

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Arthritis reumatoid (AR) merupakan penyakit dengan prevalensi yang tinggi di dunia dan di Indonesia. AR merupakan penyakit reumatik kronik dan progresif yang disebabkan oleh kondisi autoimun sistemik pada jaringan persendian (Wang et al., 2022). Pada tahun 2021, terdapat sekitar 120 juta penduduk di dunia didiagnosis menderita AR, sedangkan pada tahun 2020 prevalensi AR di Indonesia mencapai 1,3 juta kasus berdasarkan data Perhimpunan Reumatologi Indonesia (Hidayat et al., 2021; Hussein dan Aboukhamis, 2022).

Metotreksat (MTX) merupakan obat lini pertama dan *gold standard* dari kelas *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs) yang telah digunakan untuk terapi AR di Indonesia dan di dunia (Hidayat et al., 2021; Hussein dan Aboukhamis, 2022). MTX telah terbukti dapat mengobati AR dengan cara menghambat sintesis asam nukleat dan protein melalui pengikatan dihidrofolat reduktase (Majorczyk et al., 2022).

Secara konvensional, MTX diberikan melalui rute oral dan injeksi dengan dosis 7,5-25 mg/minggu pada terapi AR (Tekko et al., 2020a). Namun, melalui rute konvensional MTX dapat mengalami metabolisme lintas pertama di hati dan menyebabkan banyaknya efek samping sistemik seperti sesak napas, penurunan fungsi sumsum tulang, gangguan gastrointestinal, dan leukopenia. Hal ini dikarenakan MTX akan dilepaskan secara terus menerus dan tidak bertarget sehingga dapat menyebabkan kematian sel normal (Tekko et al., 2020b). Oleh karena itu, diperlukan sistem penghantaran yang bertarget hanya pada situs AR untuk menghindari efek samping tersebut.

Berdasarkan permasalahan tersebut, pada riset ini dikembangkan MTX dalam bentuk *smart nanoparticle* (SN). MTX dienkapsulasi dengan polimer *polyethyleneglycol-polycaprolactone* (PEG-PCL) yang bersifat *pH-sensitive* dan dapat berikatan dengan ligan kolagen tipe II serta *scavenger receptor* pada situs AR (Qindeel et al., 2020). SN-MTX dapat mengontrol pelepasan MTX hanya pada kondisi inflamasi pada situs AR secara bertarget sehingga dapat mengatasi permasalahan efek samping sistemik dan toksisitas MTX. SN yang berukuran nanometer mendukung MTX untuk lebih mudah terbawa masuk ke makrofag dengan permeabilitas yang signifikan serta profil farmakokinetika dan farmakodinamika yang lebih baik dibandingkan partikel berukuran normal dan mikrometer (Wang et al.,



dihantarkan melalui rute transdermal dengan tujuan untuk mengurangi efek samping gastrointestinal akibat pemberian MTX secara konvensional. Rute transdermal menargetkan obat untuk memasuki aliran darah melalui pori-pori pori-pori di lapisan dermis kulit (Ilyas et al, 2024). Namun, *stratum corneum* merupakan salah satu lapisan kulit dapat menghalangi masuknya obat ke dalam aliran darah sehingga diperlukan agen penetrasi untuk menembus SC.

Oleh karena itu, perlu dipilih agen penetrasi yang dapat menembus lapisan SC secara maksimal. Sistem *dissolving microneedle* (DMN) merupakan salah satu sistem berbasis jarum berukuran mikrometer yang tersusun atas polimer terlarut di dalam kulit membentuk lubang mikroskopis sehingga obat mampu berpermeasi melewati lapisan SC kemudian melarut dan melepaskan obat masuk ke pembuluh darah tanpa menimbulkan rasa sakit (Syafika et al., 2023).

