

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Human Immunodeficiency Virus (HIV) merupakan virus yang menyerang sistem kekebalan tubuh manusia dengan menginfeksi sel-sel vital seperti sel T helper (CD4+) dan makrofag (Février et al., 2011). Sejak pertama kali ditemukan pada tahun 1981, HIV masih menjadi masalah kesehatan global dengan angka kematian yang tinggi (Schwetz & Fauci, 2019). Pada tahun 2019, prevalensi global HIV diperkirakan telah mencapai 36,9 juta individu, setara dengan 0,5% dari populasi dunia (Govender et al., 2021). Berdasarkan data United Nations on HIV/AIDS (UNAIDS), pada tahun 2020 diperkirakan sekitar 81% atau 38 juta kasus HIV yang dikonfirmasi telah terjadi di seluruh dunia (UNAIDS, 2020). Berdasarkan data Kementerian Kesehatan (Kemenkes), jumlah kasus HIV di Indonesia diperkirakan mencapai 515.455 kasus selama periode Januari-September 2023. Menurut usianya, pengidap HIV di Indonesia mayoritas dari kelompok usia 25-49 tahun, yakni sebanyak 69,9% dari total kasus tersebut. Kemenkes menyebut, baru sekitar 40% dari jumlah kasus tersebut yang mendapatkan pengobatan HIV (databoks.katadata.co.id, 2023).

Pengobatan HIV yang tersedia saat ini adalah penggunaan obat antiretroviral, salah satunya ialah Efavirenz (EFV) yang merupakan golongan *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor* (NNRTI) yang direkomendasikan sebagai terapi awal dari pengobatan HIV selama 10 tahun (Apostolova et al., 2015). Salah satu keunggulan dari EFV dibandingkan terapi antiretroviral lainnya adalah kemampuannya menembus sistem saraf pusat (CNS) yang dapat membantu mengurangi gangguan neurokognitif terkait HIV (Brown et al., 2014). Selain itu, EFV terbukti meningkatkan kepatuhan pasien yang lebih baik karena regimen dosis sekali sehari dibandingkan dengan obat-obatan lainnya yang membutuhkan dosis ganda setiap hari (Truong et al., 2015). EFV dilaporkan telah terbukti dapat mengurangi *viral load* HIV lebih dari 50% (Tandel et al., 2015). EFV juga memperlambat dan mencegah kerusakan sistem kekebalan tubuh sehingga menjadikan EFV digunakan sebagai *first line therapy* pada pasien penderita HIV (Subronto et al., 2020).

EFV yang beredar di pasaran saat ini dalam bentuk tablet dengan dosis 50 mg, 200 mg, dan 600 mg. Pemberian rute secara oral merupakan rute yang paling banyak digunakan, paling sederhana, dan mudah didapatkan. Akan tetapi, pemberian obat hidrofobik seperti EFV melalui rute ini terhambat hampir 50 % karena kelarutan yang buruk dan berkurangnya bioavailabilitas dengan adanya metabolisme lintas pertama



l., 2015). Metabolisme lintas pertama yang tinggi dari EFV is terapeutik secara keseluruhan dan pemberian obat dengan ari masih menjadi hambatan untuk kepatuhan jangka panjang oj et al., 2018). Oleh karena itu, perlu dilakukan sistem mampu meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas dari EFV obat dapat tercapai secara maksimal.

Berdasarkan *Biopharmaceutical Classification System* (BCS), EFV digolongkan dalam BCS kelas II yang memiliki kelarutan air yang rendah dengan permeabilitas yang tinggi (Braga et al., 2020). EFV memiliki kelarutan air <10 mg/mL dan bioavailabilitas rendah sekitar 40% dengan log P sebesar 4,6 (Mazonde et al., 2020). Untuk meningkatkan laju disolusi obat hidrofobik, salah satu strategi yang paling efektif, menarik dan telah banyak digunakan karena fleksibilitas, skalabilitas, dan efisiensi pemuatan obat yang tinggi ialah obat tersebut diformulasi dalam bentuk nanokristal (Raghava Srivalli & Mishra, 2016). Nanokristal (NC) adalah dispersi koloid berukuran nano dari partikel obat padat murni yang distabilkan oleh surfaktan (Yang et al., 2021). NC memiliki ukuran 100-400 nm dan terdiri atas 100% senyawa obat (Chen et al., 2021). Bentuk ini dapat meningkatkan kelarutan jenuh dan laju disolusi obat hidrofobik dengan mengurangi ukuran partikel obat, yang dengan demikian memperbesar luas permukaan obat tersebut (Mauludin et al., 2009). Beberapa sediaan obat telah berhasil dikembangkan dalam bentuk nanokristal diantaranya telmisartan, fluconazole, itraconazole, dan ketokonazole yang menunjukkan bahwa formulasi obat-obat tersebut ke dalam bentuk nanokristal berpotensi meningkatkan kelarutannya. Saat ini, NC telah digunakan untuk berbagai rute pemberian seperti pemberian secara oral, mata, paru, dan rute transdermal (Aziz et al., 2023).

