

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Fungal keratitis* (FK) adalah kondisi inflamasi pada kornea yang disebabkan oleh infeksi jamur, seperti *Fusarium*, *Aspergillus*, dan jamur mirip ragi seperti *Candida* (Mishra et al., 2020). Setiap tahun, diperkirakan terdapat 1,5 juta kasus infeksi baru FK di seluruh dunia, terutama di negara tropis dan subtropis, dengan prevalensi antara 20-60% di daerah tropis (Hoffman et al., 2021). Di Asia Tenggara, diperkirakan terdapat 57.990 kasus setiap tahunnya, sementara di Indonesia sendiri diperkirakan terdapat 40.000 kasus (Stapleton, 2023; Wahyuningsih et al., 2021). FK merupakan salah satu penyebab kebutaan dengan insiden berkisar antara 2,5 hingga 799 ribu kasus per 100 ribu populasi. (Ting et al., 2021). Salah satu obat yang digunakan untuk terapi FK adalah Amfoterisin B (AMB), yang dianggap sebagai "*Gold Standard*" karena spektrum luas dan rendahnya resistensi klinis (Mishra et al., 2020).

Pengobatan FK bisa dilakukan secara sistemik atau lokal, tetapi pengobatan lokal lebih diutamakan karena memberikan konsentrasi obat yang lebih tinggi di lokasi infeksi, seperti sediaan tetes mata atau salep (Jansook et al., 2020). Namun, sediaan ini memiliki keterbatasan yaitu kurang dari 5% obat lipofilik dan kurang dari 0,5% obat hidrofilik mencapai jaringan target akibat mekanisme pembersihan yang cepat (Ioniță et al., 2023). Untuk meningkatkan ketersediaan hayati, alternatif seperti platform hidrogel dapat digunakan.

Hidrogel adalah polimer hidrofilik berbentuk jaringan berikatan silang yang memiliki kemampuan difusi air tinggi dan dapat mengembang dalam air (Erizal, 2010). Kandungan air dalam hidrogel menciptakan kondisi mirip jaringan alami, melindungi senyawa aktif dari dekomposisi dan mempertahankan pelepasan obat secara bertahap. Formulasi AMB dengan polimer menunjukkan potensi signifikan dalam mengurangi toksisitas dan meningkatkan efek terapeutik berkat sifat biodegradabilitas, biokompatibilitas, dan fungsionalitasnya (Wang et al., 2021).

Polimer hidrogel dibedakan menjadi alami dan sintetik, dengan hidrogel alami lebih populer karena biaya yang rendah, biokompatibilitas tinggi, dan non-immunogenisitas (Tejada et al., 2022). Salah satu polimer alami yang sering digunakan adalah alginat, yaitu polisakarida polianionik yang terdiri dari  $\alpha$ -L-Gulonuronic acid (G) dan  $\beta$ -D-Mannuronic acid (M) (Tan et al., 2023). Alginat dapat membentuk hidrogel dalam kondisi ringan, memiliki biokompatibilitas dan biodegradabilitas yang baik, serta toksisitas rendah (Zhang et al., 2021). Umumnya, hidrogel berbasis



CaCl<sub>2</sub> sebagai agen pengikat silang karena Struktur  $\alpha$ -L-ikatan dengan ion bervalensi dua atau lebih seperti Ca<sup>2+</sup> yang struktur *box-egg* yang stabil (Hu et al., 2021). Selain itu, dapat meningkatkan struktur jaringan, sifat reologi, dan (Szekalska et al., 2018).

*e-like hydrogel* (CLH) adalah jenis hidrogel yang berpotensi antaran obat okular karena dapat meningkatkan ketersediaan

hayati obat mata yang menjadi solusi pemberian obat lokal (Choi, 2018). CLH dapat mendistribusikan obat ke permukaan mata jauh lebih lama dibandingkan tetes mata yang hanya sekitar 2 menit (Xu *et al.*, 2018). Dengan demikian, CLH dapat meningkatkan efisiensi dan kepatuhan terapeutik karena dapat mengurangi frekuensi penggunaan obat (Ioniță *et al.*, 2023).

