2000). Sementara itu Ermawati (2012) melaporkan hasil penelitiannya bahwa penelitian glutation yang dibuat dalam sistem transfersom yang berisi posfatidilkolin (PC) dan surfaktan (*edge activator*) memiliki penetrasi yang lebih baik. Formulasi obat yang dapat meningkatkan laju permeasi melewati membran dipengaruhi oleh kondisi fisik dan konsentrasi surfaktan nonionik (Walters *et al.*, 1993). Pada penelitian ini lipofilisitas glutation dicoba ditingkatkan dengan penambahan surfaktan. Surfaktan yang dipilih bersifat non ionik dengan berbagai tingkat *Hydrophile Lipophile Balance* (HLB). Surfaktan nonionik dipilih karena toleransi percutannya baik, potensi iritasi dan toksisitas yang lebih rendah (Grampurohit, 2011). Nilai HLB menunjukkan kekuatan sifat hidrofilik dan lipofilik dari surfaktan. Surfaktan yang bersifat lipofilik akan memiliki nilai HLB rendah dan lebih mudah larut dalam minyak, sedangkan surfaktan yang bersifat hidrofil memiliki nilai HLB tinggi dan akan lebih mudah larut dalam air (Pasquali *et al.*, 2008). Sehingga perlu diuji pengaruhnya terhadap koefisien partisi glutation.

Selain masalah lipofilisitas, problema glutation yang lain adalah stabilitas, terutama dalam lingkungan netral atau basa (Camera *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2012). Dalam kondisi stres oksidatif, kelompok thiol glutation dapat dengan

mudah teroksidasi menjadi glutathion disulfida (GSSG), yang kehilangan aktivitas antioksidan berdasarkan aktivitas *radical scavenging*. Sehingga diperlukan sistem penghantaran glutathion yang tepat.

Sistem penghantaran glutathion telah dikembangkan dalam beberapa tahun terakhir. Glutathion dapat dilindungi terhadap degradasi kimia atau degradasi enzimatik dengan cara mikroenkapsulasi (Xiao *et al.*, 2014). Manfaat mikroenkapsulasi antara lain: dapat melindungi dari degradasi, meningkatkan bioavailabilitas suatu bahan aktif, serta mengontrol pelepasan suatu bahan aktif melalui degradasi permukaan partikel (Choudhury *et al.*, 2009). Koo dan kawan-kawan (2011) menggunakan sistem nanopartikel kitosan untuk meningkatkan stabilitasnya. Sementara Guilford dan kawan-kawan (2012) menggunakan sistem liposom. Sistem enkapsulasi dapat digunakan untuk melindungi bahan yang sensitif terhadap kondisi lingkungan seperti cahaya, oksigen, air, dan temperature, seperti glutathion. Polimer dalam sistem enkapsulasi dapat melindungi bahan inti terhadap kondisi oksidatif, sehingga dapat meningkatkan stabilitas (Choudhury *et al.*, 2009). Selain itu, enkapsulasi telah diterapkan untuk meningkatkan fungsi dan bioavailabilitas bahan inti (Mohanraj dan Chen, 2006). Dengan sistem penghantaran mikrosfer diharapkan zat aktif akan mampu pula menembus lapisan dermis dari kulit (Kim *et al.*, 2006).

Mikrosfer adalah salah satu cara enkapsulasi yang dapat digunakan untuk melindungi glutathion. Mikrosfer merupakan serbuk yang memiliki sifat mengalir dengan bebas dan idealnya memiliki ukuran partikel kurang dari 200 μm (Alagusundaram *et al.*, 2009). Hal yang mempengaruhi efektivitas mikrosfer

sebagai sistem yang melindungi adalah pemilihan polimer yang digunakan sebagai matriks mikrosfer (Lee *et al.*, 2012). Jenis polimer mempengaruhi kemampuan mikrosfer dalam mencegah hidrasi kulit, meningkatkan efek absorpsi, meningkatkan penetrasi zat aktif dan bersifat lepas terkendali. Polimer alam yang sering digunakan sebagai matriks mikrosfer yaitu alginat.

Alginat adalah polisakarida alam yang umumnya terdapat pada dinding sel dari spesies ganggang coklat (*Phaeophyceae*). Natrium alginat merupakan biopolimer alami yang memiliki sifat biokompatibel, biodegradabel, tidak toksik dan biaya yang relatif murah (Yang *et al.*, 2006 dan Lee *et al.*, 2012). Penambahan ion Ca^{2+} atau kation yang bervalensi dua lainnya, akan terbentuk gelasi melalui ikatan ion yang spesifik dengan guluronat dan dapat menyebabkan perubahan konformasi struktur natrium alginat (Martin, 2002). Beberapa contoh larutan penyambung silang yang dapat digunakan antara lain Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , dll. Ion Ca^{2+} salah satu kation divalen yang paling umum digunakan dibandingkan yang lain (Kuo *et al.*, 2001).

Pada penelitian ini diupayakan meningkatkan stabilitas glutation dengan membentuk mikrosfer menggunakan polimer alginat dan larutan penyambung silang CaCl_2 . Kalsium klorida (CaCl_2) merupakan bahan yang dapat digunakan sebagai penyambung silang pada pembentukan mikrosfer dengan polimer alginat. Kadar Ca^{2+} menentukan kepadatan gel yang terbentuk (Goudanavar *et al.*, 2010). Selain itu CaCl_2 mudah disambungkan dengan Na alginat karena ion Ca^{2+} terikat pada residu asam guluronat yang merupakan komponen dari Na alginat (Lee *et al.*, 2012). Kompleks yang terbentuk antara ion Ca^{2+} dengan natrium alginat dapat

meningkatkan stabilitas glutation dan menyebabkan pelapasan obat yang terkontrol (Ravindra *et al.*, 2010).

Berbagai teknik pembuatan mikrosfer telah banyak dikembangkan, namun pemilihan metode yang baik untuk suatu mikrosfer harus disesuaikan dengan sifat polimer, jenis obat, kegunaan obat, pelarut, dan waktu terapi (Jain *et al.*, 2000). Metode pembuatan mikrosfer yang sudah ada sampai saat ini antara lain metode *solvent evaporation*, *hot melt microencapsulation*, *solvent removal*, *spray drying*, *ionotropic gelation*, dan *size extrusion* (Jain *et al.*, 2000).

Metode yang akan digunakan pada penelitian ini adalah *ionotropic gelation* dengan teknik aerosolisasi. Metode *ionotropic gelation* dapat menghasilkan partikel mikrosfer metformin-alginat berbentuk sferis dengan permukaan yang halus dan berukuran kecil (Hariyadi *et al.*, 2014). Diharapkan mikrosfer glutation yang terbentuk sferis, permukaan halus dan berukuran < 200 μ m. Keunggulan dari metode *ionotropic gelation* dengan teknik aerosolisasi adalah bahan aktif dapat dienkapsulasi tanpa menggunakan pelarut organik atau suhu tinggi yang dapat merusak bahan aktif. Selain itu metode ini merupakan metode yang sederhana, cepat, *cost-effective*, dan dapat menghasilkan ukuran partikel yang kecil yaitu <10 μ m (Hariyadi *et al.*, 2014, Laura *et al.*, 2010). Pada proses pembuatan mikrosfer diperlukan pengeringan dengan memperhatikan masalah stabilitas bahan aktif. Pengeringan yang dilakukan menggunakan teknik *freeze drying* sesuai untuk mengantisipasi ketidakstabilan. Dalam pengeringan dengan teknik *freeze drying* perlu ditambahkan *lyoprotectan* yaitu maltodekstrin

yang memiliki keuntungan dapat menjaga kestabilan mikrosfer pada suhu yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang lain (Laura *et al.*, 2010).

Mikrosfer yang dihasilkan dilakukan evaluasi karakteristik mikrosfer Glutation-Ca alginat. Evaluasi meliputi bentuk mikrosfer, ukuran mikrosfer, spektrokopi FTIR, analisis termal, efisiensi penjejakan, *drug loading*, dan *yield*. Selain itu dilakukan uji stabilitas mikrosfer glutation-alginat.

Aplikasi mikrosfer secara topikal membutuhkan basis pembawa. Gel merupakan salah satu basis pembawa dalam sediaan farmasi yang sering digunakan dalam produk kosmetik yang memiliki beberapa keuntungan diantaranya efek pendinginan pada kulit saat digunakan, penampilan sediaan yang jernih dan elegan, pada pemakaian di kulit setelah kering meninggalkan film tembus pandang, elastis, mudah dicuci dengan air, pelepasan obatnya baik, kemampuan penyebarannya pada kulit baik (Lachman, 1994).

Glutation yang telah ditingkatkan lipofilisitasnya dengan surfaktan dan ditingkatkan stabilitasnya dengan sistem mikrosfer, selanjutnya ditentukan kemampuan penetrasinya. Kemampuan penetrasi glutation ditentukan berdasarkan peningkatan jumlah kolagen di kulit dengan indikasi berkurangnya kadar MMP-1 pada kulit.

1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh HLB surfaktan yang ditambahkan pada glutation terhadap lipofilisitas sistem glutation?
2. Bagaimana penetrasi glutation dengan HLB terpilih dan mikrosfer glutation dengan HLB terpilih dibanding dengan glutation tanpa perlakuan dan

mikrosfer glutation ditinjau dari penurunan ekspresi MMP-1 kulit mencit galur balb-c?

3. Bagaimana pengaruh pembentukan mikrosfer alginat-glutation pada stabilitas glutation?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Menentukan peningkatan lipofilisitas (Log P) sistem glutation akibat pengaruh surfaktan dengan berbagai HLB.
2. Membandingkan daya penetrasi dari glutation dengan HLB terpilih dan mikrosfer glutation dengan HLB terpilih dibanding dengan glutation tanpa perlakuan dan mikrosfer glutation ditinjau dari penurunan ekspresi MMP-1 kulit mencit galur balb-c.
3. Membandingkan stabilitas mikrosfer glutation dengan glutation tanpa dibuat mikrosfer secara in vitro.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh data ilmiah untuk pengembangan glutation sebagai antioksidan dalam sistem mikrosfer yang memiliki karakteristik fisikokimia yang baik sehingga dapat meningkatkan stabilitas produk sebagai sistem penghantaran obat secara topikal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Antioksidan

2.1.1 Definisi

Antioksidan secara umum didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipid (Sayuti dan Yenrina, 2015). Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat. Menurut Meydani, dan kawan-kawan (1995), keseimbangan oksidan dan antioksidan sangat penting karena berkaitan dengan fungsinya sistem imunitas tubuh. Senyawa asam lemak tak jenuh merupakan komponen terbesar yang menyusun membran sel, yang diketahui sangat sensitif terhadap perubahan keseimbangan oksidan-antioksidan. Sehingga, sel imun memerlukan antioksidan dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan dengan sel lain. Defisiensi antioksidan yang berupa vitamin C, vitamin E, Se, Zn, dan glutathion sangat berpengaruh terhadap sistem imun.

2.1.2 Antioksidan dan Efek Perlindungannya pada Kulit dalam Proses *Photoaging*

Radikal bebas mempunyai peranan yang besar dalam mekanisme kerusakan kulit akibat paparan sinar UV. Ada 4 cara untuk mengurangi

kerusakan kulit dari radikal bebas akibat paparan sinar UV, yaitu 1) menghindari paparan sinar matahari yang berlebihan, 2) memakai pakaian pelindung sinar matahari, 3) menggunakan tabir surya krim atau lotion yang mengandung antioksidan, 4) menggunakan antioksidan baik secara sistemik maupun topikal (Wiraguna, 2013).

Proses penuaan alami dari tubuh kita tidak berfungsi maksimal, ketika terjadi peningkatan produksi ROS. Hal ini yang membuat ketidakseimbangan dan jumlah dari radikal bebas yang merusak DNA, elemen sitoskeletal, protein selular, dan membran selular. Kebanyakan dari mekanisme pertahanan antioksidan tubuh dihambat oleh UV dan sinar kasat mata (*visible light*). Dimana paparan sinar UV dikenal karena peningkatan dari radikal bebas.

Peredaman efek negatif dari oksidan dilakukan melalui 2 cara yaitu 1) mencegah terjadinya dan tertimbunnya senyawa oksidan secara berlebihan, dan 2) mencegah terjadinya reaksi rantai yang berkelanjutan. Bertitik tolak dari 2 cara tersebut maka antioksidan dibedakan menjadi dua golongan yaitu : antioksidan pencegah (*preventive antioxidants*) seperti enzim SOD, katalase, glutathion peroksidase, glutathion, sistein; dan antioksidan pemutus reaksi rantai (*chain breaking antioxidants*) yang dibedakan atas eksogen dan endogen. Golongan antioksidan eksogen contohnya vitamin C, vitamin E, likopen, sedangkan yang endogen adalah glutathion, sistein. Vitamin E, β karoten dan likopen bersifat lipofilik sehingga dapat berperan pada membran sel untuk mencegah peroksidasi

lipid, sebaliknya vitamin C, glutathione dan sistein bersifat hidrofilik dan berperan dalam sitosol dan cairan ekstraseluler (Wiraguna, 2013).

Akhir-akhir ini, peneliti mempelajari penggunaan antioksidan eksogen yang digunakan untuk mengurangi kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Banyak yang mempercayai bahwa aplikasi topikal dan konsumsi secara oral dari kombinasi antioksidan dapat memelihara kapasitas antioksidan pada kulit, karena aksi sinergis dari kombinasi antioksidan (Baumann dan Saghari, 2009).

Antioksidan topikal akhir-akhir ini dipasarkan untuk mencegah penuaan dan kerusakan kulit karena UV yang merusak kulit tetapi yang diberikan pada kerutan dan eritema yang disebabkan oleh faktor peradangan. Teori radikal bebas dari proses penuaan menjelaskan mengapa antioksidan dapat mencegah kerutan, tetapi teori ini tidak dapat membuktikan penggunaan antioksidan dapat menyembuhkan kerutan yang telah ada. Banyak pabrik yang menyatakan bahwa produk antioksidan mereka mengandung produk yang dapat menyembuhkan kerutan. Hal ini penting untuk menekankan pada pasien bahwa antioksidan dapat mencegah kerutan tetapi tidak dapat menyembuhkan kerutan (Baumann dan Saghari, 2009).

2.2 Radikal Bebas

2.2.1 Definisi

Radikal bebas yang juga dikenal sebagai *reactive oxygen species* (ROS) didefinisikan sebagai suatu molekul, atom, atau beberapa grup atom

yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Molekul atau atom tersebut sangat labil dan mudah membentuk senyawa baru. Terdapat berbagai macam radikal bebas sebagai turunan dari karbon (C) dan nitrogen (N), akan tetapi yang paling banyak dipelajari adalah radikal oksigen. Satu oksigen berpasangan dengan elektron berarti stabil; sedangkan, oksigen dengan elektron tidak berpasangan adalah bersifat reaktif karena akan mencari dan membangkitkan elektron dari komponen vital dan meninggalkan kerusakan (Muchtadi, 2013; Baumann dan Saghari, 2009).

Radikal bebas yang terdapat dalam tubuh dapat berasal dari dalam (endogen) atau dari luar tubuh (eksogen). Secara endogen, radikal bebas terbentuk sebagai respon normal dari rantai reaksi respirasi (pernafasan) di dalam tubuh. Sumber terbentuknya radikal bebas dalam bahan biologis adalah : enzim-enzim superoksida dismutase (SOD), sitokrom P-450, xantin oksidase, lipoksigenase, siklo-oksigenase, enzim-enzim pentranspor elektron dan kuinon. Secara endogen, radikal bebas dapat timbul melalui beberapa macam mekanisme seperti oto-oksidasi, aktivitas oksidasi (misalnya siklooksigenase, lipoksigenase, dehidrogenase dan peroksidase), dan sistem transport elektron. Radikal bebas diproduksi di dalam sel oleh mitokondria, membran plasma, lisosom, peroksisom, endoplasmik retikulum dan inti sel. Secara eksogen, radikal bebas diperoleh dari bermacam-macam sumber antara lain polutan, makanan dan minuman, radiasi, ozon dan pestisida (residu pestisida) (Muchtadi, 2013).

2.2.2 Pembentukan Radikal Bebas pada Kulit yang Mengalami *Photoaging*

Teori radikal bebas pada proses penuaan merupakan salah satu teori yang paling diterima untuk menjelaskan penyebab terjadinya penuaan. *Activated Oxygen Species* mungkin akan berefek pada DNA, elemen sitoskeleton, protein selular, dan membran selular. ROS tidak hanya telah berpengaruh pada proses penuaan secara keseluruhan, tetapi dipercaya berperan secara kutan pada penyebab *photoaging*, proses karsinoma, dan peradangan. Hal ini dikenal bahwa UV menginduksi kerusakan kulit diperantai oleh *reactive oxygen intermediate*. Jika antioksidan dapat menyerap sebagian dari hasil radikal bebas, maka mungkin akan terjadi penurunan kerusakan kulit yang akibat induksi dari UV. Radikal bebas juga berperan pada peradangan dimana diketahui berperan pada penuaan kulit. Radikal bebas kemungkinan menyumbang dalam perkembangan kanker kulit. Terdapat banyak penelitian yang menjelaskan peranan radikal bebas dan kanker kulit (Baumann dan Saghari, 2009).

Radikal bebas juga berperan penting pada proses penuaan interna dan eksterna. Radikal bebas dibentuk secara normal melalui metabolisme manusia normal, tetapi dapat diproduksi sebagai hasil faktor eksterna, seperti paparan sinar matahari, polusi udara, rokok, radiasi, penggunaan alkohol, olahraga, inflamasi, dan paparan dari obat tertentu atau logam berat seperti zat besi. Pada kenyataannya, radiasi UV, stres, rokok, polusi, obat-obatan dan makanan merupakan sumber dari ROS seperti superoksida, anion hidroksil, hidrogen peroksida (H_2O_2) dan singlet oksigen. Data baru-

baru ini menyatakan bahwa radikal bebas dapat menginduksi sebagian banyak faktor transkripsi seperti protein activator-1 (AP-1) dan faktor nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). Sejauh ini, ROS meningkatkan ekspresi matrik metalloproteinase (MMP), kolagenasi tertentu, dimana memiliki kemampuan mendegradasi kolagen kulit. Formasi kolagenasi muncul sebagai hasil dari aktivasi dari faktor transkripsi c-Jun dan c-Fos, kombinasi tersebut untuk menghasilkan AP-1, sebaliknya, mengaktifkan MMP. Sebagai tambahan, jalur MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) merupakan target dari stress oksidatif (Baumann dan Saghari, 2009).

Adanya molekul oksigen (O_2) di bagian bawah epidermis merupakan target utama gelombang sinar UV yang masuk ke dalam kulit. Molekul oksigen adalah unik dan merupakan substansi yang tidak stabil, oleh karena elektron yang terdapat pada orbit luarnya tidak lengkap, sehingga mempunyai kecenderungan menarik elektron untuk melengkapi pasangan elektronnya (*two vacant orbits*). Konsekuensinya adalah dengan masuknya sinar UV kedalam lapisan kulit, maka dapat sebagai donatur sebuah elektron kepada molekul oksigen di epidermis (Meschino, 2003).

Jika sinar UV memberikan satu buah elektron, maka molekul oksigen sekarang mempunyai satu elektron yang tidak berpasangan pada orbit luarnya. Akibatnya timbul masalah, ketika molekul oksigen menarik satu elektron dari molekul normal yang ada disekitarnya sehingga menyebabkan molekul tersebut mempunyai elektron yang tak berpasangan,

menjadi tidak stabil dan menjadi radikal bebas yang agresif. Molekul oksigen dapat dikonversi menjadi oksigen singlet (O_2^{\cdot}) atau anion superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dan untuk menstabilkannya harus dilakukan sendiri secara elektrik, anion superoksid akan mengambil secara acak sebuah elektron dari molekul yang terdekat. Hal ini tidak hanya merusak molekul, tapi juga mengubahnya menjadi radikal bebas dan menimbulkan reaksi berantai. Tipe pembentukan atau penyebaran radikal bebas semacam ini dapat merusak berbagai komponen dari sel-sel kulit, seperti enzim dan membran sel (Meschino, 2003).

Salah satu kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas adalah hilangnya fungsi kontrol membran sel. Walaupun demikian sel kulit masih mempunyai antioksidan enzimatik seperti superoksid dismutase, yang dapat menghilangkan dan menetralsir anion superoksid. Vitamin E yang ada dalam sel kulit juga dapat mencegah terbentuknya beberapa radikal bebas dari anion superoksid. Tetapi ketika sel-sel kulit terpapar sinar UV yang kuat dan lama, maka mekanisme pertahanan antioksidan dalam sel tidak mampu menghambat perkembangbiakan radikal bebas, dan kerusakan yang ditimbulkannya tidak dapat dihindari, semua ini mempercepat proses penuaan dini dan meningkatkan resiko terjadinya kanker kulit (Meschino, 2003).

Anion superoksida bukan satu-satunya radikal bebas yang terbentuk akibat paparan sinar UV. Elektron kedua yang berasal dari sinar UV diberikan pada anion superoksid dan membentuk kesatuan yang dikenal

dengan hidrogen peroksidan (H_2O_2). Hidrogen peroksida ini akan menjadi ancaman yang sangat berbahaya terhadap sel, sebab radikal bebas ini dapat masuk melalui membran inti dan menempati serta merusak DNA sel.

Adanya zat besi (Fe^{2+}) dan melalui reaksi Fenton, H_2O_2 dapat dengan mudah berubah menjadi hidroksi radikal (OH^{\cdot}) yang agresif dan bisa bereaksi dengan hampir semua bentuk persenyawaan (*compound*) dalam tubuh. Hidroksi radikal dikenal sebagai perusak enzim seluler, protein, karbohidrat, lipid dan DNA yang dapat menimbulkan mata rantai mutasi sehingga timbul kanker dan mempercepat penuaan dini kulit (Meschino, 2003).

2.2.3 Patogenesis Terjadi *Photoaging*

Pengaruh Sinar UV Menghambat Produksi Kolagen

Paparan sinar UV, selain mengurangi kolagen yang *mature* pada dermis, juga merusak sintesis kolagen secara berkelanjutan, terutama melalui penurunan regulasi sintesis kolagen secara berkelanjutan, terutama melalui penurunan regulasi ekspresi gen prokolagen tipe I dan tipe III. Dua mekanisme yang bertanggung jawab terhadap berkurangnya kadar gen prokolagen adalah induksi AP-1 dan menurunkan regulasi TGF- β tipe II. Seperti dijelaskan sebelumnya yaitu sinar UV menginduksi faktor transkripsi AP-1, dengan mengikat dan mengeksekusi faktor yang merupakan bagian dari kompleks transkripsional yang diperlukan untuk transkripsi prokolagen, yaitu dengan mengganggu produksi kolagen.

Faktor transkripsi AP-1 juga telah terbukti menurunkan sintesis kolagen dengan menghambat pengaruh TGF- β , sebuah sitokin profibrotik mayor, dan salah satu eksekusi dari sinyal protein ini yang akan mengaktifkan protein baik secara langsung maupun tak langsung (Wiraguna, 2013).

Sinar ultraviolet juga mengganggu ekspresi gen prokolagen tipe 1 dengan TGF- β melalui pengurangan pengaturan (*down-regulating*) reseptor TGF- β II selama 8 jam penyinaran, menunjukkan sel tidak responsif terhadap efek TGF- β . Pada kultur fibroblas, sinar UV mempengaruhi down-regulation reseptor TGF- β II sehingga mengakibatkan hilangnya respon TGF- β yang akhirnya akan mengurangi secara substansial ekspresi gen prokolagen tipe 1. Data ini menunjukkan bahwa *down-regulation* reseptor TGF- β II, dan untuk represi media transkripsi AP-1, juga berperan dalam penurunan ekspresi gen prokolagen yang diamati secara *in vivo* setelah dipapar dengan sinar UV (Wiraguna, 2013).

Bukti yang ada terus bertambah dari penelitian *in vitro* bahwa radiasi UV memicu aksi *ligand* reseptor melalui pembentukan ROS. Telah didahliikan bahwa ROS bersifat sebagai oksidan dan melalui proses oksidasi tersebut akan menurunkan enzim *proteintyrosine phosphatase*. Penurunan enzim ini akan menyebabkan terjadi *up-regulation* reseptor *growth factor* dan pada akhirnya akan mengaktifasi AP-1 (Rabe dkk., 2006).

Reactive oxygen species (ROS) juga berpengaruh dalam transduksi sinyal yang diperantarai oleh MAP kinase (MAPKs), p38 dan JNK. Enzim ini sama baiknya dengan seramid dari membran sel yang selanjutnya menyebabkan induksi AP-1. *Activator protein-1* terdiri dari dua subunit, yaitu c-fos yang diekspresikan secara konstitutif dan c-jun yang dapat terinduksi UV. Ekspresi komponen c-Jun dari AP-1 yang berlebihan pada fibroblast hasil kultur dapat mengurangi jumlah ekspresi kolagen tipe 1. *Activator protein-1* dapat menekan ekspresi gen prokolagen tipe 1, prokolagen tipe 3 dan TGF β sel fibroblas dermis sehingga terjadi penurunan sintesis kolagen. Pada manusia dalam waktu beberapa jam terpapar sinar UV akan terbentuk MMPs khususnya gelatinase dan kolagenase yang pada akhirnya menurunkan jumlah kolagen pada lapisan dermis (Rhein dan Santiago, 2010).

Produksi kolagen berkurang pada kulit yang mengalami *photoaging*. Setelah radiasi UV, persediaan pro-kolagen tampak jelas berkurang dan tidak ada sama sekali saat 24 jam setelah paparan *in vivo*. *Activator protein-1* dan *transforming growth factor β* (TGF- β) terlibat dalam *down-regulation* sintesis kolagen yang dimediasi oleh UV ini (Rabe dkk., 2006).

Paparan sinar UV pada kulit manusia atau mencit dapat menginduksi serangkaian matriks metaloproteinase (MMP), yang terlibat dalam proses *photoaging*. Matriks metaloproteinase bersama protease mampu merusak jaringan kolagen dan komponen lain dari matriks ekstraselular. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa paparan sinar UV dapat mengurangi

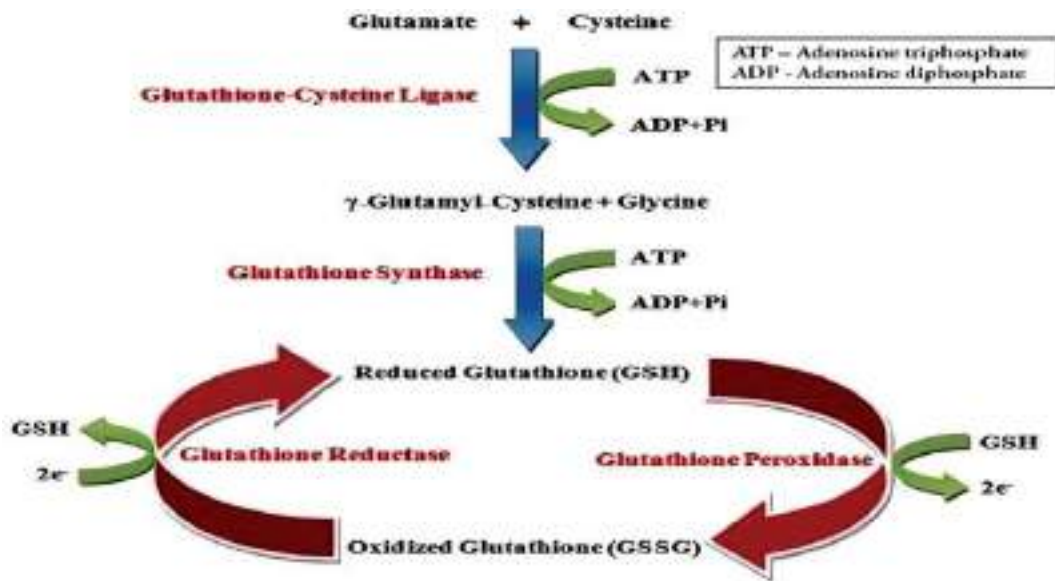
kolagen pada *photoaging* dengan membloking reseptor TGF- β tipe II/*Smad signaling* (Quan dkk., 2009)

Secara keseluruhan, efek radiasi UV pada dermis menghasilkan degradasi kolagen, hambatan sintesis kolagen, inflamasi dan stres oksidatif, serta penurunan kemampuan sel dan pada akhirnya terjadi proses apoptosis (Cunningham dkk., 2005; Rabe dkk., 2006).

2.3 Glutation

Glutation (*γ -glutamyl-cysteinylglycine*) memiliki berat molekul rendah, larut dalam air, tiol-tripeptida dibentuk oleh tiga asam amino yaitu glutamat, sistein dan glisin (Dickinson, 2002). Gugus sulfhidril memungkinkan untuk berinteraksi dengan berbagai sistem biokimia, sehingga bentuk aktifnya disingkat "GSH". Glutation adalah salah satu sistem antioksidan yang paling aktif dalam fisiologi manusia (Exner, 2000).

Glutation ada dalam dua bentuk menukar, glututation tereduksi (GSH) dan glututation teroksidasi (GSSG). GSH adalah bentuk intraseluler dominan, yang bertindak sebagai antioksidan kuat. Dalam proses ini, GSH terus teroksidasi menjadi GSSG oleh enzim glututation peroksidase. Untuk menjaga keseimbangan redoks intraseluler, GSH diisi kembali melalui pengurangan GSSG oleh enzim glututation reduktase (Meister, 1976).

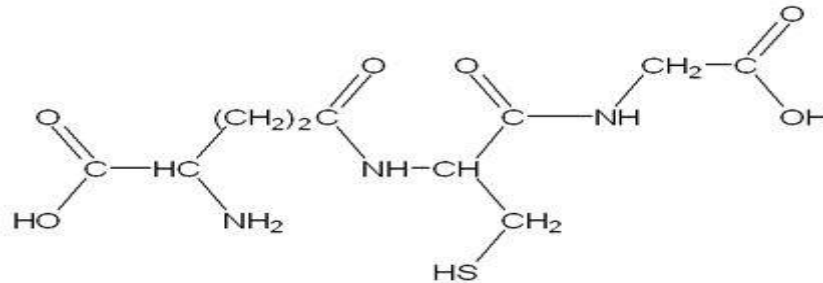


Gambar 2.1 Siklus Redoks Glutathion (Sarkar *et al.*, 2016)

Glutathion dipertimbangkan sebagai protektor sel yang sangat bernilai melalui efek langsungnya pada penetralan radikal bebas hidroksil reaktif dan radikal bebas turunan oksigen lain. Mitokondria merupakan sumber energi bahan bakar sel dan mengkonsumsi oksigen lebih banyak dibanding organel lain dalam sitosol, hal ini akan menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) yang menyebabkan stres oksidatif, hal ini merupakan alasan mitokondria digunakan sebagai target utama untuk glutathion menetralkan ROS dan mengurangi stres oksidatif, sehingga glutathion sangat penting untuk fungsi mitokondria dan juga produksi energi (Meister, 1976).

Glutathion bekerja sebagai pelindung sel, yang dapat membantu memperlambat tanda-tanda penuaan dengan melawan kerusakan radiasi yang dapat terjadi pada kulit, retina, kornea, dan lensa mata. Selain itu, juga berperan menetralisasi radikal bebas yang dapat mempercepat tanda-tanda penuaan. Kadar glutathion dalam tubuh secara cepat menurun pada sekitar

usia 20 tahun atau tergantung pada paparan toksin lingkungan (Sarkar, *et al.*, 2016).



Gambar 2.2 Glutation (Lu., 2009)

2.4 Kulit

Kulit adalah organ tubuh paling besar yang melapisi seluruh tubuh. Luas kulit pada manusia rata-rata sekitar 2 m² dengan berat 10kg jika ditimbang dengan lemaknya atau 4kg jika tanpa lemak, atau beratnya sekitar 16% dari berat badan seseorang. Kulit merupakan organ yang pertama kali terkena polusi oleh zat-zat yang terdapat di lingkungan hidup kita, termasuk jasad renik (mikroba) yang tumbuh dan hidup di lingkungan kita. Kulit juga sangat kompleks, elastis dan sensitif, serta bervariasi pada keadaan iklim, umur, jenis kelamin, ras dan lokasi tubuh (Kusantati, Prihatin, dan Wiana, 2008).

2.4.1 Anatomi Kulit

Secara histologis kulit tersusun atas 3 lapisan utama yaitu lapis epidermis atau kutikel lapis dermis (korium, kutis vera, *true skin*), dan lapis subkutis (*hypodermis*). Tidak ada garis tegas yang memisahkan antara dermis dan subkutis. Subkutis ditandai dengan adanya jaringan ikat longgar dan sel-

sel yang membentuk jaringan lemak. Lapis epidermis dan dermis dibatasi oleh taut dermoepidermal (Kusantati, Prihatin, dan Wiana, 2008).

a. Epidermis

Epidermis merupakan jaringan epitel berlapis pipih, dengan sel epitel yang mempunyai lapisan tertentu. Lapisan ini terdiri dari 5 lapisan yaitu *stratum germinativum*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lusidum*, dan *stratum korneum*.

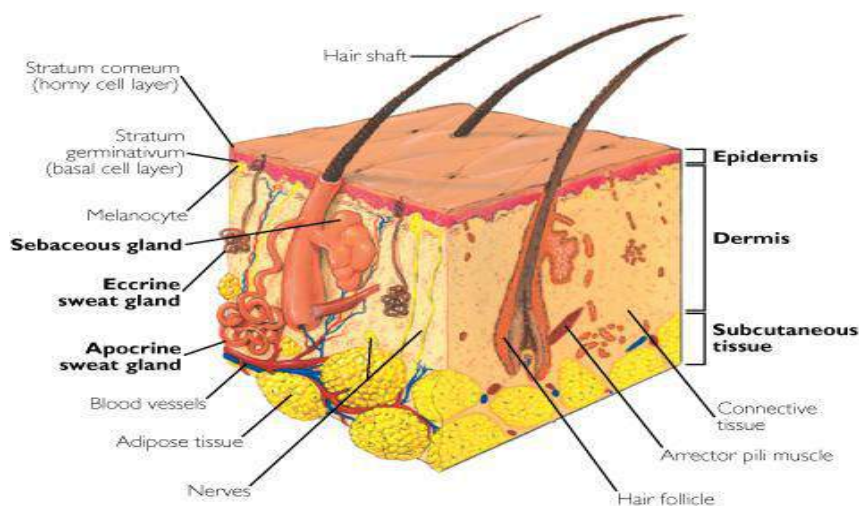
b. Dermis

Dermis merupakan jaringan ikat *fibroelastis*, dimana di dalamnya didapatkan banyak pembuluh – pembuluh darah, pembuluh – pembuluh limfa, serat – serat saraf, kelenjar keringat dan kelenjar minyak, yang masing – masing mempunyai arti fungsional untuk kulit itu sendiri. Lapisan ini jauh lebih tebal daripada epidermis, terbentuk oleh jaringan elastis dan fibrosa padat dengan elemen seluler, kelenjar, dan rambut sebagai adneksa kulit.

c. Subkutis

Lapisan ini merupakan kelanjutan dermis, terdiri atas jaringan ikat longgar berisi sel-sel lemak di dalamnya. Sel lemak merupakan sel bulat, besar, dengan inti terdesak ke pinggir karena sitoplasma lemak yang bertambah. Sel-sel ini membentuk kelompok yang dipisahkan satu dengan yang lainnya oleh *trabekulua* dan *fibrosa*. Lapisan sel lemak disebut *panikulus adiposus*, berfungsi sebagai cadangan makanan. Di lapisan ini terdapat ujung-ujung saraf tepi, pembuluh darah, dan saluran getah bening.

Tebal jaringan lemak tidak sama, bergantung pada lokasi, di abdomen 3 cm, sedangkan di daerah kelopak mata dan penis sangat tipis. Lapis lemak ini juga berfungsi sebagai bantalan.



Gambar 2.3 Gambar Struktur Kulit

2.4.2 Fisiologi Kulit

Kulit memiliki berbagai fungsi yaitu sebagai berikut :

a. Fungsi Proteksi

Epidermis berguna untuk menutupi jaringan-jaringan tubuh dari pengaruh luar. Lapisan paling luar dari kulit diselubungi dengan lapisan tipis lemak yang menjadikan kulit dapat menahan suhu tubuh, menahan luka-luka kecil, mencegah zat kimia dan bakteri masuk serta menghalau rangsang fisik seperti sinar ultraviolet dari matahari (Kusantati, Prihatin, dan Wiana, 2008).

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 (Langley dan Lenny, 1958).

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 (Langley dan Lenny, 1958).

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 (Langley dan Lenny, 1958).

e. Fungsi pengaturan suhu tubuh (termoregulasi)

Kulit mengatur suhu tubuh melalui dilatasi dan konstruksi pembuluh darah serta melalui respirasi yang dipengaruhi oleh saraf otonom (Kusantati, Prihatin, dan Wiana, 2008). Kulit melakukan peran ini dengan cara menkrimuarkan keringat dan mengerutkan otot dinding

pembuluh darah kulit ketika terjadi peningkatan suhu. Dengan dikeluarkannya keringat, maka terbuang pula panas tubuh. Mekanisme termoregulasi ini diatur oleh sistem saraf simpatis yang menkrimuarkan zat perantara asetilkolin (Langley dan Lenny, 1958).

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 (Langley dan Lenny, 1958).

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 (Langley dan Lenny, 1958).

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 (Langley dan Lenny, 1958).

2.4.3 Fibroblas

Fibroblas adalah sel yang utama di lapisan dermis, berbentuk spindle dengan sitoplasma bercabang cabang tidak teratur, nukleus berbentuk lonjong, besar dan pucat dengan nukleolus yang jelas. Sel fibroblas bertanggung jawab terhadap produksi kolagen, serat retikulin, serat elastik dan jaringan penyangga dari dermis. Selain itu fibroblas juga dapat menghilangkan serat-serat tersebut dengan mensekresikan enzim seperti *collagenase* (MMP-1) dan *elastase* (Obagi, 2000).

Fibroblas berperan penting pada proses penyembuhan luka (*wound healing process*). Adanya suatu kerusakan pada jaringan dapat merangsang sel fibrosit dan mitosis fibroblas. Jadi dapat dikatakan bahwa fungsi utama fibroblas adalah menjaga integritas struktur jaringan ikat dan mengatur *turnover* jaringan ikat dengan memproduksi enzim yang dapat mendegradasi kolagen (*collagenase*), elastin (*elastase*), proteoglikan dan glikosaminoglikan (*stromelysin* dan *lysosomal hydrolase*).

