

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi virus Hepatitis C (HCV) merupakan faktor utama penyebab sirosis hati dan *hepatocellular carcinoma* (HCC). Saat ini, sekitar 71 juta individu terinfeksi HCV dengan 20–30% populasi berkembang menjadi sirosis hati, dan 1–4% dari pasien sirosis berkembang menjadi HCC setiap tahunnya (Llovet et al., 2021) (Rabaan et al., 2020). Hingga saat ini HCC menempati peringkat keenam sebagai kanker paling umum di dunia, dengan insiden tiga kali lebih tinggi pada pria dibandingkan wanita. Sekitar 800.000 orang di seluruh dunia didiagnosis menderita HCC setiap tahun, yang menyebabkan lebih dari 700.000 kematian setiap tahunnya (Islam et al., 2024). HCV adalah patogen yang ditularkan melalui darah yang secara spesifik menyerang organ hati (Wang et al., 2020). Sebagian besar individu yang terinfeksi HCV gagal menghilangkan infeksi secara alami, yang mengarah pada infeksi kronis seumur hidup. Peradangan hati yang berkepanjangan akibat HCV dapat menyebabkan perkembangan penyakit hati lanjut seperti fibrosis hati, sirosis, dan pada akhirnya HCC yang fatal (Djajapranata et al., 2023).

Berbagai metode pengobatan hepatitis C telah terus dikembangkan, termasuk pengembangan sistem penghantaran obat secara transdermal dengan metode konvensional (Isbaniah et al., 2021) (Elim et al., 2022). Namun, metode konvensional memiliki kekurangan yaitu kurangnya kemampuan obat untuk menembus lapisan terluar kulit manusia, yang berfungsi sebagai penghalang fisik yang kuat (Mudjahit et al., 2023). Meskipun injeksi hipodermik, intradermal, dan intravena menggunakan jarum konvensional dapat digunakan untuk menembus penghalang ini, injeksi-injeksi ini sering menyebabkan rasa sakit dan berpotensi merusak jaringan. Pemberian obat secara oral dan topikal berfungsi sebagai alternatif tetapi mengakibatkan penurunan signifikan dalam efisiensi penghantaran obat karena eliminasi *first-pass* melalui saluran pencernaan dan proses dekomposisi gastrointestinal (Lee et al., 2020) (Sabri et al., 2020). Akibatnya, konsentrasi terapeutik obat yang efektif tidak tercapai secara konsisten. *Microneedle* (MN) menjadi salah satu solusi utama untuk penghantaran obat transdermal karena kemampuannya untuk mengatasi masalah efisiensi penghantaran dengan menembus lapisan stratum korneum secara fisik tanpa menimbulkan rasa sakit dan merusak jaringan (Avcil et al., 2021) (Paredes et al., 2021).

SOF menjadi lini pertama dalam manajemen klinis infeksi virus hepatitis C. Karena metabolisme *first-pass* yang kompleks. SOF merupakan golongan *prodrug* yang memerlukan aktivasi metabolik untuk menghasilkan bentuk aktif secara farmakologis dalam menghambat aktivitas RNA polimerase virus di hati. SOF adalah golongan inhibitor nukleosida yang disebut *Direct Acting Antivirals* (DAAs). SOF sebagai analog nukleosida yang menghambat HCV dengan cara yang lebih baik daripada obat-obatan segolongannya, seperti desabuvir. Sistem penghantaran obat menggunakan teknologi *Microneedle* yang digunakan dalam cangkang kapsul telah dikembangkan sebagai inovasi terbaru



