

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Alzheimer disease (AD) merupakan penyakit neurodegeneratif yang umumnya menyerang individu pada usia di atas 65 tahun. Berdasarkan data terbaru oleh *Alzheimer's Disease International* (ADI), prevalensi AD di Indonesia pada tahun 2016 mencapai 1,4 juta kasus dan diperkirakan akan meningkat hingga 4 juta kasus pada tahun 2030 (Srivastava *et al.*, 2021; *Alzheimer's Disease International*, 2022). AD tidak dapat disembuhkan, sehingga tujuan utama dari terapi yang tersedia adalah mencegah tingkat kerusakan pada sistem saraf pusat akibat rendahnya konsentrasi *acetylcholine* (Ach) pada otak. Saat ini, lini pertama pengobatan AD adalah obat golongan *acetylcholinesterase inhibitor* (AChEI) seperti rivastigmin, donepezil, dan galantamin. Namun, jika dibandingkan dengan AChEI lainnya, rivastigmin (RV) dipilih karena memiliki keunggulan, yaitu dapat menghambat dua enzim pendegradasi Ach sekaligus, yaitu *acetylcholinesterase* (AChE) dan *butyrylcholinesterase* (BuChE) (Sianturi, 2021; Vicente-zurdo *et al.*, 2022).

RV memiliki mekanisme kerja yang berkaitan dengan AChE karena memiliki struktur yang serupa dengan Ach, sehingga akan menghambat aktivitas AChE. Oleh karena itu, konsentrasi dari Ach pada otak akan meningkat dan dapat mengurangi gangguan kognitif pada pengidap AD (Sianturi, 2021). RV hingga saat ini, masih tersedia dalam bentuk sediaan kapsul dan *transdermal patch*. Akan tetapi, sediaan RV dalam bentuk kapsul memiliki banyak kekurangan seperti, dapat menyebabkan efek samping pada saluran pencernaan berupa mual, muntah, dan konstipasi, serta dapat menurunkan bioavailabilitas RV karena mengalami efek metabolisme lintas pertama di hati (Nguyen *et al.*, 2020). Selain itu, sediaan RV dalam bentuk *transdermal patch* dilaporkan dapat menyebabkan efek samping berupa iritasi pada kulit karena pengaplikasian yang berulang dalam jangka waktu yang lama (Guimarães *et al.*, 2022). Penelitian mengenai penghantaran RV dalam sediaan *microneedle* (MN) melalui rute *transdermal* telah banyak dikembangkan. Hal tersebut dikarenakan, saat pengaplikasian MN mampu menembus lapisan epidermis hingga lapisan atas dermis pada kulit tanpa menimbulkan rasa sakit, sehingga mampu menghantarkan RV ke saluran sistemik tubuh (Vora *et al.*, 2020).

Penelitian yang dilakukan oleh Guimarães *et al.*, pada tahun 2022 menganalisis sediaan RV dalam bentuk sediaan *hydrogel* MN. Sediaan ini diharapkan mampu mengatasi kekurangan sediaan kapsul dan *transdermal patch*, akan tetapi belum mampu menghantarkan RV secara signifikan, sehingga dibutuhkan dalam meningkatkan efikasi terapi penyakit Alzheimer. Tidak hanya itu, *hydrogel* MN setelah pengaplikasian masih memerlukan waktu lama dan jarum yang tajam, sehingga dapat menyebabkan iritasi pada kulit dan menurunkan kenyamanan pada pengidap setelah digunakan (Vora *et al.*, 2020).



et al., 2020; Eum *et al.*, 2021; Guimarães *et al.*, 2022). Oleh karena itu, masih dibutuhkan sebuah inovasi sistem penghantaran berbasis MN untuk menutupi kekurangan *hydrogel* MN.