Seiring bertambahnya usia, secara umum ukuran fibroblas akan menjadi semakin mengecil dan menjadi berkurang aktivitasnya, sementara pada kulit yang mengalami kerusakan oleh karena paparan sinar ultra

violet fibroblasnya sering menjadi hipertopi. Dari suatu penelitian dinyatakan bahwa sel fibroblas memiliki ketahanan yang lebih kuat terhadap pajanan UV-B dibandingkan dengan sel lain seperti keratinosit dan melanosit dengan dosis yang bersifat sitotoksik dari pajanan *narrowband UV-B* (100,200, dan 400 mJ/cm²) ataupun *broadband UV-B* (5,10, dan 25 mJ/cm²) (Cho dkk., 2008).

2.4.4 Matriks Metalloproteinase

Matriks metalloproteinase adalah suatu *zinc-dependent endopeptidase*. MMP *gene family* pada manusia terdiri dari 28 tipe dengan struktur dan spesifitas yang berbeda. MMPs berhubungan dengan proses fisiologis dan patologis yang berkaitan dengan *turnover* matriks ekstraseluler, *wound healing*, *angiogenesis*, dan kanker. Sejumlah MMPs mampu menimbulkan degradasi terhadap kolagen tipe I yaitu antara lain MMP-1, 8,13, MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), dan MT3-MMP (MMP-16). Pada kulit hanya MMP-1 yang paling banyak dipicu pembentukannya oleh pajanan sinar ultra violet dan tampaknya paling bertanggung jawab terhadap pemecahan kolagen akibat paparan matahari. Level MMP-1 akan meningkat sesuai dengan bertambahnya usia, yang mana hal ini diperkirakan sebagai akibat dari fragmentasi serat kolagen dan disorganisasi susunan serat kolagen pada dermis (Seltzer & Eisen, 2006).

Activator Protein -1 (AP-1) yang merupakan *nuclear transcription factor*, terdiri dari dua sub unit yaitu *c-jun* dan *c-fos*, berfungsi untuk

mengontrol transkripsi dari matriks metalloproteinases (MMPs). MMPs merupakan suatu enzim yang bertanggung jawab terhadap degradasi dari matriks ekstrasel, termasuk diantaranya adalah MMP-1 (*collagenase*), MMP-3 (*stromelysin*), dan MMP-9 (*92-kd gelatinase*). *Metalloproteinase* juga bertanggung jawab terhadap terjadinya degradasi kolagen.

MMP dapat dengan segera timbul hanya dengan dosis minimal sinar ultra violet, di bawah dosis yang dibutuhkan untuk menimbulkan eritema. Terdapat suatu hubungan dosis dan respon yang ditimbulkan antara paparan UV dan induksi MMP. Paparan terhadap sinar UV yang tidak cukup untuk menimbulkan *sunburn* dapat memfasilitasi terjadinya degradasi kolagen, dan pada akhirnya menimbulkan *photoaging*. Paparan minimal yang berulang dengan dosis yang setara dengan 5-15 menit paparan matahari pada tengah hari cukup untuk meningkatkan level MMP (Berneburg dkk., 2000; Rabe dkk., 2006).

Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan pada kultur fibroblas menunjukkan bahwa radiasi sinar UV-B mampu memicu ekspresi MMP pada dosis yang bervariasi antara 10 mJ/cm² – 100 mJ/cm² (Kim dkk., 2004; Kim dkk., 2005; Yulianto, 2008; Moon dkk., 2008; Lee dkk., 2009).

2.5 Sistem Transpor Obat

Transpor obat merupakan proses transpor massa dengan satu gerakan acak yang terjadi oleh pengaruh perbedaan konsentrasi. Gerakan molekul melewati suatu *barrier* dengan suatu mekanisme tertentu merupakan suatu proses difusi. Mekanisme transpor obat dari bentuk

sediaan terjadi dalam dua tahap. Tahap pertama, terjadi pelepasan obat dari pembawa, tahap kedua berpenetrasi melalui *barrier*. Proses transpor utamanya terjadi secara difusi pasif, yaitu proses transpor yang terjadi karena adanya perbedaan gradien konsentrasi (Sinko *et al*, 2011).

2.5.1 Pelepasan Obat

Mekanisme pada proses pelepasan obat antara lain:

a. Difusi

Difusi merupakan suatu proses perpindahan massa molekul suatu zat yang dibawa oleh gerakan molekular secara acak dan berhubungan dengan adanya perbedaan konsentrasi aliran molekul melalui suatu batas. Proses difusi melalui *barrier* didasari oleh Hukum Fick I yang menyatakan bahwa sejumlah zat yang mengalir melalui satuan penampang melintang S dari suatu *barrier* dalam satu satuan waktu (t) dinyatakan dengan *fluks* (J).

$$J = \frac{dM}{S \cdot dt} \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan :

M : Massa zat yang dapat melewati *barrier* (gram)

S : Luas permukaan *barrier* (cm^2)

T : Waktu (detik)

Fluks berbanding lurus dengan perbedaan konsentrasi dC/dx , dinyatakan dalam persamaan :

$$J = D \frac{dC}{dx} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan :

D : Koefisien difusi (cm^2/menit)

C : Koefisien fase donor (g/cm^3)

x: Tebal membran (cm)

Tanda negatif pada D dari persamaan (2) menunjukkan bahwa difusi terjadi dalam satu arah menurun konsentrasi difusi. Harga D dapat berubah pada konsentrasi yang lebih tinggi, dan dapat juga dipengaruhi oleh temperatur, tekanan, sifat pelarut, sifat kimia, dan difusan.

Persamaan untuk transpor massa yang menekankan perubahan konsentrasi dengan perubahan waktu pada suatu lokasi tertentu dikenal sebagai Hukum Fick II, yang dinyatakan dengan persamaan berikut :

$$\frac{dC}{dt} = D \frac{d^2c}{dx^2} \dots\dots\dots (3)$$

Hukum Fick II menyatakan hubungan antara konsentrasi pada setiap waktu tertentu yang sebanding dengan perubahan *gradien* konsentrasi antara kompartemen donor dan reseptor di dalam sistem. Dalam pelepasan secara difusi larutan dalam kompartemen, reseptor diganti secara terus-menerus untuk menjaga agar selalu dalam konsentrasi rendah, keadaan ini disebut kondisi *sink*. Profil pelepasan bahan obat yang berdifusi menggambarkan jumlah obat yang terlepas pada interval waktu tertentu. Pada tahap awal profil pelepasan menggambarkan konsentrasi bahan obat sedikit demi sedikit yang bertambah esuai waktu kemudian menjadi garis lurus, hal ini disebut sebagai keadaan *non steady state*. Selanjutnya laju difusi menjadi

konstan dan sistem berada pada masa tunak (*steady state*). Ketika *steady state* diekstrapolasikan terhadap sumbu X maka akan didapatkan titik perpotongan yang dikenal dengan nilai *lag time*, yaitu waktu yang dibutuhkan oleh suatu obat untuk memantapkan perbedaan konsentrasi yang sama dalam tiap membran atau komponen. Mengenai *lag time* dapat dinyatakan dengan modifikasi persamaan berikut (Sinko *et al*, 2011):

$$t_L = \frac{h^2}{6D} \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan :

t_L : *Lag time* (waktu laten)

h: Tebal membran

D : Koefisien difusi zat aktif

b. Disolusi

Disolusi merupakan tahap yang membatasi atau mengontrol laju biopsi obat – obat yang mempunyai kelarutan rendah, karena tahapan ini merupakan tahapan yang paling lambat dari berbagai tahapan yang ada dalam pelepasan obat dari bentuk sediaannya dan perjalanan obat menuju kulit (Sinko *et al*, 2011).

2.5.2 Penetrasi Perkutan

Pada penetrasi secara perkutan terjadi transfer bahan aktif melalui kulit dari lingkungan luar ke sirkulasi darah. Absorpsi perkutan dapat didefinisikan sebagai penggabungan antara penetrasi molekul melewati kulit, diikuti dengan resorpsi dari darah atau sistem limfatik dari demis

papularis dan lapisan dibawahnya. Tahap penetrasi merupakan difusi pasif melewati masing-masing struktur dari stratum korneum, dermis, aneksa (Berard, 2003).

Kulit memiliki beberapa lapisan antara lain, stratum korneum merupakan lapisan penghambat laju absorpsi percutan obat. Transpor molekul besar dan bersifat hidrofilik akan sulit untuk menembus lapisan lipid dari stratum korneum karena lapisan ini mengandung 40% lipid, 40% protein dan hanya 20% air. Transpor molekul obat yang lipofilik difasilitasi oleh disolusi menuju *liquid interseluler* yang terdapat di stratum korneum. Absorpsi dari obat yang hidrofilik dapat terjadi melewati pori atau pembukaan dari folikel dan kelenjar *sebaceous*, tetapi hal ini hanya terjadi sekitar 1% dari total permukaan kulit sehingga hanya sedikit jumlah obat yang diabsorpsi (Mehta, 2004).

Absorpsi percutan obat merupakan hal yang penting dalam penghantaran obat secara transdermal karena obat harus diabsorpsi dalam jumlah yang cukup untuk memperpanjang durasi kerja dan meningkatkan laju obat serta untuk menjaga keseragaman sistemik dan efek terapeutik selama periode pemakaian. Secara umum molekul obat menembus stratum korneum menuju ke lapisan terdalam dari lapisan dermal hingga menuju sistemik yang terjadi dalam waktu yang relatif singkat dan mudah (Mehta, 2004).

Laju penetrasi obat melewati stratum korneum mengikuti difusi Hukum Fick. Laju transpor obat tidak hanya dipengaruhi oleh kelarutannya

tetapi juga koefisien partisi minyak dan air, konsentrasi dalam sediaan dan luas permukaan kulit yang terpapar sediaan (Mehta, 2004).

Menurut Hukum Fick, lintasan zat aktif secara difusi pasif mengikuti persamaan berikut (Mehta, 2004) :

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D \cdot \Delta C \cdot K}{h} \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan:

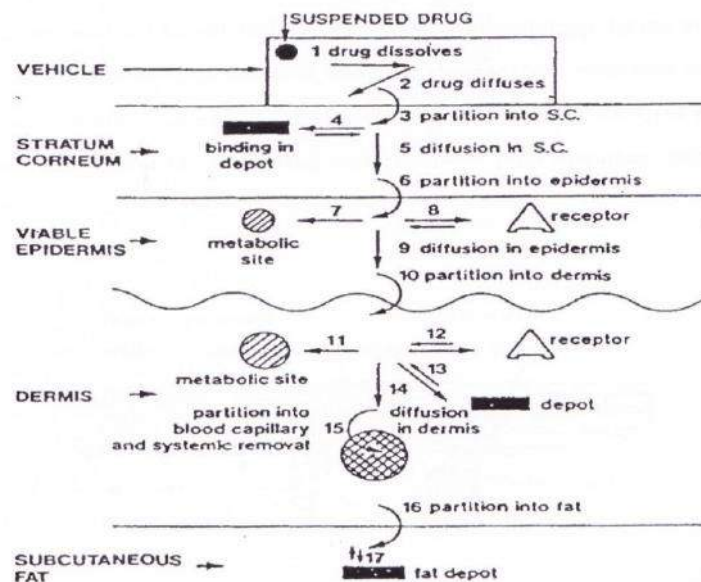
dM/dt : Fluks *steady state* menembus stratum korneum

D : Koefisien difusi dari molekul obat

ΔC : Gradient konsentrasi saat menembus stratum korneum

K : Koefisien partisi dari obat

H : Ketebalan dari stratum korneum



Gambar 2.4 Mekanisme penetrasi perkutan (Barry, 2002)

2.5.3 Penetrasi Obat Melalui Kulit

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

a. Absorpsi transepidermal

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.

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi absorpsi perkutan (Ansel, 1989; Walters dan Jonathan, 1993), antara lain :

- 1) Harga koefisien partisi obat yang tergantung dari kelarutannya dalam minyak dan air
- 2) Kondisi pH akan mempengaruhi tingkat disosiasi serta kelarutan obat yang lipofil
- 3) Konsentrasi obat
- 4) Profil pelepasan obat dari pembawanya, bergantung pada afinitas zat aktif terhadap pembawa, kelarutan zat aktif dalam pembawa, dan pH pembawa
- 5) Komposisi sistem tempat pemberian obat, yang ditentukan dari permeabilitas stratum korneum yang disebabkan hidrasi dan perubahan struktur lipid
- 6) Peningkatan suhu kulit dapat menyebabkan perubahan difusi yang disebabkan oleh peningkatan kelarutan obat
- 7) Pembawa yang dapat meningkatkan kelembaban kulit akan mendorong terjadi absorpsi obat melalui kulit
- 8) Waktu kontak obat dengan kulit
- 9) Ketebalan kulit. Absorpsi perkutan lebih besar jika obat digunakan pada kulit dengan lapisan tanduk yang tipis daripada yang tebal
- 10) 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

11) Adanya sirkulasi darah *in situ* pada kulit akan meningkatkan absorpsi obat.

2.6 Hubungan Lipofilisitas dan Koefisien Partisi

2.6.1 Lipofilisitas

Lipofilisitas adalah ukuran relatif daya tarik suatu molekul pada fase non polar terhadap fase polar yang menggambarkan absorpsi obat (Siswandono dan Soekarjo, 2000). Sifat lipofilisitas mempunyai kegunaan untuk meramalkan kemampuan absorpsi obat dalam lambung, usus, rongga bukal, kolon dan kulit juga sebagai petunjuk untuk penyimpanan obat dalam lemak, meskipun harus diperhatikan juga bahwa transport obat dipengaruhi juga oleh mekanisme transport yang lain selain cara difusi pasif (Rekker, 1977).

Hubungan antara aktivitas biologis dengan nilai log P dalam oktanol – air oleh Hansch dan kawan – kawan dinyatakan di rumus (11) :

$$\log A = \log 1/C = a \log P + b \dots \dots \dots (11)$$

dimana:

log A = logaritma aktivitas biologis relatif

C = kadar obat yang diperlukan untuk menimbulkan respon biologis

log P = logaritma koefisien partisi

a , b = tetapan koefisien partisi

Hubungan antara nilai log P dengan aktivitas biologis berdasarkan rumus di atas adalah bersifat linier Hansch (1971) juga

mengembangkan hubungan tersebut dengan menggunakan harga koefisien partisi yang jumlahnya banyak, ternyata ditemukan hubungan yang parabolik dan dirumuskan sebagai berikut :

$$\log A = \log 1/C = -a (\log P)^2 + b (\log P) + C \dots \dots \dots (12)$$

dimana : a, b dan c adalah tetapan-tetapan yang didapat dari penggunaan metode *least square*.

Dari kedua rumus di atas dapat dilihat bahwa peningkatan aktivitas biologis sebanding dengan peningkatan lipofilitas yang akan mencapai harga maksimum. Peningkatan harga lipofilitas setelah mencapai harga maksimum akan menyebabkan penurunan aktivitas (Rekker, 1977). Hal ini disebabkan karena sifat bilayer membran biologis. Membran biologis terdiri dari lapisan lipid yang bersifat non polar dan lapisan protein yang bersifat polar. Jika suatu obat mempunyai lipofilitas yang tinggi, maka dapat dengan mudah menembus lapisan lipid membran sel, untuk selanjutnya berikatan dengan reseptor dan menimbulkan efek. Akan tetapi jika lipofilitasnya terlalu tinggi, obat tersebut akan tertahan pada lapisan lipid sehingga tidak dapat larut dalam cairan biologis. Dengan demikian obat tersebut tidak dapat diedarkan ke seluruh tubuh dan berikatan dengan reseptor, sehingga aktivitasnya menurun (Siswandono dan Soekarjo, 2000).

2.6.2 Koefisien Partisi

Obat sebelum dapat mencapai sirkulasi sistemik untuk menimbulkan efek terapi, harus dapat berpenetrasi menembus membran terlebih dahulu. Karena membran tubuh bersifat lipofil, bahan obat harus memiliki

lipofilisitas tertentu untuk dapat berpenetrasi menembus membran sehingga menghasilkan efek terapi yang diinginkan. Karakteristik obat yang bersifat lipofil maupun hidrofil dapat diketahui dengan mengukur koefisien partisi molekul bahan obat tersebut dalam fase minyak air (Nogrady, 1992). Fase minyak yang paling banyak digunakan perhitungan koefisien partisi adalah oktanol dan kloroform. Besarnya koefisien partisi dapat ditunjukkan dengan persamaan berikut:

$$P = \frac{C_{\text{lipid}}}{C_{\text{air}}} \dots\dots\dots(13)$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi obat, sedangkan lipid dan air menunjukkan fasenya.

Bahan obat yang memiliki P (koefisien partisi) sebesar lebih dari 1 maka obat tersebut digolongkan lipofil. Sedangkan bahan obat yang memiliki P (koefisien partisi) sebesar kurang dari 1 maka obat tersebut digolongkan hidrofil.

Studi tentang koefisien partisi bertujuan untuk mengetahui kecepatan transport obat untuk terlepas dari basis dan menembus membrane kulit. Sehingga dapat digunakan untuk memprediksi banyaknya bahan obat yang mencapai reseptor untuk menghasilkan efek terapi (Banker dan Rhodes, 1995).

Koefisien partisi oktanol/air yang dinyatakan dalam log P merupakan standar kuantitas untuk menentukan sifat hidrofobik suatu molekul. Parameter hidrofobik/hidrofilik adalah sifat yang sangat penting dalam

aplikasi biomedis (Katritzky, et al., 1996). Koefisien partisi minyak/air dalam sistem-sistem seperti oktanol/air dan kloroform/air adalah suatu hasil pengukuran lipofilisitas obat dari indikasi kemampuannya untuk melewati membran sel. Koefisien partisi didefinisikan sebagai perbandingan obat yang tidak terion antara fase organik dan fase air pada kesetimbangan (Lachman, 1986).

Koefisien partisi merupakan suatu informasi penting karena dapat digunakan untuk memperkirakan proses absorpsi, distribusi, dan eliminasi suatu obat di dalam tubuh. Pengetahuan tentang nilai koefisien partisi dapat digunakan untuk memperkirakan onset kerja obat atau durasi kerja obat, hal ini untuk mengetahui obat akan bekerja secara aktif atau tidak (Cairns, 2004).

Koefisien partisi atau lipofilisitas bertanggung jawab terhadap potensi obat karena untuk dapat masuk ke organisme dan mencapai reseptor dengan konsentrasi yang cukup serta dapat menimbulkan efek biologis obat harus melewati satu seri daerah hidrofobik dan hidrofilik (Reksohadiprodjo, 1985).

Koefisien partisi (P) menggambarkan rasio pendistribusian obat ke dalam pelarut sistem dua fase, yaitu pelarut organik dan air. Molekul yang semakin larut lemak maka koefisien partisinya semakin besar dan difusi trans membran terjadi lebih mudah. Organisme terdiri dari fase lemak dan air sehingga bila koefisien partisi sangat tinggi ataupun sangat rendah maka hal tersebut merupakan hambatan pada proses difusi zat aktif (Ansel, 1989).

Koefisien partisi dapat ditentukan hanya jika zat terlarutnya tidak terionisasi pada pH pengukuran. Proses ionisasi pada zat terlarut yang bersifat asam lemah atau basa lemah untuk membentuk garam akan sangat mempengaruhi profil kelarutan obat. Garam yang terionisasi penuh akan jauh lebih mudah terlarut di dalam air dibanding dengan asam atau basa yang tidak terionisasi, sehingga perbandingan konsentrasi obat di dalam fase air dan di dalam fase organik akan bervariasi bergantung pada pH pengukuran. Ada dua cara untuk menyelesaikan masalah tersebut, pertama, rincian percobaan diatur untuk memastikan bahwa P terukur merupakan koefisien partisi molekul-molekul yang tidak terionisasi (dengan demikian nilai P untuk asam diukur pada pH rendah ketika asam tidak terionisasi, dan untuk basa diukur pada pH tinggi untuk mencegah terjadinya ionisasi); kedua, perbandingan konsentrasi tersebut didefinisikan sebagai koefisien partisi semu, untuk membedakannya dari koefisien partisi spesies yang tidak terionisasi yang disebut sebagai koefisien partisi sebenarnya (Cairns, 2004).

Koefisien partisi semu (*Apparent Partition Coefficient*, APC/ P_{app}) bergantung pada proporsi senyawa yang terdapat di dalam larutan, yang selanjutnya bergantung pada pH larutan. Dalam biofarmasetika dan kondisi umumnya sistem non ideal sering didapatkan dan harga koefisien partisinya tidak dilakukan koreksi. Jadi koefisien partisi ini hanya tepat untuk sistem yang spesifik, menggunakan fase minyak seperti oktanol, kloroform,

sikloheksana atau isopropyl miristat, dan fase air berupa larutan pada pH yang sesuai dan suhu percobaan tertentu, misal 30° C atau 37° C.

Penentuan koefisien partisi dikerjakan dengan melarutkan obat pertama-tama dalam air atau fase minyak. Harga koefisien partisi dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan (Ritscel, 1976):

$$APC = \frac{(C_2^0 - C_2') \cdot a}{C_2' \cdot b} \dots\dots\dots(14)$$

Keterangan:

APC : koefisien partisi apparent

C₂' : konsentrasi obat dalam fase air sesudah terjadi kesetimbangan

C₂⁰ : konsentrasi obat dalam fase air sebelum terjadi kesetimbangan

a : volume fase air

b : volume fase minyak

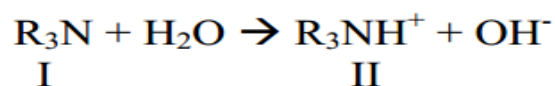
Kisaran kemungkinan nilai P yang ditemukan dalam molekul obat adalah luas, mulai dari fraksi yang kecil hingga bernilai beberapa ribu, dengan alasan ini, telah umum digunakan bentuk logaritma koefisien partisi atau log P (Cairns, 2004). Pelarut nonpolar yang dahulu digunakan pada penentuan koefisien partisi adalah kloroform, karbontetraklorida, benzen, dan lain-lain. Sekarang yang lebih sering digunakan adalah n-oktanol, hal ini dikarenakan : 1. n-oktanol mengandung rantai hidrokarbon panjang yang bersifat nonpolar dan gugus hidroksi yang bersifat polar, sebagai pendekatan terhadap model membran biologis; 2. n-oktanol bersifat inert dan toksisitasnya rendah; 3. Kadar obat dalam pelarut (C_o dan C_w) pada umumnya ditetapkan secara spektrofotometri-UV, dan 1-oktanol tidak

memberikan serapan yang berarti pada panjang gelombang ultraviolet, sehingga kadar senyawa dalam fase n-oktanol dapat ditetapkan dengan metode tersebut.

Pelarut polar yang sering digunakan adalah air, air yang didapar pada pH tertentu, atau air yang didapar pada pH 7,4 sebagai pendekatan terhadap model cairan biologis (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Koefisien partisi sistem oktanol-air dapat digunakan untuk menggambarkan distribusi suatu senyawa di antara fase organik dan fase air.

Koefisien partisi tidak berdimensi, maka setiap satuan konsentrasi dapat digunakan. Harga koefisien partisi tidak tergantung konsentrasi, sehingga idealnya pengukuran dilakukan pada konsentrasi larutan yang sangat encer. Pada asam dan molekul lain yang cenderung berasosiasi sebaiknya pengukuran dilakukan pada berbagai konsentrasi kemudian diplotkan pada konsentrasi yang sangat kecil (Hansch and Dunn, 1971).

Molekul-molekul yang dapat bereaksi dengan air membentuk ion, koefisien partisinya harus dikoreksi terhadap adanya ionisasi dan dinyatakan sebagai molekul netral atau spesies tak terionkan. Harga P harus dinyatakan sebagai molekul netral atau spesies yang tidak terionkan. Sebagai contoh :



P diukur pada pH dimana hanya terdapat salah satu bentuk molekul saja, molekul netral atau bentuk ionnya. HCl 0,1 N atau NaOH 0,1 N dapat digunakan tergantung derajat disosiasi dari aminanya, pengenceran larutan,

dan adanya larutan dapar atau tidak. Dalam larutan dapat terjadi dalam bentuk I atau II dengan perbandingan yang bervariasi (Purcell and George, 1973). Rumus koefisien partisi terkoreksi sebagai berikut :

$$P = \frac{C_{oktanol}}{(1 - \alpha) \times C_{air}} \dots\dots\dots(17)$$

Dengan, P = koefisien partisi, C = konsentrasi obat dalam fase, α = derajat ionisasi. Harga α dapat dihitung sebagai berikut :

$$\text{untuk asam, } \alpha = \frac{1}{1 + \text{antilog}(\text{pKa} - \text{pH})} \dots\dots\dots(18)$$

$$\text{untuk basa, } \alpha = \frac{1}{1 + \text{antilog}(\text{pH} - \text{pKa})} \dots\dots\dots(19)$$

Untuk pKa lebih besar dari 10^{-7} tidak perlu koreksi (Purcell and George, 1973). Koefisien partisi susah diukur dalam sistem hidup sehingga biasanya ditentukan secara in vitro dengan menggunakan n-oktanol sebagai fase lipid dan dapar fosfat dengan pH 7,4 sebagai fase air. Koefisien partisi merupakan suatu nisbah, maka tidak mempunyai satuan. Koefisien partisi merupakan sifat aditif bagi molekul, karena setiap gugus fungsi memiliki andil dalam menetapkan kepolaran, dengan demikian juga menetapkan sifat lipofil atau hidrofil dari suatu molekul (Nogrady, 1992). Semakin besar polaritas suatu obat koefisien partisinya semakin kecil, sebaliknya semakin kecil polaritas suatu obat koefisien partisinya semakin besar (Ritschel, 1976).

2.7 Tinjauan Tentang Mikroenkapsulasi

2.7.1 Definisi Mikroenkapsulasi

Mikroenkapsulasi adalah proses partikel kecil atau droplet padat atau bahan cair yang dilapisi menggunakan lapisan film dari polimer (Sri *et al.*, 2012). Umumnya produk mikroenkapsulasi (mikropartikel) mempunyai diameter antara 1 sampai 1000 μm . Produk mikroenkapsulasi dibedakan menjadi mikrokapsul dan mikrosfer. Mikrokapsul merupakan sistem resevoir dengan bentuk regular atau iregular yang mengandung inti dan kapsul dengan batasan yang jelas.

Mononuklear mikrokapsul mengandung bahan inti yang dikelilingi oleh bahan penyalut atau kapsul, polinuklear kapsul memiliki banyak inti yang dibungkus didalam kapsul, dan mikrokapsul tipe matriks merupakan bahan inti yang didispersikan secara homogen ke dalam bahan penyalut. Mikrosfer merupakan sistem yang homogen atau sistem dengan struktur monolitik yang terbuat dari campuran polimer dan bahan obat yang didispersikan ke matriks (Jadupati *et al.*, 2012). Mikrosfer mempunyai ukuran partikel yang ideal yaitu kurang dari 200 μm (Sri *et al.*, 2012).

Berdasarkan morfologinya mikrosfer dibagi menjadi 3 yaitu :

1. Monocore : (inti-kulit) mikrokapsul dengan mikrokapsul yang mengandung satu inti
2. Polycore : kapsul yang mempunyai banyak inti yang terselubung di dalam kulit mikroenkapsul

3. Matrix : bahan inti didistribusikan secara homogen di dalam kulit mikroenkapsul

2.7.2 Tujuan Mikroenkapsulasi dengan Sistem Mikrosfer

Tujuan modifikasi sistem penghantaran obat menggunakan mikrosfer antara lain meningkatkan stabilitas bahan aktif terhadap oksidasi karena reaksi di lingkungan, mengubah komponen aktif cair menjadi sistem yang padat kering. Selain itu mikrosfer bisa menutupi rasa dan bau bahan aktif, memisahkan komponen yang inkompatibel dengan bahan aktif, melindungi lingkungan dari bahan aktif, mengontrol pelepasan bahan obat (membuat sediaan *delayed release*/pelepasan tertunda atau sediaan *sustain release*/pelepasan yang berkelanjutan) (Umer *et al.*, 2011).

2.7.3 Metode Mikroenkapsulasi

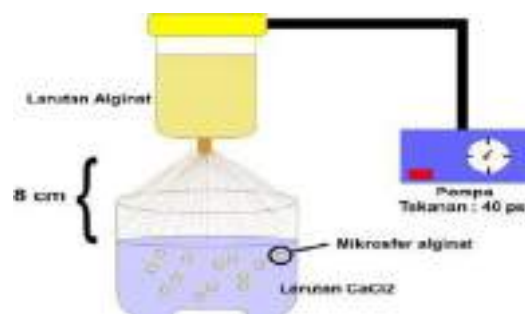
Berikut ini merupakan beberapa metode yang dapat digunakan untuk membuat mikroenkapsulasi dengan bahan obat sebagai *loading-drug* adalah sebagai berikut :

1. Gelasi Ionotropik

Metode gelasi ionotropik didasarkan pada kemampuan polielektrolit dengan menambahkan larutan polimer ke dalam larutan sambung silang untuk membentuk hidrogel (Patil *et al.*, 2010). Hidrogel dibuat dengan cara polimer-obat disemprotkan ke dalam larutan sambung silang menggunakan *spray* bertekanan yang menghasilkan dispersi droplet yang halus, kecil, dan homogen. Polielektrolit alami bertindak sebagai penghambat laju pelepasan yang mengandung anion tertentu pada struktur kimianya. Anion ini membentuk struktur dengan menggabungkan kation

polivalen dan menginduksi gelasi dengan mengikat terutama untuk blok anion (Patil *et al.*, 2010). Kemudian, mikrosfer yang terbentuk akan mengembang dalam cairan biologis tubuh sehingga pelepasan obat menjadi terkontrol (Patil *et al.*, 2012).

Pembuatan droplet dengan jarum syring akan menyebabkan ukuran mikrosfer yang dihasilkan berukuran cukup besar. Droplet dengan ukuran lebih kecil dapat dibentuk dengan menggunakan sistem vibrasi atau teknik atomisasi udara (aerosolisasi) untuk menekan larutan alginat. Pada teknik atomisasi udara ini digunakan tekanan udara yang bertujuan untuk mencampur larutan alginat dan mendorong droplet-droplet kecil keluar dari *nozzle*. Pembuatan mikrosfer dengan metode *ionotropic gelation* teknik aerosolisasi mikropartikel yang diperoleh memiliki ukuran antara 5-15 μm . Kelebihan dengan menggunakan metode ini adalah mikrosfer yang dihasilkan berukuran kecil, terbentuk mikrosfer yang homogen serta biaya yang murah (Hariyadi *et al.*, 2015).



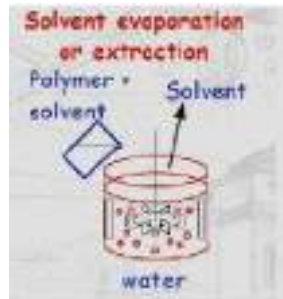
Magnetic stirrer (1000 rpm) selama 30

Gambar 2.5 Skema Metode *Ionotropic Gelation* Teknik Aerosolisasi
(Hariyadi *et al.*, 2014)

2. *Solvent Evaporation / Extraction*

Metode ini menggunakan pelarut organik bersifat toksik yang menjadi masalah terkait dengan metode penguapan. Selain itu metode

Solvent Evaporation menghasilkan efisiensi penjemakan yang rendah (Yeo *et al.*, 2001).



Gambar 2.6 Skema Metode *Solvent Evaporation / Extraction*
(Sri *et al.*, 2012)

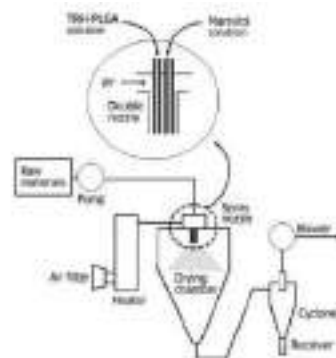
3. *Phase Separation (Coacervation)*

Pada metode *Phase Separation* proses mikroenkapsulasi dengan pemisahan fasa pada dasarnya ada tiga langkah, yaitu (1) tahap pemisahan lapisan polimer untuk membentuk tetesan *coacervate*; (2) adsorpsi tetesan *coacervate* pada permukaan obat; (3) pemadatan mikrosfer. Kekurangan metode ini di antaranya yaitu mikrosfer cenderung beragregasi dan menyulitkan proses *scale up*, terjadinya aglomerasi ketika droplet koaservat saling berhimpitan satu sama lain sebelum pelarut diuapkan seluruhnya dan sulit untuk menghilangkan pelarut dari sistem. Pelarut yang digunakan pada metode ini yaitu pelarut organik yang bersifat toksik (Yeo *et al.*, 2001).

4. *Spray drying*

Spray drying adalah proses yang melibatkan penyebaran bahan inti dalam substansi lapisan cair (Kumar *et al.*, 2013). Keuntungan metode *spray drying* yaitu waktu efektif, dapat digunakan untuk polimer hidrofobik maupun hidrofilik, efisiensi enkapsulasi yang tinggi. Tetapi

metode ini tidak dapat digunakan untuk bahan obat yang dapat terdegradasi atau terdenaturasi oleh panas dan adanya perubahan polimorfisme bahan aktif (Yeo *et al.*, 2001) . Proses *spray drying* dapat dilihat pada gambar 2.5.



Gambar 2.7 Skema Metode *Spray drying* (Yeo *et al.*, 2001)

5. *Supercritical Fluid Precipitation*

Supercritical Fluid Precipitation mempunyai dua macam tipe (Yeo *et al.*, 2001) :

a. RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solution*)

Obat dan polimer dilarutkan ke dalam cairan *supercritical* bertekanan tinggi yang mengandung padatan dan gas. Gas yang digunakan umumnya *supercritical* CO₂ dan N₂O (Kumar *et al.*, 2013).

b. SAS (*Supercritical Antisolvent Crystallization*)

Cairan *Supercritical* merupakan anti-solven yang mengakibatkan mengendapnya fasa padat. Bahan obat dilarutkan ke dalam fasa organik yang sesuai. Kemudian anti-solven ditambahkan pada larutan sampai *solute* mengendap pada tekanan yang tinggi (Yeo *et al.*, 2001).

6. *Interfacial Polymerization*

Metode ini yaitu dua monomer reaktif masing-masing dilarutkan dalam pelarut campuran dan dicampurkan untuk pembentukan emulsi o/w, selanjutnya monomer akan berdifusi di lapisan antarmuka dan semuanya bereaksi membentuk membran polimerik.

Fase *non-aqueous* yang mengandung surfaktan dan *buffer aqueous* yang mengandung bahan obat. Kedua fase tersebut dicampur dan diaduk hingga terbentuk emulsi w/o. Fase *non-aqueous* lain yang mengandung asam klorida pada emulsi untuk polimerisasi *interfacial*. Mikrosfer kemudian bersedimentasi dan dikumpulkan, selanjutnya dicuci beberapa kali supaya pelarut organik hilang. Berikut gambaran skematis proses mikroenkapsulasi dengan metode *Interfacial Polymerization*. Salah satu kekurangan dari metode ini yaitu proses pencucian bisa menyebabkan hilangnya sebagian bahan obat yang larut dengan air.

2.7.4 Tinjauan tentang Karakteristik Mikrosfer

a. Distribusi ukuran partikel

Distribusi ukuran partikel dan diameter rata-rata partikel dapat dihitung menggunakan mikroskop optik (Jin *et al.*, 2009).

b. Bentuk dan Permukaan Mikrosfer

Bentuk dan permukaan mikrosfer yang dihasilkan dapat dilihat dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) (Zafar *et al.*, 2014).

c. Metode Spektroskopi Inframerah

Digunakan untuk mengetahui karakteristik mikrosfer dan bahan penyusun pada mikrosfer melalui beberapa perubahan bilangan gelombang pada gugus-gugus yang spesifik (Prasanth *et al.*, 2011).

d. *Encapsulation Efficiency, Loading Efficiency, and Yield Value*

Efisiensi penjebakan bahan obat dapat diketahui dengan menggunakan metode UV-Vis spektroskopi. Efisiensi penjebakan dihitung dari jumlah bahan obat yang terkandung dalam mikrosfer dibandingkan dengan jumlah bahan obat yang ditambahkan pada proses pembuatan (Prasanth *et al.*, 2011).

e. *Encapsulation Efficiency (EE), Loading Efficiency, and Yield Value*

dapat dihitung dengan persamaan berikut (Jin *et al.*, 2009):

$$EE (\%) = \frac{\text{jumlah bahan obat yang terkandung dalam mikrosfer (mg)}}{\text{jumlah bahan obat yang ditambahkan pada saat pembuatan (mg)}} \times 100$$

$$\text{Loading Efficiency (\%)} = \frac{\text{jumlah bahan obat yang terkandung pada mikrosfer (mg)}}{\text{jumlah mikrosfer total (mg)}} \times 100$$

$$\text{Yield Value (\%)} = \frac{\text{jumlah mikrosfer total (mg)}}{\text{jumlah polimer dan bahan obat (mg)}} \times 100$$

2.7.5 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Karakteristik Mikrosfer

Faktor-faktor yang memengaruhi karakteristik mikrosfer dengan gelasi ionotropik (Patil *et al.*, 2012), adalah:

1. Konsentrasi polimer dan larutan sambung silang

Konsentrasi polimer dan konsentrasi sambung silang berpengaruh besar pada efisien penjerapan dengan metode gelasi ionotropik. Persen efisiensi penjerapan bervariasi mulai dari jenis penyambung silang dan konsentrasi penyambung silang.

2. Suhu

Suhu berpengaruh pada karakteristik mikrosfer seperti ukuran dan ikatan dari mikrosfer yang terbentuk.

3. pH larutan sambung silang

pH larutan sambung silang merupakan faktor yang cukup berpengaruh selama formulasi karena berefek pada kecepatan laju reaksi, bentuk dan ukuran mikrosfer.

4. Konsentrasi bahan obat

Obat untuk terjebak dalam mikrosfer harus dalam rasio yang tepat dengan polimer, karena konsentrasi obat sangat memengaruhi efisien penjebakan. Jika rasio obat polimer melebihi rentang maka efeknya bentuk, densitas dan ukuran mikrosfer akan meningkat.

5. Konsentrasi pembentukan gas

Gas pembentuk zat seperti kalsium karbonat, natrium bikarbonat ditambahkan ke formulasi untuk membentuk mikrosfer yang porus yang berakibat pada peningkatan ukuran dan bentuk mikrosfer.

2.8 Tinjauan Tentang Polimer

2.8.1 Polimer Secara Umum

Polimer yang umum digunakan pada saat gelas ionotopik, terbagi dalam dua macam yaitu polimer alam dan polimer sintetik.