yang menargetkan terapi untuk obat-obatan dengan sifat penetrasi yang buruk (Lee et al., 2020). *Luminar Unfolding Microneedle Injector* (LUMI) merupakan teknologi terbaru yang menjanjikan untuk mengatasi permasalahan penyerapan obat di usus (Abramsom et al., 2019). Namun, LUMI yang telah dikembangkan memiliki kekurangan karena masih menggunakan bahan *non-biodegradable* yaitu *aluminium elastomeric core*, yang dapat menimbulkan risiko berbahaya bagi tubuh. Oleh karena itu, penelitian ini mengembangkan sistem penghantaran obat SOF menggunakan *Luminar Capsule Microneedles* (LUCAMs). LUCAMs terdiri dari tiga komponen yaitu kapsul, *branch* atau cabang, dan *microneedle* (MN) (Lee et al., 2020) (Abramsom et al., 2019). Kapsul dirancang dengan cangkangnya dilapisi menggunakan polimer Eudragit®, sehingga memungkinkan kapsul tersebut larut hanya pada pH 5,5, yang sesuai dengan pH usus. Bagian dalam kapsul terdiri dari tiga cabang dan MN yang mengandung obat yang dapat dengan cepat menembus mukosa usus setelah kapsul larut.

Metode analisis dikembangkan untuk menetapkan prosedur yang sesuai dalam penentuan analisis kadar obat secara spesifik. Secara umum, metode untuk mengkuantifikasi obat dilakukan menggunakan metodologi HPLC, yang diperluas hingga HPLC MS/MS (De Nicolò et al., 2021). Namun, metode-metode ini dibatasi oleh waktu analisis yang lama dengan bias yang lebih besar dan memerlukan pemeliharaan instrumen, yang merupakan kendala utama dalam analisis. Pada skala analisis laboratorium, solusi alternatif adalah spektrofotometer UV-Vis, yang memberikan hasil menjanjikan dengan metode sederhana, biaya rendah, dan mengatasi kendala waktu analisis yang lebih singkat (Hidayat et al., 2024). Analisis spektrofotometri UV-Vis melibatkan penambahan zat kimia tambahan berupa reagen untuk meningkatkan efektivitas analisis sampel. Mendeteksi obat dalam sampel protein, DNA, dan senyawa kimia selama analisis obat memerlukan penggunaan reagen untuk memfasilitasi pengamatan visual sampel yang dianalisis melalui perubahan warna (El-Yazbi et al., 2021). Ammonium metavanadat merupakan salah satu zat kimia yang dapat digunakan untuk mendeteksi SOF, reagen ini membentuk kompleks warna yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 537 nm untuk mendeteksi SOF (Gosmawi et al., 2022).

Metode analisis yang telah tervalidasi sesuai dengan pedoman metode analisis ICH selanjutnya dapat diaplikasikan sebagai acuan untuk mengukur konsentrasi SOF dari sediaan LUCAMs yang dikembangkan. Metode analisis yang valid diaplikasikan dalam penentuan konsentrasi SOF melalui uji pelepasan obat secara *in vitro*, uji permeasi melalui mukosa usus secara *ex vivo*, dan penghantaran obat menggunakan hewan coba melalui uji *in vivo*.

4.2 Rumusan Masalah



Dari uraian di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah memperoleh metode analisis spektrofotometer dan kolorimetri yang valid untuk analisis SOF dalam etanol, cairan usus buatan, dan jaringan hati.

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui metode analisis spektrofotometer UV-vis dan kolorimetri yang valid untuk kuantifikasi SOF dalam media etanol, cairan usus buatan (CUB) dan jaringan hati kelinci.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beaker, labu tentukur, botol duran, erlenmeyer, eppendorf, gelas ukur, *homogenizer*, pipet mikro (Dragonlab®), sendok tanduk *stainless*, sentrifugasi, sonikator, spektrofotometer UV-Vis (Dynamica, HALO XB-10/VIS-20/ENVmaster), timbangan analitik (Sartorius®), vortex, dan vial.

2.1.2 Bahan

Ammonium metavanadat, aquadest, asam sulfat, asetonitril, etanol, kalium dihidrogen fosfat, metanol, natrium hidroksida, jaringan hati kelinci, dan SOF (kemurnian SOF ~ 99%) diperoleh dari Hangzhou Verychem Science and Technology Co., Ltd.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Penyiapan larutan stok SOF

Larutan stok SOF dibuat dengan menimbang 10 mg SOF dan dimasukkan dalam labu tentukur 10 mL yang telah dikalibrasi. Selanjutnya, dilarutkan menggunakan 0,1 M H₂SO₄ hingga tanda batas untuk memperoleh konsentrasi larutan stok 1000 µg/mL.