Formulasi MN telah banyak mengalami perkembangan, utamanya dalam pelepasan obat berkelanjutan. Salah satunya dengan menggunakan kombinasi sistem seperti nanopartikel, mikropartikel, dan implan yang bertujuan untuk meningkatkan efikasi terapi penyakit kronis yang membutuhkan pengobatan jangka panjang seperti AD (Yang *et al.*, 2022). Sistem penghantaran secara berkelanjutan dapat dicapai dengan mengkombinasi sistem penghantaran MN dengan sistem implan. Oleh karena itu, penelitian oleh Ilyas tahun 2024 memformulasikan RV dalam bentuk sistem *three-layer dissolving microneedle* (TDMN) (Ilyas, 2024). Sistem TDMN terdiri atas 3 lapisan, yaitu lapisan pertama TDMN terdiri atas RV yang terintegrasi ke dalam biopolimer *polycaprolactone* (PCL). Penggunaan polimer PCL pada lapisan pertama, dikarenakan PCL mampu memfasilitasi penghantaran RV secara berkelanjutan karena profil biodegradasi yang lambat. Selain itu, PCL juga memiliki sifat *biocompatible* dan merupakan polimer yang umum digunakan untuk sistem implan dalam pelepasan berkelanjutan (Eum *et al.*, 2021; Huo *et al.*, 2021).

Lapisan kedua TDMN terdiri atas polivinil pirolidon (PVP) dan polivinil alkohol (PVA) yang dapat langsung melarut setelah pengaplikasian, sehingga menyisakan lapisan pertama di bawah kulit. Polimer tersebut berkerja secara adekuat untuk memfasilitasi penetrasi TDMN mengandung RV ke dalam lapisan kulit dan memberikan kekuatan mekanik pada TDMN. Penggunaan kombinasi polimer PVP dan PVA pada sistem MN telah banyak digunakan pada penelitian terdahulu yang membuktikan bahwa kedua polimer tersebut mampu meningkatkan penetrasi dan kekuatan mekanik pada MN (Syafika *et al.*, 2023). Lapisan ketiga pada sistem TDMN berupa polimer poli asam laktat (PLA) berbasis *3D-printed* yang dapat langsung dilepas setelah lapisan kedua melarut (Demartis *et al.*, 2022). Oleh karena itu, sistem TDMN mampu meminimalkan terjadinya potensi iritasi dan menghantarkan RV secara berkelanjutan karena penggunaan sistem implantasi pada TDMN (Eum *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). Penelitian ini diharapkan dapat menutupi kekurangan pada penelitian sebelumnya dan dapat meningkatkan efikasi terapi pada pengidap AD.

Pada penelitian ini formulasi RV dalam sistem TDMN yang telah dikembangkan oleh Ilyas (2024) akan dikarakterisasi menggunakan fotometer FTIR (*Fourier Transform Infrared spectroscopy*)-*FTIR* dan dievaluasi potensi terjadinya iritasi secara *in vitro* pada plasma darah tikus dan membran *chorioallantois* telur ayam.



1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini, yaitu:

1. Bagaimana karakteristik kimia-fisika dari RV yang diintegrasikan dalam bentuk sistem TDMN berdasarkan hasil analisis FTIR dan XRD?
2. Bagaimana evaluasi potensi iritasi secara *in vitro* RV yang diintegrasikan ke dalam sistem TDMN?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini yaitu:

1. Untuk mengetahui karakteristik kimia-fisika dari RV yang diintegrasikan dalam bentuk sistem TDMN.
2. Untuk mengetahui potensi iritasi secara *in vitro* RV yang diintegrasikan ke dalam sistem TDMN.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini alat gelas (Pyrex®), *centrifuge* (Oregon® LC-04S), cetakan *microneedle* (silikon *mould*), desikator, difraksi sinar-X (XRD) (Rigaku Corporation, Kent, England), spektrofotometer *fourier transform infra-red* (FTIR) (AccuTrac FT/IR-4100 Series, PerkinElmer, USA), mikropipet (Mettler®), oven, vortex, sonikator, sendok tanduk plastik, silika gel, sendok tanduk besi, dan spektrofotometer UV-Vis (Dynamica XB-10 *single beam*), spoit 5 mL, spoit 3 mL, spoit 1 mL, timbangan analitik Ohaus®, tabung eppendorf 1,5 mL, dan vial.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, aseton, *aquadest*, eter, hewan coba, kulit hewan coba, kertas perkamen, *phosphate buffer saline* (PBS), rivastigmine tartrat (Anhui Biological Technology Co.Ltd (China)), *polycaprolactone* (PCL) (Sigma-Aldrich® (Dorset, UK)), poli vinil pirolidon (PVP) (Kidderminster, UK), poli vinil alkohol (PVA) (Sigma-Aldrich® (Dorset, UK)), dan telur ayam.

