

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker mulut merupakan salah satu dari sepuluh tumor ganas yang memiliki insidensi tinggi di seluruh dunia. Kanker *Oral Squamous Cell Carcinoma* (OSCC) adalah kanker oral yang paling umum, berkontribusi terhadap sekitar 90-95% kasus kanker mulut (Limanthara *et al.*, 2024). Menurut *World Health Organization* (WHO), melalui lembaga riset kanker *International Global Cancer Observatory* (GCO) pada tahun 2022, kanker mulut menempati peringkat ke-14 di antara seluruh kanker di Indonesia, dengan 6.515 kasus yang dilaporkan dengan 3.546 kematian. Hal ini menekankan pentingnya penanganan yang lebih baik untuk mengurangi angka kematian akibat kanker mulut terutama OSCC.

Pendekatan terapi konvensional dalam pengobatan kanker seperti pembedahan yang disertai dengan kemoterapi dan radioterapi merupakan terapi antikanker pilihan utama. Namun, obat kemoterapi menghadapi keterbatasan seperti sitotoksitas, waktu paruh yang pendek, dan pertumbuhan kembali sel kanker (Cheng *et al.*, 2021). Selain itu, adanya masalah resistensi *multi drug* terhadap obat-obatan seperti 5-*fluorouracil* dan cisplatin pada kanker OSCC menekankan perlunya pengembangan obat baru yang lebih efektif (Atashi *et al.*, 2021).

Nitric oxide (NO) adalah salah satu obat antikanker baru yang telah ditemukan dan berpotensi dalam pengobatan kanker. NO terbentuk dari penguraian asam amino L-arginin menjadi L-sitruilin, yang dibantu oleh enzim NO sintase. Ketika NO bereaksi dengan oksigen atau radikal bebas lain, NO dapat membentuk senyawa yang disebut spesies nitrogen reaktif yang dapat merusak sel (Ghosh *et al.*, 2021). Namun, NO adalah molekul gas reaktif yang tidak stabil, waktu paruhnya sangat singkat, dan memiliki jarak difusi yang pendek (150-300 μm). Oleh karena itu, dibutuhkan NO donor, salah satunya adalah *S-nitrosothiol*. *S-nitroglutathione* (GSNO) adalah bagian dari *S-nitrosothiol* yang dapat digunakan sebagai NO donor yang memiliki aktivitas anti kanker. GSNO dipilih karena relatif tidak toksik yaitu dapat melepaskan *glutathione* (GSH) yang merupakan antioksidan endogen. GSNO tidak efektif dalam pengobatan kanker karena tidak spesifik ke sel kanker, oleh karena itu dibutuhkan sistem penghantaran obat untuk menghantarkan NO (Lee *et al.*, 2021).

Nanopartikel (NPs) merupakan salah satu sistem penghantaran obat yang efektif untuk pengobatan kanker karena dapat meminimalkan efek samping dan meningkatkan penargetan ke sel kanker sehingga dapat mengurangi toksisitas pada sel normal (Gavas *et al.*, 2021). Pada sel kanker terdapat efek *Enhanced Permeability and Retention* (EPR), di mana pembuluh darah di sekitar sel kanker menjadi permeabel dibandingkan sel



Ps dapat dengan mudah terakumulasi ke sel kanker (Wu, 2021).
ana tidak cukup untuk memaksimalkan pengobatan kanker karena
ndisi lingkungan mikro (*microenvironment*) kanker, yang mencakup
H (asidosis), kadar oksigen (hipoksia), enzim, dan molekul spesifik
itu NPs perlu dimodifikasi (Huai *et al.*, 2019).

dapat dimodifikasi dengan menjadikannya lebih responsif terhadap
g responsif terhadap pH dirancang untuk mendukung pelepasan