DMN tersusun atas dua bagian yakni jarum berukuran mikro dan bagian baseplate yang terbuat dari polimer biodegradable dan larut dalam air. Kombinasi asam hialuronat (AH) dan polivinil pirolidon (PVP) digunakan untuk menghasilkan DMN dengan karakteristik fisik yang lebih baik dibandingkan penggunaan secara tunggal. Penggunaan AH sebagai polimer DMN dapat memberikan sifat viskoelastisitas, biokompatibilitas tinggi dan imunogenisitas yang rendah (Chi et al, 2022). Selain itu, sistem nanopartikel yang dikombinasikan dengan AH dapat membantu pengiriman obat yang lebih selektif serta dapat membantu mengurangi kerusakan pada jaringan (Alsaikhan, 2023). Penelitian ini berfokus pada pengembangan formulasi DMN yang terintegrasi dengan SN-MTX dengan variasi polimer AH dan PVP. Formula yang diperoleh kemudian dievaluasi karakteristik fisik, waktu melarut, dan profil permeasinya untuk menentukan formula SN-DMN-MTX terbaik dengan karakteristik yang optimal.

1.2 Teori

1.2.1 Arthritis Reumatoid (AR)

AR merupakan penyakit autoimun yang disebabkan oleh kondisi abnormalitas sel imun pada jaringan sendi. Interaksi antara kompleks antibodi-antigen dengan limfosit T serta sitokin proinflamasi memicu hiperproliferasi *fibroblast-like synoviocytes* (FLS) menuju fenotipe proinflamasi. Sel FLS akan menghasilkan enzim *matrix metalloproteinase*, molekul adhesi, serta kemokin, yang berperan dalam degradasi protein pada kartilago sendi, sehingga berkontribusi terhadap kerusakan struktural pada persendian (Nanke, 2023).

1.2.2 Metotreksat (MTX)

MTX merupakan obat golongan DMARDs yang menghambat pembentukan asam nukleat dan protein melalui pengikatan dengan dihidrofolat reduktase sehingga dapat menghambat pembentukan DNA dan RNA yang menyebabkan kematian sel AR. Mekanisme kerja MTX meliputi pengurangan akumulasi poliamina, menghambat sintesis purin dan pirimidin, serta mengurangi molekul adhesi inflamasi, mempengaruhi pelepasan adenosin, dan mengatur kaskade sitokin (Katturajan et al., 2022).



NP

(2020) membuktikan bahwa MTX dalam bentuk NP memiliki bilabilitas seluler yang lebih baik serta pelepasan MTX melalui jaringan sendi yang mengalami AR (Qindeel et al., 2020). Hal ini Wang et al. (2022) yang menghasilkan partikel berbentuk NP

dapat mendukung MTX untuk lebih mudah terbawa masuk ke dalam makrofag yang menjadi kunci dalam patologi AR dengan permeabilitas yang signifikan serta profil farmakokinetika dan farmakodinamik yang lebih baik dibandingkan partikel berukuran normal dan mikrometer (Wang et al., 2022).

1.2.4 ***Dissolving Microneedle (DMN)***

MTX yang diformulasikan dalam bentuk DMN menunjukkan pelepasan obat yang terkontrol (Zhao et al., 2022). Hal ini didukung oleh Syafika et al. (2023) yang memformulasikan DMN dengan *microparticle* dengan hasil pelepasan obat yang lebih terkontrol dengan permeabilitas, bioavailabilitas dan efektivitas yang lebih tinggi dibandingkan sediaan konvensional metformin serta aman dan tidak berpotensi toksik (Syafika et al., 2023). Selain itu, DMN tidak menimbulkan rasa sakit, dapat mengurangi frekuensi pemberian obat, dan tidak meninggalkan sisa *biohazard* (He et al., 2021; Permana et al., 2020).

1.3 **Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini ialah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi dari kombinasi AH dan PVP terhadap karakteristik fisik SN-DMN-MTX?
2. Bagaimana profil permeasi secara *ex vivo* dari SN-DMN-MTX?