Polimer alam

a. Alginat

Alginat adalah polisakarida alami yang diperoleh dari alga coklat, tidak toksik, dan biodegradabel. Natrium alginat adalah garam natrium dari asam alginat polisakarida alami dan polimer linier yang terdiri dari 1,4- β -D terkait-manuronat asam (M) dan asam α -D-gluronic (G) residu dalam berbagai proporsi dan pengaturan. Natrium alginat larut dalam air

dan membentuk struktur *reticulated* yang dapat sambung silang dengan kation *divalen* atau *polivalen* untuk membentuk *meshwork* tidak larut (Patil *et al.*, 2012).

b. Kitosan

Kitosan adalah polimer alam *poly-(aminosaccharide)*, yang mempunyai ciri-ciri struktur yang serupa dengan *glycosaminoglycans*. Kitosan tidak toksik dan *biodegradable*. Kitosan juga biopolimer yang digunakan untuk berbagai produk kompleks *polyelectrolyte* dengan *polyanions* (Patil *et al.*, 2012).

c. *Carboxymethyl cellulose* (CMC)

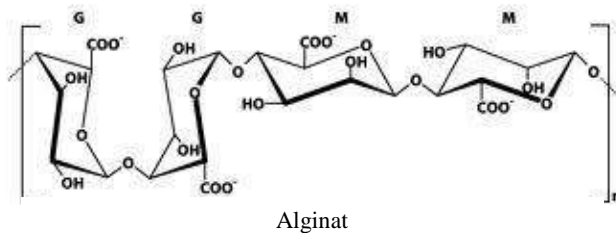
Selulosa merupakan produk alami yang mengalami proses karboksimetilasi sehingga membentuk *carboxymethyl cellulose* (CMC). CMC juga dapat membentuk gel ionotropik yang berikatan dengan ion logam multivalen. Pelepasan obat yang terkontrol dapat diperbaiki melalui *coating* CMC yang dikombinasi dengan kitosan/gelatin dan menggunakan ikatan sambung silang (Patil *et al.*, 2012).

d. Pektin

Pektin adalah polisakarida non toksik dan murah yang diekstrak dari *citrus peels* atau *apple pomaces*. Pektin juga telah digunakan sebagai bahan tambahan makanan, *a thickening agent*, dan *gelling agent*. Pada dasarnya, pektin adalah satu polimer dari α -D-galacturonic acid dengan 1-4 linkages.

2.8.2 Tinjauan Tentang Alginat

Alginat adalah polimer tidak toksik, biodegradabel, polisakarida alami yang diperoleh dari ganggang laut coklat dan beberapa spesies bakteri (Patil *et al.*, 2010). Alginat adalah polimer polisakarida alami terdiri dari unit guluronat dan asam manuronat. Alginat tersusun dari asam beta-D-manuronat (M) dan asam alfa-L-guluronat yang diikat oleh ikatan bata-1-4 dan alfa-1-4 (Patil *et al.*, 2012). Struktur asam manuronat dan asam guluronat dapat dilihat pada gambar berikut (Chapman, 1980; Gaserod, Smidsrod, & Skjak-Braek, 1998).



(Guluronat (G); Manuronat (M))

Gambar 2.8 Struktur Alginat (Rowe *et al.*, 2009)

Natrium alginat merupakan garam natrium dari polisakarida asam alginate alami dan polimer linier yang terdiri dari ikatan 1,4 beta-D-Asam Manuronat (M) dan sisa ikatan alfa-D-Asam Guluronat (G). Komposisi homopolimer dari M-blocks dan G-blocks diselingi dengan M G heteropolimer yang biasa disebut dengan *egg box junction* (Patil *et al.*, 2012). Natrium alginat merupakan serbuk tidak berbau dan tidak berasa, memiliki warna putih hingga coklat kekuningan (Rowe *et al.*, 2009)

2.9 Tinjauan Tentang Kalsium Klorida

Kalsium klorida berbentuk serbuk kristal putih/tak berwarna, granul, atau massa kristal, dan bersifat higroskopis. Kalsium klorida inkompatibel dengan larutan karbonat, sulfat, dan tartrat (Rowe *et al.*, 2009). Kation Ca^{2+} adalah ion yang paling sering digunakan karena non toksik dan banyak digunakan dalam penghantaran obat (Patil *et al.*, 2010). Kation Ca^{2+} sering digunakan untuk *cross-linking* dengan Na alginat (Jin *et al.*, 2009), karena ion Ca^{2+} dengan mudah terikat pada residu asam guluronat yang merupakan komponen Na alginat (Hariyadi *et al.*, 2013). Ion Ca^{2+} dari CaCl_2 banyak digunakan dalam penghantaran obat dengan menggunakan mikrosfer karena sifatnya yang tidak toksik (Patil *et al.*, 2012).

2.10 Tinjauan Tentang *Freeze Drying*

Prinsip metode *freeze drying* adalah pengeringan suspensi sel dari fase cair dengan cara sublimasi melalui proses pembekuan terlebih dahulu. Proses *freeze drying* dibagi ke dalam tiga tahap. Tahap pertama, yaitu proses pembekuan. Tahap kedua, yaitu proses pengeringan primer melalui proses sublimasi pada suhu rendah, sehingga menyebabkan sebagian besar air tertarik dari suspensi beku sel. Tahap ketiga, yaitu proses pengeringan sekunder pada suhu yang lebih tinggi dengan tujuan mengeringkan sisa air (Matejtschuk, 2007).

Tahap *freezing* adalah tahapan pertama dalam *freeze-drying*. Dalam tahap ini, suspensi larutan didinginkan, dan kristal es dari air murni terbentuk. Ketika proses *freezing* terus berlanjut, maka semakin banyak air dalam cairan yang membeku. Hal ini menyebabkan peningkatan konsentrasi dari cairan yang tertinggal. Ketika suspensi cairan menjadi lebih terkonsentrasi. Cairan yang mengeras dengan konsentrasi dan viskositas

yang tinggi ini berfasa amorf, kristal atau gabungan amorf-kristal. Sebagian kecil air yang tertinggal dalam cairan dan tidak membeku disebut *bound water* (Bjerketorp, *et al.*, 2006).

Tahap *primary drying* melibatkan sublimasi es dari produk yang membeku. Dalam tahap ini, 1) panas berpindah dari *shelf* ke larutan yang membeku melalui *tray* dan vial, dan terjadilah sublimasi, 2) es yang tersublimasi dan uap air yang terbentuk keluar melewati bagian yang kering dari produk menuju permukaan sampel, 3) uap air berpindah dari permukaan produk ke kondensor melalui *chamber*, dan 4) uap air terkondensasi di dalam kondensor. Di akhir tahap sublimasi terbentuklah bagian yang berpori-pori (Bozkurt, 2005).

Tahap *secondary drying* melibatkan penghilangan air yang diserap dari produk yang tidak dapat dipisahkan sebagai es pada tahap freezing, dan juga tidak dapat tersublimasi. Ukuran sistem yang khas dari freeze dryer terdiri dari drying chamber mengandung *shelves* yang dapat diatur temperaturnya, yang dihubungkan dengan *condenser chamber* melalui katup besar. *Condenser chamber* merupakan tempat dari rangkaian *plates* atau coil yang temperaturnya dapat dipertahankan pada titik yang sangat rendah (di bawah -50°C). Satu atau lebih pompa vakum dalam rangkaian yang dihubungkan ke condenser chamber untuk dapat mencapai tekanan antara 4-40 Pa di dalam keseluruhan sistem selama pengoperasian (Brockbank, *et al.*, 2007).

2.11 Tinjauan Tentang Lyoprotectant

2.11.1 Pengertian lyoprotectant

Lyoprotectant merupakan penstabil dan pencegah degradasi suatu molekul selama proses liofilisasi dan setelahnya pada saat selama penyimpanan (Macfarlane *et al.*, 2002).

2.11.2 Jenis Lyoprotectant Gula/ poliol

Berbagai gula atau poliol yang digunakan untuk stabilizer dalam larutan selama proses liofilisasi. Tingkat stabilisasi oleh gula atau poliol tergantung pada tingkat konsentrasinya (Macfarlane *et al.*, 2002). Gula atau poliol ini juga berguna untuk penyimpanan di suhu yang rendah (Macfarlane *et al.*, 2002).

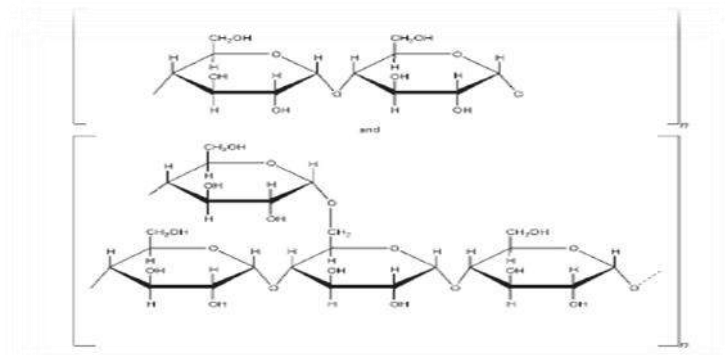
2.11.3 Tinjauan Tentang Maltodekstrin

Maltodekstrin $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot H_2O$ merupakan sakarida campuran dari polimer yang mengandung unit D-glukosa dengan DE (*Dextrose Equivalent*) kurang dari 20. Maltodekstrin diperoleh dari hasil hidrolisis sebagian dari amilum (*food grade*) dengan menggunakan asam atau enzim yang sesuai. Maltodekstrin berupa serbuk atau granul berwarna putih, tidak manis, dan tidak berbau. Kelarutan, higroskopisitas, kemanisan, dan kompresibilitas maltodekstrin meningkat dengan peningkatan DE (Rowe *et al.*, 2009).

Maltodekstrin merupakan oligosakarida. Peningkatan oligosakarida mengakibatkan aktivitas sebagai protektan juga meningkat. Hal ini dikarenakan oleh meningkatnya jumlah ikatan hidrogen yang disebabkan konsentrasi oligosakarida meningkat (Devineni *et al.*, 2007). Penggunaan maltodekstrin umumnya 5 % sampai 10% untuk *lyoprotectant*.

Konsentrasi maltodekstrin 5% dalam formulasi mikrosfer menghasilkan karakteristik terbaik dibanding konsentrasi maltodekstrin 10%. Pada konsentrasi 5% maltodekstrin memberikan hasil presentase efisiensi penjebakan dan presentase *drug loading* yang lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi 5% laktosa. Peningkatan konsentrasi pada maltodekstrin mengakibatkan penurunan efisiensi penjebakan, *drug loading*, dan *yield* (Nirmala, 2014).

Golongan oligosakarida dibandingkan dengan golongan disakarida memiliki berat molekul yang besar dan mempunyai ikatan hidrogen yang banyak, mengakibatkan air pada mikrosfer dapat tergantikan secara keseluruhan dengan pembentukan ikatan hidrogen antara *lyoprotectan* golongan oligosakarida dan gugus polar pada permukaan mikrosfer selama proses liofilisasi, sehingga mikrosfer tetap stabil (Nirmala, 2014).

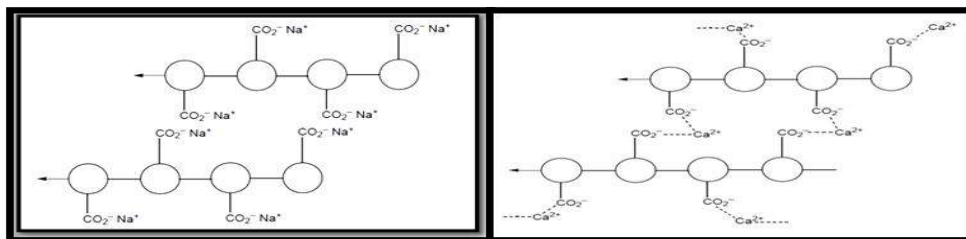


Gambar 2.9 Struktur Maltodekstrin (Rowe *et al.*, 2009)

2.12 Reaksi Sambung Silang Na Alginat dengan CaCl_2

Natrium alginat mampu membentuk mikrosfer dengan cara berikatan sambung silang dengan kation divalen atau multivalen seperti Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , dan Sr^{2+} . Ba^{2+} dan Sr^{2+} memiliki

potensial stabilitas mikrosfer yang tinggi, sedangkan Mg^{2+} kurang potensial untuk memperoleh stabilitas mikrosfer yang tinggi (Lee *et al.*, 2012). Ion Ca^{2+} paling banyak digunakan dalam penghantaran obat bentuk mikrosfer dan $CaCl_2$ mudah disambung silang dengan natrium alginat karena ion Ca^{2+} akan terikat pada residu asam guluronat (G) pada natrium alginat sehingga membentuk model “egg-box” yang menghasilkan struktur gel (Lee *et al.*, 2012). Sehingga pada saat Na alginat masuk ke dalam larutan sambung silang $CaCl_2$, maka ion Ca^{2+} dari larutan $CaCl_2$ akan menggantikan ion Na^+ dari polimer. Setiap ion Ca^{2+} dapat berikatan dengan dua rantai polimer. Dengan demikian terjadilah ikatan sambung silang antara ion Ca^{2+} dengan gugus karboksilat dari polimer alginat (Advancing the Chemical Science). Proses sambung silang dapat dilihat pada gambar 2.10.



2.10.1

2.10.2

Gambar 2.10

2.10.1 sebelum reaksi sambung silang 2.10.2 sesudah reaksi sambung silang (Wang *et al.*, 2015)

2.13 Gel

Gel atau disebut juga jeli, merupakan sistem semipadat terdiri dari suspensi yang dibuat dari partikel anorganik kecil atau molekul organik besar terpenetrasi oleh suatu cairan. Jika massa gel terdiri dari jaringan

partikel kecil yang terpisah, gel digolongkan sebagai sistem dua fase. Gel fase tunggal terdiri dari makromolekul organik yang tersebar serba sama dalam suatu cairan sedemikian hingga tidak terlihat adanya ikatan antara molekul makro yang terdispersi dalam cairan. Gel fase tunggal dapat dibuat dari makromolekul sintetik (misalnya karbomer) atau dari gom alam (misalnya tragakan). Gel dapat digunakan untuk obat yang diberikan secara topikal atau dimasukkan ke dalam lubang tubuh (Farmakope Indonesia Edisi IV, 1995).

2.14 Formulasi Gel

1. Carbomer

Secara kimia, carbomer ini merupakan polimer sintetik dari asam akrilat dengan bobot molekul tinggi (Rowe, Sheskey, Quinn, 2009). Range konsentrasi carbomer sebagai *gelling agent* yaitu 0,5%-2%. Carbomer berbentuk serbuk, berwarna putih dan higroskopis, memiliki *bulk density* 208 kg/m³, dengan pH yang dihasilkan jika 1% terdispersi di air adalah 2,5-3,0 dan apabila 0,5% terdispersi di air adalah 2,7-3,5 (Salomone, 1996). Jika konsentrasi carbomer 940 rendah, gel bersifat pseudoplastis, sebaliknya jika konsentrasi carbomer 940 tinggi akan menjadi plastis. Carbomer 940 tidak toksis dan tidak mempengaruhi aktivitas biologi obat tertentu (Barry, 1983). Carbomer bersifat stabil, higroskopik, penambahan temperatur berlebih dapat mengakibatkan kekentalan menurun sehingga mengurangi stabilitas.

Carbomer 940 mempunyai viskositas antara 40.000-60.000 (cP) digunakan sebagai bahan pengental yang baik, viskositasnya tinggi, menghasilkan gel yang bening (Rowe, Sheskey, Owen, 2006). Mekanisme pembentukan gel terjadi saat struktur polimer dari carbomer terikat dengan pelarut, dan terjadi ikatan silang pada polimer-polimer sehingga molekul pelarut akan terjebak didalamnya, kemudian terjadi immobilisasi molekul pelarut dan terbentuk struktur yang kaku dan tahan terhadap gaya maupun tekanan tertentu (Martin, 1993).

2. Propilen glikol

Propilen glikol adalah cairan kental jernih, tidak berwarna, tidak berbau, dengan rasa manis sedikit pedas mirip gliserin. Propilen glikol larut dalam air, etanol 95%, aseton, dan kloroform, tidak larut dalam *mineral oil*. Propilen glikol memiliki stabilitas yang baik pada pH 3-6. Sebagai humektan dari sediaan topikal, propilen glikol digunakan sebanyak $\pm 15\%$ dari total berat sediaan. (Allen, 2002).

Propilen glikol merupakan humektan dengan viskositas tinggi sehingga dapat mempertahankan stabilitas gel. Selain sebagai humektan, propilen glikol dapat digunakan sebagai *solvent* atau *cosolvent*, dan pengawet. Dibandingkan dengan gliserol, dibutuhkan propilen glikol dengan jumlah yang lebih sedikit untuk menjalankan fungsi yang sama.

3. Triethanolamine (TEA)

TEA memiliki penampilan yang jernih, berupa cairan kental yang berwarna kuning serta sedikit memiliki bau amonia. TEA memiliki pH 10,5 dalam 0,1 N larutan, sangat higroskopis, berwarna coklat apabila terpapar udara dan cahaya. *Triethanolamine* (TEA) digunakan sebagai

agen pembasa dan dapat juga digunakan sebagai *emulsifying agent* (Rowe, *et al.*, 2009).

2.15 Stabilitas Obat

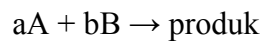
2.15.1 Pengertian Stabilitas Obat

Stabilitas adalah kapasitas suatu sediaan farmasi untuk mempertahankan spesifikasi yang telah ditentukan untuk menjamin identitas, kekuatan, kualitas, dan kemurniannya (Carstensen, 1990). Tujuan uji stabilitas adalah meneliti karakteristik tentang bagaimana mutu bahan atau produk berubah dengan berjalannya waktu di bawah pengaruh lingkungan seperti suhu, kelembaban, cahaya, dan oksigen; memberikan informasi mengenai kondisi pemrosesan, pengangkutan, dan penyimpanan yang harus dilakukan untuk bahan atau sediaan tersebut; dan menentukan masa uji ulang bahan obat atau produk obat (Martin, 2006).

Data stabilitas bahan baku memberikan informasi tentang bentuk sediaan yang dapat dibuat, formula sediaan yang dibuat, cara/proses produksi yang harus dilakukan, cara penyimpanan bahan, bahan kemasan yang harus digunakan untuk produk jadi, dan waktu kadaluwarsa bahan baku itu sendiri. Sedangkan data stabilitas sediaan jadi memberikan informasi tentang kondisi penyimpanan sediaan jadi, *interval test* kadar zat aktif dalam sediaan tersebut, dan waktu kadaluwarsa sediaan tersebut (Carstensen, 1990).

2.15.2 Orde reaksi-reaksi Kimia

Orde reaksi adalah jumlah atom atau molekul yang konsentrasinya menentukan kecepatan reaksi. Misalnya untuk reaksi:



maka orde reaksi untuk A adalah a, untuk B adalah b, dan orde reaksi keseluruhan adalah (a + b) (Martin dkk., 1993).

a. Reaksi orde nol

Reaksi orde nol terjadi jika kecepatan reaksi tidak tergantung pada konsentrasi pereaksi sehingga perubahan konsentrasi konstan setiap waktu, karena $C^0 = 1$ dan C adalah konsentrasi, maka persamaan kecepatan reaksi untuk reaksi orde nol adalah:

$$\begin{aligned} -\frac{d[C]}{dt} &= k_0 \cdot C^0 \\ -dC &= k_0 \cdot dt \end{aligned}$$

Jika persamaan di atas diintegrasikan, maka diperoleh persamaan:

$$C = C_o - k_o t$$

Jika data perubahan konsentrasi dari reaksi orde nol diplot terhadap waktu maka akan diperoleh garis lurus dengan kemiringan $-k_o$. Satuan untuk konstanta kecepatan reaksi orde nol, k_o , adalah konsentrasi per satuan waktu, contoh: mol liter⁻¹ detik⁻¹, dimana waktu (detik) dan konsentrasi (mol liter⁻¹). Dari persamaan di atas dapat dihitung waktu paruh k_o ($t_{1/2}$) suatu obat yaitu waktu yang dibutuhkan suatu zat untuk terurai menjadi setengah konsentrasi semula (Martin *et al.*, 2006).

b. Reaksi Orde Satu

Reaksi orde satu terjadi jika kecepatan reaksi tergantung pada konsentrasi salah satu pereaksi. Persamaan kecepatan reaksi untuk reaksi orde satu adalah:

$$-\frac{d[C]}{dt} = k_1 \cdot C$$

Jika persamaan di atas diintegrasikan, maka diperoleh persamaan:

$$\ln C = \ln C_o - k_1 t$$

Persamaan di atas menunjukkan bahwa dalam reaksi orde satu konsentrasi akan turun secara eksponensial. Jika logaritma konsentrasi dari reaksi orde satu diplot terhadap waktu maka akan diperoleh garis lurus dengan kemiringan garis yang setara dengan $-k_1/2,303$. Satuan untuk konstanta kecepatan reaksi orde satu, k_1 , adalah 1/satuan waktu (Martin *et al.*, 1993). Persamaan waktu paruhnya adalah:

$$\frac{1}{2} \ln C = \ln C_o - k_1 t$$

$$t_{1/2} = \ln \frac{2}{k_o} = \frac{0,693}{k_1}$$

2.15.3 Metode Penentuan Orde Reaksi

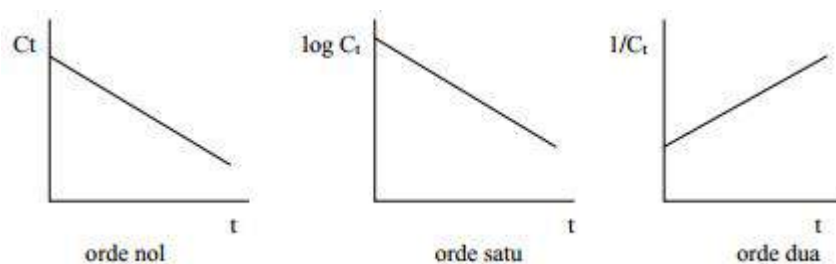
Batas kadar obat yang masih tersisa 90 % tidak dapat lagi atau disebut sebagai sub standar waktu diperlukan hingga tinggal 90 % disebut umur obat. Orde reaksi dapat ditentukan dengan beberapa metode, diantaranya;

1. Metode substitusi

Data yang terkumpul dari hasil pengamatan jalannya suatu reaksi disubstitusikan ke dalam bentuk integral dari persamaan berbagai orde reaksi. Jika persamaan itu menghasilkan harga k yang tetap konstan dalam batas-batas variasi percobaan, maka reaksi dianggap berjalan sesuai dengan orde tersebut (Martin *et al.*, 1993).

2. Metode Grafik Plot

Data dalam bentuk grafik dapat digunakan untuk mengetahui orde reaksi tersebut. Jika konsentrasi di plot terhadap t dan didapat garis lurus, reaksi adalah orde nol. Reaksi dikatakan orde pertama bila $\log(a-x)$ terhadap t menghasilkan garis lurus. Suatu reaksi orde kedua akan memberikan garis lurus bila $1/(a-x)$ diplot terhadap t (jika konsentrasi mula-mula sama). Jika plot $1/(a-x)^2$ terhadap t menghasilkan garis lurus dengan seluruh reaktan sama konsentrasi mula-mulanya, reaksi adalah orde ketiga (Martin *et al.*, 1993)



Gambar 2.11 Grafik Orde Reaksi

3. Metode waktu paruh

Dalam reaksi orde nol, waktu paruh sebanding dengan konsentrasi awal, a . Waktu paruh reaksi orde pertama tidak bergantung pada a ; waktu

paruh untuk reaksi orde kedua, dimana $a = b$ sebanding dengan $1/a$ dari dalam reaksi orde ketiga, dimana $a = b = c$, sebanding dengan $1/a^2$. Umumnya berhubungan antar hasil di atas memperlihatkan waktu paruh suatu reaksi dengan konsentrasi seluruh reaktan sama (Carstensen, 1990) .

Energi aktivasi (E_a) yaitu kemampuan suatu sediaan untuk dapat mengalami penguraian zat. Energi aktivasi (E_a) harus ditentukan dengan cara mengamati perubahan konsentrasi pada suhu tinggi, dengan membandingkan dua harga konstanta penguraian zat pada temperatur atau suhu yang berbeda sehingga dapat ditentukan energi aktivasinya (Martin *et al.*, 1993).

T_{90} adalah waktu yang tertera yang menunjukkan batas waktu diperbolehkannya obat tersebut dikonsumsi karena diharapkan masih memenuhi spesifikasi yang ditetapkan. 90% dari 100% konsentrasi obat yang masih dalam kondisi baik senyawa aktifnya sedangkan 10% nya mengalami penguraian yang dapat menurunkan efektivitas dari senyawa aktifnya atau menjadi toksik (Martin *et al.*, 2006).

Data stabilitas suatu obat merupakan hal penting dalam pembuatan sediaan farmasi. Sediaan farmasi umumnya diproduksi dalam jumlah besar dan membutuhkan waktu yang cukup lama untuk sampai ke tangan konsumen. Jika obat tidak stabil maka potensinya akan menurun atau bahkan dapat membentuk hasil urai yang toksik dan membahayakan jiwa konsumen (Carstensen, 1990).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Uraian Kerangka Konseptual

Penurunan jumlah kolagen dan peningkatan kadar matriks metalloproteinase-1 (MMP-1) akibat sinar UV pada dasarnya diperantarai dua mekanisme yang paling bertanggungjawab yaitu adalah induksi AP-1 dan penurunan regulasi TGF- β tipe II (Rabe dkk, 2006; Rhein dan Santiago, 2010). Efek radiasi UV pada dermis menghasilkan degradasi kolagen, hambatan sintesis kolagen, inflamasi dan stres oksidatif, serta penurunan kemampuan sel hingga akhirnya terjadi proses apoptosis (Cunningham dkk, 2005; Rabe dkk, 2006). Proses tersebut dapat dicegah dengan antioksidan (Wiraguna, 2013). Salah satu antioksidan di dalam tubuh yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah tersebut adalah *L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine* (glutathion).

Glutathion merupakan kofaktor penting bagi banyak enzim dan terlibat dalam beberapa jalur metabolisme dan sinyal (Meister, 1976). Konsentrasi glutathion yang menurun seiring dengan bertambahnya usia menyebabkan gejala penuaan. Kekurangan glutathion akan menambah terjadinya kerusakan karena radikal bebas (Sarkar *et al.*, 2016).

Glutathion oral memiliki bioavailabilitas yang rendah disebabkan absorpsi yang rendah di saluran pencernaan akibat aksi enzim usus *γ -glutamyl transpeptidase* (GGT) yang menurunkan glutathion (Shin, *et al.*, 2010). Salah satu upaya untuk menghindari *first pass effect* adalah menggunakan rute topikal (Strober *et al.*, 2008).

Glutation sebagai antioksidan akan bekerja pada lapisan epidermis dan dermis (Shindo et al., 1994). Produk antiaging seperti glutathione bekerja pada lapisan dermis (Tosato et al., 2007). Glutathione diharapkan dapat melewati jalur interseluler dan transeluler sehingga dapat meningkatkan efektivitas dari penggunaan glutathione topikal. Agar dapat melalui jalur interseluler dan transeluler nilai log P yang optimal untuk penetrasi zat menembus stratum korneum adalah 2-3 (Benson dan Watkinson, 2012). Glutathione mempunyai kemampuan penetrasi rendah di kulit. Hal ini disebabkan karena Glutathione mempunyai sifat yang sangat hidrofilik (Bronaugh dan Maibach, 2005). Sehingga diperlukan upaya untuk meningkatkan lipofilisitas dari glutathione agar dapat menembus stratum korneum. Salah satu metode untuk mempengaruhi lipofilisitas obat dengan menggunakan surfaktan. Formulasi obat yang dapat meningkatkan laju permeasi melewati membran dipengaruhi oleh kondisi fisik dan konsentrasi surfaktan nonionic (Walters et al., 1993). Selama ini obat yang bersifat lipofilik ditingkatkan hidrofilisitasnya dengan cara penambahan surfaktan (Martinet et al., 1993).

Selain masalah lipofilisitas, problema glutathione yang lain adalah stabilitas, terutama dalam lingkungan netral atau basa (Camera et al., 2002; Johnson et al., 2012). Dalam kondisi stres oksidatif, kelompok thiol glutathione dapat dengan mudah teroksidasi menjadi glutathione disulfida (GSSG), yang kehilangan aktivitas antioksidan berdasarkan aktivitas *radical scavenging*. Sehingga diperlukan sistem penghantaran glutathione yang tepat. Dengan menggunakan sistem mikrosfer dapat melindungi bahan yang sensitif terhadap kondisi lingkungan seperti oksigen, air,

dan temperature (Mohanraj dan Chen, 2006). Polimer dalam sistem mikrosfer dapat melindungi bahan inti terhadap kondisi oksidatif, sehingga dapat meningkatkan stabilitas (Choudhury *et al.*, 2009), untuk itu dibuat sistem penghantaran mikrosfer agar glutation dapat terjebak di dalamnya sehingga dapat meningkatkan stabilitas.

Dalam pembuatan mikrosfer glutation dibutuhkan polimer yang dapat melingkupinya. Polimer yang paling sering digunakan untuk pembuatan mikrosfer di antaranya adalah alginat. Alginat merupakan polimer alam yang memiliki sifat biokompatibel, biodegradabel, tidak toksik dan biaya yang relatif murah (Lee *et al.*, 2012). Polimer alginat dapat membentuk mikrosfer dengan penambahan ion Ca^{2+} atau kation yang bervalensi dua lainnya. Pembentukan gelasi pada alginat melalui ikatan ion yang spesifik dapat menyebabkan perubahan konformasi struktur natrium alginat (Martin, 2002).

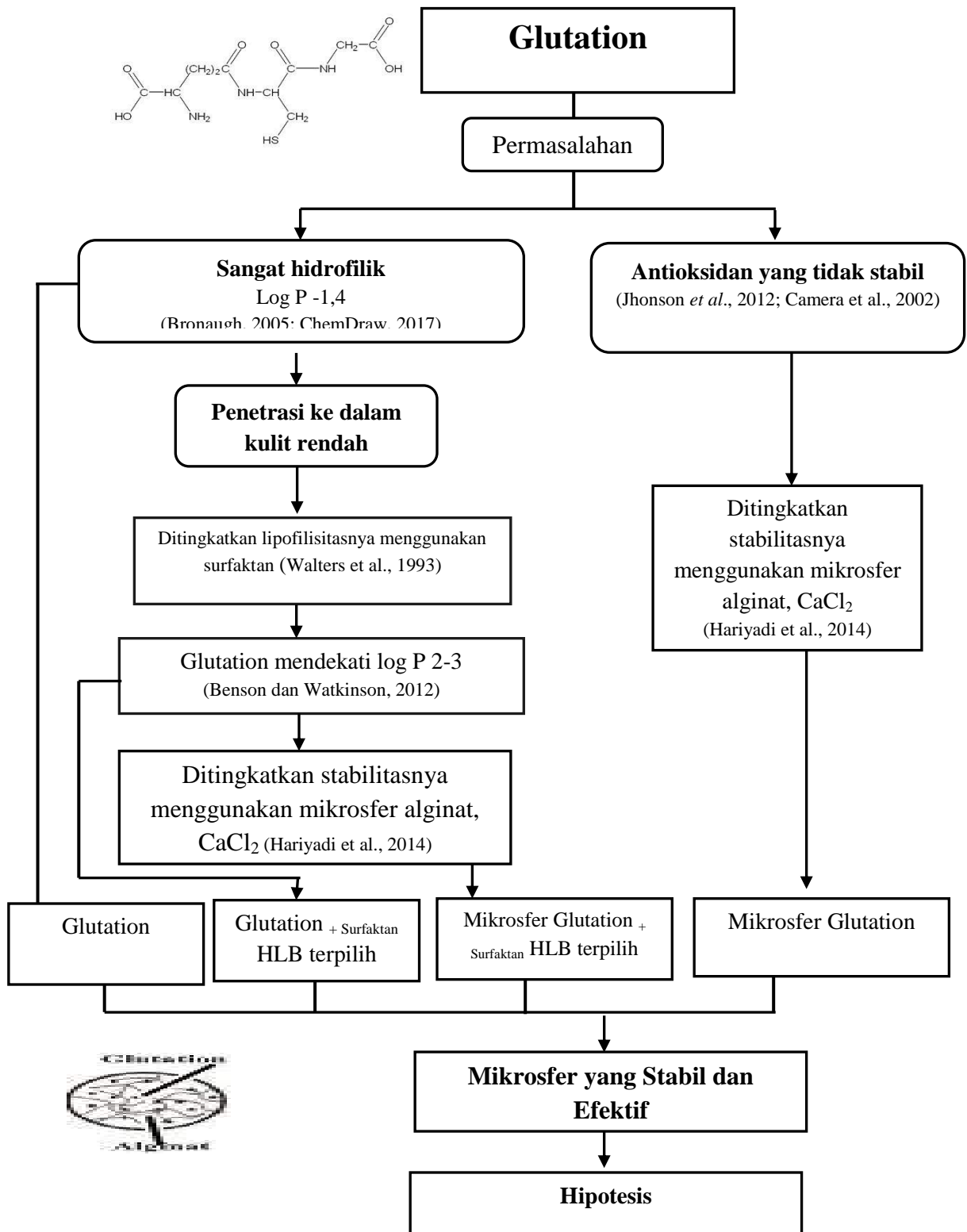
Kalsium Klorida (CaCl_2) merupakan bahan penyambung silang yang tidak toksik dan efektif dalam pembuatan mikrosfer alginat. Kalsium Klorida (CaCl_2) membentuk gel dengan interaksi antara gugus kalsium dengan ion negatif gugus karboksilat pada rantai alginat.

Metode pembuatan mikrosfer glutation pada penelitian ini adalah metode gelasi ionotropik dengan teknik aerosolisasi. Metode ini sederhana, cepat, biaya relatif murah dan efektif (Haryadi *et al.*, 2014). Metode pengeringan *freeze drying* dipilih dengan menambahkan *lyoprotectant* maltodekstrin karena dapat menjaga kestabilan mikrosfer (Haryadi *et al.*, 2014).

Aplikasi mikrosfer secara topikal dibutuhkan basis pembawa. Gel merupakan salah satu basis pembawa dalam sediaan farmasi yang digunakan dalam produk kosmetik (Wahyuni, 2005).

Glutation yang telah ditingkatkan lipofilisitasnya dengan surfaktan dan ditingkatkan stabilitasnya dalam sistem mikrosfer, selanjutnya ditentukan kemampuan penetrasinya. Kemampuan penetrasi glutathione ditentukan berdasarkan parameter penurunan ekspresi MMP-1.

3.2 Skema Kerangka Konseptual



3.3 Hipotesis

1. Semakin tinggi nilai HLB surfaktan yang ditambahkan pada glutation akan menurunkan lipofilisitas sistem glutation.
2. Penetrasi glutation terpilih (mendekati Log P 2-3) lebih tinggi ditinjau dari penurunan ekspresi MMP-1 pada kulit mencit galur balb-c daripada glutation tanpa peningkatan lipofilisitas.
3. Pembentukan mikrosfer alginat-CaCl₂ pada glutation akan meningkatkan stabilitas glutation.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dengan metode eksperimental, untuk mencapai tujuan penelitian ini, maka tahapan-tahapan yang akan dilakukan antara lain:

1. Analisis kualitatif beberapa bahan penyusun formula yaitu Glutation (bahan aktif), Na Alginat, Maltodextrin, CaCl_2 , Tween 80, dan Span 80.
2. Peningkatan lipofilisitas glutation, dengan penambahan surfaktan (Tween 80 dan Span 80) dengan berbagai nilai HLB.
3. Pengeringan menggunakan metode *freeze drying*.
4. Penentuan koefisien partisi pada glutation yang telah ditingkatkan lipofilisitasnya
5. Pembuatan mikrosfer dengan polimer Na Alginat, penyambung silang CaCl_2 , dan *lyoprotectant* Maltodextrin,
6. Evaluasi karakteristik fisik sistem mikrosfer glutation-alginat
7. Penentuan stabilitas fisik glutation pada mikrosfer glutation-alginat dan yang tidak di mikrosfer.
8. Penentuan penetrasi glutation dalam mikrosfer dilihat dari penurunan kadar MMP-1 dilakukan pada mencit *balb/c* jantan berumur 6-8 minggu dengan berat 20-25 gram.

4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1 Variabel bebas

Nilai HLB surfaktan, bentuk mikrosfer, waktu uji stabilitas

4.2.2 Variabel tergantung

Log koefisien partisi (P) glutation, Kadar MMP-1, stabilitas glutation

4.2.3 Variabel kendali

Glutation, suhu, waktu pengadukan, kecepatan pengadukan, tekanan

4.2.4. Definisi Operasional

1. Nilai HLB Surfaktan : Surfaktan yang digunakan surfaktan adalah Tween 80 dengan Span 80, dengan nilai HLB 15, 11, 7, 5,5 dan 4,3 yang dibuat dari tween 80 dan span 80.
2. Mikrosfer: Polimer yang digunakan adalah Natrium Alginat, Larutan CaCl_2 digunakan sebagai sambung silang. Tidak ada perbedaan konsentrasi polimer dan sambung silang antar formula.
3. Waktu uji stabilitas: Pada uji stabilitas glutation disimpan dalam oven yang bersuhu 80°C dan RH 75% selama 5 hari pada mikrosfer glutation yang sudah ditingkatkan lipofilisitasnya dan glutation yang tidak di mikrosfer. Kemudian dilakukan pengamatan organoleptis (warna, bau, rasa), konsentrasi glutation pada hari ke 0, 1, 3 dan 5 (Blessy *et al.*, 2013).
4. Log koefisien partisi (P) glutation: Penentuan koefisien partisi glutation ditentukan dengan menggunakan metode spektrofotometri. Fase polar yang digunakan adalah larutan dapar fosfat 0,01 M pH $6,0 \pm 0,05$. Fase non-polar yang digunakan adalah n-octanol.
5. Kadar MMP-1: Efektivitas penetrasi dilihat berdasarkan pada penurunan ekspresi MMP-1 pada mencit yang telah dipapar sinar UV 2

hari sekali, yaitu pada hari ke 1,3,5,7,9,11, dan 13 dengan dosis setiap penyinaran 60mJ/m^2 (Vayalil *et al.*, 2014).

6. Stabilitas Glutation: Konsentrasi glutatation pada hari ke-0,1,3, dan 5 ditentukan. Kemudian data yang didapatkan dibentuk grafik dapat digunakan untuk mengetahui orde reaksi tersebut. Jika konsentrasi (Ct) di plot terhadap t dan didapat garis lurus (linieritas mendekati 1), reaksi adalah orde nol. Reaksi dikatakan orde pertama bila log Ct terhadap t menghasilkan garis lurus (linieritas mendekati 1). Setelah ditentukan orde reaksinya kemudian dihitung harga k dari masing-masing bahan

4.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian apabila tidak disebutkan lain, memiliki kemurnian *pharmaceutical grade*. Bahan tersebut antara lain L-Glutation tereduksi- $\geq 98,0\%$ (Sigma Aldrich), Tween 80, Span 80, 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) Ellman's Reagent (Sigma Aldrich), etanol pa (Merck), Natrium alginat *pharmaceutical grade* (Sigma-Algirich), CaCl_2 (Solvay Chemicals International); Maltodextrin, cera alba, parafin liquidum, span 80, metilparaben, propilparaben, *aquadest* n-octanol. Bahan penyusun dapar digunakan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang semuanya dengan derajat kualitas proanalisis diproduksi oleh Merck, Kit MMP-1, antibodi MMP-1 (*Sigma Aldrich*). Subjek penelitian menggunakan mencit balb-c jantan berumur 6-8 minggu dengan berat 20-25 g. Biopsi mencit menggunakan ketamin. *Clearing agent* menggunakan xylene.