Dalam penelitian ini, NC yang mengandung EFV diformulasikan menggunakan Pluronic® F127, surfaktan yang dapat meningkatkan stabilitas dan dispersi nanopartikel (Li et al., 2023). Pluronic® F127 merupakan surfaktan yang efektif digunakan dalam formulasi NC karena dapat meningkatkan stabilitas dan mengurangi agregasi yang sangat penting untuk mempertahankan efikasi dari NC. Penelitian sebelumnya tentang formulasi NC yang berbasis Pluronic telah menunjukkan potensinya untuk meningkatkan penghantaran obat dan diharapkan menjadi pilihan yang tepat dalam penghantaran EFV karena stabilitasnya yang tinggi, adanya peningkatan bioavailabilitas, dan pengurangan toksisitas sistemik (Katana et al., 2020). Formulasi dalam bentuk NC tersebut merupakan formulasi terbaru dari penghantaran EFV yang diharapkan dapat mengatasi beberapa keterbatasan utama dari sistem penghantaran EFV yang tradisional dengan menawarkan opsi terapeutik yang lebih terkontrol dan efektif.

Selanjutnya, penghantaran obat secara bukal menjadi pilihan yang tepat untuk menghantarkan agen terapeutik secara lokal maupun sistemik karena mukosa bukal merupakan tempat penyerapan obat yang sangat vaskularisasi dan tidak melewati metabolisme lintas pertama di hati sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas (Shaikh et al., 2011). Penelitian sebelumnya juga telah mengkonfirmasi bahwa mukosa bukal dapat menjadi tempat yang strategis dalam menghantarkan agen



meningkatkan terapi HIV (Jones et al., 2014). Pemberian melalui rute bukal non-invasif sehingga menjadikan pilihan yang menarik untuk meningkatkan kepatuhan pasien. Pada epitel bukal terdapat banyak mukosa dan pembuluh darah dibandingkan bagian lain dari rongga mulut (Creighton & Woodrow, 2009). Epitel bukal memiliki sel langerhans 2,5 kali lebih banyak dibandingkan epitel sublingual, sehingga respons imun yang lebih efektif dapat diinduksi (Srinivasan et al., 2018). Rongga bukal juga merupakan tempat yang cocok

untuk pemberian sediaan berupa *dissolving microneedle* karena mukosa bukal mempunyai epitel yang relatif lebih tebal (500-600 μm) dibandingkan bagian rongga mulut lainnya dan pembuluh darah terletak di bawah epitel tersebut (Guillot et al., 2020; Kraan et al., 2014).

Pada penelitian ini nanokristal EFV (NC-EFV) dihantarkan melalui sistem *dissolving microneedle* (DMN), merupakan teknologi mutakhir yang dirancang untuk penghantaran obat yang tidak menimbulkan rasa sakit dan terkontrol. DMN, yang terbuat dari bahan biokompatibel seperti polivinil alkohol (PVA) dan polivinilpirolidon (PVP), larut saat bersentuhan dengan cairan tubuh dan memungkinkan pelepasan obat yang berkelanjutan dan terlokalisasi (Ananda et al., 2021). Kombinasi antara NC-EFV dengan DMN yang mudah larut sangat menjanjikan untuk pengobatan HIV, karena mengatasi beberapa keterbatasan utama dari penghantaran EFV konvensional. Penggunaan DMN juga meningkatkan kepatuhan pasien dengan menyediakan metode penghantaran obat yang tidak menyakitkan dan dapat dilakukan sendiri, mengurangi frekuensi pemberian dosis dan meminimalkan efek samping sistemik (Sartawi et al., 2022). Dibandingkan dengan penelitian lain tentang penghantaran obat berbasis microneedle, penggunaan NC bersamaan dengan DMN yang mengandung EFV yang dihantarkan melalui jaringan bukal merupakan pendekatan baru dan efektif, menawarkan strategi unggul untuk meningkatkan hasil terapeutik pada pasien HIV.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh jenis dan variasi konsentrasi surfaktan terhadap karakteristik nanokristal efavirenz?
2. Bagaimana hasil evaluasi formula nanokristal efavirenz terhadap studi pelepasan secara *in vitro*?
3. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi polimer terhadap karakteristik *dissolving microneedle* nanokristal efavirenz?
4. Bagaimana hasil evaluasi formula *dissolving microneedle* yang mengandung nanokristal terhadap profil permeasi secara *ex vivo*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh jenis dan variasi konsentrasi surfaktan terhadap karakteristik nanokristal efavirenz sehingga dihasilkan formula yang terbaik.
2. Mengevaluasi formula optimal dari nanokristal efavirenz terhadap studi pelepasan secara *in vitro*.
3. Mengetahui pengaruh variasi konsentrasi polimer terhadap karakteristik *needle* nonokristal efavirenz sehingga dihasilkan formula yang



