BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Selama dekade terakhir, perkembangan tak terduga dalam bidang kesehatan telah menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam jumlah penderita infeksi jamur oportunistik. Salah satu infeksi oportunistik yang paling sering terjadi adalah *Oral Candidiasis* (OC). OC adalah infeksi jamur yang disebabkan oleh jenis jamur Candida, terutama *Candida albicans*, yang mempengaruhi mulut dan tenggorokan (Qadir et al., 2023). Infeksi ini menunjukkan gejala seperti bercak putih di lidah, langit-langit mulut, dan nyeri atau sensasi terbakar. Infeksi OC sering terjadi pada penderita diabetes, penggunaan terapi antibiotik dan kortikosteroid, kebersihan bukal yang buruk, transplantasi organ, dan terutama pada pasien dengan immunodefisiensi (seperti pasien HIV dan kanker) (Hellstein & Marek, 2019; R & Rafiq, 2023). Penyakit ini diketahui telah terjadi sekitar 20-25% populasi dunia dan diperkirakan bahwa sekitar 25.000 kasus kandidiasis terjadi setiap tahun (CDC, 2021). Di Indonesia sendiri, OC memiliki prevalensi antara 20-72% yang disebabkan oleh *Candida albicans* (Demolsky et al., 2022). Infeksi Candida telah menjadi tantangan klinis yang signifikan dan menyebabkan beban ekonomi yang besar karena munculnya strain yang resisten terhadap obat-obatan belakangan ini (Dubey AK, 2019). Oleh karena itu, penelitian dan pengembangan obat-obatan yang efektif dan aman menjadi suatu kebutuhan mendesak untuk mengatasi permasalahan infeksi Candida yang semakin kompleks.

Sebagai lini pertama dalam terapi kandidiasis oral yang umum digunakan adalah obat golongan poliena dan azol yang telah diakui efektifitasnya dan dijadikan sebagai standar perawatan terkini (Lombardi & Ouanounou, 2020). Namun, diantara semua terapi, poliena amfoterisin B (AMB) lebih disenangi karena merupakan salah satu agen antijamur tertua yang paling sering digunakan dan termasuk golongan antijamur dengan spektrum luas yang efektif (IC_{50} 0,25–1 μg mL^{-1}) (Cavassin et al., 2021; 14). AMB bekerja dengan mengobstruksi sintesis dinding at ergosterol, membentuk pori-pori yang mengganggu ion ga mengakibatkan destruksi sel fungi dan kemudian mati). Selain itu, AMB terhadap strain *C. albicans* juga telah tingkat resistensi yang rendah, sehingga memberikan

Optimized using
trial version
www.balesio.com

keuntungan besar dibandingkan agen antijamur lain, seperti golongan azole (de Tilly & Tharmalingam, 2022).

Pemberian dosis 40 mg AMB secara oral pada tikus menunjukkan tingkat kelangsungan hidup sekitar 90-100% saat terinfeksi *Candida albicans*. Namun, ketika diuji pada manusia, menunjukkan hasil yang buruk (Fairuz et al., 2022). Pemberian obat secara oral kemungkinan besar akan menghasilkan efek samping sistemik karena obat diserap ke dalam aliran darah dan tersebar ke seluruh tubuh, sementara pemberian secara topikal tidak menyebabkan retensi obat di dalam rongga mulut (Lou et al., 2023; Song et al., 2023). Pemberian antimikroba topikal, terutama yang diterapkan pada area yang terinfeksi, terbukti lebih efektif dibandingkan pemberian oral pada kasus tertentu. Beberapa manfaat pemberian topikal adalah dapat mencegah toksisitas sistemik, penghantaran obat yang ditargetkan sekaligus memastikan jumlah obat tertahan pada membran mukosa (Bandyopadhyay, 2021). Pengiriman yang ditargetkan ini dapat menghasilkan pengobatan yang lebih efisien dan efek samping yang lebih sedikit, terutama untuk kondisi yang mempengaruhi mukosa oral.