2.2.2 Penyiapan larutan H₂SO₄ 0,1 M

Larutan H₂SO₄ 0,1 M dibuat dengan memasukkan 6,25 mL aquadest ke dalam labu tentukur 25 mL kemudian, ditambahkan 0,136 mL H₂SO₄ 98% ke dalam labu tentukur dan diencerkan dengan aquadest hingga larutan mencapai tanda batas.

2.2.3 Penyiapan reagen amonium metavanadat

Dalam penelitian ini, amonium metavanadat digunakan sebagai reagen dengan konsentrasi 5%. Reagen amonium metavanadat dibuat dengan menimbang 5 g amonium metavanadat dan diencerkan dalam 100 mL H₂SO₄ 40% menggunakan labu Erlenmeyer. Larutan tersebut kemudian dipanaskan dalam penangas air untuk

du padat.



2.2.4 Penentuan panjang gelombang dan penyiapan kurva kalibrasi

Panjang gelombang SOF diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Dynamica, HALO XB-10/VIS-20/ENVmaster Ltd./Pvt., Kowloon, Hong Kong). Larutan SOF disiapkan dengan melarutkan 10 mg SOF dalam etanol (SOF-EtOH), 10 mg SOF dalam Cairan Usus Buatan (SOF-CUB) untuk mencapai konsentrasi 1000 µg/mL. Larutan kalibrasi kemudian disiapkan dalam enam konsentrasi berbeda yang berkisar dari 40 µg/mL hingga 1,25 µg/mL dalam triplikat dengan mengencerkan larutan stok menggunakan etanol dan CUB dan diukur dalam rentang panjang gelombang 200-400 nm untuk membuat kurva kalibrasi. Larutan *quality control* (QC), termasuk LLOQ, LQC, MQC, dan HQC juga disiapkan dalam triplikat untuk setiap pelarut. Nilai QC dalam etanol adalah LLOQ-1,67 µg/mL, LQC-5 µg/mL, MQC-15 µg/mL, dan HQC-30 µg/mL. Dalam CUB, nilainya adalah LLOQ-1,21 µg/mL, LQC-5 µg/mL, MQC-15 µg/mL, dan HQC-30 µg/mL.

Kurva kalibrasi SOF dalam jaringan hati kelinci disiapkan dengan menambahkan 0,8 mL amonium metavanadat sebagai reagen pembentuk kompleks warna untuk meningkatkan sensitivitas metode analisis SOF dalam jaringan hati. Matriks hati dicampur dengan aquadest dengan rasio (9:1) dan dihomogenkan selama 10 menit, selanjutnya ditambahkan 100 µl larutan stok SOF ke 1,9 g matriks hati kosong untuk memperoleh konsentrasi yang berkisar antara 0,625 µg/mL hingga 20 µg/mL. Digunakan sampel *quality control* (QC) yaitu konsentrasi berdasarkan nilai LLOQ-0,83 µg/mL, LQC-3 µg/mL, MQC-10 µg/mL, HQC-15 µg/mL.

2.2.5 Penyiapan cairan usus buatan

Penelitian ini menggunakan Cairan Usus Buatan (CUB) tanpa enzim LP dengan pH $6,8 \pm 0,5$. CUB dibuat dengan melarutkan 6,8 g *kalium dihidrogen fosfat* dalam aquadest dan menambahkan 173,5 mL natrium hidroksida LP. Larutan tersebut kemudian diencerkan dengan hingga volume 1 L dan disesuaikan dengan pH yang diinginkan. Medium CUB kemudian digunakan sebagai medium pelarut untuk meniru kondisi usus.