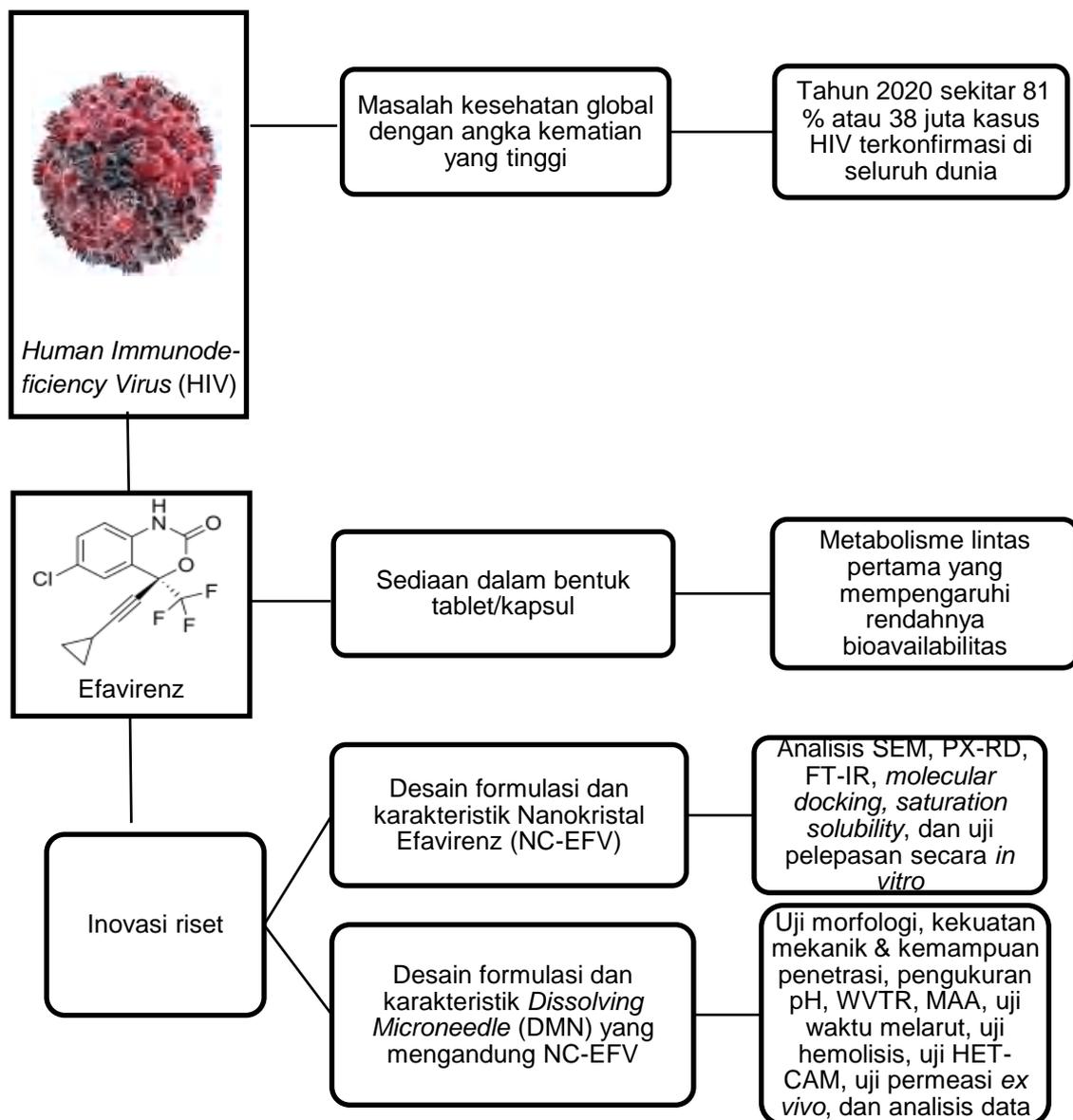
formula optimal dari *dissolving microneedle* yang mengandung dapat profil permeasi secara *ex vivo*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan menjadi landasan dalam pengembangan ilmu pengetahuan di bidang kesehatan, terkhusus dalam bidang teknologi farmasi tentang pengembangan formulasi untuk pengobatan HIV melalui jaringan bukal yang lebih efektif dan efisien.