Hingga saat ini, belum ada penelitian spesifik tentang karakteristik CLH-AMB berbasis alginat. Oleh karena itu, akan dilakukan formulasi CLH-AMB menggunakan natrium alginat sebagai polimer dan kalsium klorida sebagai agen pengikat silang. Terdapat beberapa pengujian yang akan dilakukan seperti, uji viskositas, pH permukaan, *water content*, FTIR, Pelepasan obat secara *in vitro*, hemolisis dan transparansi optik. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran mengenai pengaruh kalsium klorida sebagai agen pengikat silang terhadap karakteristik fisikokimia *contact lense-like hydrogel*

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana pengaruh variasi konsentrasi kalsium klorida sebagai agen pengikat silang terhadap karakteristik *contact-lense like hydrogel* berbasis alginat yang mengandung AMB ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh variasi konsentrasi kalsium klorida sebagai agen pengikat silang terhadap karakteristik *contact-lense like hydrogel* berbasis alginat yang mengandung AMB.



## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Laboratorium Farmasetika. Penelitian dilaksanakan pada Oktober 2024-Januari 2025. Keseluruhan alur penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

### 2.2 Bahan dan Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu, alat-alat gelas (Pyrex<sup>®</sup>), anak timbangan, centrifuge (Oregon<sup>®</sup> LC-04S), jangka sorong (Tricle Brand<sup>®</sup>), mikropipet (Dragon onemed<sup>®</sup>), orbital shaker (Optima<sup>®</sup>), oven (Mettler<sup>®</sup>), pH meter (HANNA edge<sup>®</sup>), set alat 3D *printing* (Kingroon KP3S Pro<sup>®</sup>), spektrometer IR (AccuTrac-4100<sup>®</sup>), spektrometer UV-Vis (Dynamica<sup>®</sup> HALO XB-10), timbangan analitik (Sartorius<sup>®</sup>), dan viskometer RV (Brookfield<sup>®</sup>), dan alat penunjang lainnya

Bahan-bahan yang digunakan yaitu, AMB (Sigma aldrich<sup>®</sup>), AMB BPF1 (BPOM), air murni (Waterone<sup>®</sup>), DMSO (Merck<sup>®</sup>), filamen ePLA+HS (eSUN<sup>®</sup>), gliserin (Merck<sup>®</sup>), kalium dihidrogen fosfat (Merck<sup>®</sup>), kalsium klorida (Merck<sup>®</sup>), kalium klorida (Merck<sup>®</sup>), natrium alginat (CV Subur Kimia Jaya<sup>®</sup>), natrium klorida (Merck<sup>®</sup>), natrium lauri sulfat (Merck<sup>®</sup>), silikon (Xiameter<sup>®</sup>), silikon (LSR9-9508-30<sup>®</sup>) dan bahan-bahan penunjang lainnya.

### 2.3 Metode Penelitian

#### 2.3.1 Pencetakan *mould* dengan 3D-*printing* menggunakan metode *fused deposition modeling* (FDM)

Cetakan CLH dibuat menggunakan printer 3D dengan PLA sebagai bahan dasar untuk cetakan positif, berdasarkan metode yang dijelaskan dalam literatur dengan beberapa modifikasi (Ramöller *et al.*, 2020). Desain cetakan dibuat menggunakan aplikasi web tinkercad.com. Desain 3D yang dihasilkan kemudian diproses menggunakan perangkat lunak UltiMaker Cura<sup>®</sup> untuk mendapatkan file gcode. File gcode tersebut kemudian ditransfer ke printer, dan cetakan positifnya dibuat. Dari cetakan positif tersebut, cetakan negatif CLH kemudian dibentuk dari silikon. Sejumlah silikon elastomer dan pengerasnya ditimbang dengan perbandingan bobot 10:1, lalu dihomogenkan. Setelah campuran homogen, dituangkan ke dalam cetakan positif yang telah dibuat dan kemudian dидiamkan pada suhu ruang selama 1 jam, kemudian dikeraskan dalam oven selama 5 jam pada suhu 80°C.



#### hidrogel

dimulai dengan membuat dispersi natrium alginat 3% dengan 3 gram natrium alginat ke dalam 100 ml air murni. Dispersi biarkan semalaman agar natrium alginat terhidrasi secara dispersi natrium alginat diaduk hingga homogen. Larutan

kalsium klorida dibuat dengan cara melarutkan sejumlah kalsium klorida di dalam air hingga diperoleh larutan yang jernih. Konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  dalam larutan *crosslinking* masing-masing adalah 1,5, 3 dan 6% w/v. Rasio alginat dan kalsium klorida dapat dilihat pada **Tabel 1**.