Secara komersial, AMB saat ini tersedia dalam bentuk oral dan injeksi. Namun, kedua sistem tersebut memiliki kekurangan yakni risiko toksisitas, efek samping yang merugikan, dan kemungkinan resistensi, penggunaan terapi ini seringkali terbatas serta proses administrasi yang kurang nyaman pada pemberian injeksi. Sementara formulasi konvensional pemberian oral lokal biasanya menunjukkan pelepasan awal yang cepat tetapi kemudian menurun menjadi konsentrasi subterapeutik (Gheorghe et al., 2021) dan rendahnya bioavailabilitas oral (0,2-0,9%) yang disebabkan karena kelarutan AMB yang rendah dan akibat *first pass effect* (Cavassin et al., 2021; Serrano & Lalatsa, 2017)**.** Oleh karena itu, perlu dipertimbangkan alternatif pengobatan baru yang meningkatkan efisiensi pengobatan anti-Candida sambil melindungi pasien dari kemungkinan efek yang berbahaya, dengan pengembangan inovasi sistem penghantaran baru melalui transmukosa oral.

Sistem penghantaran transmukosa oral dapat diberikan secara lokal
a dengan baik oleh pasien, mukosa oral relatif permeabel
suplai darah, kuat dan menunjukkan waktu *recovery* yang
usakan serta hampir tidak ada sel langerhans yang
oral toleran terhadap alergen potensial (Gorzelanny et al.,
l., 2019). Selain itu, dapat meningkatkan sifat antibiotik,
nerasi jaringan, mengatur difusi obat di dalam rongga

Optimized using
trial version
www.balesio.com

mulut, dan melewati metabolisme lintas pertama, dan meningkatkan kepatuhan pasien (Bolla et al., 2020; Y. Zhang et al., 2022). Faktor-faktor ini membuat rongga mukosa oral menjadi tempat yang sangat menarik dan layak untuk penghantaran obat secara lokal.

Tantangan utama dalam mencapai pengobatan lokal yang efektif adalah terbatasnya volume disolusi obat dan kebutuhan akan permeabilitas yang cepat di rongga mulut agar konsentrasi obat yang optimal dapat tercapai. Kemudian, sediaan antijamur yang tersedia saat ini ialah dalam bentuk suspensi oral karena kelarutan sebagian besar antijamur dalam air yang buruk dan waktu kontak yang singkat dengan mukosa oral, sehingga diperlukan obat yang tersedia dan terlarut untuk meningkatkan efektivitas antijamur (Serrano et al., 2019). Untuk mengatasi masalah ini, berbagai formulasi telah dikembangkan seperti formulasi misel, nanopartikel polimer, koklea, dan sistem penghantaran obat *self-emulsifying* (SEDDS) (Wasan et al., 2022). Beberapa formulasi ini telah menunjukkan hasil yang menjanjikan dalam uji praklinis dan klinis, seperti metode penguapan pelarut emulsifikasi bertekanan tinggi yang mencapai efisiensi enkapsulasi hingga 60% dan meningkatkan bioavailabilitas amfoterisin B 11 kali lipat (Wasan et al., 2022). Penelitian Zhou et al. (2017) mengembangkan formulasi oral AMB dalam bentuk misel untuk pengobatan lokal infeksi oral candidiasis, menunjukkan peningkatan signifikan terhadap aktivitas antijamur terhadap keadaan biofilm *C. albicans*. Namun, sediaan misel memiliki kelemahan terkait kapasitas pemuatan obat terbatas dan potensi toksisitasnya (Wang et al., 2023). Saat ini, ada banyak metode yang digunakan untuk meningkatkan kelarutan bahan obat yang memiliki kelarutan rendah dalam air (hidrofobik), termasuk penggunaan teknologi nanokristal.