4.4 Alat Penelitian

Double-beam Spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu), Spektro FTIR (Perkin Elmer Instrument), Penekan Hidrolik IR 13 mm (Carver Hidrolik

Pump), Differential Thermal Apparatus (DTA), Neraca analitik (Chyo balance corporation Kyoto Japan-160), Alat penyemprot aerosolisasi (*spray*), statif, *freeze dryer* Eyela FD 81, Alat-alat gelas, Mikroskop optik (Axioskop 40-Zeiss), pH meter Eutch Instrument pH 700, *stirring plate* (Dragon Lab MS Pro), *centrifuge* (Rotofix-32), *waterbath shaker*, *Thermoshake*, SEM (Scanning Electronic Microscope) (Hitachi MT 3000 dan Fei Inspect S50), *Moisture Content Tester*, *Hygrometer*. Penangas air, oven (Shimadzu), alat uji daya sebar (Lab. Teknologi Farmasi, FFUNAIR), *stopwatch* (Alba Digital Stopwatch), Lampu *broadband* Ultraviolet buatan tipe KN-4003 B, mikrotom rotari (Jung Histocut Leica 820), Lux meter (LX-90).

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

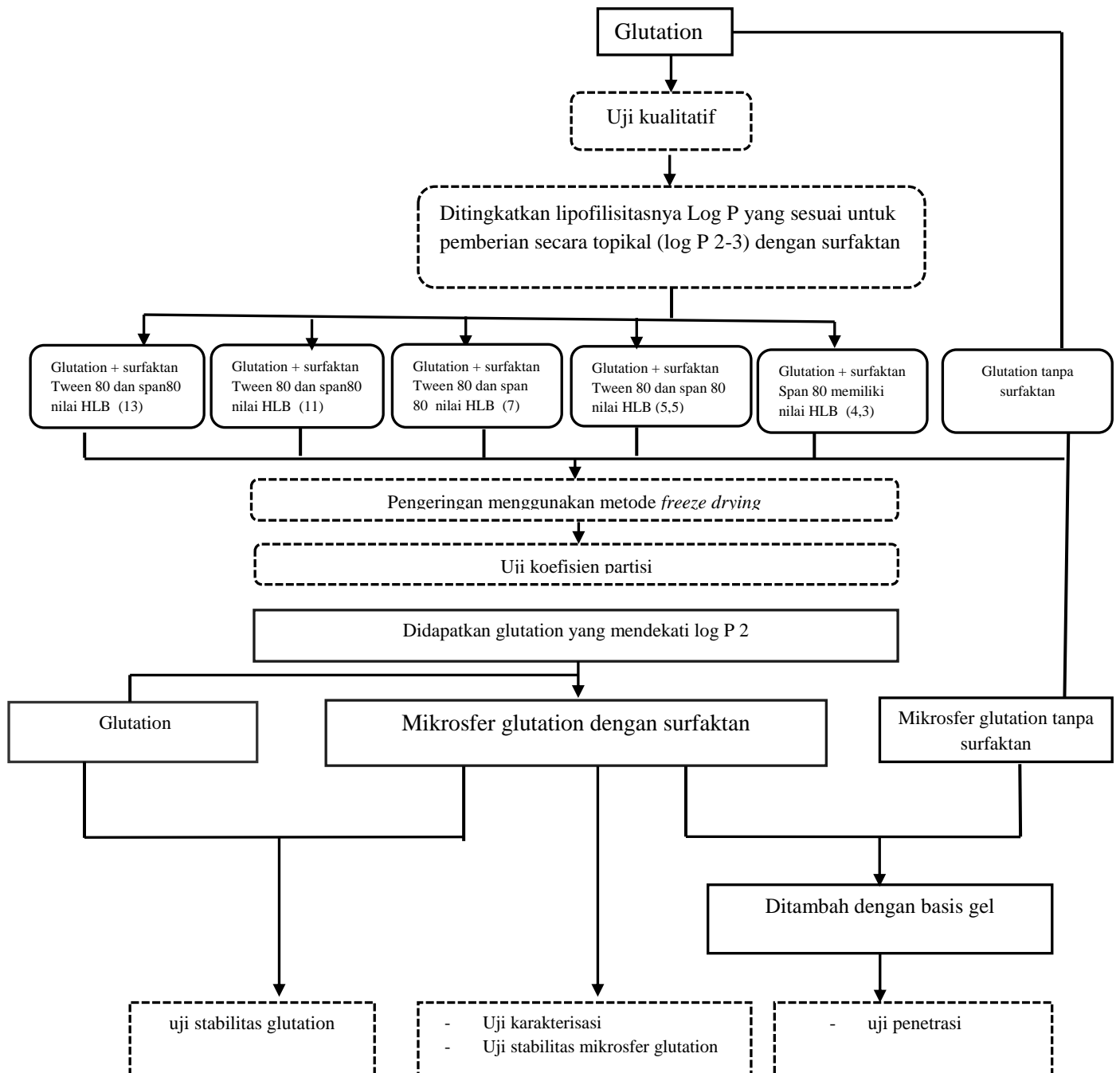
Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2017 sampai dengan bulan September 2017. Proses pelaksanaan dilakukan di Departemen Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, Departemen Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, Fakultas Teknik Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, Departemen Farmasetika Universitas Wahid Hasyim Semarang.

4.6 Prosedur Pengumpulan Data

4.6.1 Tahapan Penelitian

Penelitian ini diawali dengan analisis kualitatif bahan yang dipakai dalam penelitian yaitu glutation, natrium alginat, maltodextrin dan CaCl_2 . Selanjutnya glutation ditingkatkan lipofilisitasnya menggunakan surfaktan.

Setelah didapatkan glutation dengan harga log P sekitar 2-3, glutation kemudian dibuat mikrosfer dengan menggunakan metode *ionotropic gelation* teknik aerolisasi sesuai dengan rancangan formula. Hasil mikrosfer yang didapat kemudian dikeringkan dengan *freeze dryer*. Pada mikrosfer yang kering, dilakukan uji karakteristik morfologi mikrosfer, meliputi: ukuran mikrosfer, penentuan kandungan glutation, efisiensi penjebakan dan *yield*. Mikrosfer glutation yang didapatkan kemudian di uji stabilitasnya dibandingkan dengan glutation tanpa dimikrosfer. Hasil antara mikrosfer glutation tanpa surfaktan dengan mikrosfer ditambah surfaktan, kemudian ditambah basis gel kemudian diuji penetrasinya dengan melihat efektivitasnya berdasarkan penurunan kadar MMP-1. Tahapan penelitian dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

4.6.2 Analisa Kualitatif Bahan Baku

Pemeriksaan kualitatif bahan penelitian meliputi Glutathione, tween 80, span 80, narium alginat, CaCl_2 , maltodextrin. Pemeriksaan dilakukan

berdasarkan pada *Certificate of Analysis* (COA) bahan serta pemeriksaan berikut ini :

4.6.2.1 Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis yang dilakukan meliputi pemeriksaan bentuk, warna dan bau. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan *Certificate of Analysis*

4.6.2.2 Identifikasi Glutation

1. Identifikasi glutation dengan Spektra IR

Pemeriksaan spektra inframerah dengan menggunakan pellet KBr 1 mg zat uji digerus dengan serbuk KBr kering, kemudian dikompresi dengan penekan hidrolis yang dilengkapi alat penarik uap air agar diperoleh lempeng yang tipis serta dapat ditembus oleh cahaya. Spektra inframerah yang diperoleh dibandingkan dengan spektra inframerah dari pustaka (Depkes RI, 2014).

2. Identifikasi glutation dengan DSC (*Differential Scanning Calorimeter*)

Glutation ditimbang 3-5 mg, lalu dimasukkan ke dalam *sample pan* dan ditutup. *Sample pan* yang digunakan adalah *aluminum crucible* dengan suhu maksimum 400°C. Kemudian *sample pan* dimasukkan ke dalam *sample holder*. Pemanasan dilakukan dengan laju pemanasan 10°C per menit dibawah aliran nitrogen. Hasil pengujian yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka (Balpande *et al*, 2013).

4.6.2.3 Identifikasi Natrium Alginat

1. Identifikasi Natrium Alginat dengan Spektra IR

Pemeriksaan spektra inframerah dengan menggunakan pellet KBr 1 mg zat uji digerus dengan serbuk KBr kering, kemudian dikompresi dengan penekan hidrolis yang dilengkapi alat penarik uap air agar

diperoleh lempeng yang tipis serta dapat ditembus oleh cahaya. Spektra inframerah yang diperoleh dibandingkan dengan spektra inframerah dari pustaka (Depkes RI, 2014).

2. Identifikasi Natrium Alginat dengan DTA

Identifikasi dilakukan mengamati suhu lebur dengan menggunakan alat *Differential Thermal Apparatus* (DTA) dengan menggunakan cara natrium alginat ditimbang 3-5 mg, lalu dimasukkan ke dalam *sample pan* dan ditutup. *Sample pan* dimasukkan ke dalam *sample holder*. Sample yang dipakai *Aluminium crucible* dengan menggunakan suhu maksimum 350°C. Program pemanasan dijalankan dengan laju pemanasan 5°C/menit, waktu kesetimbangan didapat sesudah suhu awal melebur tercapai. Hasil pengujian yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka.

4.6.2.4 Identifikasi Maltodextrin

1. Identifikasi Maltodextrin dengan Spektra IR

Pemeriksaan spektra inframerah dengan menggunakan pellet KBr 1 mg zat uji digerus dengan serbuk KBr kering, kemudian dikompresi dengan penekan hidrolis yang dilengkapi alat penarik uap air agar diperoleh lempeng yang tipis serta dapat ditembus oleh cahaya. Spektra inframerah yang diperoleh dibandingkan dengan spektra inframerah dari pustaka (Depkes RI, 2014).

2. Identifikasi Maltodextrin dengan DTA

Identifikasi dilakukan mengamati suhu lebur dengan menggunakan alat *Differential Thermal Apparatus* (DTA) dengan menggunakan cara natrium alginat ditimbang 3-5 mg, lalu dimasukkan

ke dalam *sample pan* dan ditutup. *Sample pan* dimasukkan ke dalam *sample holder*. Sample yang dipakai *Aluminium crucible* dengan menggunakan suhu maksimum 350°C. Program pemanasan dijalankan dengan laju pemanasan 5°C/menit, waktu kesetimbangan didapat sesudah suhu awal melebur tercapai. Hasil pengujian yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka.

4.6.2.5 Identifikasi Kalsium Klorida (CaCl₂)

Identifikasi dilakukan mengamati suhu lebur dengan menggunakan alat *Differential Thermal Apparatus* (DTA) dengan menggunakan cara Kalsium Klorida ditimbang 3-5 mg, lalu dimasukkan ke dalam *sample pan* dan ditutup. *Sample pan* dimasukkan ke dalam *sample holder*. Sample yang dipakai *Aluminium crucible* dengan menggunakan suhu maksimum 350°C. Program pemanasan dijalankan dengan laju pemanasan 5°C/menit, waktu kesetimbangan didapat sesudah suhu awal melebur tercapai. Hasil pengujian yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka.

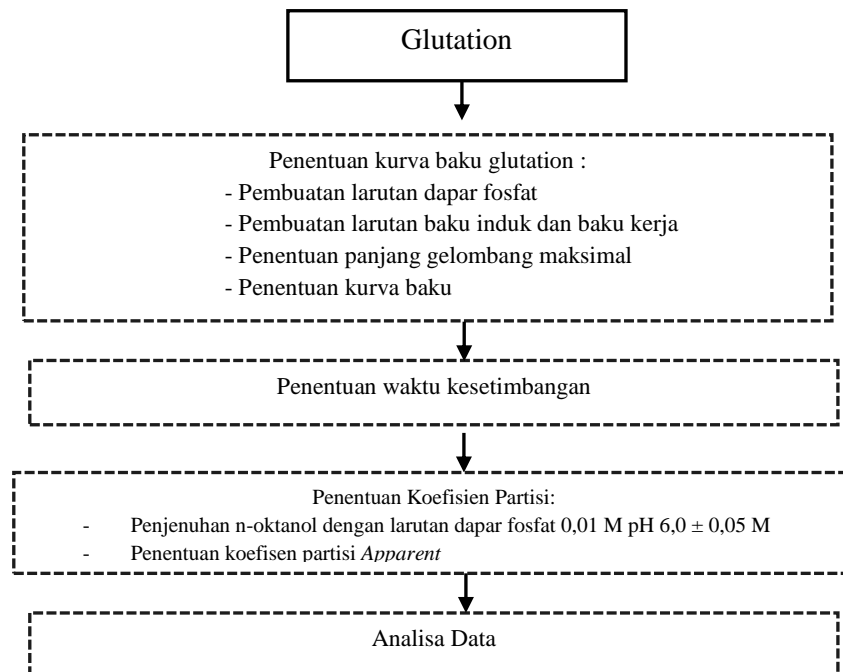
4.7 Peningkatan Lipofilisitas Glutation dengan Penambahan Surfaktan

Glutation 2 gram dilarutkan dalam 20 ml larutan dapar fosfat pH $6 \pm 0,05$ kemudian ditambah surfaktan yang memiliki nilai HLB 11 didapatkan dengan penambahan antara Tween 80 dan Span 80 sesuai pada table 4.1 sebanyak 0,5 g. Pembuatan Kemudian dilakukan *freeze drying* - 26°C selama 30 jam. Hal yang sama juga dilakukan untuk pembuatan larutan glutathione dengan HLB 7. Span 80 dengan HLB 4,3 dilarutkan ke

dalam 10 ml etanol, kemudian ditambahkan ke dalam larutan dapar fosfat tetes demi tetes ad 20ml. Setelah itu dilakukan uji koefisien partisi. Skema uji koefisien partisi dapat dilihat pada gambar 4.2.

Tabel 4.1 Harga HLB

HLB	Tween 80	Span 80
13	8,1 ml	1,9 ml
11	6,26 ml	3,74 ml
7	2,52 ml	7,47 ml
5,5	1,2 ml	8,8 ml
4,3	-	10 ml



Gambar 4.2 Skema Penentuan Koefisien Partisi

4.8 Penentuan Kurva Baku Glutation

4.8.1 Pembuatan Larutan Dapar Fosfat 0,01 M pH 6,0 ± 0,05

Pembuatan larutan dapar fosfat 0,01M pH 6,0 ± 0,05 dibuat dengan cara sebagai berikut: Sebanyak 1,530 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dimasukkan

ke dalam labu ukur 1 liter. Kemudian ditambahkan air bebas CO₂ sampai tanda. Pada labu ukur yang lain, dibuat larutan Na₂HPO₄.12H₂O dengan cara sebanyak 0,9020 gram Na₂HPO₄.12H₂O dilarutkan dalam air bebas CO₂ dan dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL. Setelah itu ditambahkan air bebas CO₂ sampai garis tanda. Larutan NaH₂PO₄.2H₂O diambil sebanyak 831,9470 mL, sedangkan larutan Na₂HPO₄.12H₂O diambil sebanyak 168,0530 mL, sehingga diperoleh larutan campuran sebanyak 1 liter yang kemudian diukur pHnya menggunakan pH meter. Bila pH yang diperoleh lebih kecil dari 6,0 maka ditambah larutan 0,01 M NaH₂PO₄.2H₂O sampai mencapai pH 6,0 ± 0,05 (Ningsih, 2006).

4.8.2 Pembuatan Larutan Baku Induk Glutation

Pembuatan larutan baku induk glutathion 300 ppm dengan cara melarutkan 15 mg glutathion kedalam larutan bufer fosfat pH 6,0±0,05 sebanyak 50 ml. Larutan 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 1mM disiapkan dengan melarutkan 19,8 mg DTNB ke dalam 50 ml buffer fosfat pH 6,0±0,05 (Ullah, Khan., & Hashmat, 2012).

4.8.3 Pembuatan Larutan Baku Kerja

Larutan Glutathion induk 300 ppm dibuat dan dilakukan seri pengenceran. Berturut-turut pengencerannya hingga didapatkan konsentrasi 60 ppm, 120 ppm, 180 ppm, 240ppm. 0,2 ml dari larutan glutathion masing-masing konsentrasi dicampur dengan 2,3 ml bufer fosfat pH 6,0 ± 0,05 kemudian ditambah dengan 0,5 ml dari larutan DTNB 1mM. Kelima

campuran dikocok dan diinkubasi selama 5 menit (Ullah, Khan., & Hashmat, 2012).

4.8.4 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks}) Glutation

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mengamati nilai serapan 4 kadar larutan baku glutathione pada panjang gelombang 200-500 nm.

4.8.5 Penentuan Kurva Baku

Kurva baku antara kadar dan serapan larutan baku kerja glutathione dibuat dengan cara mengukur serapan glutathione pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Untuk mendapatkan persamaan regresi, maka dibuat kurva hubungan antara absorbansi dan kadar dengan absorbansi sebagai sumbu Y dan kadar sebagai sumbu X. Dari kurva baku yang diperoleh, dibuat persamaan regresi linier dan dihitung harga koefisien relasi (r) dari persamaan tersebut. Suatu garis dinyatakan linier bila harga r yang diperoleh lebih besar daripada r tabel.

4.9 Penentuan Koefisien Partisi

4.9.1 Penentuan n-oktanol dan larutan dapar fosfat 0,01 M pH 6,0 \pm 0,05

Larutan dapar fosfat 0,01 M pH 6,0 \pm 0,05 sebanyak 600 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1 L dan kemudian ditambahkan n-oktanol sebanyak 200 mL. Campuran larutan tersebut disonifikasi selama 15 menit dan didiamkan selama semalam hingga larutan jernih dan tampak batas yang jelas antara n-oktanol dan larutan dapar fosfat 0,01 M pH 6,0 \pm

0,05. Setelah itu, n-oktanol dan larutan dapar fosfat 0,01 M pH $6,0 \pm 0,05$ dipisahkan dengan menggunakan corong pisah (Ningsih, 2006).

4.9.2 Penentuan Koefisien Partisi Apparent Glutation+surfaktan

Penentuan koefisien partisi apparent dilakukan dalam larutan dapar fosfat pH $6,0 \pm 0,05$ jenuh oktanol dan larutan oktanol jenuh dapar fosfat pH $6,00 \pm 0,05$. Kadar awal glutathion dalam fase air yang digunakan adalah $200 \mu\text{g/mL}$ ($20 \text{ mg ad } 100 \text{ mL}$) (Wening, 2012).

Volume fase air yang digunakan untuk penentuan koefisien partisi adalah $10,0 \text{ mL}$. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam vial dan ditambah $0,50 \text{ ml}$ pelarut organik (n-oktanol) yang sudah dijenuhkan dengan larutan dapar fosfat pH $6,0 \pm 0,05$.

Campuran antara fase air yang mengandung glutathion dan n-oktanol yang telah jenuh dikocok dengan *thermoshake* hingga tercapai waktu kesetimbangan pada suhu $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ dengan frekuensi pengocokan 150 rpm . Kemudian fase air dipisahkan dari fase organiknya dengan cara disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan putaran 2200 rpm . Setelah itu, serapannya diperiksa dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum untuk mengetahui kadar glutathion pada fase air. Penentuan koefisien *apparent* ini dilakukan dengan replikasi sebanyak tiga kali.

Penentuan koefisien partisi glutathion dilakukan ketika kesetimbangan telah tercapai pada fase minyak dan fase air dengan acuan waktu keseimbangan yang diperoleh dari kelarutan pada suhu $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ dengan melakukan replikasi tiga kali. Harga koefisien partisi *apparent* dapat dihitung setelah diperoleh konsentrasi glutathion dalam fase air

sesudah terjadi keseimbangan dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$APC = \frac{(C_2^0 - C_2') \cdot a}{C_2' \cdot b}$$

Keterangan:

APC: koefisien partisi apparent

C_2' : konsentrasi obat dalam fase air sesudah terjadi kesetimbangan

C_2^0 : konsentrasi obat dalam fase air sebelum terjadi kesetimbangan

a : volume fase air

b : volume fase minyak

4.10 Rancangan Formula Mikrosfer Glutation–Alginat

Mikrosfer dibuat dengan metode *ionotropic gelation* teknik aerosolisasi dengan konsentrasi bahan obat, alginat, konsentrasi CaCl_2 yang sama dan waktu sambung silang yang sama.

Tabel 4.2 Formulasi Mikrosfer Glutation dan Alginat dengan konsentrasi CaCl_2 dengan waktu kontak sambung silang yang sama

Bahan	Fungsi	Kadar dalam Formula	
		I	II
Glutation +surfaktan	Bahan aktif	Setara dengan 0,5 g	-
Glutation -surfaktan	Bahan aktif	-	0,5 g
Na Alginat	Polimer	2 %	2 %
Larutan CaCl_2	Penyambung Silang	1 M	1 M

Keterangan:

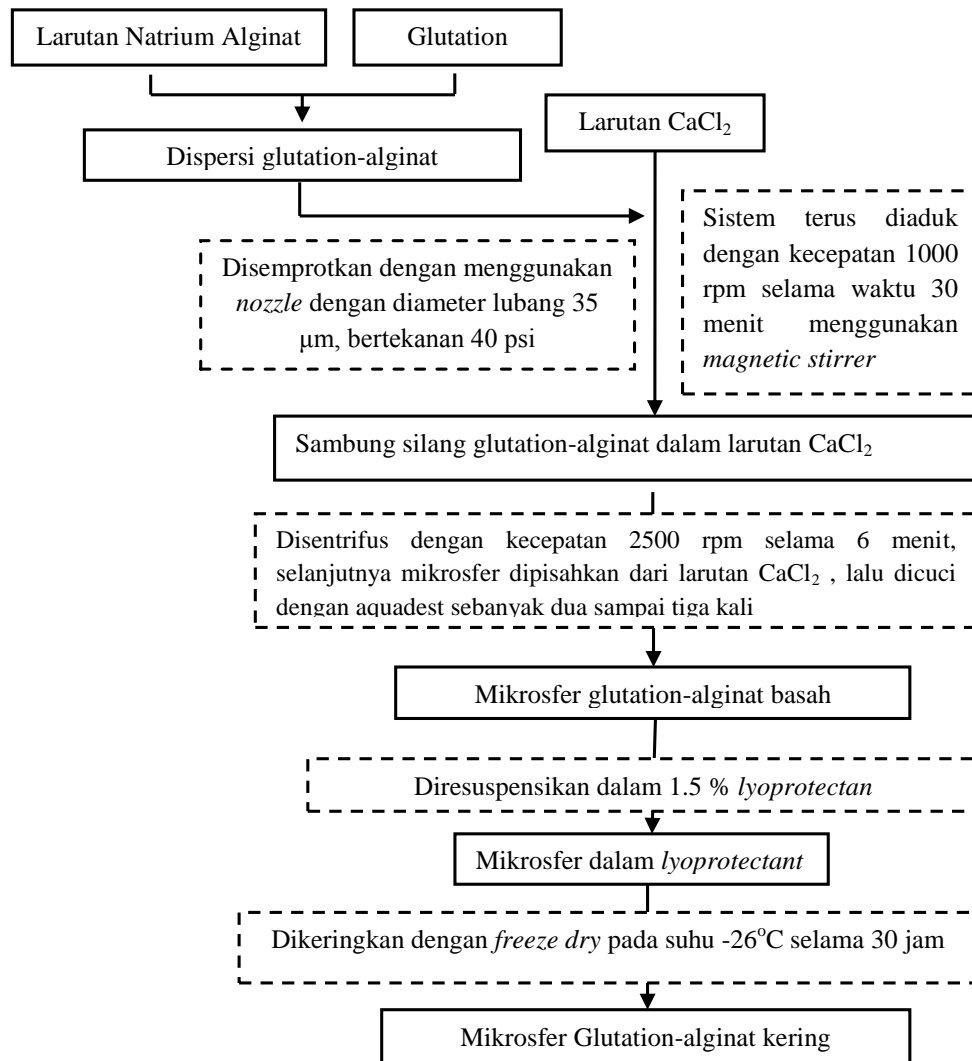
Formula I : Formula mikrosfer glutation dengan surfaktan

Formula II : Formula mikrosfer glutation tanpa surfaktan

4.10.1 Pembuatan Mikrosfer Glutation - Ca Alginat dengan Metode *Ionotropic Gelation* Teknik Aerosolisasi

1. Natrium alginat ditimbang 1 gram dilarutkan dalam 50 ml aquades diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga diperoleh larutan alginat.

2. Glutation yang setara dengan 500mg glutation didispersikan kedalam 50 ml larutan alginat yang telah terbentuk dan dicampur sampai homogen.
3. Larutan CaCl_2 dibuat dengan 11,098 gram CaCl_2 dalam 100 ml aquadest.
4. Larutan Glutation-alginat yang terbentuk disemprotkan menggunakan *spray aerosol* dengan ukuran lubang 200 μm dan tekanan konstan 40 psi ke dalam larutan CaCl_2 , terus diaduk selama 30 menit dengan kecepatan 1000rpm.
5. Suspensi mikrosfer yang terbentuk di *centrifuge* pada kecepatan 2500 rpm selama 6 menit, lalu dicuci dengan aquadest untuk memisahkan mikrosfer dari larutan CaCl_2 .
6. Mikrosfer disaring kemudian ditimbang berat mikrosfer basah.
7. Sejumlah mikrosfer diresuspensi menggunakan aquadest yang mengandung *lyoprotectant* maltodekstrin dengan konsentrasi 1.5 % .
8. Mikrosfer yang telah terkumpul selanjutnya dikeringkan dengan *freeze drying* pada suhu -26°C selama 30 jam. Skema pembuatan mikrosfer dapat dilihat pada gambar 4.3



Gambar 4.3 Skema pembuatan mikrosfer Glutathion-Ca alginat

4.10.2 Karakteristik Mikrosfer Glutathion-Ca Alginat

4.10.2.1 Pemeriksaan Distribusi Ukuran Partikel

Dilakukan dengan menggunakan mikroskop optik

- Mikrosfer yang akan diamati diletakkan pada objek glass
- Dilakukan pengukuran partikel sebanyak 300 partikel
- Dilakukan pengelompokan : ditentukan ukuran partikel terkecil dan terbesar dari seluruh sampel, dibagi ke dalam beberapa interval dan kelas

- d. Ditentukan harga diameter rata-rata dan dibuat kurva distribusi ukuran partikel dengan rumus :

$$D \text{ rata-rata} = \frac{\sum nd}{\sum n}$$

Keterangan:

n = jumlah mikropartikel yang diamati

d = ukuran mikropartikel

(Dhaker *et al.*, 2010)

4.10.2.2 Pemeriksaan Bentuk dan Permukaan Mikrosfer

Uji menggunakan SEM dilakukan dengan cara:

1. Mikropartikel diletakkan pada pegangan sediaan dengan bahan perekat yang mengandung butir-butir logam, misalnya logam Pt.
2. Emas pada *Chamber* diuapkan sehingga uap emas melapisi seluruh permukaan mikropartikel.
3. Permukaan mikropartikel yang dilapisi emas diamati menggunakan SEM.

4.10.2.3 Pemeriksaan Spektrum Inframerah

Uji spektroskopi FTIR ini untuk mengetahui interaksi obat-polimer pada saat proses mikroenkapsulasi. Metode spektroskopi inframerah dilakukan menggunakan pellet KBr, dengan cara :

1. Sampel dari masing-masing formula digerus kemudian ditimbang sebanyak 2 mg
2. Ditambahkan serbuk KBr pro spektroskopi yang telah dikeringkan sebanyak 300 mg
3. Campuran tersebut digerus dalam mortir sampai homogen

4. Dimasukkan ke dalam alat pembuat cakram KBr, ditekan dengan penekan hidrolik hingga diperoleh cakram yang transparan
5. Cakram diletakkan dalam *sample holder* dan direkam
6. Sampel diamati pada panjang gelombang 4000-400 cm^{-1}
7. Hasil pemeriksaan spektrum inframerah mikrosfer yang didapatkan kemudian dibandingkan dengan spektrum inframerah dari mikrosfer tanpa bahan obat.

4.10.2.4 Penentuan Kandungan glutation dalam mikrosfer

Kandungan obat dalam mikrosfer dilakukan dengan cara memecah mikrosfer glutation yang sudah terbentuk sebesar 120mg dengan 50 ml Na Sitrat selama 7 jam. Dilakukan pembuatan baku kerja terlebih dahulu. Diamati serapannya pada panjang gelombang maksimal. Dari kurva baku dan serapan obat dalam mikrosfer dapat dilakukan perhitungan efisiensi penjebakan, kandungan glutation, dan *yield* (Ullah, Khan., & Hashmat, 2012). Hasil yang diperoleh bisa dihitung presentase kandungan glutation tiap formula dengan rumus:

$$\text{Drug Loading} = \frac{\text{Berat glutation dalam mikrosfer}}{\text{Berat total mikrosfer kering}} \times 100\%$$

4.10.2.5 Penentuan Efisiensi Penjebakan Glutacion

Efisiensi penjebakan dihitung dari hasil evaluasi kandungan glutacion dalam mikrosfer dengan perhitungan :

$$\text{Efisiensi penjebakan} = \frac{\text{Berat glutacion dalam mikrosfer}}{\text{Berat glutacion yang seharusnya}} \times 100\%$$

(Prasanth *et al*, 2011)

4.10.2.6 Penentuan Perolehan kembali (*Yield*)

Persen perolehan kembali dihitung dari jumlah mikrosfer kering total yang dihasilkan dibandingkan dengan jumlah natrium alginat-glutacion

yang ditambahkan pada proses pembuatan. Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh persen yield mikrosfer yang dihasilkan.

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{Berat total mikrosfer kering}}{\text{Berat total glutation dan polimer}} \times 100\%$$

4.11 Pembuatan Sediaan Gel

1. Carbomer dikembangkan dalam *aquadest* yang sudah melalui proses pemanasan dan didiamkan hingga dingin, dengan cara menaburkan Carbomer di atas *aquadest*.
2. Kemudian propilenglikol, trietanolamin dilarutkan dalam campuran I dan diaduk hingga homogen (campuran II), ditambahkan pada campuran I tersebut, kemudian diaduk hingga homogen
3. Selanjutnya ditambahkan dengan carbomer yang telah dikembangkan sebelumnya.
4. Kemudian setelah basis gel jadi tambahkan glutation, diaduk dengan menggunakan mortar alu, sampai glutation tercampur dengan basis gel. Skema pembuatan mikrosfer dapat dilihat pada gambar 4.4.

Tabel 4.3 Formula Gel

Bahan	Formula I (g)	Formula II (g)	Formula III (g)	Formula IV	Formula V
Glutation	0,2	0,2	-	-	-
Mikrosfer Glutation	-	-	Setara 0,2	Setara 0,2	-
Carbomer	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Propilenglikol	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Trietanolamin	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Aquadest ad	5	5	5	5	5

Keterangan:

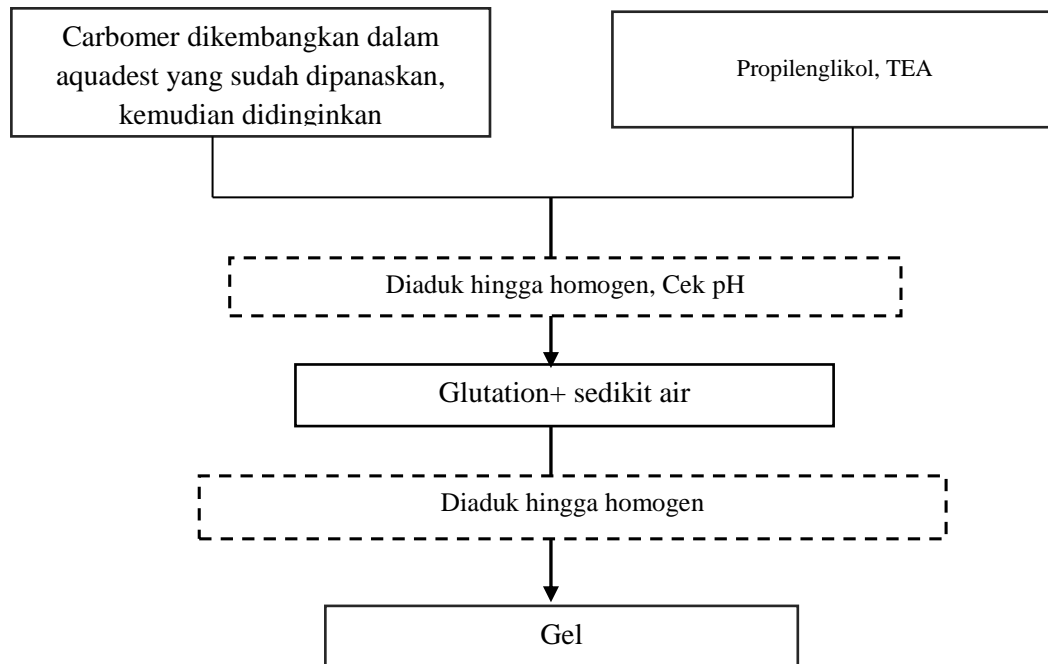
Formula I : Formula gel glutation _{+ surfaktan} HLB 7

Formula II : Formula gel glutation _{-surfaktan}

Formula III : Formula gel mikrosfer glutation + surfaktan HLB 7

Formula IV : Formula gel mikrosfer glutation -surfaktan

Formula V : Formula gel basis



Gambar 4.4 Skema Pembuatan Mikrosfer Glutation-Ca alginat

4.12 Uji Stabilitas Glutation

Pada uji stabilitas glutacion disimpan dalam oven yang bersuhu 80°C dan RH 50-60% selama 5 hari pada mikrosfer glutacion yang sudah ditingkatkan lipofilisitasnya dan glutacion yang tidak di mikrosfer. Kemudian dilakukan pengamatan organoleptis (warna, bau, rasa) , konsentrasi glutacion pada hari ke 1, 3 dan 5 (Blessy *et al.*, 2013).

Data yang didapatkan dibentuk grafik dapat digunakan untuk mengetahui orde reaksi tersebut. Jika konsentrasi (Ct) di plot terhadap t dan didapat garis lurus (linieritas mendekati 1), reaksi adalah orde nol. Reaksi dikatakan orde pertama bila log Ct terhadap t menghasilkan garis lurus

(linieritas mendekati 1). Setelah ditentukan orde reaksinya kemudian dihitung harga k dari masing-masing bahan (Martin *et al.*, 1993)

4.13 Uji Penetrasi dengan Melihat Aktivitas Penurunan MMP-1

Preparasi Jumlah Hewan Uji

1. Penentuan jumlah hewan uji yang digunakan menggunakan rumus :

Besar replikasi yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus Zainuddin (2011) :

$$n = (Z\alpha - Z\beta) \frac{S^2}{d^2}$$

Keterangan:

n = jumlah sampel

$Z\alpha$ = harga standar distribusi normal untuk α tertentu

$Z\beta$ = harga standar distribusi normal untuk β tertentu

S = Simpangan baku

d = Penyimpangan yang ditoleransi terhadap harga μ normal/standar

Jadi untuk 5 perlakuan dapat didapatkan jumlah ulangan tiap kelompok sebagai berikut :

$$n = (1,96 - (-1,645))^2 \frac{0,29^2}{0,43^2}$$

$$n = 6 \text{ ekor}$$

2. Tiga puluh ekor mencit balb/c terlebih dahulu dilakukan adaptasi selama 7 hari.
3. Tiga Puluh ekor mencit *balb/c* diaklimatisasi di unit Animasi Laboratorium Farmakologi Universitas Airlangga.
4. Dilakukan pencukuran pada punggung mencit (area yang mendapat penyinaran).

5. Dilakukan penyinaran UV 2 hari sekali, yaitu pada hari ke 1,3,5,7,9,11, dan 13 (Mencit dibiarkan terlebih dahulu selama dua puluh empat jam setelah penyinaran berakhir untuk menyingkirkan pengaruh efek penyinaran akut dengan dosis setiap penyinaran 60mJ/m^2 (Vayalil *et al.*, 2014).
6. Kelompok I : diaplikasikan gel glutation surfaktan HLB 7
Kelompok II : diaplikasikan gel glutation
Kelompok III : diaplikasikan gel mikrosfer glutation surfaktan HLB 7
Kelompok IV : diaplikasikan gel mikrosfer glutation
Kelompok V : diaplikasikan basis gel

Semua gel diaplikasikan ke kulit 2 kali sehari, yaitu 20 menit sebelum disinari (untuk memberikan waktu absorpsi bahan topikal ke dalam kulit) dan 4 jam setelah penyinaran (terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) mulai 4 jam setelah paparan). Aplikasi bahan topikal tetap dilakukan pada hari tanpa penyinaran.
7. Dilakukan biopsi menggunakan ketamin. Dosis Ketamin 22-44mg/kgBB IM (KNEPK, 2011).
8. Pembuatan sediaan histologis (jaringan kulit hasil biopsi kulit mencit diameter 5 mm dan kedalaman sampai sub kutan) dengan langkah-langkah sebagai berikut:
 - a. Kulit hasil biopsi direndam dalam formalin bufer fosfat 10% selama 24 jam kemudian dilakukan *triming* bagian jaringan yang akan diambil.

- b. Selanjutnya jaringan tersebut direndam dengan alkohol bertingkat (tahap dehidrasi) direndam berturut turut 50%, 70%, 90%, 96% dan 100% masing masing 2 kali selama 2 jam.
 - c. Tahap *clearing*: jaringan dimasukkan ke *clearing agent* (*xylene*) selama 24 jam sampai transparan.
 - d. Tahap *embedding* diawali dengan infiltrasi sebanyak 2 kali selama 1 jam dengan parafin murni (Histoplast) cair (suhu 60°C)
 - e. Jaringan ditanam ke dalam parafin cair dan dibiarkan membentuk blok selama satu hari agar mudah diiris dengan mikrotom. Pemotongan menggunakan mikrotom rotari, tebal 5 mikro meter secara seri dan diambil irisan ke 5, 10, 15 selanjutnya ditempelkan pada gelas obyek, kemudian
 - f. Diinkubasi pada suhu 60° C selama 2 jam. Khusus untuk slide yang dicat dengan immunohistokimia, menggunakan objek glass yang sudah dilapisi daya rekat seperti Poly-Lysine atau yang sejenis.
9. Pengecatan Immunohistokimia MMP-1
- a. Slide dideparafinisasi dan direhidrasi dengan perendaman dalam larutan *xylene* 2 x 5 menit, etanol 100% selama 2 menit, etanol 96% 2 x 2 menit, etanol 70% selama 2 menit dan PBS selama 2 menit.
 - b. Dilakukan *antigen retrieval*, yaitu slide direndam dalam buffer Tri Sodium Citrat lalu dipanaskan dalam *microwave* selama 5 menit dengan menggunakan daya 800 Watt, dinginkan lalu cuci dengan PBS 2 x 5 menit.