2.2 Metode Kerja

2.2.1 Penyiapan TDMN sebelum Analisis FTIR-XRD dan Pengujian Potensi Iritasi secara *In Vitro*

Formulasi TDMN mengandung RV telah dilakukan oleh penelitian Ilyas (2024) dengan 5 formulasi yang memvariasikan konsentrasi polimer PCL dan PVP pada lapisan pertama dan diperoleh konsentrasi terbaik dari PCL dan PVP secara berurutan adalah 10% b/b dan 20% b/b. Pembuatan formula terbaik TDMN dilakukan dengan metode *moulding* berdasarkan pada penelitian sebelumnya. Lapisan pertama TDMN dibuat dengan melarutkan polimer PCL dengan konsentrasi sebanyak 10% b/b pada pelarut aseton, dan konsentrasi polimer PVP beserta RV sebanyak 20% b/b dilarutkan pada pelarut *aquadest*. Masing-masing campuran kemudian divortex selama 15 menit hingga melarut dan homogen. Kemudian campuran polimer PCL yang telah melarut dicampurkan dengan campuran polimer PVP dan RV menggunakan sonikator selama 15 menit. Hasil campuran yang telah homogen kemudian dicuplik sebanyak 1 mL, lalu dituangkan ke dalam silikon *mould*. Setelah itu, silikon *mould* yang berisi campuran polimer dan RV kemudian disentrifugasi selama 15 menit, lalu dikeringkan selama 24 jam pada suhu 37°C (Ilyas, 2024).



lapisan pertama mengering, lapisan kedua TDMN dibuat dengan PVP dan PVA dengan konsentrasi masing-masing sebanyak 10% b/b dalam pelarut *aquadest* yang dihomogenkan menggunakan vortex, campuran polimer tersebut dicuplik sebanyak 1 mL dan dituangkan pada lapisan pertama. Kemudian, silikon *mould* disentrifugasi selama 15 menit dan dikeringkan selama 24 jam pada desikator bersuhu 37°C. Setelah

mengering, TDMN akan dicabut dari silikon *mould* yang nantinya akan dilakukan analisis secara kimia-fisika dan pengujian potensi iritasi (Ilyas, 2024).

2.2.2 Analisis TDMN menggunakan Instrumen FTIR (Spektrofotometer *Fourier Transform Infra-Red*)

FTIR merupakan metode analisis untuk mengidentifikasi keberadaan suatu zat pada formulasi pengembangan sistem penghantaran obat. Analisis FTIR pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya keberadaan RV pada sistem TDMN yang dikembangkan. Analisis FTIR dilakukan dengan membandingkan hasil analisis dari TDMN mengandung RV, TDMN tanpa RV, dan RV murni yang dikarakterisasi menggunakan alat spektrofotometer FTIR pada panjang gelombang 4000 sampai 400 cm^{-1} (Elim *et al.*, 2023).

2.2.3 Analisis TDMN menggunakan Instrumen XRD (Difraksi Sinar-X)

XRD merupakan analisis untuk mengidentifikasi struktur dari suatu zat yang akan diformulasikan pada sistem penghantaran obat. Instrumen XRD digunakan untuk mengkarakterisasi sifat fisik dari RV murni sebelum diformulasikan dalam sistem TDMN yang dibandingkan dengan TDMN mengandung RV, dan TDMN tanpa RV. Analisis dilakukan dengan kecepatan pemindaian 4°/menit. Pola difraksi ditentukan pada 2 θ dengan kisaran 20-70° (Manzoor *et al.*, 2022).