Pemanfaatan Teknologi Nanokristal (NC) bisa menjadi solusi yang menguntungkan untuk meningkatkan kelarutan AMB. Nanokristal (NC) adalah dispersi koloid berukuran nano dari partikel obat padat murni yang distabilkan oleh surfaktan dan/atau polimer (Wang et al., 2021). Teknologi ini telah dianggap menjanjikan terutama dapat diterapkan pada bahan aktif dengan kelarutan dalam air yang buruk untuk meningkatkan disolusi serta
(Shankar et al., 2020). Penelitian sebelumnya berhasil
formulasi nanokristal untuk obat-obat yang bersifat
AMB, dengan menunjukkan peningkatan kelarutan obat
s, et al., 2021). Nanokristal lebih unggul dibandingkan
seperti nanopartikel polimer, karena memiliki kapasitas
ng tinggi (hampir 100%), penggunaan eksipien yang

Optimized using
trial version
www.balesio.com

terbatas untuk mengurangi risiko hipersensitivitas, dapat meningkatkan kecepatan disolusi dan kelarutan saturasi obat karena besarnya luas permukaan dari bahan aktif tersebut (Pardhi et al., 2019). Namun, untuk mencapai stabilitas fisik dan kimia yang optimal, pemilihan *stabilizer* yang tepat menjadi faktor krusial dalam pembuatan nanokristal. *Stabilizer* seperti PVA, SLS, dan Pluronic F-127 digunakan untuk menstabilkan partikel nanokristal dan mencegah agregasi partikel yang dapat mengurangi efisiensi formulasi nanokristal (Gupta et al., 2022).

Setiap *stabilizer* memiliki mekanisme kerja dan interaksi molekuler yang berbeda dengan AMB dan media pembawa, yang pada akhirnya mempengaruhi karakteristik fisik nanokristal seperti ukuran partikel, distribusi ukuran, dan stabilitas jangka panjang. PVA sering digunakan karena sifatnya yang larut dalam air dan kemampuan membentuk lapisan pelindung di sekitar partikel nanokristal. Sementara itu, SLS sebagai surfaktan anionik memiliki kemampuan menurunkan tegangan permukaan secara signifikan, yang dapat meningkatkan dispersibilitas partikel. Pluronic F-127, poloxamer non-ionik, dikenal karena sifatnya yang biokompatibel dan kemampuannya untuk menstabilkan partikel melalui pembentukan *micelle* di sekitar nanokristal (Kumar et al., 2023). Oleh karena itu, penting untuk memahami pengaruh jenis *stabilizer* terhadap karakteristik fisik nanokristal AMB yang dihasilkan.

Sistem penghantaran nanokristal AMB ditingkatkan dengan cara dihantarkan melalui matriks *microneedle*. Sistem ini mampu menghantarkan pemuatan obat yang tinggi melalui stratum korneum dengan menciptakan saluran mikro tanpa rasa sakit sehingga dapat meningkatkan kenyamanan penggunanya (Yang et al., 2021). Menurut Jamaledin et al. (2020), *Microneedle* telah sering digunakan untuk mengatur pelepasan antibiotik secara terkontrol di kulit dan jaringan halus yang terinfeksi (Jamaledin et al., 2020). Sejumlah bahan telah dieksplorasi untuk membuat *microneedle*, salah satu contohnya adalah microneedle yang terbuat dari polimer terlarut (*dissolving microneedle*) karena keunggulannya yang mudah diaplikasikan sendiri dan tidak meninggalkan bahaya tajam (Donnelly & Larrañeta, 2018). Dengan memungkinkan pasien untuk melakukan pengobatan sendiri, DMN
li alternatif yang menjanjikan dibandingkan metode
n pemberian AMB.
nicroneedle (DMN) yang terbuat dari polimer mudah larut
pirolidon (PVP) dan polivinil alkohol (PVA) tidak
si. Penelitian sebelumnya hanya menggunakan PVP
nggal dalam formulasi DMN, namun tidak memberikan