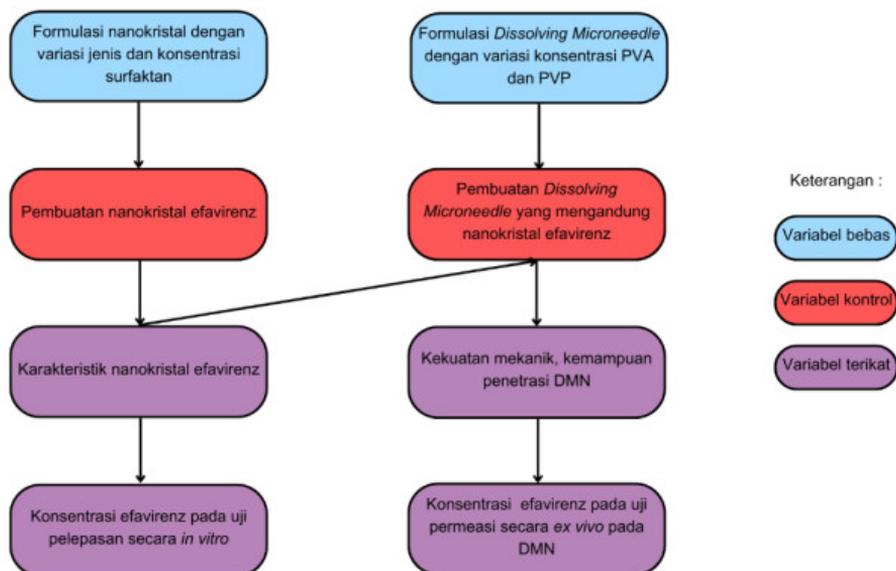
1.5 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka teori



1.6 Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka konsep



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Rencana dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengembangkan formula *dissolving microneedle* yang mengandung nanokristal efavirenz dan menguji aktivitasnya terhadap peningkatan profil permeasi secara *ex vivo*. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat Dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah botol duran, cawan porselen, centrifuge (Oregon® LC-04S), desikator, sonikator (Krisbow®), instrumen FT-IR, instrumen SEM, instrumen PX-RD, *magnetic stirrer*, *microneedle* mould (Micropoint Technologies®, ST-08 10x10 array), mikroskop optik (Olympus®), oven (Memmert®), pH meter (Lutron®), pipet mikro, sel difusi franz, spektrofotometer UV-Vis (Dynamica®, HALO XB-10), timbangan analitik (Sartorius®), Parafilm® M, vial dan alat-alat gelas (Pyrex®).

Bahan-bahan yang digunakan adalah Aquadest (Waterone®), Dikalium Hidrogen Ortofosfat, Etanol, Gel Silika, Efavirenz (EFV) yang diperoleh dari Zhejiang Jiangbei Pharmaceutical Co.,Ltd, Kalium Klorida, Kalsium Klorida dihidrat, Magnesium Klorida, Natrium Bikarbonat, Natrium Klorida, Natrium Nitrit, Zirconium, Polivinil Pirolidon (PVP) K-30, Pluronic® F127 (PL-127), Polivinil Alkohol (PVA), Sodium Lauril Sulfat (SLS).

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Metode Analisis Efavirenz

Pembuatan saliva buatan. Cairan saliva buatan disiapkan dengan melarutkan sebanyak 1,2 g kalium klorida (KCl), 0,85 g natrium klorida (NaCl), 0,05 g magnesium klorida (MgCl), 0,13 g kalsium klorida (CaCl) dan 0,13 g dikalium hidrogen ortofosfat (K₂HPO₄) ke dalam 1000 mL aquadest dan pH diukur hingga mencapai 6,8 (Baus et al., 2019).

Pembuatan larutan stok. Larutan stok efavirenz (EFV) dibuat untuk penentuan maksimum. Larutan stok dibuat dalam dua pelarut berbeda yaitu dalam media pelepasannya yaitu saliva buatan + SLS 2%. EFV sama sebanyak 10 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur dengan pelarut hingga tanda batas (1000 bpj).

panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum pada pelarut yang berbeda yaitu dalam etanol dan saliva buatan + etanol, panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara



larutan stok EFV dipipet sebanyak satu mL dimasukkan ke dalam vial dan dicukupkan volumenya dengan pelarut etanol hingga 10 mL (100 bpj). Sedangkan pada saliva buatan + SLS 2%, panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara larutan stok EFV dipipet sebanyak satu mL dimasukkan ke dalam vial dan dicukupkan volumenya dengan cairan saliva buatan + SLS 2% hingga 10 mL (100 bpj). Larutan hasil pengenceran dimasukkan ke dalam kuvet kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 200-400 nm (Tittikpina et al., 2020). Panjang gelombang maksimum ditentukan dari serapan tertinggi pada sampel.