zat obat di lokasi target akibat adanya perubahan pH (Huai *et al.*, 2019). Sel kanker telah terbukti memiliki pH yang lebih asam dibandingkan pH sel normal berkisar 6,4-6,8 (Deirram *et al.*, 2019). NPs yang responsif terhadap pH biasanya menggunakan polimer yang responsif terhadap pH, salah satunya yaitu *poly(L-histidine)* (PLH). Ketika NPs yang diinkorporasikan dengan PLH memasuki lingkungan asam di sekitar sel tumor, struktur NPs mengalami destabilisasi yang memicu pelepasan zat obat. Dengan demikian, obat dapat secara efektif bekerja langsung ke sel target (Zhang *et al.*, 2022). NPs ini telah dibuat menggunakan polimer *poly(lactic-co-glycolic acid)* (PLGA) sebagai pembentuk utama dari NPs. PLGA dipilih karena sifatnya yang *biodegradable* dan *biocompatible* serta telah disetujui oleh FDA (Muddineti & Omri, 2022). Rahmani., *et al* (2022) telah membuat *proceded glycid nanoparticles* menggunakan polimer yang responsif terhadap pH yaitu polimer *polycaprolactone* dan *polyvinyl alcohol* untuk obat doksorubisin. Namun pada penelitian tersebut tidak menggunakan NO sebagai zat aktif dan tidak menggunakan PLH sebagai polimer pH responsif.

Salah satu hal yang perlu diperhatikan dalam NPs yaitu *drug loading*. Seringkali zat aktif yang bersifat hidrofilik menghasilkan *drug loading* yang rendah, maka salah satu solusi yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan metode *solid in organic in water (s/o/w)*. Karena GSNO bersifat hidrofilik, penggunaan metode *organic in water (o/w)* tidak memungkinkan zat ini terenkapsulasi dengan baik. Sementara itu, metode *water in organic in water (w/o/w)* juga hanya memberikan hasil *drug loading* yang rendah. Oleh karena itu, salah satu solusi yang dapat diterapkan adalah dengan mengenkapsulasi GSNO dalam bentuk serbuk. Penelitian oleh (Hlaing *et al.*, 2018) telah mengenkapsulasi GSNO dalam bentuk serbuk ke PLGA sebagai obat antibakteri dan telah terbukti efektivitasnya tinggi. Untuk membuktikan bahwa GSNO dalam bentuk serbuk atau *solid* dapat diinkorporasikan ke PLGA-PLH (fase organik), maka telah dilakukan penelitian dengan menginkorporasikan GSNO ke PLGA-PLH.

Berdasarkan permasalahan di atas, maka telah dilakukan penelitian formulasi *pH-responsive* GSNO-terinkorporasi PLGA-PLH nanopartikel (GSNO/PLGA-PLH NPs) yang kemudian dilanjutkan dengan evaluasi karakteristik fisikokimia yang terbaik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka masalah yang dapat dirumuskan adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi polimer PLGA-PLH terhadap karakteristik fisikokimia NPs?
2. Bagaimana profil pelepasan obat dari GSNO terinkorporasi PLGA-PLH NP?

1.3 Tujuan Penelitian



kannya penelitian ini meliputi:
 1. Evaluasi pengaruh konsentrasi polimer PLGA-PLH terhadap karakteristik fisikokimia NPs GSNO.
 2. Evaluasi profil pelepasan GSNO dari GSNO/PLGA-PLH NPs

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex[®]), *centrifugal machine* (ZENY[®]800-1), *Differential Scanning Calorimetry* (DSC Q2000 V24.10 Build 122) (Netzsch Proteus[®]), *freeze dryer* (LC-10N-60E), *high speed dispersion homogenizer* FJ200-SH (AIK[®]), *high speed refrigerated centrifuge* MK-20RB (SCI Material Hub[®]), *magnetic stirrer* (Joanlab[®]), *micropipette* (Joanlab[®]), *probe sonicator* (SCIENTZ[®]New Chi), *Scanning Electron Microscope* (SEM), spektrofotometer FT-IR (Shimadzu[®]), spektrofotometer UV-Vis (Jinghua[®]754PC), *Nitric Oxide Analyzer* (Sievers 280i), timbangan analitik (Xing Yun[®]), *vortex mixer* (DLab[®]), *ultrasonic homogenizer* (Scientz-IID[®]), *waterbath sonicator* (DigitalPro+[®]), dan *X-Ray Diffractometry* (XRD), dan zeta sizer (Malvern Nano Zeta-Sizer[®]).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *aquadest* (Waterone[®]), diklorometana (DCM) (Macklin[®]), *S-nitroglutathione* (GSNO) (sumbangan dari peneliti Nurhasni Hasan), *methanol pro analysis* (Macklin[®]), *Poly Vinyl Alcohol* (PVA) 1% (BM 44,05 g/mol) (Merckmillipore[®]), PLGA-PLH (sumbangan dari peneliti Nurhasni Hasan), dan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) pH 7,4.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Formulasi GSNO/PLGA-PLH NPs