- c. Dilakukan bloking peroksidase endogen dalam boks plastik dengan H₂O₂ 3% selama 30 menit.
- d. Dicuci dengan PBS 1X selama 5 menit masing-masing dua kali.
- e. Ditetaskan 5% FBS 100 µL selama 2 jam dalam suhu ruang dan boks dalam keadaan tertutup.
- f. Dicuci PBS 1X selama 5 menit masing-masing dua kali, ditetaskan antibodi primer 100 µL selama satu malam dalam boks tertutup.
- g. Dicuci dengan PBS 1X selama 5 menit dalam *glass jar* masing-masing sebanyak 2 kali sambil digoyangkan.
- h. Ditetaskan *biotinylated link* pada seluruh permukaan jaringan kemudian diinkubasi 30 menit dalam boks tertutup
- i. Dicuci dalam PBS 1X selama 5 menit dalam *glass jar* masing-masing dua kali sambil digoyangkan.
- j. Selanjutnya ditetaskan *streptavidin peroxidase* kemudian didiamkan selama 30 menit dalam boks tertutup,
- k. Dicuci kembali dalam *glass jar* menggunakan PBS 1X sebanyak empat kali masing-masing selama 3 menit sambil digoyangkan.
- l. Ditetaskan DAB hingga berwarna coklat kemudian dicuci dengan PBS 1X hingga bersih dan dikeringkan.
- m. Ditetaskan Hematoxylin Gill didiamkan selama lima menit kemudian dicuci dengan air mengalir.
- n. Direndam dalam etanol absolut sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit.

- o. Direndam pada *xylene* sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit. Setelah kering slide di-*mounting* dengan medium berbasis *xylene* (DPX) dan ditutup *cover glass*.
- p. Kadar MMP-1 (%) = $\frac{\text{Fibroblas yang mengekspresikan MMP-1}}{\text{Total fibroblas pada lapang pandang}} \times 100\%$

4.14 Analisis Data

4.14.1 Penentuan Koefisien Apparent

Penentuan koefisien partisi glutation dilakukan ketika kesetimbangan telah tercapai pada fase minyak dan fase air dengan acuan waktu keseimbangan yang diperoleh dari kelarutan pada suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ dengan melakukan replikasi tiga kali. Harga koefisien partisi *apparent* dapat dihitung setelah diperoleh konsentrasi glutation dalam fase air sesudah terjadi keseimbangan dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$APC = \frac{(C_2^0 - C_2') \cdot a}{C_2' \cdot b}$$

Keterangan:

APC: koefisien partisi apparent

C_2' : konsentrasi obat dalam fase air sesudah terjadi kesetimbangan

C_2^0 : konsentrasi obat dalam fase air sebelum terjadi kesetimbangan

a : volume fase air

b : volume fase minyak

4.14.2 Penentuan *Drug Loading*, *Entrapment Efficiency*, *Yield*

Data dari masing-masing pemeriksaan kandungan glutation dalam mikrosfer, *yield* mikrosfer, serta efisiensi penjebakan bahan obat. Dari perhitungan di dapatkan presentase kandungan glutation dalam mikrosfer, *yield* mikrosfer, serta efisiensi penjebakan bahan obat dan dibandingkan dengan masing-masing formula. Analisis data dilakukan dengan

menggunakan statistik program SPSS 23 dengan metode *independent sample t-test*.

4.14.3 Penentuan Stabilitas Glutation

Uji stabilitas dilakukan pada mikrosfer glutation ^{+surfaktan}, mikrosfer glutation ^{-surfaktan}, glutation ^{-surfaktan}, glutation ^{+surfaktan}, pada hari ke 0,1,3,5 ditentukan orde reaksinya menggunakan metode grafik plot kemudian ditentukan konstanta laju reaksi dari masing-masing bahan.

4.14.4 Penentuan Efektivitas Glutation Gel

Data dari masing-masing perlakuan pada uji penetrasi yang dilihat dari efektivitas penurunan MMP-1, didapatkan data kadar MMP-1. Seluruh pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel dan *software* pengolah gambar *Nikkon Image System*. Analisis data dilakukan dengan menggunakan statistik program SPSS 23 dengan metode *Factorial Design* dengan derajat kepercayaan 95% dan program Minitab 17 dengan metode *Design of Experiment* (DoE). Hasil Uji Statistik dapat dilihat pada lampiran 20 dan 21.

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Pemeriksaan Kualitatif Bahan

5.1.1 Glutation

Hasil pemeriksaan kualitatif glutacion dapat dilihat pada tabel 5.1 di bawah ini:

Tabel 5.1 Pemeriksaan Kualitatif Glutation

Pemeriksaan	Pengamatan	Pustaka
Organoleptis	Serbuk hablur, putih, tidak berbau	Serbuk hablur, putih, tidak berbau atau hampir tidak berbau *)
Spektrum IR	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹) **)
- O-H stretching	3252,33-2525,33	3400-2400
- N-H stretching	3347,32	3400
- S-H stretching	2525,33	2500-2700
- N-H(b) stretching	1598,2	1575-1650
- Amida	1661,24	1670-1700
Analisis Termal (DSC)	202,56° C ***)	198,0 ° C*)

*) Sertifikat analisis glutacion (Lampiran 1)

**) Jam *et al.*, 2009

***) Lampiran 5

5.1.2 Natrium Alginat

Hasil pemeriksaan kualitatif natrium alginat dapat dilihat pada tabel 5.2 di bawah ini:

Tabel 5.2 Pemeriksaan Kualitatif Natrium Alginat

Pemeriksaan	Pengamatan	Pustaka
Organoleptis	Serbuk tidak berbau, tidak berasa dan berwarna kuning kecoklatan	Serbuk tidak berbau dan tidak berasa, berwarna putih sampai coklat pucat kekuningan *)
Spektrum IR	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang (cm ⁻¹) **)
- Gugus Garam Karboksilat	1634,47	1620
Struktur sakarida:	1419,59	1420
- C-O stretching	1099,62	1320
	950,66	1090
- C-O-C stretching	1034,61	950
		1020
- Sidik jari guluronat	883,42	900-890
Analisis Termal (dengan DTA)	238,7 °C ***)	240,0 °C ***)

- *) Sertifikat analisis natrium alginat (Lampiran 2)
 **) Jaya *et al*, 2010
 ***) Manjanna *et al*, 2010
 ****) Lampiran 7

5.1.3 Kalsium Klorida (CaCl₂)

Hasil pemeriksaan kualitatif kalsium klorida dapat dilihat pada tabel 5.3 di bawah ini:

Tabel 5.3 Pemeriksaan Kualitatif Kalsium Klorida

Pemeriksaan	Pengamatan	Pustaka
Organoleptis	Bentuk serpihan putih, keras dan tidak berbau	Granul atau serpihan putih, keras dan tidak berbau *)
Analisis Termal (dengan DTA)	176,5 °C ***)	CaCl ₂ anhidrat = 772 °C CaCl ₂ dihidrat = 176 °C CaCl ₂ heksahidrat = 30 °C**)

- *) Farmakope Indonesia V, 2015
 **) Rowe *et al*, 2009
 ***) Lampiran 6

5.1.4 Maltodekstrin

Hasil pemeriksaan kualitatif kalsium klorida dapat dilihat pada tabel 5.4 di bawah ini:

Tabel 5.4 Pemeriksaan Kualitatif Maltodextrin

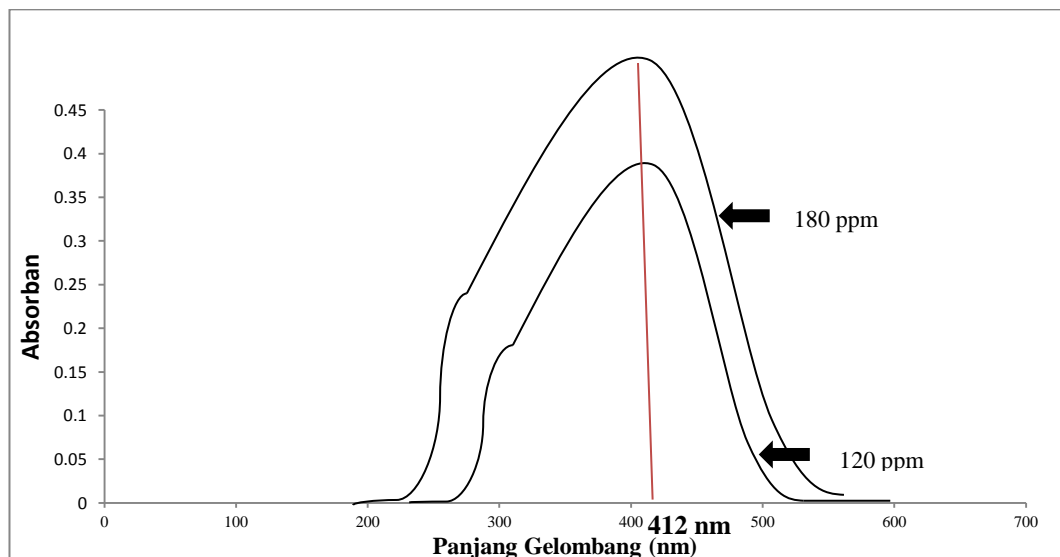
Pemeriksaan	Pengamatan	Pustaka
Organoleptis	Serbuk berwarna putih, berbau khas maltodekstrin, dan tidak manis	Serbuk tidak berbau dan tidak berasa, berwarna putih sampai coklat pucat kekuningan *)
Analisis Termal (dengan DTA)	185,2 °C	40-185 °C **)
Spektrum IR	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang (cm ⁻¹) ***)
Polisakarida (C-O stretching)	1024,26 1078,33 1153,34	980 - 1200
O-H Stretching	3432,5	3400

- *) Sertifikat analisis maltodekstrin
 **) Garnero *et al*, 2013
 ***) Sun *et al.*, 2013

5.2 Penentuan Koefisien Partisi

5.2.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum glutation dalam larutan dapar fosfat 0,01 M pH $6,0 \pm 0,05$ ditentukan dengan menggunakan larutan baku kerja dengan kadar 120 dan 180 ppm yang diamati absorbannya dengan spektrofotometer UV – Vis pada panjang gelombang 250-450 nm. Berdasarkan hasil penentuan panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 412 nm. Profil spektrum glutation dalam larutan dapar fosfat 0,01 M pH $6,0 \pm 0,05$ dapat dilihat pada gambar 5.1



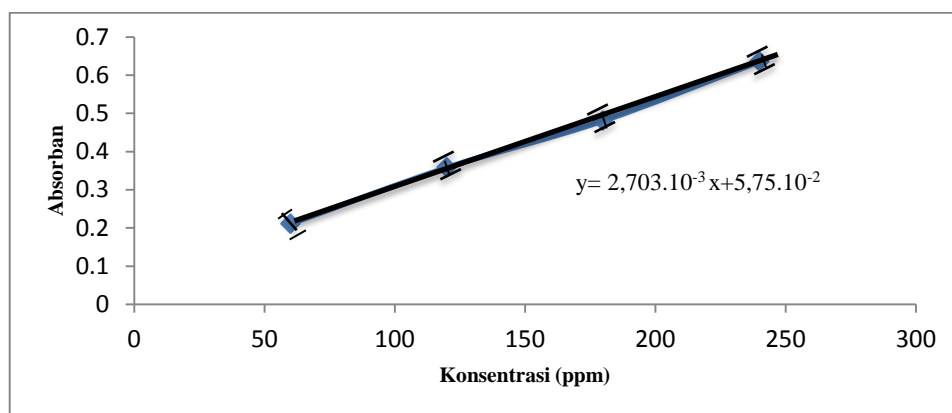
Gambar 5.1 Profil Serapan Larutan Baku Kerja Glutation 120 ppm dalam larutan dapar fosfat 0,01 M pH $6,0 \pm 0,05$

5.2.2 Penentuan Kurva Baku

Penentuan kurva baku glutation dilakukan dengan cara mengamati serapan berbagai konsentrasi glutation dalam larutan dapar fosfat 0,01 M pH $6,0 \pm 0,05$ pada panjang gelombang 412 nm. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.5 dan gambar 5.2. Dari kurva baku tersebut diperoleh persamaan regresi linier $y = 2,703 \cdot 10^{-3} x + 5,75 \cdot 10^{-2}$ dengan koefisien korelasi (r) = 0,99905.

Tabel 5.5 Hubungan konsentrasi glutation dengan absorban pada λ 412nm

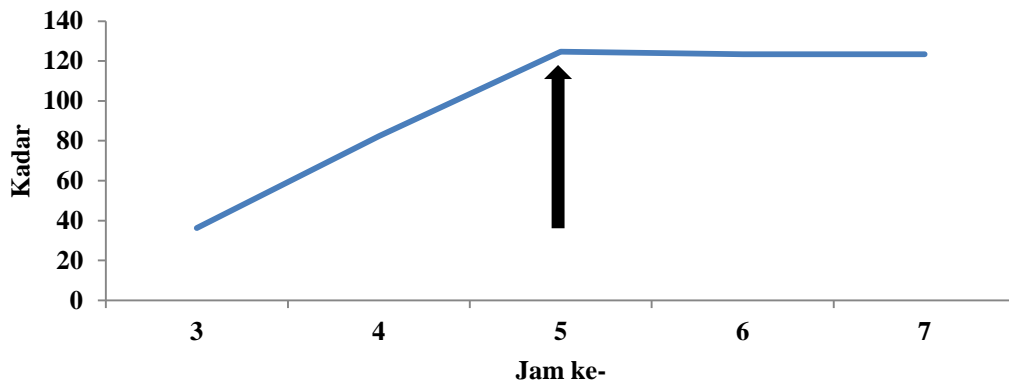
Konsentrasi (ppm)	Absorban
60	0,216
120	0,318
180	0,557
240	0,698

**Gambar 5.2** Glutation Dalam Larutan Dapar Fosfat pH $6,00 \pm 0,05$

5.2.3 Penentuan Koefisien Apparent GSH Hasil *Freeze Dry*

5.2.3.1 Penentuan Waktu Kesetimbangan

Penentuan waktu kesetimbangan dilakukan pada glutation hasil *freeze dry* dari larutan glutation dalam larutan dapar fosfat pH $6,00 \pm 0,05$ yang jenuh oktanol, setelah digojok pada suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, konsentrasi 120 ppm pada jam ke- 3,4,5,6 dan 7 (lampiran 9), sampel diambil dengan replikasi sebanyak tiga kali. Dari absorban yang diperoleh dapat dihitung kadar glutation yang masih tertinggal di fase air dengan menggunakan kurva baku. Harga koefisien partisi apparent dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (7). Grafik waktu kesetimbangan glutation dalam larutan dapar fosfat pH $6,00 \pm 0,05$.



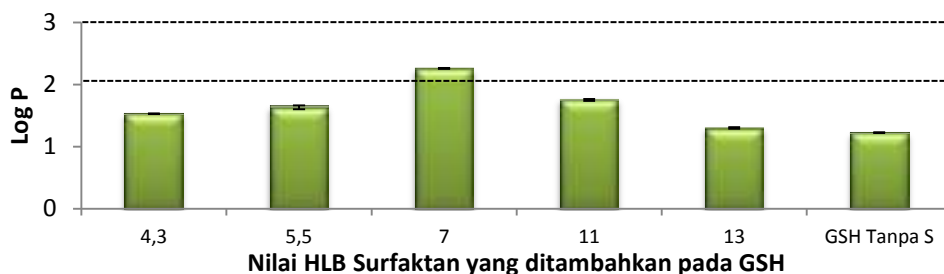
Gambar 5.3 Grafik Waktu Kesetimbangan Glutation dalam Larutan Dapar Fosfat pH $6,00 \pm 0,05$

5.2.3.2 Penentuan Koefisien Partisi

Penentuan koefisien apparent dilakukan seperti pada penentuan waktu kesetimbangan, waktu kesetimbangan yang terpilih adalah pada jam ke-5 (lampiran 9), sampel diambil dengan replikasi sebanyak tiga kali. Dari absorbansi yang diperoleh dapat dihitung kadar glutathione yang masih tertinggal di fase air dengan menggunakan kurva baku. Harga koefisien partisi apparent dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (7). Perolehan kadar glutathione di dalam fase air atau larutan dapar dan harga log APC dapat dilihat pada tabel 5.6 dan cara perhitungan pada lampiran 10.. Profil harga log APC pada berbagai HLB dapat dilihat pada gambar 5.4.

Tabel 5.6 Koefisien Partisi Nyata dalam dapar fosfat pH $6,0 \pm 0,05$ (fase air) pada jam kelima suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Nilai HLB	Replikasi	Koefisien Partisi Nyata	Rerata Log APC \pm SB	%KV
4,3	1	1,531	1,535 \pm 0,004	0,260
	2	1,539		
	3	1,536		
5,5	1	1,595	1,632 \pm 0,032	1,960
	2	1,643		
	3	1,657		
7	1	2,255	2,259 \pm 0,009	0,398
	2	2,252		
	3	2,270		
11	1	1,743	1,750 \pm 0,016	0,914
	2	1,770		
	3	1,739		
13	1	1,290	1,300 \pm 0,012	0,923
	2	1,314		
	3	1,296		
GSH Tanpa Surfaktan	1	1,218	1,224 \pm 0,006	0,490
	2	1,231		
	3	1,223		

**Gambar 5.4** Grafik Koefisien Partisi Glutation setelah ditambah surfaktan dengan Berbagai Nilai HLB

Koefisien partisi glutatation dengan penambahan berbagai surfaktan berbagai HLB yang mendekati 2-3 sesuai harga Log P kulit (Benson dan Watkinson, 2012) adalah glutatation dengan penambahan surfaktan HLB 7 yaitu campuran Span 80 sebanyak 2,52 ml dengan Tween 80 sebanyak 7,47 ml. Selanjutnya glutatation yang diproses mikrosfer adalah glutatation dengan penambahan surfaktan HLB 7 (GSH_{+Surf})

5.3 Pemeriksaan Spektrum Inframerah Formula Mikrosfer Glutation-Alginat

5.3.1 Formula Mikrosfer GSH⁺ surfaktan -Alginat F1

Hasil pemeriksaan temogram spektra IR F1 dari mikrosfer GSH⁺Surf dapat dilihat pada tabel 5.7 dibawah ini:

Tabel 5.7 Hasil Spektra IR Fomula F1

Mikrosfer GSH ⁺ Surf (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi	Spektrum IR (cm ⁻¹) Pustaka		
		Glutation	Maltodekstrin	Na-Alginat
3429,32	N-H <i>primary</i> (Amina)	N-H stretch: 3400		
3429,32		O-H <i>stretch</i> : 3400	O-H <i>stretch</i> : 3400	
1423,52 1638,47	Gugus Garam Karboksilat	Amida: 1670-1700		Gugus Garam Karboksilat: 1614; 1420
-				Sidik jari guluronat: 900- 890
1024,42, 1079,46 1154,47 H	C-O stretch		C-O <i>stretch</i> : 980- 1200	C-O <i>stretch</i> : 1028,06; 1091,71; 1126,43

Hasil pengamatan spektra formula F1 pada tabel 5.7 menunjukkan adanya interaksi antara bahan obat, polimer, dan larutan *crosslink* CaCl₂. Interaksi tersebut ditandai dengan bergesernya bilangan gelombang, hilangnya serapan sidik jari guluronat dan satu serapan gugus garam karboksilat (1614 cm⁻¹) dari Na alginat karena bereaksi sambung silang dengan CaCl₂ (Hariyadi *et al.*, 2014).

5.3.2 Formula Mikrosfer Glutation-Alginat F2

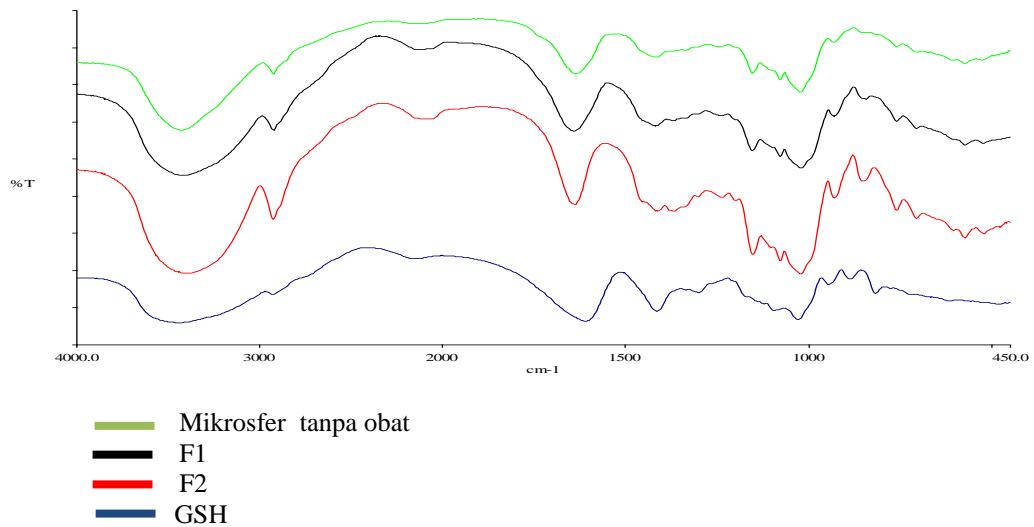
Hasil pemeriksaan temogram spektra IR F2 dari mikrosfer GSH -_{Surf} dapat dilihat pada tabel 5.8 dibawah ini:

Tabel 5.8 Hasil Spektra IR Fomula F2

Mikrosfer GSH- _{Surf}	Gugus Fungsi	Spektrum IR (cm ⁻¹) Pustaka		
		Glutation	Maltodekstrin	Na-Alginat
3429,12	N-H <i>primary</i> (Amina)	N-H stretch: 3400		
		O-H <i>stretch</i> : 3400	O-H <i>stretch</i> : 3400	
1421,25 1642,24	Gugus Garam Karboksilat	Amida: 1670-1700		Gugus Garam Karboksilat: 1614; 1420
				Sidik jari guluronat: 900- 890
1022,14 1155,18 1154,47	C-O stretch		C-O <i>stretch</i> : 980-1200	C-O <i>stretch</i> : 1028,06; 1091,71; 1126,43

Seperti halnya pada formula F1 terdapat interaksi antara bahan obat, polimer, dan larutan *crosslink* CaCl₂ ditandai dengan bergesernya bilangan gelombang, hilangnya serapan sidik jari guluronat dan satu serapan gugus garam karboksilat (1614 cm⁻¹) dari Na alginat karena bereaksi sambung silang dengan CaCl₂(Hariyadi *et al.*, 2014).

Glutation sebagai bahan aktif yang dijebak ke dalam mikrosfer masih terlihat ditandai Hal tersebut diketahui dengan masih adanya Serapan glutation pada bilangan gelombang 3429,32; 3429,12 (amina) dan 1638,47; 1642,24 (amida). Hasil *overlay* pemeriksaan spectrum IR mikrosfer glutation-alginat dengan dapat dilihat pada gambar 5.4.



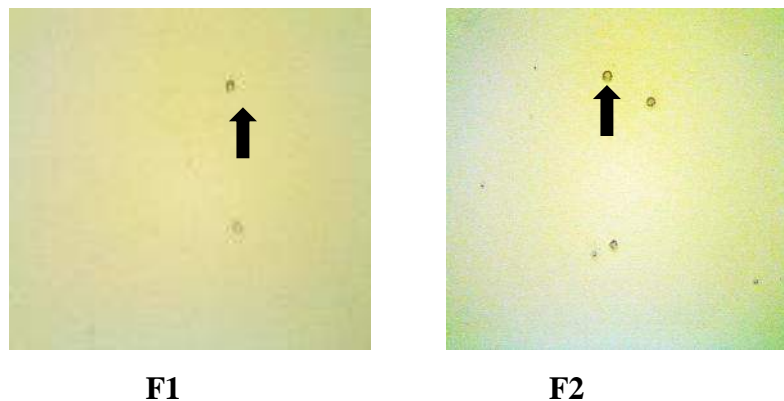
Gambar 5.5 Spektrum IR mikrosfer glutation-alginat mikrosfer tanpa bahan obat dan F1 – F2

5.4 Hasil Pemeriksaan Fisik Mikrosfer Glutacion-Alginat

Berikut hasil pemeriksaan fisik mikrosfer glutacion-alginat dengan menggunakan mikroskop optik dan SEM.

5.4.1 Hasil Pemeriksaan Morfologi Mikrosfer dengan Mikroskop Optik

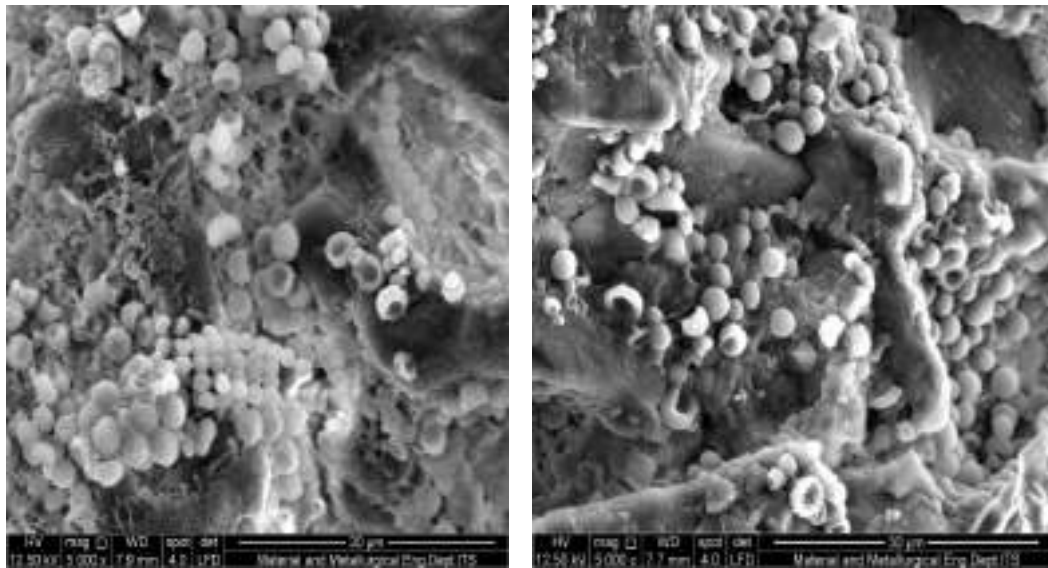
Hasil pemeriksaan bentuk dan permukaan mikrosfer basah dapat dilihat pada gambar 5.6



Gambar 5.6 Morfologi dari mikrosfer glutacion-Alginat F1 dan F2 dengan menggunakan mikroskop optik perbesaran 400X

5.4.2 Hasil Pemeriksaan Morfologi Mikrosfer dengan SEM

Hasil pemeriksaan bentuk dan permukaan mikrosfer kering dapat dilihat pada gambar 5.7 berikut:



F1

F2

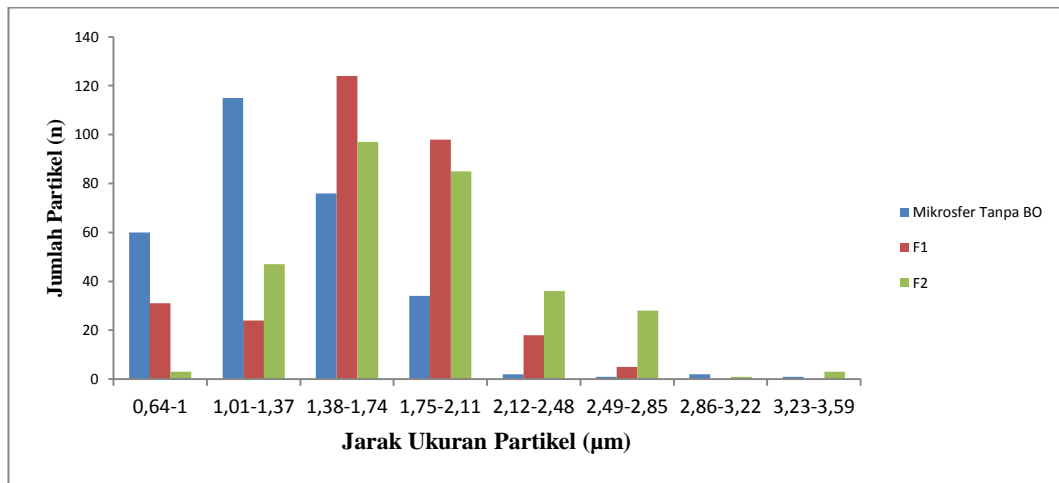
Gambar 5.7 Morfologi bentuk dan permukaan dari mikrosfer (A) F1 (GSH HLB 7), (B) F2 (GSH) dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) perbesaran 5000x

5.4.3 Hasil Pemeriksaan Distribusi Ukuran Partikel

Hasil pemeriksaan distribusi ukuran partikel mikrosfer dari keempat formula mikrosfer glutation-Ca alginat dan mikrosfer tanpa glutation dapat dilihat pada tabel 5.9.

Tabel 5.9 Distribusi ukuran partikel mikrosfer glutation-Ca Alginat

Jarak Ukuran (μm)	Rata-rata Jarak Ukuran (μm)	Mikrosfer Tanpa Bahan Obat		F1		F2	
		n	Nxd	n	Nxd	n	Nxd
0,64 – 1	0,76	69	52,44	31	23,56	3	2,28
1,01 - 1,37	0,94	115	136,8	24	22,56	47	44,18
1,38 - 1,74	1,29	76	124,8	124	159,9	97	125
1,75 - 2,11	1,68	34	57,12	98	164,6	85	142,8
2,12 - 2,48	2,22	2	4,6	18	39,96	36	79,9
2,49 - 2,85	2,41	1	2,41	5	12,05	28	67,5
2,86 - 3,22	3,10	2	6,2			1	3,1
3,23 - 3,59	3,39	1	3,39			3	10,2
Diameter Rata-Rata (μm)		1,34		1,40		1,58	
Polydispersitas Index		0,003		0,003		0,003	



Gambar 5.8 Perbandingan ukuran partikel mikrosfer antara formula dan mikrosfer tanpa bahan obat

Hasil pengamatan ukuran partikel antara mikrosfer tanpa bahan obat dan formula menunjukkan bahwa ukuran partikel dari kedua formula lebih besar dibanding ukuran partikel dari mikrosfer tanpa bahan obat. Indeks polidispersitas (IP) dihitung untuk mengetahui ukuran lebarnya distribusi partikel. Ketiga formula memiliki indeks polidispersitas yaitu 0,003.

5.5 Hasil Pemeriksaan Kandungan Obat, Efisiensi Penjebakan, dan Perolehan Kembali (*Yield*)

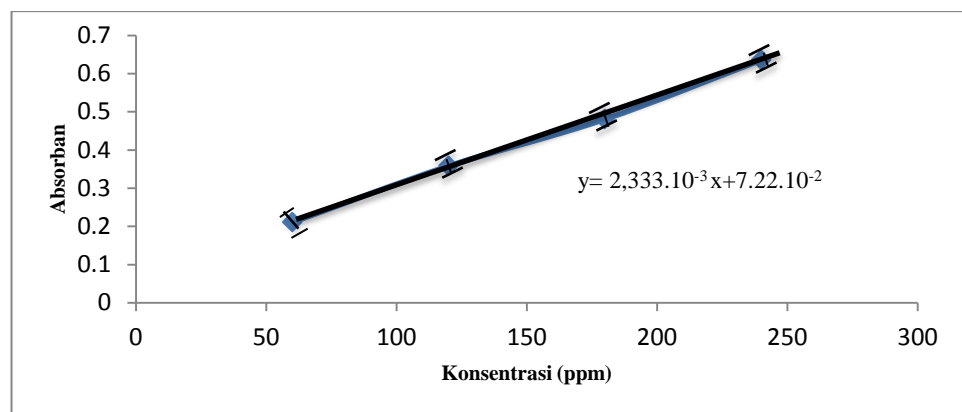
5.5.1 Kurva Baku Glutation dalam Larutan Na-Sitrat 0,5 M pH 8,5

Hubungan konsentrasi glutathione dengan absorbansi pada λ 412 nm dapat dilihat pada tabel 5.10 di bawah ini:

Tabel 5.10 Hubungan konsentrasi glutathione dengan absorbansi pada λ 412nm

Konsentrasi (ppm)	Absorban
60	0,211
120	0,358
180	0,481
240	0,636

Dari hasil pengukuran didapatkan harga slope (b) sebesar $2,3333.10^{-3}$ dan harga intersep (a) $7,22.10^{-2}$ sehingga di peroleh persamaan regresi $y = 2,333.10^{-3}x + 7,22.10^{-2}$ dengan harga koefisien korelasi (R) sebesar 0,9992. Harga R yang diperoleh lebih besar dari $R_{tabel} = 0,9911$ pada tingkat signifikan 0,1% yang menunjukkan tingkat kepercayaan 99,9%. Hal ini berarti bahwa terdapat hubungan yang linier antara konsentrasi larutan baku dan absorban. Grafik kurva baku glutation dalam larutan Na-sitrat 0,5 M pH 8,5 dapat dilihat pada gambar 5.9



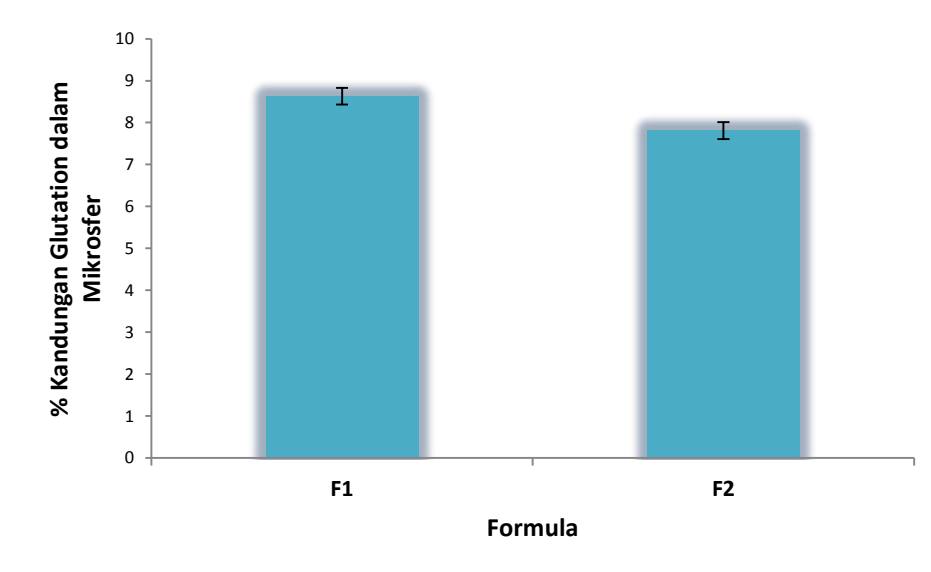
Gambar 5.9 Kurva Baku Glutation Dalam Larutan Na-Sitrat 0,5 M pH 8,5

5.5.2 Pemeriksaan Kandungan Glutation dalam Mikrosfer

Hasil pemeriksaan kandungan glutation dalam mikrosfer dapat dilihat pada tabel 5.11 dan cara perhitungannya pada lampiran 12.

Tabel 5.11 Hasil Pemeriksaan Kandungan Glutation dalam Mikrosfer

Formula	Rerata Kandungan GSH \pm SD (%)	KV (%)
1	8,623 \pm 0,12	1,4
2	7,81 \pm 0,22	2,81



Gambar 5.10 Kandungan Glutathion Dalam Mikrosfer pada F1 dan FII

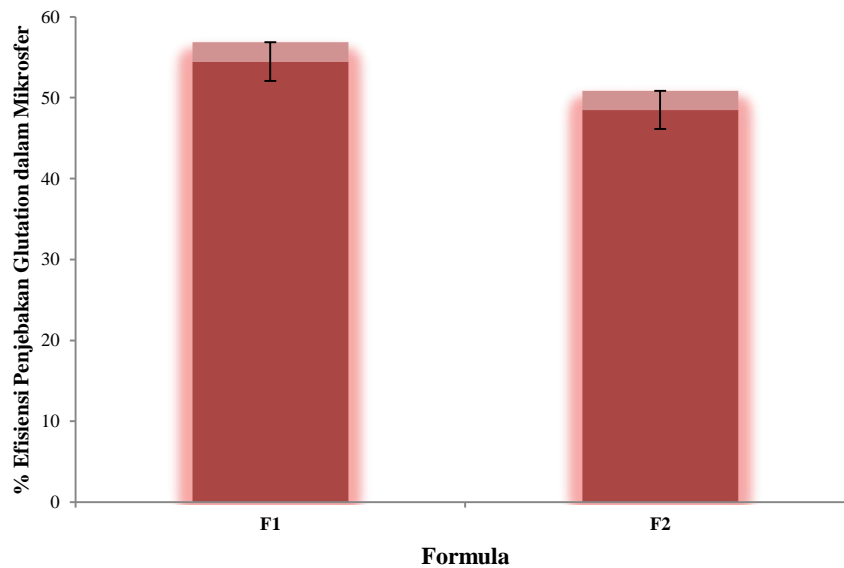
Berdasarkan hasil analisa statistika *independent sample t-test* pada kandungan glutathion mikrosfer didapatkan nilai *p value* (sig) 0,056 (lampiran 12) lebih dari 0,05. Hal tersebut menunjukkan tidak ada perbedaan kandungan glutathion F1 dan F2.

5.5.3 Pemeriksaan Efisien Penjebakan Glutathion dalam Mikrosfer

Hasil pemeriksaan efisiensi penjebakan glutathion dalam mikrosfer dilihat pada tabel 5.12 dan cara perhitungan pada lampiran 13.