Pembuatan Kurva Baku Efavirenz dalam Etanol. Kurva baku diukur dengan mengambil larutan dari konsentrasi 100 bpj secara berturut-turut 1.000 μL , 500 μL , 250 μL , 125 μL , dan 62 μL kemudian diencerkan dengan 1000 μL , 1.500 μL , 1.750 μL , 1.875 μL , dan 1.938 μL etanol sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 50, 25, 12,5, 6,25, dan 3,125 bpj. Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 247 nm.

Pembuatan Kurva Baku Efavirenz dalam Saliva Buatan + SLS 2%. Kurva baku diukur dengan mengambil larutan dari konsentrasi 100 bpj secara berturut-turut 960 μL , 480 μL , 240 μL , 120 μL , dan 60 μL kemudian diencerkan dengan 1.040 μL , 1.520 μL , 1.760 μL , 1.880 μL , dan 1.940 μL saliva buatan + SLS 2% sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 48, 24, 12, 6, dan 3 bpj. Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 248 nm.

2.3.2 Molecular Docking

Molecular docking digunakan untuk menginteraksikan ikatan yang terjadi antara Efavirenz dengan surfaktan yang digunakan pada nanokristal yang terdiri atas PVA, SLS, dan Pluronic® F127. Struktur EFV dan ketiga surfaktan diunduh dari situs PubChem dengan CID tiap senyawa 64139 (efavirenz), 10154203 (Pluronic F-127), 11199 (Vinyl alcohol/PVA), dan 3423265 (Sodium dodecyl sulfate/sodium lauryl sulfate). Struktur yang telah diunduh kemudian dipreparasi menggunakan software UCSF Chimera 1.16 (University of California, San Francisco) dan AutoDock Vina (The Scripps Research Institute). Tahap preparasi struktur ligan dilakukan pada menu *dock-prep*. Selanjutnya dilakukan proses *docking* dengan menentukan *grid-box* dan direktori penyimpanan file melalui menu Autodock Vina. Hasil dari proses *docking* tersebut akan menunjukkan interaksi dan afinitas energi yang terbentuk. Konformasi energi terendah yang dihasilkan oleh AutoDock dianggap sebagai konformasi pengikatan terbaik dari EFV dengan ketiga surfaktan yang digunakan (Butt et al., 2020).



2.3.3 Formulasi dan Pembuatan Nanokristal

Tabel 1. Rancangan formula nanokristal EFV

Formula	Efavirenz (g)	Zirconium (g)	Surfaktan (%)
F1	0,2	20	PVA 1% (1 g dalam 100 mL aquadest)
F2	0,2	20	PVA 2% (2 g dalam 100 mL aquadest)
F3	0,2	20	SLS 1% (1 g dalam 100 mL aquadest)
F4	0,2	20	SLS 2% (2 g dalam 100 mL aquadest)
F5	0,2	20	Pluronic® F127 1% (1 g dalam 100 mL aquadest)
F6	0,2	20	Pluronic® F127 2% (2 g dalam 100 mL aquadest)

Nanokristal EFV (NC-EFV) dibuat dengan metode “*top down*” yang dimodifikasi. Sebanyak 0,2 gram EFV, 20 gram *Zirconium* dan 2 *magnetic bar* (5 cm) dimasukkan ke dalam botol vial berukuran 20 mL, kemudian dicukupkan dengan larutan surfaktan. Pada penelitian ini menggunakan surfaktan yang terdiri atas PVA, SLS, dan Pluronic® F127 dengan konsentrasi masing-masing 1% b/v dan 2% b/v. Kemudian, botol vial ditutup rapat dengan penutup kedap udara. Formula diaduk selama 24 jam dengan kecepatan 1500 rpm pada *magnetic stirrer*. Sampel diambil pada interval waktu 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 24 jam untuk mengukur ukuran partikel. Setelah 24 jam, dispersi yang diperoleh disaring dengan saringan 200 mesh untuk memisahkan batang magnet dan zirconium kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 menit. Pelet nanokristal yang terbentuk dikeringkan pada suhu 80°C selama 3-4 jam kemudian digerus di dalam lumpang sampai diperoleh serbuk nanokristal (Permana et al., 2021).