Optimized using
trial version
www.balesio.com

hasil yang memuaskan (Permana et al., 2019). Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan komposit polimer untuk mencapai karakteristik DMN yang lebih baik. Salah satu polimer yang sering digunakan adalah PVA. Menurut Zhang et al. (2021), PVA merupakan polimer yang tidak beracun, tidak berbau, mudah larut dalam air, bersifat biodegradable yang menghadirkan kapasitas pembentukan film yang baik, tahan terhadap lemak dan minyak, dan memiliki sifat mekanik yang baik. Selain itu, memilki kemampuan untuk menghasilkan pelepasan yang terkontrol dengan mudah disesuaikan dengan konsentrasinya. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kombinasi PVP dengan PVA menghasilkan karakteristik DMN yang lebih baik dan kekuatan mekanik yang memadai (Permana et al., 2020).

Penelitian ini mengeksplorasi potensi DMN untuk menghantarkan AMB secara lokal, memaksimalkan efek antijamur, sekaligus meminimalkan paparan sistemik dan toksisitas dalam mengobati infeksi jamur di rongga mulut. Sistem ini diharapkan memperpanjang durasi terapi AMB di mukosa oral dan meningkatkan penetrasi sel epitel mukosa, sehingga lebih efektif dalam mengatasi infeksi, khususnya pada pasien dengan *oral candidiasis*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh jenis *stabilizer* terhadap karakteristik fisik nanokristal Amfoterisin B yang dihasilkan?
2. Bagaimana aktivitas antijamur sediaan nanokristal amfoterisin B dalam penghambatan *Candida albicans* secara *in vitro*?
3. Bagaimana pengaruh konsentrasi PVP K-30 terhadap karakteristik fisik *dissolving microneedle* nanokristal amfoterisin B?
4. Bagaimana profil permeasi, retensi, dan kinetik mukosa oral nanokristal amfoterisin B dari sistem *dissolving microneedles* pada pengujian secara *ex vivo*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan formula nanokristal amfoterisin B yang memiliki karakteristik fisik dengan jenis *stabilizer* terbaik.
2. M[illegible]gkan kemampuan antijamur nanokristal amfoterisin B [illegible]ntuk murninya dalam menghambat *Candida albicans* [illegible]*ro.*
3. [illegible]n konsentrasi PVP K-30 yang menghasilkan formula [illegible]*icroneedle* nanokristal amfoterisin B terbaik.

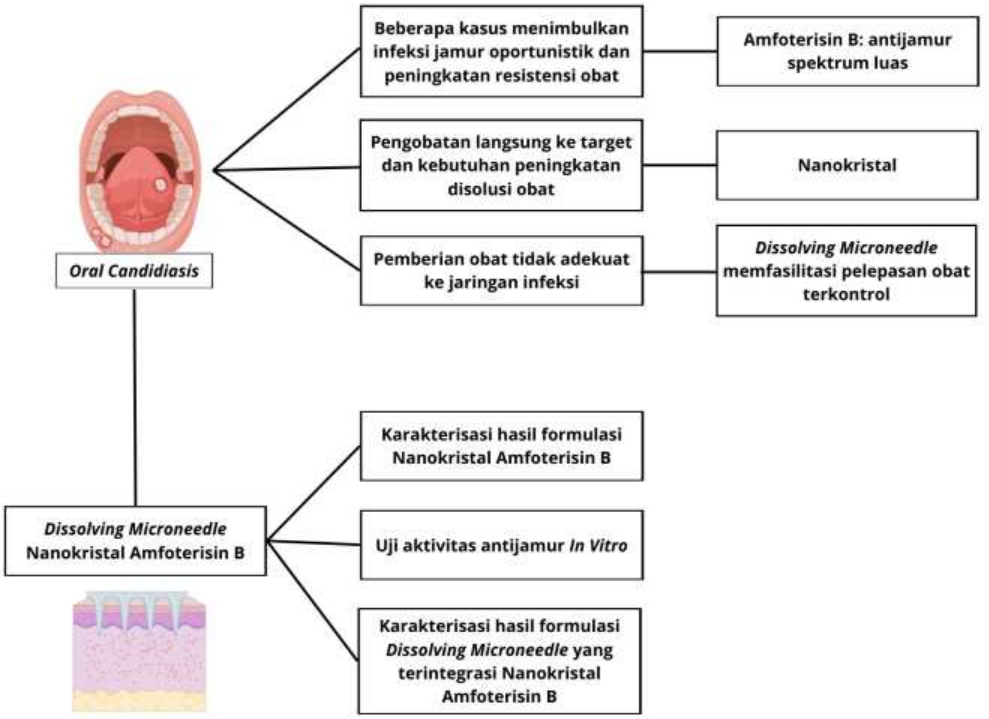
Optimized using
trial version
www.balesio.com