Tabel 5.12 Hasil Pemeriksaan Efisiensi Penjebakan Glutathion

Formula	Rerata EP \pm SD (%)	KV (%)
1	54,46 \pm 2,4	4,41
2	48,49 \pm 2,37	4,87



Gambar 5.11 Efisiensi Penjebakan Glutation dalam Mikrosfer

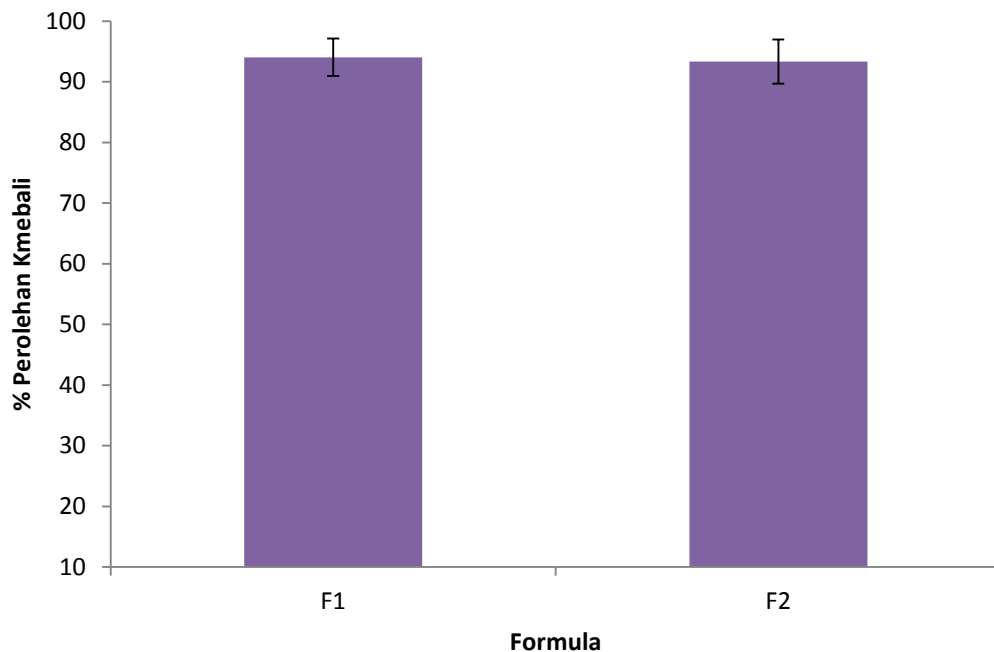
Berdasarkan hasil analisa statistika *independent sample t-test* pada efisiensi penjebakan mikrosfer didapatkan nilai *p value* (sig) 0,0952 (lampiran 13) lebih dari 0,05. Hal tersebut menunjukkan tidak ada perbedaan efisiensi penjebakan glutation F1 dan F2.

5.5.4 Perhitungan Perolehan Kembali (*Yield*)

Hasil perhitungan perolehan kembali mikrosfer (*Yield*) dapat dilihat pada tabel 5.13 dan cara perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 14.

Tabel 5.13 Hasil Perhitungan Perolehan Kembali Mikrosfer

Formula	Rerata Yield \pm SD (%)	KV (%)
1	94,03 \pm 3,07	3,27
2	93,34 \pm 3,65	3,91



Gambar 5.12 Perolehan Kembali (*Yield*) Mikrosfer

Berdasarkan hasil analisa statistika *independent sample t-test* pada kandungan glutation mikrosfer didapatkan nilai *p value* (*sig*) 0,755 (lampiran 14) lebih dari 0,05. Hal tersebut menunjukkan tidak ada perbedaan *yield* pada F1 dan F2.

5.5.5 Pengujian Stabilitas Mikrosfer

Hasil uji stabilitas mikrosfer yang disimpan pada suhu 80°C RH 50-60% selama 5 hari dapat dilihat pada tabel 5.14 dan cara perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 15.

Tabel 5.14 Kadar Rata-rata Glutation yang Tersisa Setelah Penyimpanan

Hari ke-	Rerata Kadar "Ct" (ppm)± SB dari:			
	GSH _{-surf}	Mikrosfer GSH _{-surf} (F2)	GSH _{+Surf}	Mikrosfer GSH _{+Surf} (F1)
0	238,82± 1,69	257,01±1,36	219,94±1,48	254,4±2,41
1	227,59±0,77	254,83±2,43	218,58±2,23	252,57±3,59
3	188,12±1,33	220,36±4,04	182,94±2,21	230,04±2,82
5	149,53±2,22	196,54±3,03	148,17±2,05	212,51±4,76
Persamaan regresi	Y = 18, 2736 x + 242,13	Y = 12,9528 x + 261,328	Y = -15,1469x + 226,488	Y = -15, 1469x + 226,488
r	-0,9972	-0,9871	-0, 9847	0,98476

Tabel 5.15 Harga Log Ct Vs t Glutation

Hari ke-	Log Ct GSH	Log Ct GSH _{-Surf} (F2)	Log Ct GSH _{+Surf}	Log Ct GSH _{+Surf} (F1)
	0	2,378	2,41	2,34
1	2,357	2,406	2,339	2,402
3	2,274	2,343	2,26	2,36
5	2,175	2,293	2,17	2,32
Persamaan regresi	Y = -0,0414x + 2,3892	Y = -0,02488x + 2,4189	Y = -0,0357x + 2,3575	Y = -0,0186x + 2,4149
r	-0,9930	-0,9878	-0,9799	-0,99411

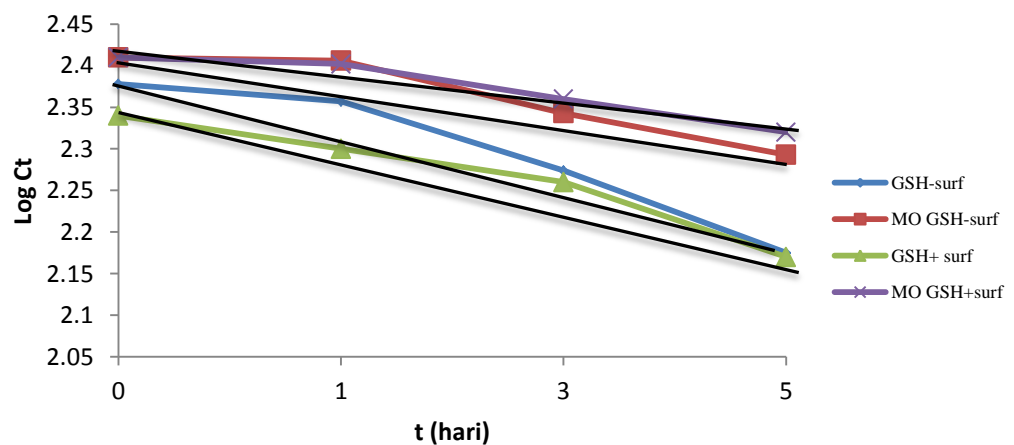
Tabel 5.16 Linieritas Kurva Stabilitas Orde 0 dan Orde 1

Nama Bahan	Linieritas (r)	
	Orde 0	Orde 1
GSH _{-surf}	-0,9972	-0,9930
Mikrosfer GSH _{-surf} (F2)	-0,9871	-0,9897
GSH _{+Surf}	-0,9847	-0,9799
Mikrosfer GSH _{+Surf} (F1)	-0,9889	-0,9941

Berdasarkan harga linieritas stabilitas (r) diperoleh bahwa dengan reaksi orde 1 lebih linier (harga r mendekati 1), sehingga penentuan nilai konstanta degradasi glutation (k) menggunakan rumus persamaan pada orde 1.

Tabel 5.17 Penentuan Nilai k pada Orde 1

Nama Bahan	Konstanta degradasi (k) Orde 1 ($k= b \times 2,303$)
GSH _{-surf}	-0,0953 / hari
Mikrosfer GSH _{-surf} (F2)	-0,0571/ hari
GSH _{+ Surf}	-0,0822/ hari
Mikrosfer GSH _{+Surf} (F1)	-0,0429/ hari



Gambar 5.13 Kurva Hubungan Log Ct Vs t Glutation

Berdasarkan gambar 5.13 diketahui bahwa glutation yang dimikrosfer lebih stabil daripada glutation yang tidak dimikrosfer. Hal ini sesuai dengan tujuan dari mikrosfer adalah untuk meningkatkan stabilitas bahan aktif (Hariyadi *et al.*, 2014).

5.5.6 Hasil Uji Efektivitas Glutation dalam Sistem Mikrosfer berdasarkan Penurunan Ekspresi MMP-1

Pada hasil uji ekspresi MMP1-1 diperoleh hasil rerata ekspresi MMP-1 yang disajikan pada tabel 5.18, gambar 5.13 dan cara perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 17.

Tabel 5.18 Hasil Uji Ekspresi MMP-1

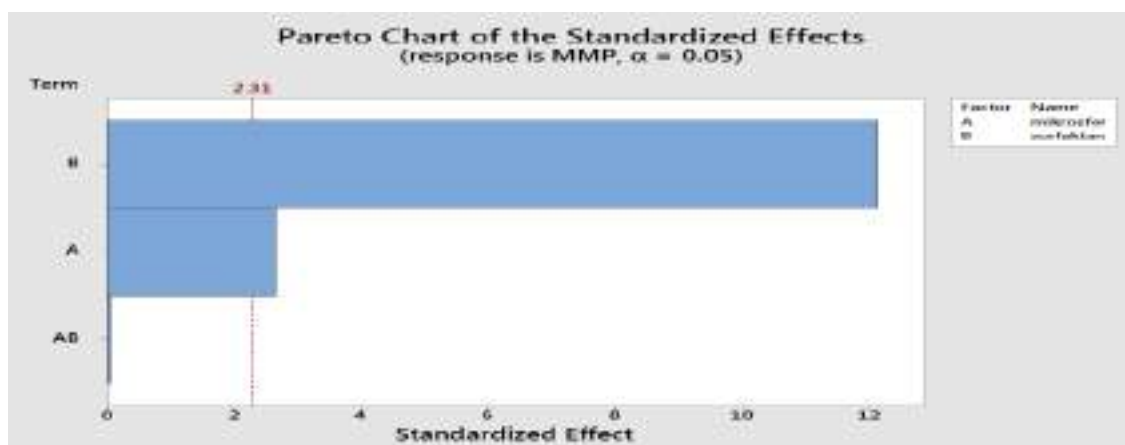
Formula	Rerata Ekspresi MMP-1 (%) ± SB
GSH _{+Surf}	24,25 ± 8,79
GSH _{-surf}	63,49 ± 0,69
Mikrosfer GSH _{+Surf}	15,44 ± 3,83
Mikrosfer GSH _{-surf}	55,12 ± 5,85
5 (kontrol)	72,03 ± 0,59

Tabel 5.19 Nilai *sig* analisis pengaruh surfaktan mendekati log P 2-3 dan pembentukan mikrosfer terhadap penurunan ekspresi MMP-1

Variabel	Perbandingan	Nilai Sig Analisis Statistik
Penambahan Surfaktan	Glut _{+surf} : Glut _{-surf}	0,000
Pembentukan Mikrosfer	Mikrosfer Glut _{+surf} : Mikrosfer Glut _{-surf}	0,000
	Mikrosfer Glut _{+surf} : Glut _{-surf}	0,000

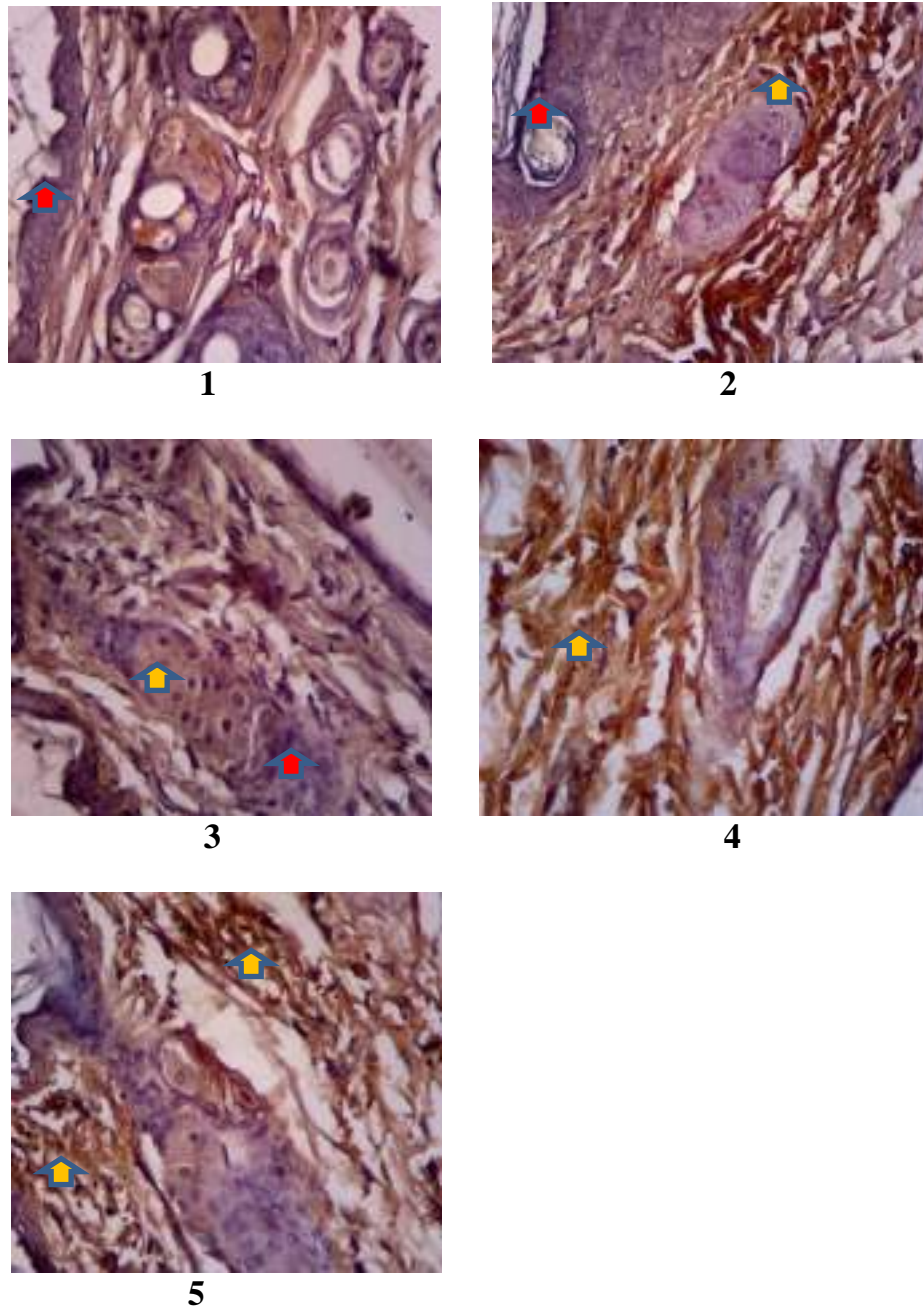
Pada analisis pengaruh penambahan surfaktan terhadap kadar MMP-1 diperoleh nilai *sig* sebesar $0.000 < 0,05$ untuk perbandingan kelompok glutation_{+surf} dan glutation_{-surf}. Sedangkan analisis pengaruh pembentukan mikrosfer terhadap penurunan ekspresi MMP-1 diperoleh nilai *sig* sebesar $0,000 < 0,05$ untuk perbandingan kelompok mikrosfer glutation_{+surf} dan mikrosfer glutation_{-surf} serta nilai *sig* sebesar $0,000 < 0,05$ untuk perbandingan kelompok mikrosfer

glutaion + surf dan glutation -surf. Dari hasil analisis tersebut didapatkan nilai *sig* lebih kecil dari 0,05 yang menunjukkan adanya perbedaan bermakna, Kemudian dilanjutkan analisis menggunakan metode *Design of Experiment* (DoE) untuk mengetahui interaksi antara penambahan surfaktan dengan pembentukan mikrosfer. Grafik pareto interaksi antara surfaktan dengan mikrosfer dapat dilihat pada gambar 5.14.



Gambar 5.14 Grafik Pareto Hubungan Surfaktan dengan Mikrosfer terhadap MMP-1

Pada grafik pareto (gambar 5.14) berarti tidak ada interaksi antara penambahan surfaktan dan pembentukan mikrosfer. Namun, penambahan surfaktan paling mempengaruhi dalam penurunan ekspresi MMP-1, sedangkan mikrosfer hanya sedikit mempengaruhi penurunan ekspresi MMP-1.



Gambar 5.12 Ekspresi MMP-1 Jaringan Dermis Mencit dengan Pengecatan Imunohistokimia (1) dioles gel glutation_{+surf}, (2) dioles gel glutation_{-surf}, (3) dioles gel mikrosfer glutation_{+Surf}, (4) dioles gel mikrosfer glutation_{-surf}, (5) dioles basis gel (Perbesaran 400x).Tanda panah kuning menunjukkan sel fibroblas yang mengekspresikan MMP-1 (sitoplasma disekitarnya berwarna keunguan sampai kecoklatan), sedangkan tanda panah berwarna merah menunjukkan sel fibroblas (sitoplasma disekelilingnya berwarna kebiruan) yang tidak mengekspresikan MMP-1

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada penelitian kali ini dilakukan penentuan peningkatan lipofilisitas (Log P) glutation akibat pengaruh surfaktan dengan berbagai HLB. Kemudian membandingkan daya penetrasi (efektivitas) glutation dari sistem mikrosfer dengan glutation tanpa dibuat sistem mikrosfer ditinjau dari penurunan kadar MMP-1 pada kulit mencit balb-c. Serta membandingkan stabilitas mikrosfer glutation dengan glutation tanpa dibuat mikrosfer secara *in vitro*.

Berdasarkan pemeriksaan organoleptis, glutation berwarna putih, tidak berbau, sesuai dengan spesifikasi organoleptis glutation yang tercantum dalam spesifikasi produk glutation. Pada pemeriksaan spectrum IR, glutation memberikan puncak serapan spesifik yang menunjukkan adanya gugus amina (N-H) pada $3347,32\text{ cm}^{-1}$, O-H stretching pada $3252,33\text{ cm}^{-1}$, S-H stretching pada $2525,33\text{ cm}^{-1}$, Amida pada $1661,24\text{ cm}^{-1}$. Bilangan gelombang tersebut sesuai dengan pustaka yang menyatakan puncak spesifikasi glutation secara berurutan adanya gugus amina (N-H) pada 3400 cm^{-1} , O-H stretching pada $3400\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$, S-H stretching pada $2500\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$, Amida pada $1670\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. Pada pengamatan DSC menunjukkan hasil suhu lebur glutation sebesar $202,56^\circ\text{C}$ yang sesuai dengan suhu lebur glutation pustaka yaitu 198°C (Jam *et al.*, 2009).

Identifikasi organoleptis Na-alginat berupa serbuk tidak berbau, tidak berasa dan berwarna kuning kecoklatan, sesuai dengan pustaka yaitu, serbuk tidak berbau dan tidak berasa, berwarna putih sampai coklat pucat kekuningan (Jaya *et al.*, 2010). Pada pemeriksaan spektrum IR menunjukkan Na-alginat memberikan

puncak serapan spesifik yang menunjukkan adanya gugus garam karboksilat ($1634,47\text{ cm}^{-1}$, $1419,59\text{ cm}^{-1}$), C-O *stretching* ($1099,62\text{ cm}^{-1}$, $950,66\text{ cm}^{-1}$), C-O-C *stretching* ($1034,61\text{ cm}^{-1}$), dan sidik jari guluronat ($883,42\text{ cm}^{-1}$). Hasil pengamatan tersebut sesuai dengan pustaka bahwa gugus spesifik Na-alginat terdiri dari gugus garam karboksilat (1620 cm^{-1} , 1420 cm^{-1}), C-O *stretching* (1090 cm^{-1} , 950 cm^{-1}), C-O-C O *stretching* (1020 cm^{-1}), dan sidik jari guluronat (900 cm^{-1} - 980 cm^{-1}) (Jaya *et al.*, 2010). Pada pengamatan temogram DTA Na-alginat, di dapat puncak eksoterm pada suhu $238,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ yang sesuai dengan pustaka yaitu, $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ menurut Manjanna *et al.*, (2010).

Pada identitas CaCl_2 berupa serpihan berwarna putih, keras dan tidak berbau menunjukkan hasil pengamatan sesuai dengan pustaka dari Farmakope Indonesia edisi V (2015), yaitu berupa granul atau serpihan putih, keras, dan tidak berbau. Hasil temogram DTA CaCl_2 menunjukkan puncak lebur berada pada suhu $176,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ yang juga sesuai dengan pustaka yaitu 180 - $200,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Manjanna *et al.*, 2010).

Hasil identifikasi organoleptis *lyoprotectant* yang digunakan yaitu maltodekstrin, berupa serbuk berwarna putih, berbau khas maltodekstrin, dan tidak manis. Identifikasi tersebut sesuai dengan sertifikat analisis matodekstrin berupa serbuk berwarna putih, berbau khas maltodekstrin, dan memiliki rasa sedikit manis atau tidak manis. Hasil termogram DTA maltodekstrin menunjukkan puncak leburnya pada suhu $185,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ yang masuk dalam rentang lebur dalam pustaka yaitu 40 - $185\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Garnero *et al.*, 2013). Hasil spektra IR menunjukka maltodekstrin memiliki gugus polisakarida (C-O *stretching*) pada

1024,26 cm^{-1} , 1078,33 cm^{-1} dan 1153,34 cm^{-1} serta OH *stretching* pada 3432,5 cm^{-1} . Hasil tersebut sesuai dengan pustaka yaitu gugus polisakarida (C-O *stretching*) pada rentang 980-1200 cm^{-1} , dan OH *stretching* pada 3400 cm^{-1} .

Setelah semua bahan baku dinyatakan sesuai dengan pustaka, langkah berikutnya adalah penentuan koefisien partisi terhadap glutation yang telah ditambah surfaktan dan di *freeze dry*, untuk itu diperlukan penentuan waktu kesetimbangan partisi glutation dalam fase air dan oktanol. Waktu kesetimbangan adalah waktu yang diperlukan oleh suatu zat untuk mencapai keadaan jenuhnya, yang diperlukan sebagai dasar penentuan waktu kelarutan suatu bahan obat. Pada penelitian ini, penentuan waktu kesetimbangan dilakukan dengan menggunakan pelarut dapar fosfat pH $6,0 \pm 0,05$ jenuh oktanol dan larutan oktanol jenuh dapar fosfat pH $6,0 \pm 0,05$ pada suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ dengan pengambilan sampel setiap satu jam selama tujuh jam dimulai dari jam ketiga (lampiran 9). Setelah dilakukan perhitungan kadar dapat diketahui waktu kesetimbangan partisi glutation adalah pada jam kelima (gambar 5.3). Hal ini dibuktikan dengan harga uji anova pada jam ke 5,6, dan 7 tidak berbeda bermakna ($\text{sig} > 0,05$).

Setelah didapatkan waktu kesetimbangan, dilakukan uji penentuan koefisien partisi. Koefisien partisi merupakan perbandingan kelarutan suatu bahan obat dalam fase minyak dan fase air, yang dapat digunakan untuk memprediksi kemampuan bahan aktif menembus membran kulit untuk mencapai reseptor (Banker dan Rhodes, 1979).

Berdasarkan hasil penelitian (gambar 5.3) diketahui bahwa penambahan surfaktan HLB 7 pada glutation dapat meningkatkan lipofilisitas glutation yang

mendekati lipofilisitas kulit ($\log P$ 2-3). Pada penelitian ini proses pembentukan misel diperlukan penambahan etanol sebagai co-surfaktan. Pada penambahan surfaktan $HLB < 7$ didapatkan hasil tidak sesuai dengan hipotesis. Hal tersebut disebabkan glutation bersifat hidrofilik sedangkan surfaktan yang ditambahkan bersifat lipofilik sehingga pada proses *freeze drying* ketika etanol menguap membuat surfaktan tidak mampu bekerja untuk membentuk misel. Hal tersebut menyebabkan pada sampel $HLB < 7$ yang terjadi adalah seperti campuran fisik. Sementara itu, pada penambahan $HLB \geq 7$ pada glutation hasil yang didapatkan sesuai hipotesis. Hal tersebut karena glutation bersifat hidrofilik sehingga pada penambahan surfaktan $HLB \geq 7$, glutation dengan mudah masuk ke dalam struktur misel. Penguapan etanol pada proses *freeze drying* tidak berpengaruh pada sistem misel yang telah terbentuk.

Setelah didapatkan glutation dengan lipofilisitas yang meningkat mendekati lipofilisitas kulit, yaitu pada kombinasi dengan surfaktan HLB 7, selanjutnya dilakukan peningkatan stabilitas dengan cara dibuat sediaan mikrosfer. Proses mikroenkapsulasi dapat melindungi bahan aktif terhadap degradasi kimia atau enzimatik (Xiao *et al.*, 2014).

Pembuatan mikrosfer glutation-alginat dilakukan pada glutation yang telah diupayakan lipofilisitasnya menggunakan surfaktan (glutation_{+surf}) dan glutation tanpa peningkatan lipofilisitas (glutation_{-surf}). Metode pembuatan mikrosfer menggunakan metode gelas ionotropik dengan teknik aerosolisasi. Pada pembuatan mikrosfer terdapat proses pencucian. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan kelebihan CaCl_2 yang tidak bereaksi dengan natrium alginat

karena CaCl_2 yang berlebih dapat menurunkan efisiensi penjemakan (Balasubramaniam *et al.*, 2007). Pengecekan mikrosfer telah bebas dari sisa CaCl_2 dengan meneteskan H_2SO_4 ke dalam air cucian mikrosfer. Jika sudah tidak terbentuk endapan CaSO_4 yang berwarna putih maka mikrosfer dikatakan sudah bebas dari sisa CaCl_2 . Proses pencucian dilakukan dengan menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 2500 rpm selama 6 menit. Tujuan penggunaan *centrifuge* pada tahap pencucian mikrosfer adalah untuk memudahkan proses pencucian mikrosfer.

Setelah mikrosfer bebas dari sisa CaCl_2 , mikrosfer dikumpulkan selanjutnya diberi maltodekstrin 1,5% berat mikrosfer basah. Pemberian maltodekstrin sebagai lioprotektan ditujukan untuk menstabilkan mikrosfer dari tekanan selama proses *freeze drying* dalam *water replacement hypothesis* (Alpert *et al.*, 2000). *Water replacement hypothesis* adalah mekanisme stabilisasi yang terjadi selama proses *drying*. Maltodekstrin menempati (mensubstitusi) molekul air dengan membentuk ikatan hidrogen antara maltodekstrin dengan gugus polar pada permukaan mikrosfer pada akhir proses *drying*, sehingga mikrosfer akan terlindungi dari stress mekanik dan dapat mencegah agregasi selama proses *freeze drying*. Selain itu juga berperan dalam hal pembentukan permukaan mikrosfer (Nirmala, 2014).

Setelah proses *freeze drying*, mikrosfer diamati organoleptisnya. Kedua formula memiliki organoleptis berupa serbuk, berwarna putih, dan tidak berbau. Evaluasi karakteristik mikrosfer yang dilakukan adalah ukuran mikrosfer,

morfologi bentuk dan permukaan mikrosfer, spektrofotometri IR, pemeriksaan efisiensi penjebakan, pemeriksaan kandungan glutathione, dan penentuan *yield*.

Evaluasi pertama yang dilakukan adalah distribusi ukuran mikrosfer. Evaluasi distribusi ukuran mikrosfer dilakukan pada mikrosfer basah dengan menggunakan mikroskop optik sebanyak 300 partikel. Distribusi ukuran mikrosfer dinyatakan dalam rata-rata *diameter volume surface* (dvs) yang sesuai untuk sediaan serbuk farmasi yang distribusinya tidak normal (Alpert *et al*, 2000). Dari hasil perhitungan pada penelitian ini didapatkan diameter rata-rata pada masing-masing formula yaitu 1,4 μm (F1), 1,58 μm (F2). Ukuran mikrosfer alginat tanpa glutathione adalah 1,34 μm . Mikrosfer tanpa bahan obat memiliki ukuran paling kecil dibandingkan kedua formula tersebut. Hal ini karena belum dimuati bahan obat. Dari keseluruhan formula tersebut menghasilkan ukuran partikel kurang dari 200 μm . Dari ketiga formula, memiliki indeks polidispersitas 0,003. Hasil indeks polidispersitas yang didapatkan lebih kecil dari 0,3 mengindikasikan sampel tersebut memiliki distribusi yang sempit (*monodisperse*) atau ukuran dinyatakan seragam (Yen *et al.*, 2008).

Hasil pemeriksaan bentuk dan permukaan mikrosfer dilakukan dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Dalam perbesaran yang sama menunjukkan bahwa mikrosfer F1 memiliki bentuk permukaannya tidak rata. Hal tersebut karena proses sublimasi air glutathione _{+surf} tidak dapat kering seluruhnya dibuktikan dari kadar MC pada F1 8,25%, sedangkan kadar MC pada F2 lebih kecil, yaitu sebesar 2,65%. Proses sublimasi F1 tidak optimal, karena mikrosfer mengandung surfaktan yang berpotensi untuk menarik air. Sedangkan,

pada permukaan mikrosfer F2 memiliki bentuk permukaannya halus dan rata. Hal tersebut karena pada saat proses sublimasi, air dalam mikrosfer dapat keluar lebih banyak. Selanjutnya posisi air tersebut akan ditempati oleh maltodekstrin sebagai lioprotektan.

Permukaan mikrosfer F1 dan F2 menjadi sferis karena adanya penambahan maltodekstrin yang bekerja dengan cara menutup rongga atau pori pada permukaan mikrosfer yang meningkat jumlah maupun ukurannya selama proses *freeze drying*, melalui pembentukan ikatan hidrogen dengan gugus polar pada permukaan mikrosfer (Dubey *et al.*, 2009). Pada mikrosfer yang tidak mengandung surfaktan permukaan mikrosfer menjadi halus dan sferis karena posisi air yang telah menguap digantikan oleh maltodekstrin. Sementara itu pada F1 yang mengandung surfaktan pada proses liofilisasi masih memungkinkan adanya air yang tertahan pada surfaktan.

Dari hasil pemeriksaan spektra-IR kedua formula, serapan gugus spesifik glutation masih terdapat di semua formula yang mengartikan bahwa glutation terjerap di dalam sistem mikrosfer dan tidak bereaksi dengan alginat. Pada pemeriksaan serapan gugus spesifik Na-alginat, sidik jari guluronat menghilang pada semua formula dan serapan gugus garam karboksilat masih terdapat pada semua formula, namun satu dari dua serapannya yaitu 1614 cm^{-1} menghilang. Bilangan gelombang gugus garam karboksilat pada F1 dan F2 secara berurutan yaitu $1423,52\text{ cm}^{-1}$; $1421,25\text{ cm}^{-1}$. Hilangnya satu serapan pada gugus garam karboksilat dan sidik jari guluronat dikarenakan terjadinya reaksi sambung silang

antara alginat dengan *crosslinker* (CaCl_2) yang melibatkan pertukaran ion pada gugus karboksilat dari asam guluronat dengan Ca^{2+} dari *crosslinker*.

Pemeriksaan efisiensi penjejakan dan *drug loading* diawali dengan pembuatan kurva baku glutation dalam Na sitrat 0,5 M pH 8,5. Larutan Na Sitrat dipilih sebagai media karena mampu memecah mikrosfer dengan mengganti Ca^{2+} pada ikatan sambung silang Ca karboksilat dengan Na^+ sehingga membuat alginat kembali larut dan glutation larut dalam sitrat. Glutacion yang terlarut kemudian diukur absorbannya dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 412 nm yang merupakan panjang gelombang maksimal glutacion dalam larutan Na Sitrat. Data pemeriksaan kandungan glutacion dalam mikrosfer diperoleh hasil (dalam persen) $F1 = 8,623 \pm 0,12$; $F2 = 7,81 \pm 0,22$. Hasil pemeriksaan efisiensi penjejakan $F1 = 54,46 \pm 2,40\%$; $F2 = 48,49 \pm 2,37\%$. Dari hasil tersebut terlihat bahwa jumlah obat 500mg belum dapat dijebak seluruhnya oleh alginat pada konsentrasi 2%. Kandungan bahan obat yang dihasilkan masih relatif sangat rendah, hal ini disebabkan karena kapasitas mikrosfer mempunyai kapasitas maksimal untuk menjerap bahan obat pada konsentrasi alginat tertentu karena untuk menghasilkan jumlah obat yang terperangkap optimal pada mikrosfer maka harus dalam jumlah polimer dan *crosslinking* yang sesuai (Patil *et al.*, 2010). Pada penelitian ini jumlah polimer yang digunakan yaitu 1 gram sehingga memungkinkan untuk penjerapan tidak bisa optimal saat jumlah bahan obat melebihi 0,5 gram. Setelah dilakukan uji anova didapatkan hasil tidak berbeda bermakna ($\text{sig} > 0,05$) karena konsentrasi alginat dan CaCl_2 yang digunakan dari

kedua formula adalah sama, dan penambahan surfaktan pada glutation tidak berpengaruh pada efisiensi penjebaran mikrosfer.

Hasil perhitungan perolehan kembali mikrosfer (yield) F1= 94,03±3,07%; F2= 93,34±3,65%. Dari hasil tersebut terlihat bahwa tidak ada perbedaan *yield* antara F1 dan F2 karena jumlah konsentrasi alginat dan CaCl₂ pada kedua formula sama. Penentuan perolehan kembali (yield) bertujuan untuk mengetahui jumlah perolehan kembali mikrosfer kering dari jumlah bahan awal yang ditambahkan dalam pembuatan mikrosfer (polimer dan bahan aktif) (Oktaviana, 2015).

Pada penelitian lebih lanjut disarankan melakukan penelitian tentang kapasitas maksimum mikrosfer agar mendapatkan kandungan (*drug loading*), efisiensi penjebaran, perolehan kembali (yield) yang tinggi dengan jumlah polimer alginat dan penyambung silang CaCl₂ yang sesuai dengan jumlah bahan obat, serta ditambahkan uji pelepasan untuk membuktikan pengaruh dari penjerapannya.

Mikrosfer yang telah didapatkan kemudian dilakukan uji stabilitas yang bertujuan untuk mengetahui stabilitas glutation setelah dimikrosfer. Setelah uji stabilitas diketahui glutation mengikuti orde satu karena plot grafik log Ct terhadap t menghasilkan garis yang lurus atau linieritas mendekati 1 (Martin *et al.*, 1993). Berdasarkan harga k masing-masing bahan (tabel 5.17) diketahui bahwa mikrosfer glutation _{+surf} lebih stabil daripada glutation _{+surf} dan mikrosfer glutation _{-surf} lebih stabil daripada glutation _{-surf}. Hal ini sesuai dengan tujuan mikroenkapsulasi yaitu melindungi glutation dari reaksi oksidasi (Johnson *et al.*, 2012).

Mikrosfer yang didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam basis gel untuk dilakukan uji penetrasi yang dilihat dari penurunan kadar MMP-1 pada kulit mencit dengan penyinaran UV 2 hari sekali dengan dosis setiap penyinarannya 60mJ/m^2 . Semua gel diaplikasikan ke kulit 2 kali sehari, yaitu 20 menit sebelum disinari (untuk memberikan waktu absorpsi bahan topikal ke dalam kulit) dan 4 jam setelah penyinaran (terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) mulai 4 jam setelah paparan). Aplikasi bahan topikal tetap dilakukan pada hari tanpa penyinaran. Basis gel dipilih karena mikrosfer bersifat hidrofilik sehingga tepat menggunakan gel sebagai basis pembawa yang memiliki efek pendinginan pada kulit saat digunakan, elastis, mudah dicuci dengan air, kemampuan penyebarannya pada kulit baik (Lachman, 1994).

Uji efektivitas yang ditinjau dari penurunan ekspresi MMP-1 dianalisis menggunakan program SPSS 23 dan metode *factorial design* dan program Minitab 17 dengan metode *design of experiment*. Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan *factorial design* didapatkan nilai *sig* yang diperoleh sebesar $0,000 < 0,05$ untuk perbandingan kelompok glutation_{+surf} dan glutation_{-surf} menunjukkan ada perbedaan bermakna. Sedangkan analisis pengaruh pembentukan mikrosfer terhadap penurunan ekspresi MMP-1 diperoleh nilai *sig* sebesar $0,000 < 0,05$ untuk perbandingan kelompok mikrosfer glutation_{+surf} dan mikrosfer glutation_{-surf}. Nilai *sig* sebesar $0,000 < 0,05$ untuk perbandingan kelompok mikrosfer glutation_{+surf} dan glutation_{-surf} menunjukkan ada perbedaan bermakna (lampiran 21). Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahan glutation_{+surf} lebih efektif daripada glutation_{-surf} dan mikrosfer glutation_{+surf} lebih efektif daripada mikrosfer glutation_{-surf}. Hal ini karena glutation dengan

penambahan surfaktan HLB 7 dapat meningkatkan lipofilisitasnya mendekati log P 2-3 sehingga mampu berpenetrasi menembus stratum korneum hingga masuk ke dalam jaringan dermis. Selanjutnya dilakukan hasil analisis menggunakan DoE pada grafik pareto (gambar 5.15) menggambarkan tidak ada interaksi antara penambahan surfaktan dengan pembentukan mikrosfer. Namun penambahan surfaktan paling mempengaruhi dalam penurunan ekspresi MMP-1, sedangkan mikrosfer hanya sedikit pengaruhnya terhadap penurunan ekspresi MMP-1. Hal tersebut menunjukkan penambahan surfaktan HLB 7 tanpa pembentukan mikrosfer dapat menurunkan ekspresi MMP-1, namun dari uji stabilitasnya didapatkan hasil yang tidak stabil. Sehingga perlu pembentukan mikrosfer untuk meningkatkan efektivitas glutation_{+surf}.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Penambahan HLB surfaktan mempengaruhi lipofilisitas glutation, penambahan surfaktan HLB 7 pada glutation mengakibatkan lipofilisitasnya mendekati lipofilisitas kulit (Log P 2-3).
2. Penetrasi glutation dengan HLB 7 dan mikrosfer glutation HLB 7 meningkat dibanding glutation tanpa perlakuan, mikrosfer glutation ditinjau dari penurunan ekspresi MMP-1 kulit mencit galur balb-c.
3. Pembentukan sistem mikrosfer alginat-glutation meningkatkan stabilitas glutation dibanding glutation yang tidak dimikrosfer.