2.3.4 Uji Karakterisasi Nanokristal

Analisis Scanning Electron Microscopy (SEM). Analisis SEM dilakukan untuk mengamati morfologi NC-EFV dengan menggunakan mikroskop TM3030 dari Hitachi, Krefeld, Jerman. Selain itu, ukuran partikel, indeks polidispersitas (PDI), dan potensial zeta diukur dengan mendispersikan NC-EFV dalam aquadest hingga larut sepenuhnya dan dianalisis menggunakan Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Inggris).

Analisis Powder X-Ray Diffraction (PX-RD). Analisis PX-RD dilakukan untuk menganalisis karakteristik kristalinitas serbuk EFV murni, NC-EFV, dan *physical mixture* dari formulasi yang dioptimalkan menggunakan instrumen *Powder X-Ray Diffraction* (PX-RD).



Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Analisis FT-IR menganalisis interaksi kimia serbuk EFV murni, NC-EFV, dan formulasi yang dioptimalkan digunakan untuk penelitian ini.

2.3.5 Pengujian *Saturation Solubility*

Pengujian *saturation solubility* dilakukan untuk menilai kelarutan dari EFV dalam cairan saliva buatan. Dalam prosedur ini, sejumlah EFV yang berlebih dimasukkan ke dalam vial kaca yang mengandung berbagai pelarut yang terdiri atas cairan saliva buatan yang dikombinasikan dengan SLS 1%, SLS 2%, PEG 400 10%, PEG 400 20%, Tween 80 1% , dan Tween 80 2%. Vial tersebut kemudian diaduk dengan vortex selama 10 menit dengan EFV murni terus ditambahkan hingga pelarut jenuh sepenuhnya. Selanjutnya, vial diinkubasi dalam *rotary shaker* pada suhu 37°C selama 24 jam dengan kecepatan 40 rpm. Setelah periode inkubasi, sampel dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

2.3.6 Pengujian Pelepasan *In Vitro*

Uji pelepasan *in vitro* dilakukan menggunakan cairan saliva buatan (pH 7,4) yang ditambahkan SLS 2% sebagai medium pelarutan. Sebanyak 10 mg EFV murni, NC-EFV, dan campuran fisik dimasukkan ke dalam membran selofan. Membran selofan kemudian direndam dalam 100 mL medium pelarutan di dalam sel difusi vertikal, diaduk dengan menggunakan alat shaker dengan kecepatan 100 rpm pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Pada interval waktu 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 12; dan 24 jam, sampel sebanyak 1 mL dari medium pelarutan diambil dan diganti dengan volume medium segar yang sama. Sampel yang dikumpulkan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur jumlah EFV yang dilepaskan dari NC. Untuk menilai model kinetika pelepasan EFV, termasuk *zero-order* (ZO), *first-order* (FO), Higuchi (HG), Korsmeyer-Peppas (KP), dan Hixon-Crowell (HC), data yang dikumpulkan dianalisis menggunakan perangkat lunak DD Solver®.

2.3.7 Formulasi dan Evaluasi *Dissolving Microneedle*

Tabel 2. Rancangan formula DMN mengandung NC-EFV (DMN-NC-EFV)

Formula	Konsentrasi (% b/b)			
	EFV-NC	PVP	PVA	Aquadest
F1	10	10	10	ad 100
F2	10	15	10	ad 100
F3	10	20	10	ad 100
F4	10	25	10	ad 100
F5	10	30	10	ad 100



dibuat menggunakan NC-EFV dengan cara mencampurkan /P dan PVA berdasarkan perbandingan konsentrasi yang ada uran kemudian dipanaskan pada suhu 80°C hingga diperoleh sebanyak 1 mL dari campuran tersebut kemudian dituang ke *mon* yang membentuk *needles* berukuran mikro. Kemudian, i selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Formula DMN telah disentrifugasi selanjutnya dikeringkan pada suhu 37°C

selama 2 x 24 jam. DMN yang telah dikeringkan dilanjutkan ke tahap evaluasi (Aziz et al., 2023).

Uji morfologi. Uji morfologi dilakukan menggunakan mikroskop yang telah dikalibrasi dengan kamera optilab untuk mengetahui bentuk dan ukuran *needle* dengan pembesaran empat kali. Bentuk DMN yang dihasilkan disimpan dalam bentuk gambar untuk keperluan metode selanjutnya. Sedangkan untuk ukuran tinggi *needle* diukur menggunakan aplikasi optilab® yang telah dikalibrasi dengan mikrometer okuler (Permana et al., 2020a).