4. Menentukan profil permeasi, retensi, dan kinetik mukosa oral nanokristal amfoterisin B dari sistem *dissolving microneedles* pada pengujian secara *ex vivo*.

1.4 Manfaat Penelitian

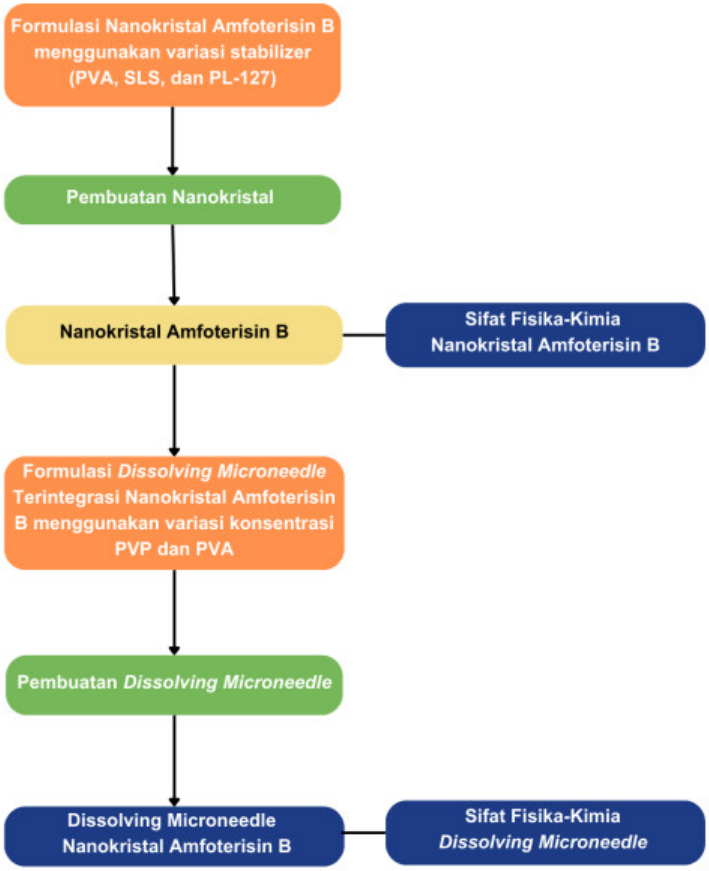
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan menjadi landasan dalam pengembangan ilmu pengetahuan dibidang kesehatan, terkhusus dalam bidang teknologi farmasi tentang pengembangan formulasi untuk pengobatan infeksi jaringan mulut yang lebih efektif dan efisien.