7.2 Saran

1. Penelitian lebih lanjut tentang kapasitas maksimum mikrosfer agar mendapatkan kandungan (*drug loading*), efisiensi pengebakan, perolehan kembali (*yield*) yang tinggi dengan jumlah polimer alginat dan penyambung silang CaCl₂ yang sesuai dengan jumlah bahan obat.
2. Penelitian lebih lanjut terkait dengan uji pelepasan mikrosfer glutation-alginat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agnihotri SA, Nadagounda N, Mallikarjuna, Tejraj M, Aminabhavi. 2004. **Recent advances on chitosanbased micro and nanoparticles in drug delivery**. p. 5-28
- Agral, O., Fatimawali, Yamlean, P., Sri, H., 2013. **Formulasi dan Uji Kelayakan Sediaan Krim Anti Inflamasi Getah Tanaman Patah Tulang (Euphorbiatirucalli L)**. Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT, 2(3)
- Alagusurandam, M., Madhu Sudana Chetty, C., Umashankari, K., Attuluri, V.B., Lavanya, C., Ramkanth, S., 2009. Microspheres as a novel drug delivery system. **International Journal of ChemTech Reserch**, 1(3), p. 526-534
- Alexandridis, K. Andersson, 1997. Effect of solvent quality on reverse micelle formation and water solubilization by poly(ethylene oxide) poly(propylene oxide) and poly (ethylene oxide) poly(butylene oxide) block copolymers in xylene, **J. Colloid Interface Sci.**, p. 166–173
- Anief, Moh. 1999. **Ilmu Meracik Obat**. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press
- Ansel, H.C. 1989. **Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi**. Jakarta : UI Press
- Balasubramaniam, J., Vinay U. Rao, M. Vasudha, Jeevan Babu, P.S. Rajinikanth. 2007. Sodium alginate microspheres of metformin HCl: Formulation and In Vitro Evaluation. **Current Drug Delivery**, 4(3), p. 249-256
- Banker, G.S. and Rhodes, C.T., 1995. **Modern Pharmaceutics**. New York-Basel : Marcel Dekker Inc., p. 576
- Barry, B.W.. 2002. Drug Delivery Routes In Skin: A Novel Approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 54 Suppl. 1, p. S31–S40
- Baumann, L. and Saghari, S. 2009. Photoaging. In : Baumann, Leslie, editors. **Cosmetic Dermatology**. 2nd. Ed. New York : McGraw-Hill, p. 34-41
- Benson, A.E.H. dan Watkinson, C.A., 2012. Transdermal and Topical Drug Delivery : Principles and Practice, First Edition. ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Berard, F., Marty, J., P., Nicolas, J., F., 2003. Allergen Penetration Through The Skin. **European Journal of Dermatology**, 13 (4), p. 324-330
- Berneburg, M., Plettenberg, H., Krutmann, J. 2000. Photoaging of Human Skin. **Photodermatology, Photoimmunology, & Photomedicine**, 16, p. 239-244

- Bjerketorp, J., S. Hakansson, S. Belkin & A. K. Jansson. 2006. Advances in preservation methods: Keeping biosensor microorganisms alive and active. **Biotechnology**, **17**: 1-7.
- Bniarie, D. 2014. Pemberian Krim Ekstrak Biji Markisa Dosis 25%, 50%, 100% Menurunkan Kadar MMP-1 dan Meningkatkan Jumlah Kolagen pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Sinar UV-B. *Tesis*. Denpasar : Universitas Udayana
- Bozkurt, Y. 2005. Relationship between body conection and spermatological properties in scaly carps (*Cyprinus carpio*) semen. **Journal of Animal and Veterinary Adveneer** **5**(5): 412-414
- Bronaugh, R. L., & Maibach, H. I. 2005. **Percutaneous absorption: Drugs, cosmetics, mechanisms, methodology**. Boca Raton: Taylor & Francis
- Brockbank, K. G. M., J. C. Covault & M. J. Taylor. 2007. **Cryopreservation guide**. Thermo Fisher Inc., South Carolina: v + 30 hlm.
- Cairns, Donald, 2004, **Intisari Kimia Farmasi**, Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Camera E, Picardo M. **Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes**. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., 781(1-2), p. 181-206
- Chabib, L., Martien, R., Ismail, ., 2011. Indonesian J. Pharm. **Formulation of Nanocurcumin Using Low Viscosity Chitosan Polymer and Its Cellular Uptake Study Into T47D Cells**, 23(1), p. 27-35
- Chen, Y., Z. Shen, H. Frey, J. Perez-Prieto, S.-E. 2005. **Stiriba, Synergistic assembly of hyperbranched polyethylenimine and fatty acids leading to unusual supramolecular nanocapsules**, p. 755–757
- Cho,T.H., Lee, J.W., Lee, M.H. 2008. Evaluating the Cytotoxic Doses of Narrowband and Broadband UV-B in Human Keratinocytes, Melanocytes, and Fibroblas. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, **(24)**, p. 110-114
- Choudhury, Pratim K. dan Mousumi Kar. 2009. Controlled release metformin hydrochloride microspheres of ethyl cellulose prepared by different methods and study on the polymer affected parameters. **Journal of Microencapsulation**, 26(1), p. 46-53
- Cooper, J.D. Londono, G. Wignall, J.B. McClain, E.T. Samulski, J.S. Lin, A. Dobrynin, M. Rubinstein, A.L.C. Burke, J.M.J. Frechet, J.M. Desimone,

1997. Extraction of a hydrophilic compound from water into liquid CO₂ using dendritic surfactants, **Nature** (389), p. 368-371
- Cunningham, W. B. R and Maibah, H. 2005. Aging and Photoaging. **In : Textbook of Cosmetic Dermatology**. Francis Taylor 3 rd ed. London. p. 443
- Depkes RI. 2014. **Farmakoepi Indonesia**. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Ermawati Dian, Joshita Djajadisastra, Iskandarsyah. 2012. **Formulasi Gel Transfersom Glutation sebagai Antioksidan dan Uji Penetrasi Menggunakan Sel Difusi Franz** THESIS. Jakarta : Universitas Indonesia
- Dickinson DA, Forman HJ. 2002. **Glutathione in defense and signaling: Lessons from a small thiol**.(973), p. 488-504
- Dustgani A, Ebrahim V, Mohammmd I. 2008. Preparation of chitosan nanoparticles loaded by dexamethasone phosphate. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 4(2), p. 111-4
- Exner R, Wessner B, Manhart N, Roth E. 2000. Therapeutic potential of glutathione. **Wien Klin Wochenschr**. 112, p. 610-6
- FDA. 2005. **ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product**. USA : FDA, p. 1-9
- Gadri A, Sasanti TD, Rahmat M, Maria M., 2012, Formulasi Sediaan Tabir Surya dengan Bahan Aktif Nanopartikel Cangkang Telur Ayam Broiler, **Jurnal Matematika & Sains**, 17 (3)
- Goglen, K. E. and Hatton, T. A., 1987. **Separation Science and Technology**, p. 831. New York: Marcel Sekker
- Goundanavar, P. S., R. S. Bagali, Chandrashekhara S., S. M. Patil. 2010. Design and characterization of diclofenac sodium microbeads by ionotropic gelation technique. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 1(2), p. 1-10
- Goindi S., Kumar G., Kumar N., Kaur A. 2013. Development of Novel Elastic Vesicle-Based Topical Formulation of Cetirizine Dihydrochloride for Treatment of Atopic Dermatitis. **AAPS PharmSciTech**. 10.1208/s12249-013-0017-3
- Grampurohit,N, Padmini, R.,and Rashmi, M., 2009. Microemulsions For Topical Use – A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**

- Grega Klančnik, Jožef Medved, Primož Mrvar. 2009. **Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation**. RMZ – Materials and Geoenvironment. 57(1), p. 127–142
- Grey V, Mohammed SR, Smountas AA, Bahlool R, Lands LC. 2003. **Improved glutathione status in young adult patients with cystic fibrosis supplemented with whey protein**. 2, p. 195-8
- Guilford F.T, Palo Alto, CA ; Brian C. Keller, Antioch, CA. 2012. **Liposome-Encapsulated Glutathione For Oral Administration**
- Gupta, R., and Kompela, U., 2006. **Nanoparticle Technology for Drug Delivery**. New York : Taylor & Francis Group
- Halliwell B and J. M. C. Gutteridge, 1989. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford, UK : Clarendon Press
- Hansch, C., dan Dunn, W.J., 1971, **Quantitative Structure – Activity Relationship in Drug Design**, New York : Academic Press, 1, p. 271-342
- Hariyadi, Dewi Melani, Tutiek Purwanti, Rahma Nita Nirmala. 2014. Effect of Lactose and Maltodextrin on The Physical Characteristics of Ovalbumin-loaded Alginate Microspheres Produced by Aerosolization. **2nd Annual International Conference on Pharmacology and Pharmaceutical Sciences**. 5(2), p. 26-29
- ICH, 2003, **Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2)**, <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA419>
- Katritzky, A.R., Karelson, M., dan Lobanov, V.S., 1996, **Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies**, J. Am. Chem. Soc. 96 (3), p. 1027-1044
- Kim D, Young IJ, Mi-Kyeong J, Jun-Kyu P, HakSu J, Min-Ja J, Joong-Kuen K, Dong-Hyuk S, JaeWoon N. 2006. Preparation and characterization of Retino-encapsulated chitosan nanoparticle. **Journal Applied Chemistry**. 10(1), p. 65-8
- Komisi Nasional Etik Penelitian Kesehatan (KNEPK). 2011. **Buku Ajar Penelitian Kesehatan**. Malang : Universitas Brawijaya Press
- Koo SH, Ji-Soo Lee, Gun-Hee Kim, and Hyeon Gyu Lee. 2011. **Preparation, Characteristics, and Stability of Glutathione-Loaded Nanoparticles**, 59 (20)

- Kramer, M., J.-F. Stumbé, H. Türk, S. Krause, A. Komp, L. Delineau, S. Prokhorova, H. Kautz, R. Haag, 2002. **pH-responsive molecular nanocarriers based on dendritic core– shell architectures**, *Angew. Chem. Int. p.* 4252–4256
- Kuo, Catherine K., Peter X. Ma. 2001. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. **Biomaterials**, 22(6), p. 511-521
- Kusantati, H., Prihatin, P. T. & Wiana, W., 2008, **Tata Kecantikan Kulit**, 1 (96) (109), p. 112-113, Jakarta : Direktorat Pembinaan Sekolah Menengah Kejuruan
- Lachman L, H.A. Lieberman, dan J.L. Kanig. 1994. **Teori dan Praktek Farmasi Industri**. Penerjemah: Suyatmi S dan Aisyah I, p. 1049-1088;1091- 1145. Jakarta: UI Press
- Lachman, L. Herber, A, Lieberman, Joseph L, dan Kanig, 1986, **Teori dan Praktik Farmasi Industri**, diterjemahkan oleh Siti Suyatmi Edisi III., p. 624-947, 957. Jakarta : UI Press
- Langley, & Lenny Lester. 1958. **Dynamic anatomy and physiology**. USA : Mc Graww Hill
- Laura T. Rodriguez Furlan, Antonio Perez Padilla, Mercedes E. Campderros. 2010. Inulin like lyoprotectant of bovine plasma proteins concentrated by ultrafiltration. **Food Research International**, 43(3), p. 788-796
- Lee, Kuen Yong, David J. Mooney. 2012. Alginate: Properties and Biomedical Applications. **Progress in Polymer Science**, 37(1), p. 106-126
- Lindman, B, and Stilbs, P., 1984, **Surfactants in Solution**, p. 1651. New York : Plenum Press
- Luisi, P. L. Meier, P., Imre, V. E.. and Pande, A, 1984, **Reverse Micelles**, p. 323. New York : Plenum Press
- Lund, W. 1994. **The Pharmaceutical Codex**. London : The Pharmaceutical Press
- Malwina Lachowicz , Michał Kołodziejczyk , Marek Lukosek , Jacek Kosno, Paulina Olszewska and Paweł Szymanski . 2016. **New Biopolymer Nanoparticles Improve the Solubility of Lipophilic Megestrol Acetate**, p. 197

- Matejtschuk, P. 2007. Lyophilization of protein. *Dalam*: Day, J. G. & G. N. Stacey. 2007. **Cryopreservation and freeze-drying protocol**. 2nd ed. Humana Press Inc., New Jersey: xi+347 hlm
- Martin, A., Bustamante, P., & Chun, A.H.C., 1993, **Physical Pharmacy**, p. 324-361, Philadelphia, London : Lea and Febiger
- Martin, M., 2002. **Surfactans and Polymers in Drug Delivery**. New York : Marcel Dekker, Inc Mehta, R., 2004. **Topical and Transdermal Drug Delivery What a Pharmacist Needs to Know**
- Meister A, Tate SS. 1976. **Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization**. (45), p. 559-604
- Meschino, P. J. 2003. UV Light, **Skin Cancer and Photo-Aging : Nutritional Antioxidant Protection**
- Meydani,S.N., Wu, D., Santos, MS., Hayek, M,G. 1995. Antioxidants and immune response in aged persons: Overview of present evidence. **American Journal of Clinical Nutrition**, 62 (6): 1462S.
- Mohanraj and Chen, 2006, Nanoparticles – A Review, **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 5 (1), p. 561-573
- Montenegro L.,Bonina F., Rigand L., Giogill S.. P. 1995. Protective effect evaluation of free radical scavengers on UVB induced human cutaneous erythema by skin reflectance spectrophotometry. **International Journal of Cosmetic Science**. 1(37), p. 91-103
- Muchtadi, D. 2013. **Antioksidan dan Kiat Sehat di Usia Produktif**. Bandung : Alfabeta
- Murray RK. 2009. Metabolism of xenobiotics. In: Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA, editors. **Harper's Illustrated Biochemistry**, p. 612-3. Michigan: McGraw-Hill
- Nogrady T., 1992, Kimia Medisinal : **Pendekatan secara Biokimia**, p. 2-7. Bandung : ITB
- Obagi, Z.E. 2000. **Skin Health Concepts, in Obagi Skin Health Restoration & Rejuvenation**, p. 27-45
- Oktaviana, W. 2015. Karakterisasi Mikropartikel Natrium Alginat yang Mengandung Serbuk Getah Pepaya yang dipreparasi dengan Metode Gelasi Ionik. **Skripsi**. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah.

- Park ES, Chang SY, Hahn M, Chi SC. 2009. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen. **International Journal Of Pharmaceutics** (209), p. 109–19
- Park EY, Shimura N, Konishi T, Sauchi Y, Wada S, Aoi W, *et al.* 2009. Increase in the protein-bound form of glutathione in human blood after the oral administration of glutathione. **Journal Agriculture Food Chemistry**. 62, p. 6183-9
- Pasquali, R. C., Taurozzi, M. P., & Bregni, C. 2008. Some Considerations About the Hydrophilic–Lipophilic Balance System. **International Journal of Pharmaceutics**,356(1), 44-51
- Purcell, W.P., and George, E.B., 1973, **Strategy of Drug Design, A Guide to Biological Activity**, p. 126-145, New York : John Wiley & Sons
- Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J.J. and Fisher, G. 2009. MatrixDegrading Metalloproteinases in Photoaging. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. 14 : 20-24
- R. K, Ravindra., Sabitha, R. P., 2010. Effect of different co-polymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid. **International Journal of Pharmtech Research**, 2(4), p. 2198-2203
- Rabe, J.H., Mamelak, A.J., Mc Elgunn, P.J.S., and Morison, W.L. 2006. Photoaging Mechanism and Repair . **Journal Americans Academy of Dermatology**. 55, p. 1-19
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., Saraf, S., 2006, **Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs**. 29(9), p. 1790-1798. Bull : Biol. Pharm
- Reeves, L. R., Harkaway, S. A., 1977, **Micellization, Solubilition and Microemulsion**, New York : Plenum Press
- Rekker, R.F., 1977, **The Hydrophobic Fragmental Constant**. New York : Elsevier Science Pub Co
- Reksohadiprodjo, M.S., 1985, **Strategi dalam Riset Obat melalui Pendekatan Farmakokimia atau Kimia Medisinal**, Yogyakarta : Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada
- Rhein, L.D., and Santiago, J.M. 2010. Aging Skin: Current and FutureTherapeutic Strategis 1st ed. Eparation of various cell aggregates by droplet-based microfluidics. **The Royal Society of Chemistry**. p. 26-81. USA: AlluRed Bussiness Media
- Rieger, M. 2000. **Harry’s Cosmeticology**. New York : Chemical Publishing Co Inc

- Ritschel, W.A., 1976, **Hand Book of Basic Pharmacokinetics**, Illionis : Drugs Intelligence, Inc. Hamilton
- Rowe, R.C., Paul J. Sheskey, dan M.E. Quinn. 2009. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, p. 178-358. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association
- S Honary ; A Majidian ; F Naghibi. 2007. The Effect of Different Surfactants on Dissolution Rate of Recrystallized Indomethacin, **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. 6 (1), p. 25-33
- S.K. Ghosh, S. Kawaguchi, Y. Jinbo, Y. Izumi, K. Yamaguchi, T. Taniguchi, K. Nagai, K. Koyama, 2003. Nanoscale solution structure and transfer capacity of amphiphilic poly (amidoamine) dendrimers having water and polar guest molecules inside, **Macromolecules**, 36, p. 9162–9169
- Sahu, A., 2013, Nanotechnology in herbal medicines and cosmetics, **International Journal Research Ayurveda Pharm**, 4(3), p. 472-474
- Sarkar R., Sidhart S., Deepashree D., 2016, Glutathione as a skin whitening agent: Facts, myths, evidence and controversies, **Indian Journal of Dermatology Venereology, and Leprology**. (82), p. 262-72
- Sayuti, K., Yenrina, Rina., 2015. **Antioksidan Alami dan Sintetik**. Padang: Andalas University Press
- Seltzer, J.L., Eisen, A.Z., 2006. The Role of Extracellular Matrix Metalloproteinase in Connective Tissue Remodelling. **Dermatology**. Mc Graw-Hill Book co, p. 200-209
- Shin JW, Nam KM, Choi HR, Huh SY, Kim SW, Youn SW, *et al.* 2010. Erythrocyte malondialdehyde and glutathione levels in vitiligo patients. **Annals of Dermatology**. (22), p. 279-83
- Shindo Y, Eric Witt, Derick Han, William Epstein, and Lester Packer. 1994. **Enzymic and Non-Enzymic Antioxidants in Epidermis and Dermis of Human Skin**. 02, p. 122-124
- Sinko, Patrick. 2011. **Physical Pharmacy and Pharmaceutical Science**, p. 355-367. 469-473. China : Lippincot Williams and Wilkins
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000, **Kimia Medisinal**, Surabaya : Airlangga University Press

- Strober BE, Washenik K, Shupack JL. 2008. Principles of topical therapy. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen K, eds. **Dermatology in general medicine**, 2090-6. New York: McGraw-Hill
- Sundar, S., Kundu, J., dan Kundu, S., 2010, Biopolymeric nanoparticles, **Science and Technology Advance Materials** , p. 11
- Sunder, A., T. Bauer, R. Mülhaupt, H. Frey, 2000. Synthesis and thermal behavior of esterified aliphatic hyperbranched polyether polyols, **Macromolecules**. 33, p. 1330–1337
- Sunder, A., M. Krämer, R. Hanselmann, R. Mülhaupt, H. Frey, 1999. **Molecular nanocapsules based on amphiphilic hyperbranched polyglycerol**, *Angew.* 38, p. 3552–3555
- Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari M, 2007. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. **Clinical Interventions in Aging**. 2(3), p. 401-12
- Ullah H., Khan Farid., Hashmat F., 2012. Spectrophotometric Analysis of Selected Coordination Compound with Glutathione (GSH) In-Vitro Study. **International Research Journal of Pharmaceutical**. 02 (04), p. 98-105
- Wahyuni, T. 2005. **Cara Rasional Peremajaan Kulit**. Jakarta : Health Today
- Walters, K.A & Jonathan, H. 1993. **Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement**. New York : Marcel Dekker Inc
- Wang Hai-Bo and Liu De-Shan, 2003, CMC0 of Nonyphenol Polyoxyethylene Ethers in Oil Phases and Problems Concerned, **Chemical Journal of Chinese Universities**, 6 (24), p. 1126-1130
- Wang X, Na C, Xian T. 2008. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 70, p. 735-40
- Wiraguna, A. A. G. P. 2013. Pemberian Gel Ekstrak Bulung Boni (*Caulerpa* spp.). **Topikal Mencegah Penuaan Kulit Melalui Peningkatan Ekspresi Kolagen, Penurunan Kadar dan Ekspresi MMP-1 Serta Ekspresi 8-OHdG pada Tikus Wistar yang Dipapar Sinar Ultra Violet-B**. Denpasar : Universitas Udayana
- Wu Y, Yang W, Changchun W, Jianhua H, Fu S. 2005. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**. 295, p. 235-45

- Xiao J, Zhang Y, Yu W, Wang W, Ma X. 2014. Effect of microencapsulation on the expression of the oxidative stress genes of Hep G2 cells and exogenous regulation. **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi**, 31(2), p. 373-8
- Y. Zhang, T. Jin, R.-X. Zhuo, 2005. Methotrexate-loaded biodegradable polymeric micelles: Preparation, physicochemical properties and in vitro drug release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 44(2-3), p. 104-109
- Yang,L., Bifang Z., Liqum,W., Qiuyi L., Li-Ming Z., 2007. Amphiphilic cholesteryl grafted sodium alginate derivative: synthesis and self assembly in aqueous solution, **Carbohydrate Polymer**, 68(2), p. 218-225
- Yanhendri dan Yenny, S.W., 2012. **Berbagai Bentuk Sediaan Topikal dalam Dermatologi**, 39 (6), p. 423-430

Lampiran 1

SERTIFIKAT ANALISIS GLUTATION

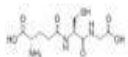
SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com


Certificate of Analysis

Product Name: L-Glutathione reduced - ≥98.0%

Product Number: G4251
 Batch Number: SLBQ4892V
 Brand: SIAL
 CAS Number: 70-18-8
 MDL Number: MFCD00065939
 Formula: C10H17N3O6S
 Formula Weight: 307.32 g/mol
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 02 FEB 2016
 Recommended Retest Date: FEB 2021



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50 mg/mL, H2O		
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Titration with Iodine	≥ 99 %	100 %
Purity (HPLC)	≥ 98.0 %	99.5 %



Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Lampiran 2

SERTIFIKAT ANALISIS NA-ALGINAT

SIGMA-ALDRICH®		sigmaaldrich.com
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA		
Website: www.sigmaaldrich.com		
Email USA: techserv@sigma.com		
Outside USA: eurtechserv@sigma.com		
Certificate of Analysis		
Product Name:	Sodium alginate	
Product Number:	W201602	
Lot Number:	MKBJ2764V	
Brand:	ALDRICH	
CAS Number:	9005-38-3	
MDL Number:	MFCD00081310	
Quality Release Date:	28 OCT 2011	
Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Tan to Light Brown	Tan
Appearance (Form)	Solid	Solid
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Loss on Drying	≤ 15.0 %	11.8 %
Viscosity	5.0 - 40.0 cps	10.2 cps
pH	5 - 8	6
c = 1%, Water @ 25°C		
Arsenic (As)	≤ 3.0 ppm	< 1.0 ppm
Cadmium (Cd)	≤ 1.0 ppm	< 1.0 ppm
Mercury (Hg)	≤ 1.0 ppm	< 1.0 ppm
Lead (Pb)	≤ 10.0 ppm	< 1.0 ppm
 Jamie Gleason, Manager Quality Control Milwaukee, Wisconsin US		
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.		

Lampiran 3

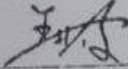
SERTIFIKAT ANALISIS CaCl_2

QINGDAO HUADONG CALCIUM PRODUCING CO.,LTD.
NO.78 SILIU BEI ROAD, QINGDAO, CHINA
CALCIUM CHLORIDE FLAKE 74% MIN (FOOD GRADE)
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Invoice No.: 13HDL082202
Batch No: 201308281AF
Date of Product: 10 Sep 2013
Shelf Life: Two Years
Date: SEP. 14, 2013


ITEM	RESULT
Calcium Chloride (as CaCl_2)	76.53%
Magnesium & Alkali Metal Chloride(as NaCl)	3.87%
Alkalinity [as Ca(OH)_2]	0.028%
Heavy Metal (as Pb)	Less than 20 ppm
Lead (as Pb)	Less than 5 ppm
Arsenic (as As)	Less than 3 ppm
Fluorine (as F)	Less than 4 ppm
Ph Value	8.82
Loss of Drying at 200°C	0.01%

青島華東制鹽有限公司
QINGDAO HUADONG CALCIUM PRODUCING CO.,LTD.

Sign by  GENERAL MANAGER

Lampiran 4

SERTIFIKAT ANALISIS MALTODEKSTRIN


 诸城东晓生物科技有限公司
 ZHUCHENG DONGYAO BIOTECHNOLOGY CO.,LTD.
 XINXING TOWN, ZHUCHENG, SHANDONG, CHINA

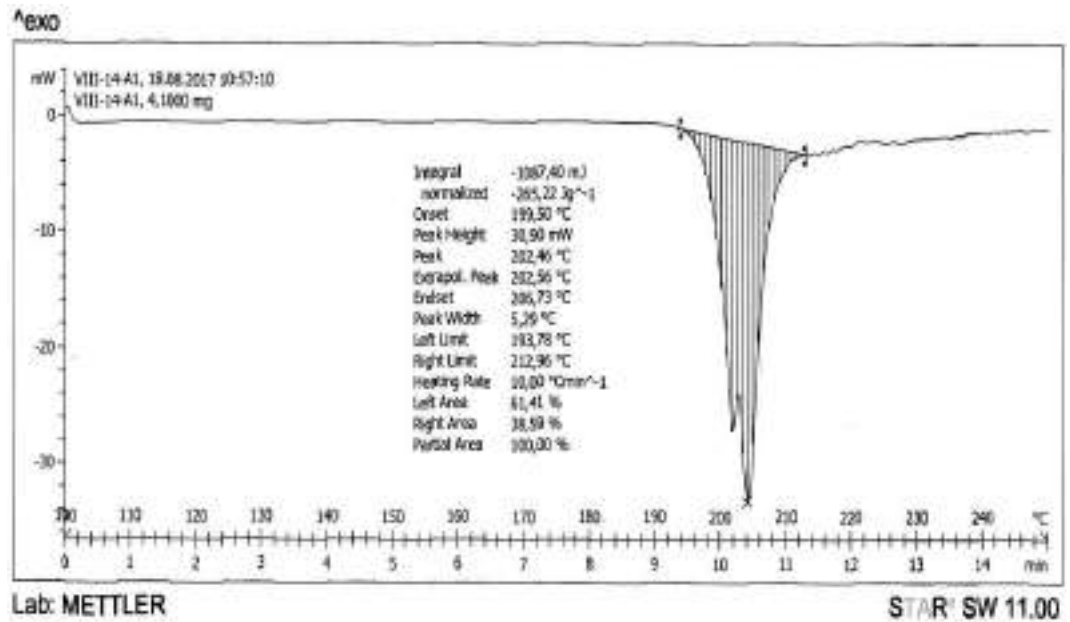
CERTIFICATE OF ANALYSIS

DATE: MAR.13, 2014
 I.C. NO: MY7106072473
 INVOICE DATE: MAR.13, 2014
 INVOICE NO: DX140212

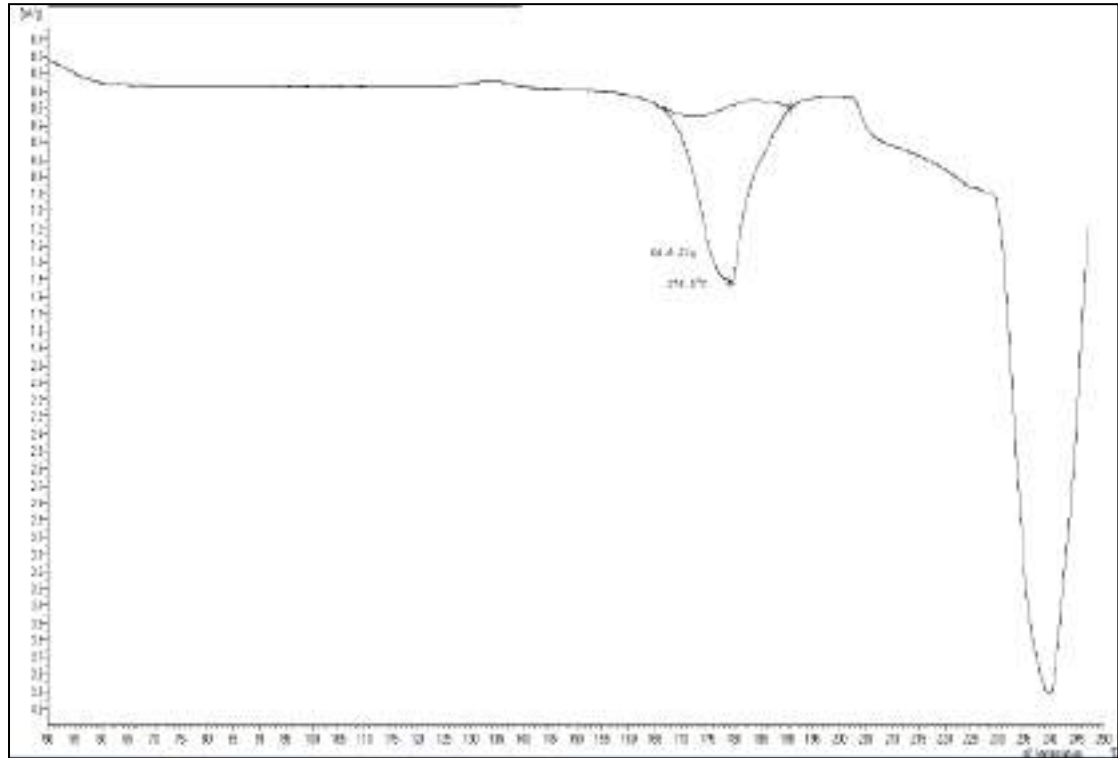
Product Name	MALTODEXTRIN DE 10-15	
Production Date:	MAR.01, 2014	
Expire Date:	MAR.01, 2016	
Batch Number:	20140301 ✓	
Test Standard	GB/T20884-2007	
Appearance	White powder and no fixed shape	
Smell	Has special smell of maltodextrin and no exceptional smell	
Taste	Sweetness or slightly sweetness, no other taste	
Items	Standards	Results
Dx% (w/w)	10-15	13.0
STARCH test	Negative	Conform
Moisture% (w/w)	≤ 6.0	5.4
ASH (w/w)	≤ 0.2	0.2
pH	4.5-6.5	5.1
Ash% (w/w)	≤ 0.6	0.1
Toxic Experiment	No blue reaction	Conform
As (mg/kg)	≤ 1.0	0.04
Pb (mg/kg)	≤ 0.5	0.06
Sulfur Dioxide Residual g/kg	≤ 0.04	0.01
Total Plate Account	≤ 3000	130
Ecoli MPN/100g	≤ 30	< 30
Pathogenic bacterium	No exist	Conform

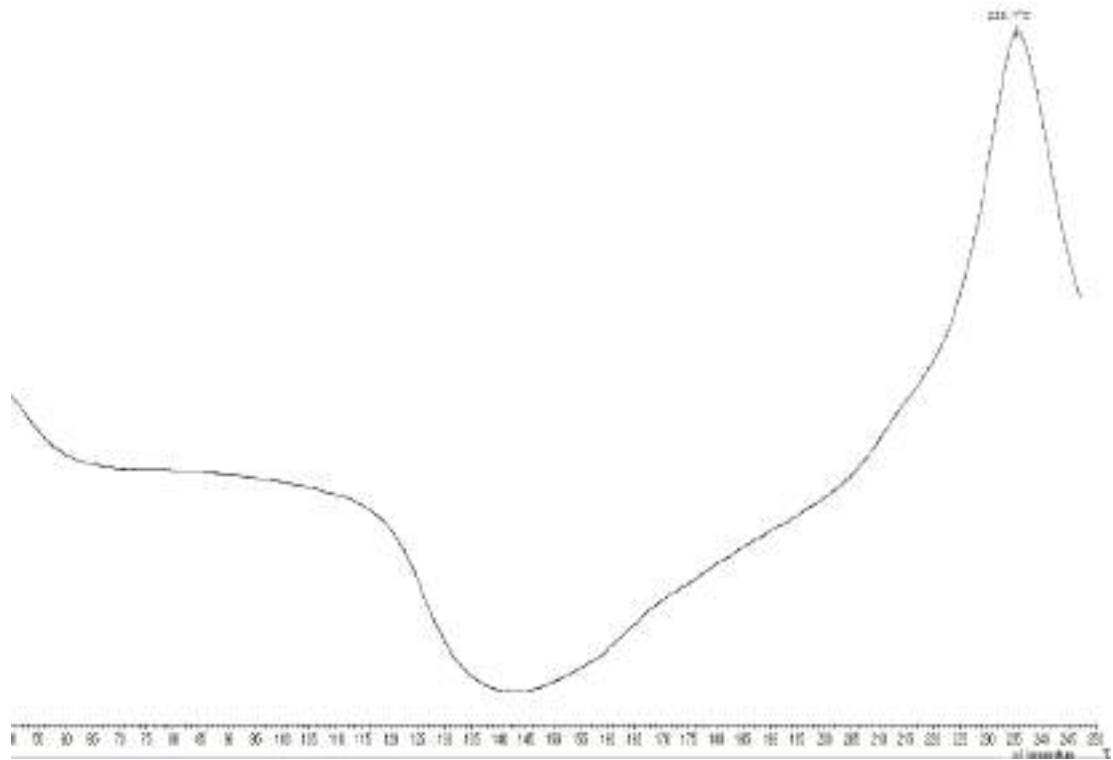
Lampiran 5

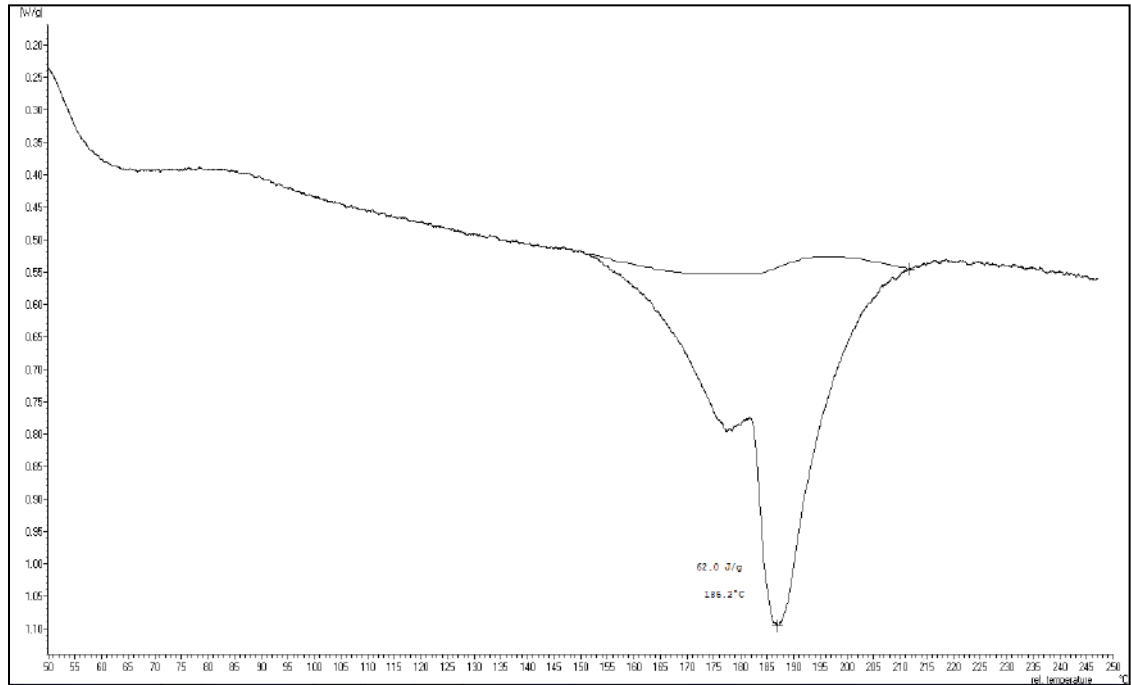
ANALISIS TERMOGRAM DSC GLUTATION



Lampiran 6

ANALISIS TERMOGRAM DTA CaCl_2 

Lampiran 7**ANALISIS TERMOGRAM DTA NA-ALGINAT**

Lampiran 8**ANALISIS TERMOGRAM DTA MALTODEKSTRIN**

Lampiran 9

PENENTUAN WAKTU KESETIMBANGAN

Jam ke-	Replikasi	Absorban	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	Rerata Kadar \pm SB	%KV
3	1	0,156	36,44	36,25 \pm 0,84	2,31
	2	0,153	35,33		
	3	0,157	36,99		
4	1	0,276	80,84	82,31 \pm 1,33	1,62
	2	0,283	83,42		
	3	0,281	82,68		
5	1	0,391	123,37	124,73 \pm 1,30	1,04
	2	0,395	124,85		
	3	0,398	125,96		
6	1	0,388	122,27	123,37 \pm 0,97	0,78
	2	0,392	123,74		
	3	0,393	124,11		
7	1	0,395	124,85	123,49 \pm 1,29	1,04
	2	0,388	122,26		
	3	0,391	123,37		

Contoh cara perhitungan untuk jam ke 3 Replikasi 1

$$Y = 2,7033 \cdot 10^{-3} x + 5,75 \cdot 10^{-2}$$

Absorban Y = 0,156

Maka $x = 36,44$ ppm

Lampiran 10

PENENTUAN KOEFISIEN PARTISI GLUTATION

Nilai HLB	Replikasi	Kadar Awal GSH ($\mu\text{g/ml}$) (C^0_2)	Abs	Kadar Glutation ($\mu\text{g/ml}$) (C^1_2)	Log APC	Rata-rata \pm SB	%KV
4,3	1	236	0,294	87,495	1,531	1,535 \pm 0,004	0,260
	2	234	0,289	85,645	1,539		
	3	240	0,296	88,235	1,536		
5,5	1	220	0,258	74,176	1,595	1,632 \pm 0,032	1,960
	2	228	0,250	71,217	1,643		
	3	234	0,253	72,327	1,657		
7	1	250	0,125	24,972	2,255	2,259 \pm 0,009	0,398
	2	252	0,126	25,342	2,252		
	3	250	0,123	24,233	2,270		
11	1	196	0,198	51,979	1,743	1,750 \pm 0,016	0,914
	2	192	0,203	53,824	1,770		
	3	196	0,199	52,349	1,739		
13	1	242	0,387	121,90	1,290	1,300 \pm 0,012	0,923
	2	246	0,385	121,162	1,314		
	3	238	0,381	119,68	1,296		
GSH Tanpa Surfaktan	1	230	0,398	125,97	1,218	1,224 \pm 0,006	0,490
	2	232	0,396	123,232	1,231		
	3	236	0,405	128,561	1,223		

Contoh cara perhitungan untuk HLB 7 Replikasi 1

$$Y = 2,7033 \cdot 10^{-3} x + 5,75 \cdot 10^{-2}$$

Absorban Y = 0,125

Maka $x = 24,97$ ppm

$$APC = \frac{250 - 24,97 \cdot 10}{24,97 \cdot 0,5}$$

$$= 180,24$$

$$\text{Log APC} = 2,255$$

Lampiran 11**PEMERIKSAAN DISTRIBUSI UKURAN MIKROSFER**

Pemeriksaan distribusi ukuran partikel mikrosfer dilakukan terhadap mikrosfer basah dari formula dan mikrosfer tanpa glutation menggunakan mikroskop optik.