Uji kekuatan mekanik dan kemampuan penetrasi. Kekuatan mekanik DMN dievaluasi dengan mengukur kemampuan DMN menembus delapan lapisan Parafilm® yang memiliki ukuran dan ketebalan yang sama yang dianggap seperti lapisan jaringan bukal. DMN diletakkan diatas delapan lapisan Parafilm® yang telah disiapkan, kemudian diberikan beban yang setara dengan 32 N selama 30 detik. Indikator kekuatan mekanik dihitung dengan persentasi pengurangan tinggi jarum menggunakan persamaan berikut (González-Vázquez et al., 2017):

$$\text{Pengurangan tinggi jarum (\%)} = \frac{H_0 - H_c}{H_0} \times 100\%$$

Keterangan :

H_0 = Tinggi jarum sebelum pengujian

H_c = Tinggi jarum setelah pengujian

Kemampuan penetrasi ditentukan dengan menghitung jumlah lubang yang terbentuk pada lapisan Parafilm® dengan menggunakan persamaan sebagai berikut (González-Vázquez et al., 2017):

$$\text{Kemampuan penetrasi (\%)} = \frac{\text{Jumlah lubang yang terbentuk}}{\text{Jumlah total jarum microneedle}} \times 100\%$$

Pengukuran surface pH. DMN ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* berisi 50 mL air suling. DMN didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar. Kemudian dilakukan pengukuran pH menggunakan elektroda kaca gabungan yang ditempatkan dekat dengan permukaan DMN, dan nilai pH ditentukan setelah waktu kesetimbangan satu menit (Ananda et al., 2021).

Water Vapor Transmisson Rate (WVTR). *Water Vapor Transmission Rate* (WVTR) dievaluasi dengan memodifikasi vial kaca sebagai sel transmisi. Vial kaca dengan diameter dan volume yang sama dikeringkan dengan oven. Sebanyak satu gram kalsium klorida anhidrat ditambahkan ke dalam vial dan pada mulut vial



rumula dari DMN-NC-EFV kemudian ditutup dan disegel dengan tian disimpan dalam desikator yang berisi kalium klorida selama lilakukan setiap hari dengan menimbang botol kaca pada waktu i. Hasilnya dihitung menggunakan persamaan berikut (Ananda

$$\text{WVTR} = \frac{\text{Massa vial} \times \text{Ketebalan DMN}}{\text{Luas permukaan DMN}}$$

Moisture Absorption Ability (MAA). DMN-NC-EFV dipotong dengan dimensi 1 x 1 cm² dan kemudian diletakkan dalam desikator terpisah yang berisi natrium nitrat dengan menjaga kelembapan relatif sebesar 69%. Bobot DMN dicatat setiap 48 jam selama 14 hari. MAA dihitung menggunakan persamaan (Ananda et al., 2021) :

$$\%MAA = \frac{\text{Bobot akhir DMN} - \text{Bobot awal DMN}}{\text{Bobot awal DMN}} \times 100\%$$

Uji waktu melarut. Uji waktu melarut dilakukan dengan menggunakan jaringan bukal mulut babi. DMN di letakkan pada lapisan bukal babi dengan memberikan tekanan dari beban seberat 5 g, kemudian diamati pada interval waktu 1; 2; 3; 4; dan 5 menit hingga diperoleh waktu DMN melarut dengan sempurna pada bukal mulut babi. Selanjutnya morfologi DMN diamati dengan menggunakan mikroskop (Roy et al., 2019).

Penentuan kandungan obat. Pengujian ini bertujuan untuk mengukur jumlah EFV yang terdapat dalam DMN. Penentuan kandungan EFV dalam DMN dilakukan setelah DMN dilepaskan dari cetakan, kemudian jarum pada DMN dikerok secara perlahan dengan menggunakan pisau bedah dan ditimbang. Setelah itu, dilarutkan dalam 5 mL etanol dan disonikasi selama 5 menit. Setelah jarum melarut, dilakukan analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Mudjahid et al., 2022).

Uji permeasi *ex vivo*. Uji permeasi pada jaringan bukal secara *ex vivo* dilakukan menggunakan sel difusi Franz dengan area permeasi sebesar 1,61 cm². Jaringan bukal babi dipasang di kompartemen donor sel difusi Franz. Formula DMN ditempelkan pada jaringan bukal dan diberi tekanan dengan menggunakan baja silinder dengan berat 5 g. Kompartemen reseptor diisi dengan cairan saliva buatan yang mengandung SLS 2% sebanyak 13 mL kemudian diaduk dengan kecepatan 500 rpm dengan suhu dijaga pada 37 ± 1°C. Pada interval waktu 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 24 jam dicuplik 1 mL media dari kompartemen reseptor kemudian diganti dengan 1 mL media baru dengan suhu yang sama. Seluruh sampel dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Sinko, 2011).