2.2.6 Penyiapan sampel dan ekstraksi SOF dari jaringan hati

Sampel jaringan hati disiapkan menggunakan metode presipitasi protein (PPT) dengan menggunakan pelarut yang sesuai untuk menghilangkan molekul yang berpotensi mengganggu dalam proses analisis (Yang et al., 2024). Metanol dan asetonitril adalah pelarut organik yang digunakan sebagai agen ekstraksi. Volume pelarut yang digunakan ditunjukkan dalam **Tabel 1**. Pelarut-pelarut ini bertindak sebagai agen untuk mengekstrak obat dalam berbagai volume. Ekstraksi dilakukan dengan mencampurkan jaringan hati dan aquadest dengan rasio 9:1 lalu menggunakan homogenizer selama 10 menit hingga terbentuk bubur. Selanjutnya, pelarut organik ditambahkan lalu divortex 15 menit dan a 15 menit dan kemudian sentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 atau 30 menit dan dikumpulkan dan diuapkan pada suhu 37°C hingga kering.



Sebelum analisis, sampel dipreparasi dengan menambahkan 0,8 mL reagen amonium metavanadat ke dalam sampel dan ditambahkan dengan etanol hingga total volume 2 mL hingga kompleks hijau terbentuk yang dapat terdeteksi pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan sensitivitas pengukuran dengan menggeser panjang gelombang dari daerah UV ke daerah visible untuk mengurangi interferensi matriks. Kemudian, absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Dynamica, HALO XB-10/VIS-20/ENVmaster Ltd./Pvt., Kowloon, Hong Kong) (Hidayat et al., 2024) (Aziz et al., 2023).

Tabel 1. Volume pelarut organik untuk ekstraksi SOF dari jaringan hati kelinci

Pelarut Organik	Volume (mL)
Metanol	1
	3
	5
	7
Asetonitril	1
	3
	5
	7

2.3 Validasi Metode Analisis

2.3.1 Linearitas

Linearitas ditentukan dengan membandingkan kurva standar SOF dalam media etanol dan cairan usus buatan yang diukur pada panjang gelombang 262 nm. Penentuan linearitas dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Kurva standar SOF diperoleh menggunakan enam konsentrasi yang berbeda: 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 $\mu\text{g/mL}$ dalam etanol dan CUB. Dalam jaringan hati kelinci, linearitas ditentukan dengan menggabungkan SOF dengan 0,8 mL reagen amonium metavanadat dan dicukupkan hingga total volume 2 mL menggunakan etanol untuk menciptakan variasi konsentrasi 20, 10, 5, 2,5, 1,25, dan 0,625 $\mu\text{g/mL}$. Setiap konsentrasi disiapkan dalam triplikat dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada 537 nm. Parameter linearitas dianggap valid dengan koefisien korelasi (R) mendekati 1 (Hamdan et al., 2024).

2.3.2 Spesifisitas

Limit of detection (LOD) dan *Lower Limit of Quantification* (LLOQ) ditentukan dengan menggunakan perhitungan berdasarkan data yang diperoleh dari pengujian linearitas. Rumus untuk LOD dan LLOQ disajikan di bawah ini, di mana s nilai standar deviasi (SD), dan S menunjukkan kemiringan kurva (Hamdan et al., 2024).



2.3.3 LOD dan LLOQ

Limit of Detection (LOD) menunjukkan ambang konsentrasi yang dapat dianalisis menggunakan metode yang digunakan, spektrofotometer UV-Vis Dynamica, HALO XB-10/VIS-20/ENVmaster Ltd./Pvt. (Kowloon, Hongkong), setelah memperoleh persamaan kurva kalibrasi yang terdiri dari nilai intersep (b) atau kemiringan dan nilai persamaan regresi (Mudjahid et al., 2023). *Lower Limit of Quantification* (LLOQ) mewakili nilai konsentrasi terendah yang dapat diidentifikasi dengan akurat dan tepat. Nilai LLOQ dapat diperoleh dari persamaan kurva kalibrasi yang telah ditetapkan, di mana b mewakili kemiringan dan nilai regresi. Rumus yang digunakan untuk menghitung nilai LLOQ adalah sebagai berikut. Dalam rumus ini, "b" merujuk pada kemiringan kurva kalibrasi, dan deviasi standar diperoleh dari pengukuran yang dilakukan selama proses kalibrasi. Persamaan berikut dapat digunakan untuk menghitung nilai LOD dan LLOQ (Aziz et al., 2022).