2.2.4 Uji Potensi Iritasi *Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)* TDMN

Pengujian ini dilakukan dengan menginkubasi telur ayam fertil dalam inkubator bersuhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ dan memiliki kelembapan sebesar $58 \pm 8\%$ selama tujuh hari pertama. Setelah itu, dihari kedelapan telur ayam yang mengandung embrio akan diambil untuk digunakan. Telur ayam mengandung embrio kemudian bagian atas cangkangnya digunting dan membran bagian dalam diangkat secara perlahan agar membran korioallantoic (CAM) dapat terlihat. Selanjutnya, sebanyak 0,3 mL larutan RV, campuran polimer TDMN blanko (tanpa kandungan RV), dan formula TDMN ditetaskan masing-masing ke permukaan CAM dari tiga telur berbeda untuk mengidentifikasi terjadinya efek iritan dalam bentuk lisis, perdarahan, dan koagulasi. Efek iritan ini diamati selama 5 menit dalam rentan waktu (0; 0,5; 2 dan 5 menit) dengan membandingkan permukaan CAM ketiga telur dengan kontrol positif (permukaan CAM yang sudah ditetesi NaOH 0,1 M) dan kontrol negatif (permukaan CAM yang sudah ditetesi NaCl 0,9% b/v) (Wu *et al.*, 2022).

2.2.5 Uji Hemolisis secara *In Vitro*



ujuan untuk mengevaluasi potensi toksisitas sediaan denganosit tikus. Darah tikus yang diperoleh disentrifugasi selama 20 ahkan eritrosit dari plasma. Selanjutnya, eritrosit dibersihkan i sebanyak 3 kali dan disuspensikan kembali menggunakan ilakukan penyiapan larutan dari RV murni dan TDMN engan konsentrasi 500, 50, dan 5 $\mu\text{g/mL}$ lalu ditambahkan

pada eritrosit yang tersuspensi PBS. Sampel diinkubasi selama 60 menit dengan suhu 37°C lalu disentrifugasi selama 10 menit. Kemudian, supernatan dikumpulkan dan dibandingkan dengan kontrol negatif (eritrosit yang diberikan PBS) dan kontrol positif (eritrosit yang diberikan air) saat dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Persentase hemolisis kemudian dihitung menggunakan persamaan 1 (Elim *et al.*, 2023).

$$\text{Hemolisis (\%)} = \frac{\text{abs (sampel)} - \text{abs (kontrol negatif)}}{\text{abs (kontrol positif)} - \text{abs (kontrol negatif)}} \times 100\% \quad [1]$$

2.2.6 Uji Surface pH TDMN

Pengujian ini dilakukan untuk mengukur pH dari sistem TDMN yang dikembangkan oleh penelitian Ilyas (2024). Pada penelitian tersebut mengembangkan 5 formulasi TDMN (TDMN1, TDMN2, TDMN3, TDMN4, dan TDMN5) (Ilyas, 2024). Kemudian, kelima formulasi tersebut dilakukan pengujian *surface* pH dengan cara melarutkan 20 mg TDMN dalam 50 mL *aquadest*. Setelah 15 menit, pH TDMN diukur dengan menempatkan elektroda pH meter pada TDMN yang telah melarut. pH yang ditampilkan setelah pengukuran kemudian dicatat sebagai pH permukaan formulasi TDMN (Mahfufah *et al.*, 2023).

2.2.7 Analisis data

Data disajikan sebagai rata-rata $\pm$ standar deviasi (SD). Aplikasi *Microsoft Excel*[®] digunakan untuk menghitung rata-rata, standar deviasi (SD), pengurangan kesalahan (RE), dan deviasi standar relatif (RSD). Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan *Graphpad Prism*[®] versi 10 dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$ digunakan untuk menentukan signifikansi statistik.