1.4 **Tujuan Penelitian**

Berdasarkan uraian latar belakang dan rumusan masalah di atas, maka tujuan dari penelitian ini ialah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi dari kombinasi AH dan PVP terhadap karakteristik fisik SN-DMN-MTX.
2. Untuk mengetahui profil permeasi SN-DMN-MTX secara *ex vivo*.

1.5 **Manfaat**

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan pengembangan alternatif terapi AR berbasis *smart nanoparticle* yang dihantarkan dalam DMN.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, aparatus difusi Franz, *centrifuge* (D1008, Dlab®, Dlab Scientific, Malaysia), mikroskop (Olympus® CX23, Jepang), MPatch™ *Microneedle Template* (tinggi = 700 μm, kemiringan = 500 μm dan dasar = 200 μm; susunan = 10 jarum x 10 jarum, Micropoint Technologies Pte Ltd, Singapura), oven (Memmert®), spektrofotometer UV-Vis (Dynamica®, HALO XB-10, Dynamica Scientific Ltd., Hongkong), dan timbangan (Denver®).

2.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah air suling, asam hialuronat (AH), dinatrium fosfat, *hydrochloric acid* (HCl), kalium dihidrogen fosfat, kalium klorida, kulit tikus Wistar, Na-metotreksat (Haihang Industry Co. LTD Shandong, China), natrium klorida, Parafilm®, dan *polyvinyl pyrrolidone* K-30 (PVP K-30).

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Pembuatan Larutan Phosphate-buffered Saline (PBS)

Larutan PBS dibuat dengan menimbang sebanyak 8 g natrium klorida, 0,2 g kalium klorida, 0,25 g kalium dihidrogen fosfat, dan 1,44 g dinatrium fosfat. Selanjutnya, bahan-bahan yang telah ditimbang tersebut dilarutkan menggunakan air suling hingga 1000 mL (Syafika et al., 2023).

2.2.2 Pembuatan Larutan Stok Metotreksat (MTX)

Larutan stok MTX dengan konsentrasi 1.000 bpj dibuat dengan menimbang MTX sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan menggunakan larutan PBS pH 7,4 dan pH 5 di dalam labu tentukur 10 mL hingga tanda batas. Larutan stok tersebut kemudian dicuplik sebanyak 1000 dan 500 μL ke dalam labu tentukur 10 mL, lalu dicukupkan dengan larutan PBS pH 7,4 dan pH 5 hingga tanda batas agar diperoleh larutan stok MTX dengan konsentrasi berturut-turut yakni 100 dan 50 bpj.

2.2.3 Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum dilakukan dengan mengukur serapan dari larutan stok MTX dalam PBS pH 7,4 dan pH 5 16 bpj pada panjang gelombang 200- 400 nm menggunakan instrumen spektrofotometer



Kurva Baku

MTX dibuat dalam seri pengenceran 0,5; 1; 2; 4; 8; dan 16 bpj. Pengenceran tersebut dibuat dari stok larutan 1000 bpj yang dilarutkan dalam PBS pH 7,4 dan pH 5 hingga tanda batas sesuai dengan hasil

perhitungan, agar diperoleh larutan dengan konsentrasi yang sesuai. Masing-masing hasil 6 pengenceran tersebut kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis.

2.2.5 Formulasi *Smart Nanoparticle-Dissolving Microneedle-Metotreksat (SN-DMN-MTX)*

Formulasi SN-DMN-MTX terdiri dari dua tahapan, yakni pembuatan lapisan jarum mikro dan lapisan *baseplate*. Formulasi SN-DMN-MTX dilakukan dengan melarutkan MTX, polimer AH, dan PVP K-30 dengan menggunakan air suling, kemudian campuran tersebut dipanaskan pada suhu 95°C di dalam oven. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi hingga diperoleh campuran yang jernih dan bebas dari gelembung (campuran I). Tahap selanjutnya adalah pembuatan lapisan *baseplate* yang dilakukan dengan melarutkan PVP K-30 dan gliserin dalam air suling, kemudian diaduk hingga homogen (campuran II).