**Tabel 1.** Komposisi Formula *Contact Lense-Like Hydrogel*

Komposisi (%b/v)	Formula		
	F1	F2	F3
Dispersi Natrium Alginat	3,0%	3,0%	3,0%
Larutan Kalsium Klorida	1,5%	3,0%	6,0%

Untuk pembuatan CLH, larutan natrium alginat dituangkan ke atas cetakan silikon dan dimasukkan dalam *freezer* hingga membeku. Alginat yang sudah terbentuk kemudian direndam ke dalam larutan kalsium klorida selama 4 jam hingga terbentuk hidrogel. Hidrogel yang diperoleh dikeringkan selama 48 jam pada suhu ruang. Selanjutnya hidrogel yang diperoleh di rendam dalam larutan AMB jenuh dalam PBS pH 7.4 yang mengandung gliserin 5%. Kelebihan larutan obat dihilangkan dengan kertas saring dan CLH-AMB yang diperoleh disimpan dalam wadah tertutup kedap untuk digunakan pada pengujian selanjutnya.

### 2.3.3 Uji viskositas, reologi dan daya sebar

Pengujian viskositas dan reologi dilakukan menggunakan viskometer Brookfield RVT. Sementara itu, pengujian daya sebar dilakukan menggunakan pelat kaca. Pengujian ini dilakukan pada larutan natrium alginat dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3% untuk menentukan konsentrasi polimer pada formulasi CLH. Viskositas larutan polimer diukur pada kecepatan 50 rpm, sedangkan tipe aliran larutan polimer ditentukan dengan mengukur viskositas pada berbagai kecepatan rotasi yang berbeda (10-100 rpm). Data yang telah didapatkan dihitung menggunakan persamaan 1 (Fathalla *et al.*, 2022). Sementara itu, pengujian daya sebar dimulai dengan menimbang polimer sebanyak 0,5 gram tepat ditengah lempeng bawah kemudian ditutup dengan lempeng atas. Tambahkan 100 gram beban diatas lempeng dan diukur diameter polimer 60 detik setelah diberi beban. Ulangi proses penambahan beban hingga mencapai 600 gram. Diameter yang telah didapatkan dihitung menggunakan persamaan 1 (Szulc-Musiol *et al.*, 2023).

$$\eta = \%T \times f$$

$$S = d^2 \frac{\pi}{4} \quad (1)$$



si  
aran ( $\text{cm}^2$ )

### 2.3.4 Uji water content

Pengujian *water content* dimulai dengan menimbang CLH yang telah dikeringkan pada suhu ruang selama 48 jam. CLH yang telah kering direndam dalam larutan media yang sesuai yaitu PBS, PBS + gliserin 5% dan air. Setelah direndam CLH ditimbang kembali dan dihitung menggunakan persamaan 3 (Butylina *et al.*, 2020).

$$WC\% = \left( \frac{W_b - W_d}{W_d} \right) \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan:

WC = *Water content* hidrogel (%)

$W_b$  = berat hidrogel setelah direndam (g)

$W_d$  = berat hidrogel yang telah kering (g)

### 2.3.5 Uji pH permukaan

Nilai pH permukaan CLH-AMB diukur menggunakan pH meter. Pengujian dimulai dengan merendam CLH-AMB dalam 5 ml PBS dan didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, pH diukur dengan menempatkan elektroda pada permukaan hidrogel selama 1 menit untuk menentukan nilai pH. (Elim *et al.*, 2023).

### 2.3.6 Uji transparansi optik

Pengujian ini bertujuan untuk menentukan seberapa mudah cahaya dapat menembus suatu material tanpa hamburan cahaya. (Tran *et al.*, 2021). Pertama-tama sediaan di rendam dalam larutan PBS selama 24 jam. Setelah itu, sediaan ditempelkan pada permukaan kuvet yang mengandung 2 ml air murni. Transparansi optik ditentukan berdasarkan transmisi cahaya (T%) dalam rentang panjang gelombang 400-700 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Tran and Yang, 2020). Tingkat transmisi cahaya dari CLH dilaporkan pada panjang gelombang 600 nm sebagai titik representatif dari rentang spektrum yang digunakan, karena panjang gelombang tersebut berada di bagian tengah spektrum, yang relevan untuk analisis transmisi cahaya material (Korogiannaki *et al.*, 2015).