Hasil pengamatan kemudian diolah dengan contoh perhitungan sebagai berikut :

Formula F1

$$\text{Jumlah kelas} = 1 + 3,3 \log n$$

$$= 1 + 3,3 \log 300$$

$$= 9,17 \sim 10$$

Rentang = nilai maks – nilai min

$$= 2,49 \mu\text{m} - 0,76 \mu\text{m}$$

$$= 1,73 \mu\text{m}$$

Interval kelas = rentang / jumlah kelas

$$= 1,73 \mu\text{m} / 10$$

$$= 0,17 \mu\text{m}$$

Jarak Ukuran (μm)	Rata-Rata Jarak Ukuran (d)	Jumlah Partikel (n)	n x d
0,76 – 0,93	0,76	21	15,96
0,94 – 1,11	0,94	43	40,42
1,12 – 1,29	1,13	51	57,63
1,30 – 1,47	1,29	57	73,53
1,48 – 1,65	1,48	59	87,32
1,66 – 1,83	1,68	23	38,64
1,89 – 2,06	1,85	29	53,65
2,07 – 2,24	2,04	8	16,32
2,25 – 2,42	2,22	6	13,32
2,43 – 2,60	2,41	3	7,23
Jumlah		300	404,2

$$\text{Diameter rata-rata (dln)} = \frac{\sum n \times d}{\sum n}$$

$$= \frac{404,2}{300}$$

$$= 1,347 \mu\text{m}$$

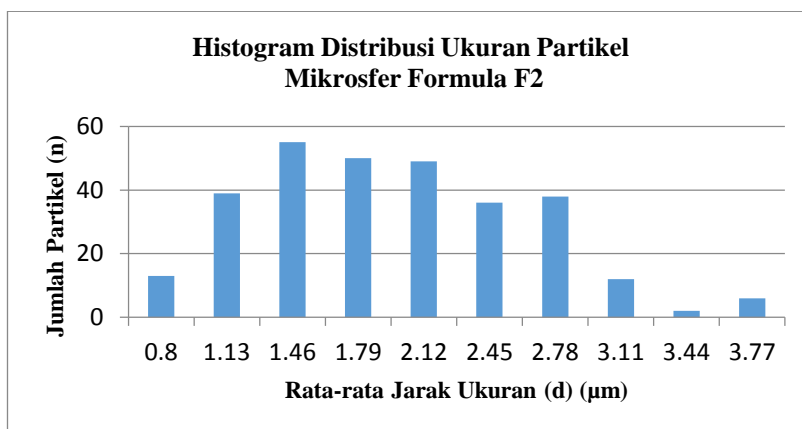
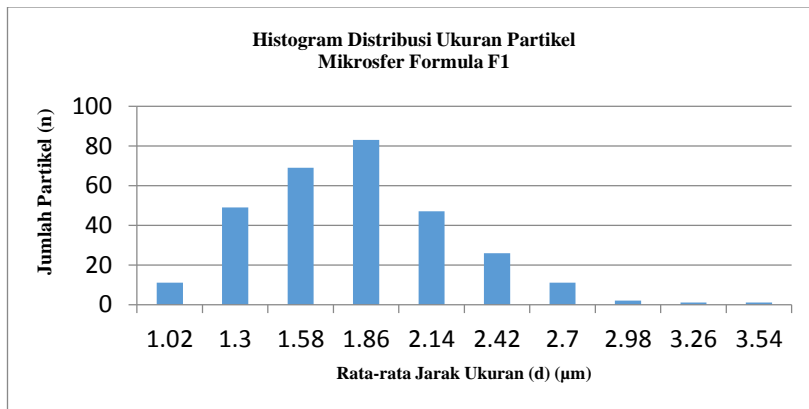
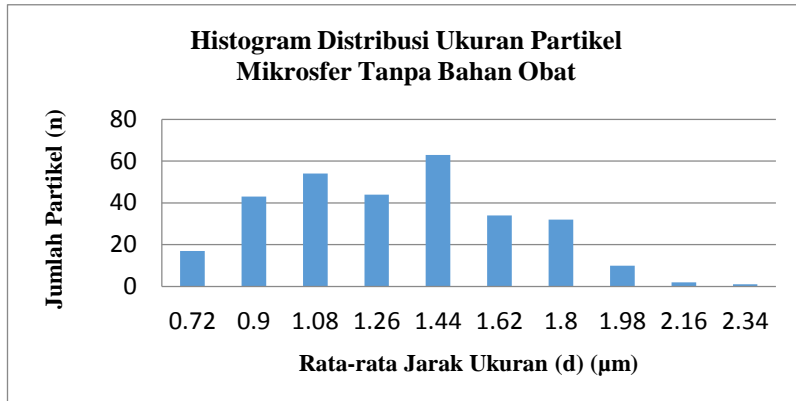
Polidispersitas Index

$$\text{PDI} = \frac{Mw}{Mn}$$

Keterangan: M= Ukuran Partikel , N = Jumlah Partikel

$$M_w = \frac{\sum(M^2 \times N)}{\sum(M \times N)} \qquad M_n = \frac{\sum(M \times N)}{\sum(N)}$$

$$PDI = \frac{1,347}{404,1} = 0,003$$



Lampiran 12

PENENTUAN KANDUNGAN GLUTATION DALAM MIKROSFER

Formula	Replikasi	Penimbangan Mikrosfer (mg)	Abs	Kadar 120 mg MO dalam 1000 ml (ppm)	Kadar GSH dalam 50 ml Na Sitrat (mg)	Kadar dalam Total MO kering (mg)	Kandungan Obat		KV (%)
							Kadar (%)	Rata-rata ± SD (%)	
F1	R1	121,0	0,564	211,158	10,5579	285,85	8,726	8,623±0,12	1,4
	R2	123,0	0,568	212,876	10,644	292,57	8,654		
	R3	123,6	0,561	209,871	10,494	259,29	8,489		
F2	R1	122,3	0,531	196,996	9,850	254,578	8,051	7,81±0,22	2,81
	R2	123,0	0,517	190,987	9,955	233,765	7,764		
	R3	122,5	0,508	187,125	9,356	251,993	7,638		

Contoh cara perhitungan untuk Formula F1 Replikasi 1

$$Y = 2,3333 \cdot 10^{-3} x + 7,22 \cdot 10^{-2}$$

Absorban Y = 0,564

$$\text{Maka } x = 211,1588 \text{ ppm} = 211,1588 \text{ mg}/1000 \text{ ml}$$

Kadar glutation dalam 120 mg mikrosfer yang dilarutkan pada 50 ml Na Sitrat

$$= \frac{50 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 211,1588 \text{ mg} = 10,5579 \text{ mg}$$

$$\text{Kadar dalam mikrosfer kering total} = \frac{3276,0}{121} \times 10,5579 \text{ mg} = 285,85 \text{ mg}$$

$$\text{Jumlah kandungan glutation} = \frac{285,85 \text{ mg}}{3276,0 \text{ g}} \times 100\% = 8,726\%$$

Tests of Normality

formula	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
drugloading 1	.206	3	.	.993	3	.837
2	.324	3	.	.877	3	.315

a. Lilliefors Significance Correction

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-Test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
drugloading	Equal variances assumed	7.898	.006	4.664	4	.011	.84497	.16872	.31829	1.37170
	Equal variances not assumed			4.664	2.221	.039	.84497	.16872	.10174	1.51819

Lampiran 13

PENETAPAN EFISIENSI PENJEBAKAN GLUTATION DALAM MIKROSFER

Formula	Replikasi	Penimbangan Mikrosfer (mg)	Kandungan Obat		KV (%)
			EP (%)	Rata-rata ± SD	
F1	R1	121,0	55,09	54,46±2,40	4,41
	R2	123,0	56,49		
	R3	123,0	51,8		
F2	R1	122,3	50,08	48,49±2,37	4,87
	R2	123,0	45,76		
	R3	122,5	49,64		

Contoh cara perhitungan Formula F1 Replikasi 1

Kadar glutation dalam 120 mg mikrosfer = 10,5579 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar dalam mikrosfer kering total} &= \frac{3276,0 \text{ mg}}{121 \text{ mg}} \times 10,5579 \text{ mg} \\ &= 285,85 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Efisiensi penjemakan} &= \frac{285,85 \text{ mg}}{518,9 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 55,09 \% \end{aligned}$$

Tests of Normality

formula	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
EP 1	.270	3	.	.949	3	.563
EP 2	.350	3	.	.829	3	.185

a. Lilliefors Significance Correction

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-Test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
EP	Equivalences assured	.004	.952	3.054	4	.038	5.96657	1.95390	54389	11.38044
	Equivalences not assured			3.054	1.999	.038	5.96657	1.95390	54255	11.38078

Lampiran 14

PENETAPAN PEROLEHAN KEMBALI (*YIELD*) MIKROSFER

Formula	Berat Penimbangan Bahan			Berat Mikrosfer Kering (g)	Yield		
	Glutation (g)	Na-Alginat (g)	Maltodekstrin (g)		Yield (%)	Rata-Rata ± SD	KV (%)
F1 R1	0,518	1,000	1,965	3,276	94,05	94,03± 3,07	3,27
F1 R2	0,517	1,000	1,974	3,390	97,10		
F1 R3	0,501	1,000	1,858	3,054	90,95		
F2 R1	0,508	1,000	1,864	3,161	93,74	93,34± 3,65	3,91
F2 R2	0,511	1,000	1,853	3,011	89,51		
F2 R3	0,508	1,000	1,901	3,299	96,77		

Contoh cara perhitungan untuk Formula F1 Replikasi 1

$$Yield = \frac{\text{Berat mikrosfer kering}}{\text{Glutation} + \text{Na-alginat} + \text{lyoprotektan}} \times 100\%$$

$$= \frac{3,276 \text{ g}}{0,518 \text{ g} + 1,000 \text{ g} + 1,965 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 94,05 \%$$

Tests of Normality

formula	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
EP 1	.175	3	.	1.000	3	.991
EP 2	.210	3	.	.991	3	.818

a. Lilliefors Significance Correction

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-Test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
EP	Equality of variances assumed	.111	.755	.252	4	.814	.68333	2.75385	-6.06268	8.33663
	Equality of variances not assumed			.252	3.889	.814	.68333	2.75385	-7.01857	8.42024

Lampiran 15

PERHITUNGAN STABILITAS GLUTATION

Bahan Uji	Hari ke-	Replikasi	Absorban	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	Rerata Kadar (ppm) \pm SB	KV (%)
GSH	0	1	0,702	238,45	228,82 \pm 1,69	0,74
		2	0,708	240,67		
		3	0,699	237,34		
	1	1	0,672	227,34	227,59 \pm 0,77	0,33
		2	0,675	228,45		
		3	0,671	226,97		
	3	1	0,566	188,48	198,12 \pm 1,33	0,67
		2	0,562	186,63		
		3	0,596	199,23		
	5	1	0,459	148,58	149,53 \pm 1,37	0,91
		2	0,460	148,90		
		3	0,466	151,11		
GSH HLB 7	0	1	0,656	221,42	219,94 \pm 1,48	0,67
		2	0,652	219,94		
		3	0,648	218,46		
	1	1	0,654	220,68	218,58 \pm 2,23	1,02
		2	0,649	218,83		
		3	0,642	216,24		
	3	1	0,552	182,94	182,94 \pm 2,21	1,2
		2	0,558	185,16		
		3	0,546	180,73		
	5	1	0,457	147,80	148,17 \pm 2,05	1,38
		2	0,464	150,38		
		3	0,453	146,32		
F1	0	1	0,671	256,75	254,4 \pm 2,41	0,94
		2	0,659	251,94		
		3	0,665	254,51		
	1	1	0,669	256,22	252,57 \pm 3,59	1,42
		2	0,653	249,04		

	3	3	0,661	252,46	230,04±2,82	1,23	
		1	0,614	232,62			
		2	0,609	230,47			
	5	3	0,601	227,03	212,51±4,76	2,24	
		1	0,556	207,49			
		2	0,569	213,31			
	F2	0	3	0,574	216,74	257,01±1,36	0,53
			1	0,675	258,47		
			2	0,668	255,74		
1		3	0,671	257,08	254,83±2,43	0,95	
		1	0,672	257,51			
		2	0,661	252,79			
3		3	0,665	254,18	220,36±4,04	1,83	
		1	0,594	224,03			
		2	0,587	221,03			
5		3	0,576	216,03	196,54±3,03	1,54	
		1	0,531	196,99			
		2	0,523	193,31			
		3	0,537	199,32			

Contoh cara perhitungan untuk Glutation (GSH) Replikasi 1

$$Y = 2,703 \cdot 10^{-3} x + 5,75 \cdot 10^{-2}$$

Absorban Y = 0,702

$$\text{Maka } x = 238,45 \text{ ppm} = 238,45 \text{ mg}/1000 \text{ ml}$$

Contoh cara perhitungan untuk Formula F1 Replikasi 1

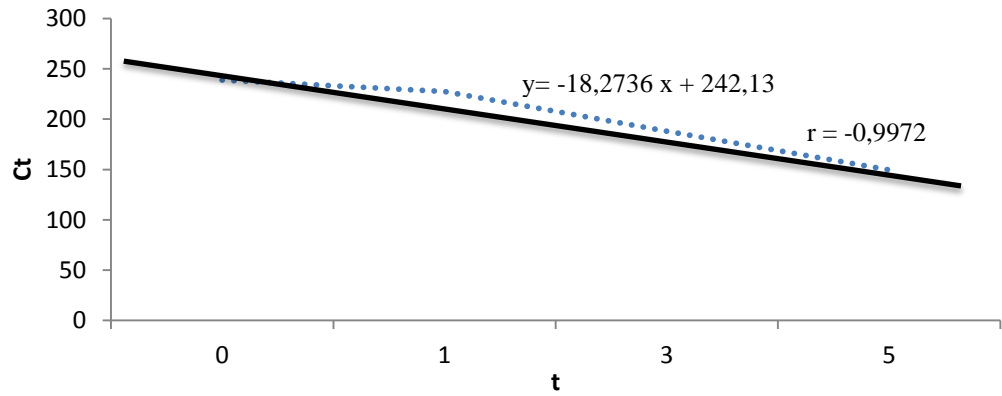
$$Y = 2,3333 \cdot 10^{-3} x + 7,22 \cdot 10^{-2}$$

Absorban Y = 0,669

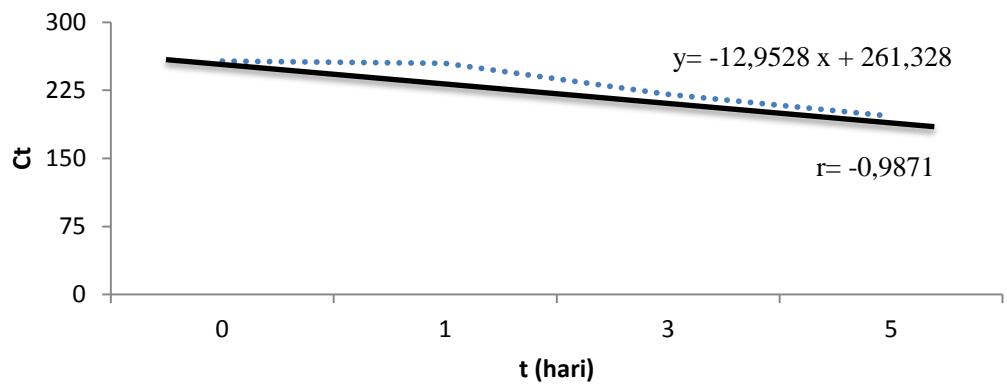
$$\text{Maka } x = 256,22 \text{ ppm} = 256,22 \text{ mg}/1000 \text{ ml}$$

Lampiran 16

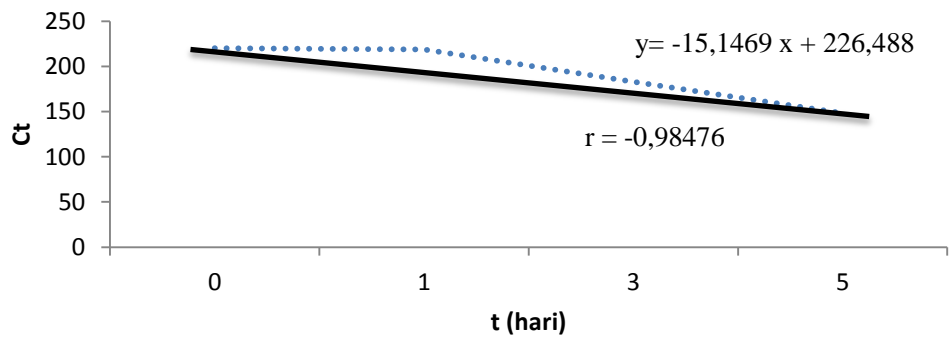
GRAFIK STABILITAS GLUTATION



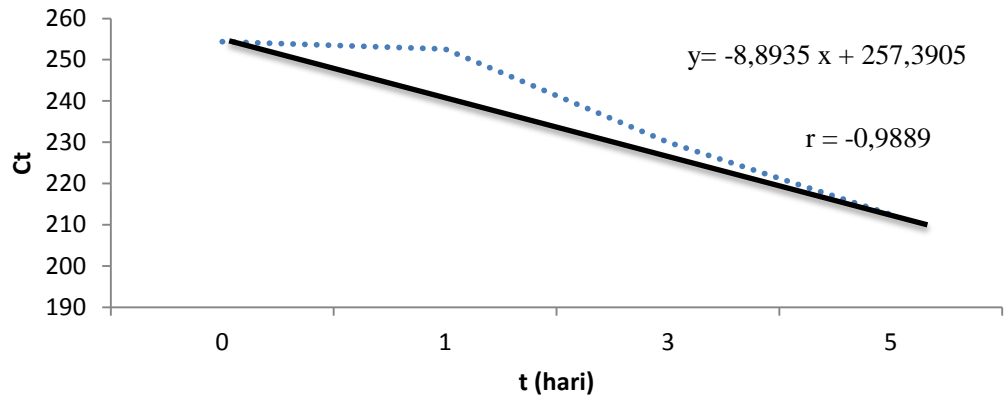
Kurva Stabilitas GSH t Vs Ct



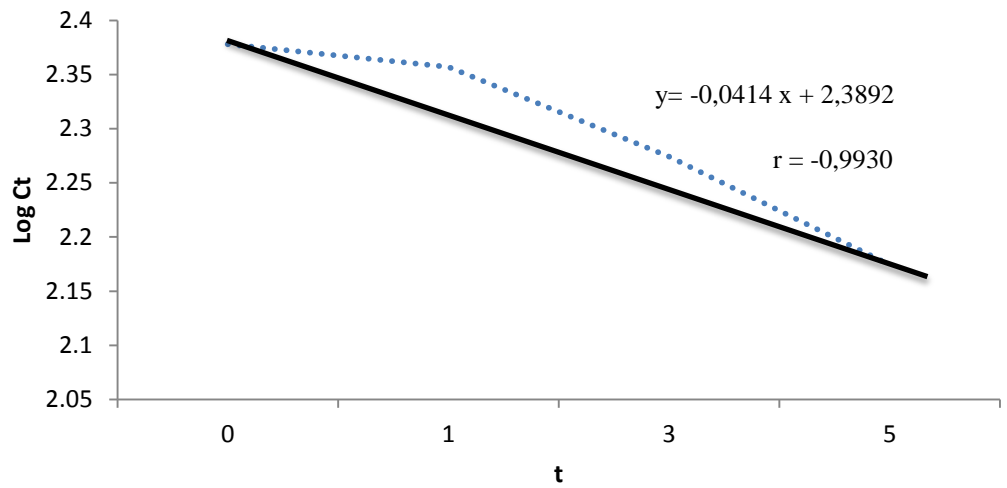
Kurva Stabilitas Mikrosfer GSH



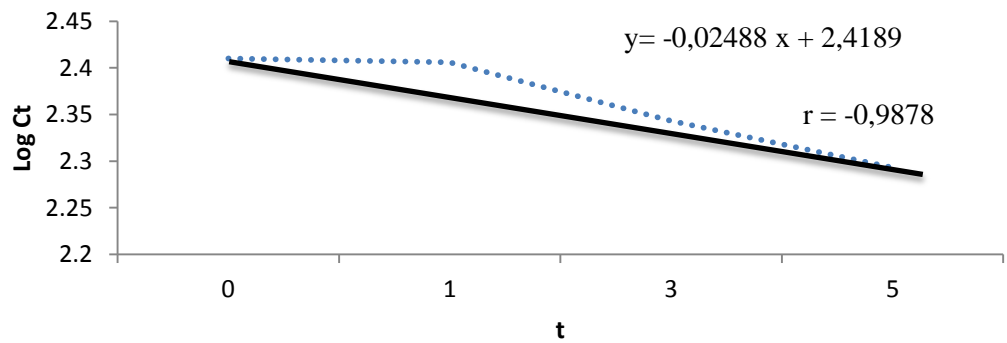
Kurva Stabilitas t Vs Ct GSH + Surfactan



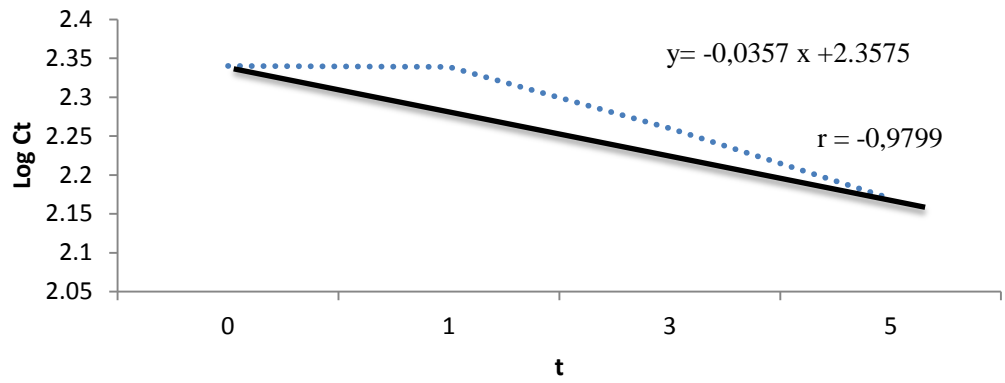
Kurva Stabilitas t Vs Ct Mikrofer GSH + Surf



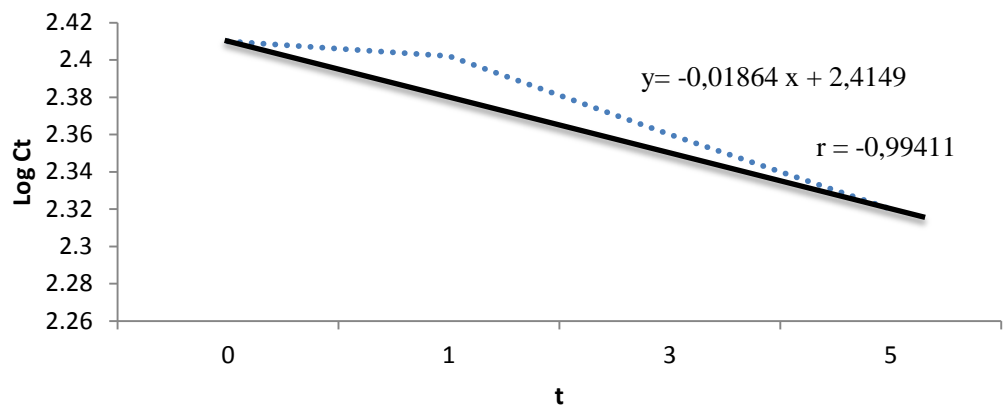
Gambar Kurva Stabilitas t Vs Log Ct GSH



Kurva Stabilitas t Vs Log Ct Mikrofer GSH



Kurva Stabilitas t Vs Log Ct GSH GSH + Surfaktan



Kurva Stabilitas t Vs Log Ct Mikrosfer GSH HLB 7

Lampiran 17**DATA PENGAMATAN AKURASI DAN PRESISI**

Dibuat konsentrasi larutan stok sampel 300 ppm

Dibuat 3 variasi konsentrasi : 48 ppm, 60 ppm, 72 ppm

Ditambahkan mikrosfer kosong ke dalam masing-masing konsentrasi

Nilai absorbansi

Konsentrasi	Absorbansi			
	I	II	III	Rata- rata
48 ppm	0,185	0,187	0,186	0,186
60 ppm	0,211	0,209	0,215	0,212
72 ppm	0,246	0,248	0,246	0,247

Persamaan garis larutan baku : $Y = 2,3333.10^{-3} x + 7,22.10^{-2}$

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Konsentrasi yang diperoleh (ppm)	Perolehan Kembali (%)	Rata-rata	SB	KV (%)
48	0,185	48,35	100,72	101,63	0,93	0,91
	0,187	49,27	102,58			
	0,186	48,78	101,6			
60	0,211	59,49	99,14	99,84	1,88	1,88
	0,210	59,06	98,41			
	0,215	61,21	101,97			
72	0,246	74,59	103,47	102,67	1,38	1,34
	0,242	72,78	101,07			
	0,246	74,59	103,47			

Dari hasil yang diperoleh, nilai ini masih dapat diterima akurasiya karena menurut (AOAC, 1998), secara umum nilai akurasi yang dapat diterima sebesar 80- 120%. Nilai KV yang didapatkan kurang dari 2% sehingga memiliki presisi yang baik.

Lampiran 18

SERTIFIKAT UJI ETIK



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
" ETHICAL CLEARANCE "**

No : 688-KE

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

PENELITIAN BERJUDUL : Penerapan *Reverse Micelles* Dan Pembentukan
Mikrosfer Alginat Untuk Meningkatkan Efektivitas Dan
Stabilitas Glutation

PENELITI UTAMA : Fitria Nugraheni

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT
PENELITIAN** : Program Magister Ilmu Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 18 April 2017

Mengetahui,
Dekan FKH Unair



Prof. Dr. Puji Srianto, M.Kes.,Drh.
NIP. 195601051986011001

Ketua

Dr Nurdianto Triakoso, M.P.,Drh.
NIP. 196805051997021001

Lampiran 19

SURAT KETERANGAN HEWAN UJI

<u>Drh Rachmad Priyadi</u>	
Peternakan Tikus	
Tlp : 085706511245 / 081325941001	
<u>Surat Keterangan</u>	
No: 01/VII/2017	
Yang bertanda tangan dibawah ini :	
Nama	: Drh. Rachmad Priyadi
Menerangkan :	
Jenis	: Mencit (Mus Musculus)
Strain	: Balb/ C
Umur	: ± 8 minggu
Jenis Kelamin	: Jantan
Berat	: ± 20 Gram
Kondisi	: Sehat dan tidak terjangkit penyakit
Jumlah	: 90 ekor
Ditujukan kepada :	
Nama	: Rektor Universitas Airlangga Surabaya
Demikian Surat Keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.	
Surabaya, 11 Juli 2017	
Hormat saya	
 	
(Drh. Rachmad Priyadi)	

Lampiran 20

Hasil Uji MMP-1

Kode Preparat	Fibroblast MMP					Jumlah	Total Fibroblast					Jumlah	Kadar MMP(%)	Rerata Perlakuan± SB
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5			
F1.1	6	11	5	4	2	28	38	36	47	38	38	197	14,2	
F1.2	23	25	10	8	3	69	28	53	44	49	52	226	30,53	24,25±8,79
F1.3	14	16	14	11	12	67	52	54	48	43	42	239	28,03	
F2.1	29	27	24	28	34	142	38	42	42	51	53	226	62,83	
F2.2	26	35	29	31	30	151	38	52	51	54	43	238	63,44	63,40±0,69
F2.3	28	31	29	24	19	131	21	52	64	25	42	204	64,2	
F3.1	13	14	2	6	9	44	38	42	56	52	34	222	19,8	
F3.2	3	7	8	5	7	30	41	47	49	50	51	238	12,6	15,44±3,83
F3.3	7	6	5	5	6	29	38	42	47	42	39	208	13,94	
F4.1	19	26	19	32	18	114	42	53	48	51	38	232	49,14	
F4.2	21	22	15	21	19	98	38	41	28	31	39	177	55,37	55,12±5,85
F4.3	33	15	16	15	22	101	39	29	31	29	38	166	60,84	
F5.1	24	27	23	24	29	127	28	31	42	36	41	178	71,51	
F5.2	22	24	25	26	28	125	31	36	42	31	32	172	72,67	72,03±0,59
F5.3	21	25	23	29	30	128	28	29	44	35	42	178	71,91	

Pemeriksaan dilakukan pada pembesaran 100x, dimana jenis lesi tersebut kemudian dikonfirmasi secara lebih mendetail pada pembesaran 400x. Seluruh pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel dan *soft ware* pengolah gambar *Nikon Image System*.

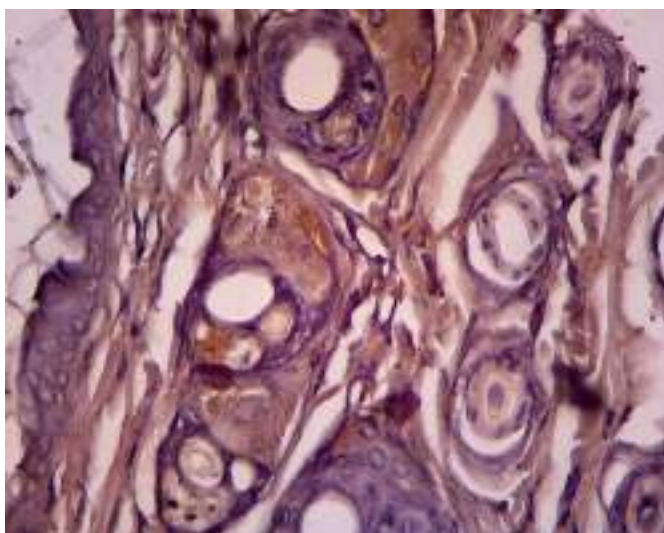
Contoh Perhitungan

$$\text{Kadar MMP-1 (\%)} = \frac{\text{Fibroblast yang mengekspresikan MMP-1}}{\text{Total fibroblast pada lapang pandang}} \times 100\%$$

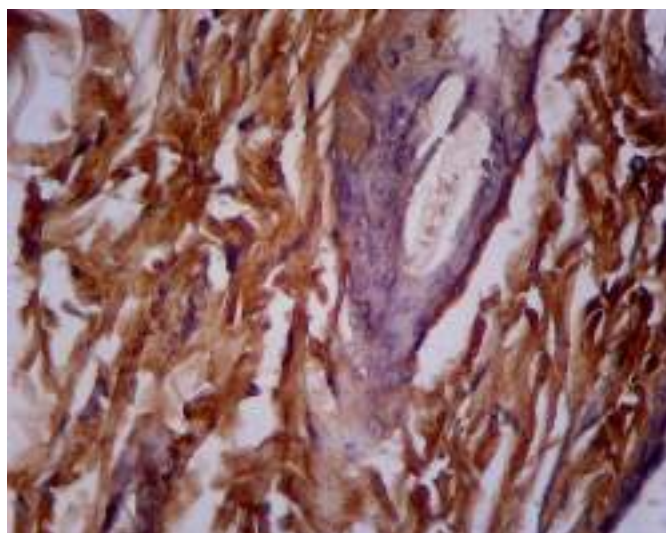
Pada F1.1

$$\text{Kadar MMP-1 (\%)} = \frac{28}{197} \times 100\%$$

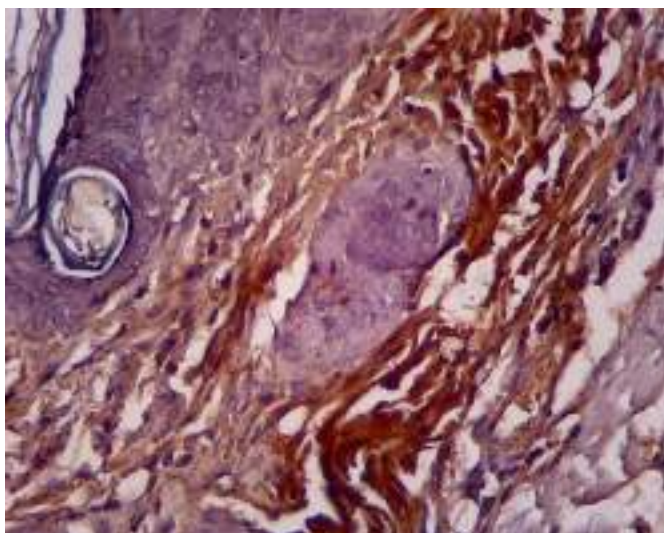
$$= 14,2 \%$$



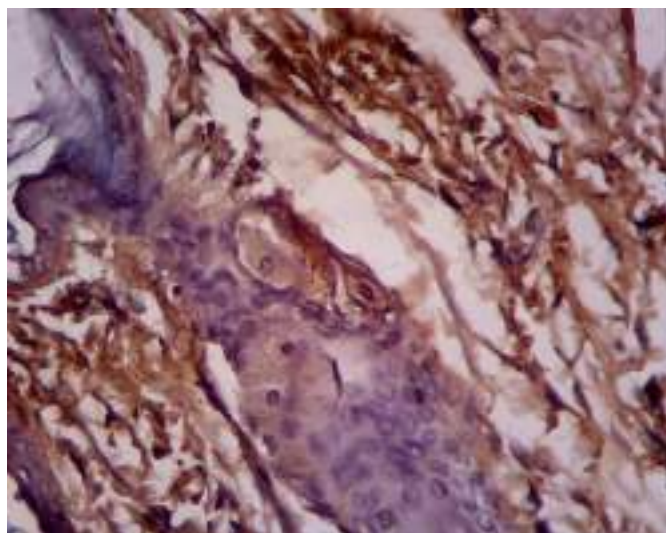
F.1 (Kulit – IHK :400x)



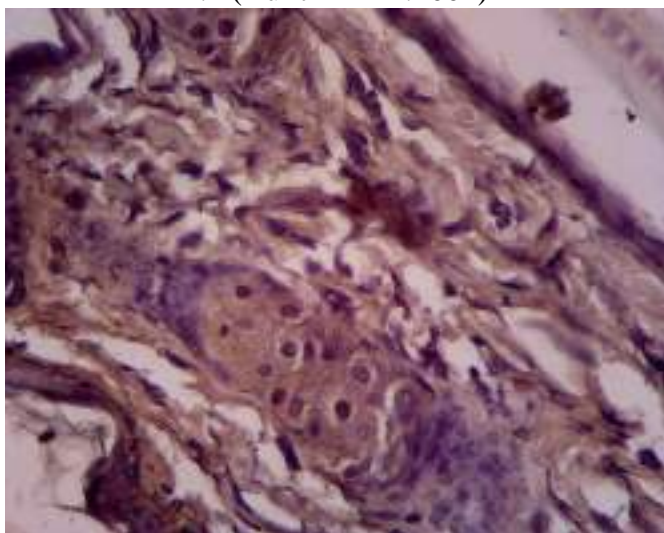
F.4 (Kulit – IHK :400x)



F.2 (Kulit – IHK :400x)



F.5 (Kulit – IHK :400x)



F.3 (Kulit – IHK :400x)

Lampiran 21**Hasil Uji Statistik****Univariate Analysis of Variance****Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
kelompok	1	glutation + surf	3
	2	glutation-surf	3
	3	mikrosfer glutation+surf	3
	4	mikrosfer glutation- surf	3
	5	kontrol	3

Descriptive Statistics

Dependent Variable:mmp

kelompok	Mean	Std. Deviation	N
glutation + surf	24.2533	8.79572	3
glutation-surf	63.4900	.68637	3
mikrosfer glutation+surf	15.4467	3.82917	3
mikrosfer glutation-surf	55.1167	5.85411	3
kontrol	72.0300	.58924	3
Total	46.0673	23.41117	15

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable:mmp

F	df1	df2	Sig.
4.570	4	10	.023

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:mmp

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7418.927 ^a	4	1854.732	72.954	.000
Intercept	31832.988	1	31832.988	1.252E3	.000
kelompok	7418.927	4	1854.732	72.954	.000
Error	254.232	10	25.423		
Total	39506.147	15			
Corrected Total	7673.159	14			

a. R Squared = .967 (Adjusted R Squared = .954)

Estimated Marginal Means**kelompok**

Dependent Variable:mmp

kelompok	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
glutation + surf	24.253	2.911	17.767	30.740
glutation-surf	63.490	2.911	57.004	69.976
mikrosfer glutation+surf	15.447	2.911	8.960	21.933
mikrosfer glutation-surf	55.117	2.911	48.630	61.603
kontrol	72.030	2.911	65.544	78.516

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

mmp

Tukey

HSD

(I) kelompo k	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
glutation + surf	glutation-surf	-39.2367*	4.11689	.000	-52.7857	-25.6876
	mikrosfer glutation+surf	8.8067	4.11689	.276	-4.7424	22.3557
	mikrosfer glutation-surf	-30.8633*	4.11689	.000	-44.4124	-17.3143
	kontrol	-47.7767*	4.11689	.000	-61.3257	-34.2276
glutation -surf	glutation + surf	39.2367*	4.11689	.000	25.6876	52.7857
	mikrosfer glutation+surf	48.0433*	4.11689	.000	34.4943	61.5924
	mikrosfer glutation-surf	8.3733	4.11689	.317	-5.1757	21.9224
	kontrol	-8.5400	4.11689	.301	-22.0890	5.0090
mikrosfe r glutation +surf	glutation + surf	-8.8067	4.11689	.276	-22.3557	4.7424
	glutation-surf	-48.0433*	4.11689	.000	-61.5924	-34.4943
	mikrosfer glutation-surf	-39.6700*	4.11689	.000	-53.2190	-26.1210
	kontrol	-56.5833*	4.11689	.000	-70.1324	-43.0343
mikrosfe r glutation -surf	glutation + surf	30.8633*	4.11689	.000	17.3143	44.4124
	glutation-surf	-8.3733	4.11689	.317	-21.9224	5.1757
	mikrosfer glutation+surf	39.6700*	4.11689	.000	26.1210	53.2190
	kontrol	-16.9133*	4.11689	.014	-30.4624	-3.3643
kontrol	glutation + surf	47.7767*	4.11689	.000	34.2276	61.3257
	glutation-surf	8.5400	4.11689	.301	-5.0090	22.0890
	mikrosfer glutation+surf	56.5833*	4.11689	.000	43.0343	70.1324
	mikrosfer glutation-surf	16.9133*	4.11689	.014	3.3643	30.4624

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 25.423.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets**mmp**

Tukey HSD

kelompok	N	Subset		
		1	2	3
mikrosfer glutation+surf	3	15.4467		
glutation + surf	3	24.2533		
mikrosfer glutation-surf	3		55.1167	
glutation-surf	3		63.4900	63.4900
kontrol	3			72.0300
Sig.		.276	.317	.301

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 25.423.