Tabel 1. Rancangan formula SN-DMN-MTX

Lapisan	Komposisi	Formula (%b/b)				
		DMN-1	DMN-2	DMN-3	DMN-4	DMN-5
Jarum mikro	AH	2,5	5	10	2,5	2,5
	PVP K-30	20	20	20	10	15
	SN-MTX	25	25	25	25	25
	Air suling	52,5	50	45	60	55
<i>Baseplate</i>	PVP K-30	40				
	Gliserin	1				
	Air	59				

Sebanyak 0,5 g campuran I dimasukkan ke dalam cetakan DMN, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Campuran I kemudian dikeringkan selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C untuk membentuk lapisan jarum mikro. Setelah lapisan jarum mikro kering, selanjutnya campuran II dituang ke atas cetakan DMN berisi lapisan jarum mikro yang telah kering. Campuran II kemudian dikeringkan selama 1x24 jam pada suhu 37°C untuk membentuk lapisan *baseplate*. Setelah itu, SN-DMN-MTX dapat dilepaskan dari cetakan untuk digunakan pada pengujian berikutnya. Formula SN-DMN-MTX dapat dilihat pada Tabel 1.

2.2.6 Uji Kekuatan Mekanik dan Kemampuan Penetrasi SN-DMN-MTX

Kekuatan mekanik SN-DMN-MTX dievaluasi menggunakan delapan lapisan Parafilm® (≈1 mm; 126 µm/lapis) yang dirancang untuk mensimulasikan ketebalan epidermis. Bagian atas SN-DMN-MTX kemudian diberi beban setara 32 N selama 5 menit dengan teknik kompresi manual. Kekuatan mekanik ditentukan dengan mengukur ketinggian jarum SN-DMN-MTX menggunakan mikroskop digital. Perhitungan menggunakan persamaan 1. Selanjutnya, kemampuan penetrasi ditentukan berdasarkan jumlah lubang yang terbentuk pada setiap jarum. Perhitungan menggunakan persamaan 2 (Fitri et al., 2022).



$$\text{Kekuatan mekanik (\%)} = \frac{\text{Tinggi sebelum uji} - \text{Tinggi sesudah uji}}{\text{Tinggi sebelum uji}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Kemampuan Penetrasi (\%)} = \frac{\text{Jumlah lubang yang teramati}}{\text{Jumlah lubang keseluruhan}} \times 100 \quad (2)$$

2.2.7 Studi Permeasi secara *Ex Vivo*

Uji permeasi secara *ex vivo* dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan SN-DMN-MTX menembus lapisan kulit dengan menggunakan sel difusi Franz. SN-DMN-MTX diletakkan di atas kulit tikus yang berada diantara kompartemen donor dan reseptor. Media yang digunakan berupa PBS pH 7,4 yang meniru kondisi normal manusia dan PBS pH 5 yang meniru kondisi AR (Qindeel et al., 2020). Uji dilakukan pada suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ dan media dicuplik pada interval waktu tertentu (0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 24 jam) sebanyak 1 ml dan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 301 nm (Syafika et al., 2023).

2.2.8 Pengumpulan dan Analisis Data

Seluruh data yang telah diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan perangkat lunak berupa Microsoft Excel® 2019 (Microsoft Corporation) dan IBM SPSS® Statistics 26.0 (IBM, Armonk, New York, U.S.A). Seluruh data disajikan dalam bentuk grafik menggunakan GraphPad® Prism9 (GrapPad Software, San Diego, California, USA). Keseluruhan data disajikan sebagai rata-rata \pm standar deviasi (SD) dan data hasil penelitian dianggap berbeda secara signifikan apabila nilai $p \leq 0,05$.