$$\text{LOD} = \frac{3.3s_y}{S} \quad (1)$$

$$\text{LLOQ} = \frac{10s_y}{S} \quad (2)$$

2.3.4 Akurasi dan presisi

Akurasi dan presisi dilakukan untuk memastikan bahwa nilai konsentrasi yang digunakan untuk konstruksi kurva kalibrasi adalah valid dan konsisten (Abdel et al., 2021). Analisis akurasi dan presisi dilakukan pada kurva kalibrasi dalam berbagai media dalam etanol, dan CUB. Konsentrasi 1,25 hingga 40 µg/mL. Pelarut kurva standar digunakan untuk mengencerkan larutan stok SOF guna membuat variasi konsentrasi ini. Untuk jaringan hati, SOF diukur dengan mencampurkan matriks hati dengan 0,8 mL amonium metavanadat 5% dalam larutan asam sulfat 0,1 M dalam rentang konsentrasi 0,625 hingga 29 µg/mL. Nilai akurasi dan presisi dievaluasi dengan melakukan pengukuran *intraday* dan *interday*, menentukan *High Quality control* (HQC), *Medium Quality control* (MQC), dan *Low Quality control* (LQC). Nilai-nilai akurasi dan presisi dianggap valid ketika %RSD (*Relative Standard Deviation*) dan %RE (*Specific Error*) memenuhi standar ICH, yaitu >15% (Sulistiawati et al., 2022).

2.3.5 Dilution Integrity

Parameter *dilution integrity* ditentukan untuk memastikan bahwa metode pengenceran yang digunakan dalam penelitian ini tidak mempengaruhi akurasi dan presisi. Sebanyak 400 µg/mL SOF disiapkan dalam berbagai media dan jaringan yaitu etanol dan CUB, Setiap larutan diencerkan 5 hingga 10 kali menggunakan suai untuk membuat 50 µg/mL dan 10 µg/mL dalam replikasi triplikat. hati, *dilution integrity* dilakukan dengan menggabungkan SOF dalam dengan 0,8 mL reagen ammonium metavanadat dan diencerkan etanol. Kemudian, larutan kalibrasi diencerkan 5 dan 10 kali untuk konsentrasi 50 µg/mL dan 10 µg/mL dalam triplikat. Larutan yang telah



diencerkan diukur pada panjang gelombang yang telah ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-vis (Afika et al., 2024).

2.3.6 *Extraction recovery*

Extraction recovery diperoleh dari jaringan hati kelinci setelah ekstraksi. Konsentrasi SOF dalam matriks hati yang ditentukan berkisar antara 0,625 µg/mL hingga 20 µg/mL. Semua pengukuran dievaluasi menggunakan analisis akurasi dan presisi *intraday* dan *interday* dengan sampel *quality control* LLOQ-0,83 µg (mL), LQC-3 µg, MQC-10 µg(mL) dan HQC-15 µg/mL yang diukur dalam tiga set menggunakan UV-Vis Spectrophotometer Dynamica, HALO XB-10/VIS-20/ENVmaster Ltd./Pvt. (Kowloon, Hong Kong) pada panjang gelombang yang ditentukan.

2.4.1 Pengumpulan Data dan Analisis Statistik

Data masing-masing hasil pengujian yang telah dikumpulkan, selanjutnya diolah menggunakan *software* GraphPad® dan MS Excel®, serta dianalisis menggunakan pendekatan statistik dengan *software* IBM SPSS® (*Statistical Product and Service Solution*) dengan melihat nilai signifikan ($p < 0,05$).