Pada uji permeasi secara *ex vivo*, selain formula DMN-NC-EFV terdapat juga patch kontrol dan DMN-EFV. Komposisi dan cara kerja dari DMN-EFV sama dengan DMN-NC-EFV, yang membedakan hanya penggunaan EFV murni sebagai pengganti NC pada DMN-EFV. Sedangkan formula patch kontrol dari NC-EFV dibuat dengan komposisi yang sama dengan DMN-NC-EFV yang dapat dilihat pada **Tabel 3**.



Tabel 3. Rancangan formula patch kontrol

Komposisi	Konsentrasi (% b/v)
NC-EFV	10
PVP	25
PVA	10
Aquadest	ad 100

Formulasi patch kontrol dibuat menggunakan NC-EFV dengan cara mencampurkan kombinasi polimer PVP dan PVA berdasarkan perbandingan konsentrasi yang ada pada **Tabel 3**. Campuran kemudian dipanaskan pada suhu 80°C hingga diperoleh larutan homogen. Sebanyak 1 mL dari campuran tersebut kemudian dituang ke dalam cetakan silikon. Formula patch dalam cetakan selanjutnya dikeringkan pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam (Aziz et al., 2025).

Uji hemolisis. Pengujian ini dilakukan untuk menilai keamanan biologis dari DMN yang mengandung NC-EFV saat diaplikasikan pada jaringan bukal, khususnya dampaknya terhadap sirkulasi darah. Uji hemolisis dilakukan menggunakan darah tikus segar yang dikumpulkan dalam tabung EDTA K3 (Medsys Uni Horizon Pharma Corp., Quezon City, Filipina). Darah tersebut disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan eritrosit dari plasma. Endapan sel eritrosit yang diperoleh kemudian dipisahkan dari supernatan, eritrosit dicuci tiga kali dengan larutan PBS pH 7,4. Eritrosit yang diperoleh disuspensikan kembali dalam PBS hingga mencapai konsentrasi akhir 10% v/v. Sampel uji seperti EFV murni, NC-EFV, dan DMN-NC-EFV disiapkan pada konsentrasi 500, 50, dan 5 bpj menggunakan PBS pH 7,4. Setiap konsentrasi pengenceran diambil sebanyak 900 µL dan ditambahkan 100 µL suspensi eritrosit. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 60 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 10 menit. Konsentrasi EFV dalam setiap supernatan kemudian diukur menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Penelitian ini menggunakan aquadest sebagai kontrol positif dan PBS pH 7,4 sebagai kontrol negatif. Persentase hemolisis dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Hemolisis (\%)} = \frac{\text{Kelompok eksperimen} - \text{Kontrol negatif}}{\text{Kontrol positif} - \text{Kontrol negatif}} \times 100\%$$

Uji Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM). Pengujian ini digunakan untuk menilai potensi iritasi yang disebabkan oleh berbagai senyawa dalam formulasi DMN-NC-EFV. Pertama, telur ayam Leghorn putih yang bersih dan subur, masing-masing dengan berat antara 50-60 gram, dipersiapkan dengan hati-



...nkubasi dalam inkubator rotari pada suhu 38,3 ± 0,2°C dengan 3 ± 2% selama tujuh hari, dengan rotasi manual 5 kali sehari. area sel udara dari setiap cangkang telur dihapus dengan hati-hati menggunakan alat gergaji rip, memastikan bahwa membran bagian dalam tetap utuh. Kemudian, 1 mL dari masing-masing sampel kemudian diteteskan pada permukaan korioallantoik. Untuk perbandingan, 0,1 M NaOH digunakan sebagai kontrol positif, dan larutan 0,9% NaCl digunakan sebagai kontrol negatif.

Observasi dilakukan untuk tanda-tanda perdarahan, lisis vaskular, dan koagulasi. Potensi iritasi dari sampel dinilai secara kualitatif dengan membandingkannya dengan kontrol negatif dan positif (Sulistiawati et al., 2024).

2.3.8 Analisis Statistik

Hasil dari penelitian ini disajikan sebagai rata-rata \pm deviasi standar (SD). Analisis statistik data dilakukan menggunakan IBM® SPSS® Statistics 23.0 (IBM, Armonk, New York, AS). Grafik dan diagram diperoleh dari aplikasi GraphPad Prism® versi 5 (GraphPad Software, San Diego, California, AS). Signifikansi statistik ditentukan pada nilai $p < 0,05$.