GSNO/PLGA-PLH NPs dibuat sesuai dengan formula pada **Tabel 1**. GSNO/PLGA-PLH NPs dibuat menggunakan metode emulsi penguapan pelarut (s/o/w). PLGA-PLH dan GSNO dilarutkan dalam 10 mL DCM dan dituangkan ke dalam 20 mL larutan PVA 1%. Campuran ini diaduk menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 14.500 rpm selama 2 menit di atas penangas es, selanjutnya disonikasi menggunakan *probe sonicator* pada 150 W selama 3 menit di atas penangas es. Setelah itu, ditambahkan 10 mL *aquadest* dan diuapkan selama 4 jam menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 400 rpm dalam lemari asam. Selanjutnya, setelah sisa pelarut diuapkan, dilakukan sentrifugasi pada 20.000×g selama 30 menit dan dicuci sebanyak tiga kali. Pelet yang diperoleh dikeringkan dengan alat *freeze dryer* dan disimpan pada suhu -20°C untuk penggunaan selanjutnya (Hasan *et al.*, 2019).

Tabel 1. Komposisi formula GSNO/PLGA-PLH NPs

Bahan	Fungsi	Komposisi					
		F1	F1B	F2	F2B	F3	F3B
Fase Organik							
GSNO (mg)	Zat aktif	15	-	30	-	45	-
	Polimer	100	100	200	200	300	300
	Pelarut	10	10	10	10	10	10
	Surfaktan	20	20	20	20	20	20
	Pelarut	10	10	10	10	10	10



2.2.2 Analisis Morfologi Nanopartikel

Penentuan morfologi NPs dilakukan dengan cara NPs dipasang pada karbon *tape* lalu di-*coating* dengan platinum di bawah vakum selama 2 menit. Morfologi NPs kemudian dianalisis pada tegangan akselerasi 1 kV (Hasan *et al.*, 2019).

2.2.3 Analisis Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersitas

Penentuan ukuran partikel dan indeks polidispersitas dilakukan dengan cara NPs disuspensikan dengan *aquadest* lalu dimasukkan ke dalam kuvet. Setelah itu, sampel diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dengan metode *Dinamyc Light Scattering* (DLS) lalu dianalisis dengan *Malvern nano-zetasizer* (*Malvern Instrument Co.*) (Hasan *et al.*, 2019).

2.2.4 Analisis Zeta Potensial

Penentuan zeta potensial dilakukan sebanyak tiga kali. NPs diencerkan menggunakan air destilasi, kemudian larutan hasil pengenceran dimasukkan ke dalam kuvet untuk dianalisis menggunakan *Malvern nano-zeta sizer* (*Malvern Instruments Co.*) (Hasan *et al.*, 2019).

2.2.5 Analisis X-Ray Diffraction (XRD)

Pengukuran difraksi sinar-X dilakukan dengan cara sampel nanopartikel GSNO/PLGA-PLH NPs dipadatkan ke dalam *sample holder* hingga permukaan rata. Selanjutnya dianalisis menggunakan alat XRD pada pengukuran *2-theta* yaitu 5-40° dengan sumber radiasi dari CuK α sebesar 1,5406 Å (Shah *et al.*, 2017).

2.2.6 Analisis Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Analisis DSC dilakukan dengan cara sampel nanopartikel ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam wadah kecil berupa *aluminium pan*. Kemudian sampel dimasukkan dan dianalisis dengan instrumen DSC (Oshi *et al.*, 2020). Kondisi pengukuran yang digunakan yaitu *heating rate* 10 K/min, rentang suhu -20 - 300°C, dengan atmosfer N₂, 40 mL/min.

2.2.7 Analisis Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

Analisis FT-IR dilakukan dengan cara sampel dicampur dengan 200 mg kalium bromida (KBr). Kemudian dipadatkan ke dalam cakram dan dipindai satu per satu pada rentang bilangan gelombang 500-4000 cm⁻¹ (Anter *et al.*, 2019).



cadar GSNO

larutan stok

stok 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) dilakukan dengan cara menimbang baku mg lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, kemudian mL *aqua pro analisis* hingga tanda batas (Santos *et al.*, 2021).

dinyatakan berbeda secara signifikan apabila hasil analisis menunjukkan nilai $p < 0,05$. Selanjutnya dilakukan analisis *multiple comparison (Post Hoc Test)* melalui uji *Tukey's Honest Significant Difference*.



Optimized using
trial version
www.balesio.com