### 2.3.7 Penetapan panjang gelombang maksimal dan pembuatan kurva baku AMB

Panjang gelombang absorbansi maksimum ditentukan dengan spektrofotometri UV-Vis. Pertama membuat larutan stok AMB 1.000 µg/ml dengan menimbang 10 mg AMB dan dituangkan ke dalam labu volumetrik, kemudian menambahkan DMSO hingga volume total 10 ml. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan mengukur absorbansi pada konsentrasi 50 µg/ml pada panjang gelombang 200-800 nm. Kemudian dibuat lima konsentrasi larutan AMB mulai dari 3,125-50 µg/ml dalam media PBS + gliserin 5% dan 1,25-20 µg/ml untuk media PBS + SLS 2%. Absorbansi masing-masing larutan diukur pada panjang gelombang maksimum AMB menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Mualim *et al.*, 2024).



### 2.3.8 Uji *saturation solubility*

Pengujian *saturation solubility* dilakukan dengan menggunakan orbital shaker pada kecepatan 100 rpm selama 24 jam. Dalam pengujian ini, digunakan tiga media, yaitu PBS, PBS + gliserin 5%, dan PBS + SLS 2%. Setelah 24 jam, larutan disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit untuk memperoleh supernatan. Supernatan yang diperoleh kemudian diencerkan dan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Konsentrasi AMB dihitung menggunakan persamaan regresi kurva yang telah diperoleh sebelumnya (Mualim *et al.*, 2024).

### 2.3.9 Uji pelepasan obat secara *in vitro*

Uji pelepasan dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan orbital shaker pada kecepatan 100 rpm. Pertama CLH-AMB dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan 1 ml media PBS + 2% SLS. Kemudian, pada interval waktu 0,5, 1, 2, 4, 8, dan 24 jam, 1 ml media dicuplik dan diganti dengan media segar dalam jumlah yang sama. Setelah dicuplik absorbansi sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum AMB (Mualim *et al.*, 2024).

### 2.3.10 Analisis *fourier-transform infra red* (FTIR)

Analisis FTIR dilakukan untuk menganalisis keberadaan AMB dan interaksi antara alginat dan kalium klorida dalam formulasi. Sampel dianalisis menggunakan spektrometer pada rentang spektra 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  dengan 128 *scans* pada resolusi 4  $\text{cm}^{-1}$  (Elim *et al.*, 2023).

### 2.3.11 Uji hemolisis

Uji hemolisis umumnya menggunakan sel darah merah dari tikus sebagai skrining toksisitas awal untuk sediaan yang dikembangkan. Pertama-tama, darah disentrifugasi pada 2000 rpm selama 20 menit. Setelah itu, plasma dikumpulkan, dan sel darah merah dicuci menggunakan NaCl 0,9% sebanyak 3 kali untuk mendapatkan supernatan yang jernih. Setelah disentrifugasi, ditambahkan PBS hingga konsentrasi akhir mencapai 10%v/v. Sampel uji diencerkan menggunakan PBS dan dibuat dalam tiga konsentrasi berbeda, yaitu 500, 50, dan 5 ppm. CLH dan CLH-AMB dicuplik sebanyak 900  $\mu\text{l}$ , dan 100  $\mu\text{l}$  suspensi sel darah merah dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Untuk kontrol positif menggunakan air murni dan kontrol negatif menggunakan PBS. Setelah inkubasi, larutan disentrifugasi pada 7000 rpm selama 10 menit, dan supernatan diambil untuk diukur menggunakan UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Persentase hemolisis digunakan persamaan 5 (Elim *et al.*, 2023).



$$S = \left( \frac{\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi kontrol negatif}}{\text{Absorbansi kontrol positif} - \text{Absorbansi kontrol negatif}} \right) \times 100\% \quad (3)$$

## 2.4 Analisis Data, Pembahasan Hasil dan Penarikan Kesimpulan

Penelitian ini akan menerapkan pendekatan analitis yang terstruktur untuk menilai hasil yang diperoleh. Data eksperimen akan dikalkulasi dengan perangkat Microsoft Excel<sup>®</sup>. Grafik, kurva dan analisis statistik akan dilakukan menggunakan perangkat GraphPad<sup>®</sup> untuk menentukan signifikansi data, dengan menerapkan uji statistik yang sesuai, tergantung pada jenis data dan desain eksperimen. Pembahasan hasil akan mencakup interpretasi data, menghubungkannya dengan literatur yang relevan, serta membahas implikasi dari temuan yang diperoleh. Kesimpulan akan dirumuskan berdasarkan hasil analisis dan pembahasan, merangkum temuan utama, menjawab rumusan masalah dan tujuan penelitian, serta memberikan saran untuk penelitian di masa mendatang.