1.5 Kerangka Teori



Optimized using
trial version
www.balesio.com

1.6 Kerangka Konsep



Optimized using
trial version
www.balesio.com

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Rancangan dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengembangkan formula *dissolving microneedle* yang mengandung nanokristal amfoterisin B dengan melakukan pengujian karakterisasi formula terbaik, aktivitas antijamur secara *in vitro*, studi pelepasan obat secara *in vitro*, aktivitas terhadap peningkatan profil permeasi secara *ex vivo*, dan aktivitas antijamur secara *ex vivo*. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmasetika, laboratorium Mikrobiologi, dan laboratorium Biofarmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah botol duran, cawan petri, cawan porselen, centrifuge (Oregon® LC-04S), desikator, sonikator (Krisbow®), hotplate (Maspion®), instrumen FTIR, instrumen X-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®), inkubator, bunsen, cawan petri, vial dan alat-alat gelas (Pyrex®).

Bahan-bahan yang digunakan adalah Aquadest (Waterone®), Dikalium Hidrogen Ortofosfat, Dimetil Sulfoksida (DMSO), Gel Silika, Amfoterisin B (AMB), Kalium Klorida, Kalsium Klorida dihidrat, Magnesium Klorida, Methanol p.a, Natrium Bikarbonat, Natrium Klorida, Natrium Nitrit, Parafilm® M, Polivinil Pirolidon (PVP) K-30, Pluronic® F-127 (PL-127), Polivinil Alkohol (PVA), Sodium Lauril Sulfat (SLS), *Candida albicans* (ATC®14503), Saboaraud Dextrose Broth (SDB), dan Saboaraud Dextrose Agar (SDA).

2.3. Metode Kerja

alisis Amfoterisin B

Cairan Saliva Buatan. Cairan saliva buatan disiapkan
sebanyak 1,2 g kalium klorida (KCl), 0,85 g natrium
5 g magnesium klorida ($MgCl_2$), 0,13 g kalsium klorida

Optimized using
trial version
www.balesio.com

($CaCl_2$) dan 0,13 g dikalium hidrogen ortofosfat (K_2HPO_4) ke dalam 1000 mL air deionisasi dan pH diukur hingga mencapai 6,8 (Baus et al., 2019).

Pembuatan Larutan Stok Amfoterisin. Larutan stok AMB dibuat untuk penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan stok dibuat dalam dua pelarut berbeda yaitu, dalam metanol dan cairan saliva buatan + SLS 2% sebagai media pelepasan. AMB ditimbang secara saksama sebanyak 10 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan dicukupkan dengan metanol hingga tanda batas (1000 bpj).

Optimized using
trial version
www.balesio.com

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Panjang gelombang maksimum AMB diukur dalam dua pelarut yang berbeda yaitu dalam metanol dan cairan saliva buatan + SLS 2% b/v. Pada pelarut metanol, Panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara larutan stok AMB dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam vial dan dicukupkan volumenya dengan pelarut metanol hingga 10 mL (100 bpj). Sedangkan pada cairan saliva buatan + SLS 2%, panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara larutan stok AMB dipipet sebanyak 1 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 pada panjang gelombang 300-600 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dari serapan tertinggi pada sampel.

Pembuatan Kurva Baku Amfoterisin B dalam Metanol. Kurva baku diukur dengan mengambil larutan dari konsentrasi 500 bpj secara berturut-turut 800 µL, 400 µL, 200 µL, 100 µL, dan 50 µL kemudian diencerkan dengan 1200 µL, 1600 µL, 1800 µL, 1900 µL, dan 1950 µL metanol sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 200, 100, 50, 25, dan 12,5 bpj. Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 360.8 nm.

Pembuatan Kurva Baku Amfoterisin B dalam Cairan Saliva Buatan + SLS 2%. Kurva baku diukur dengan mengambil larutan dari konsentrasi 500 bpj secara berturut-turut 400 µL, 200 µL, 100 µL, 50 µL, dan 25 µL kemudian diencerkan dengan 1600 µL,1800 µL, 1900 µL, 1950 µL, dan 1975 µL cairan saliva buatan + SLS 2% b/v sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100, 50, 25, 12,5 dan 6,25 bpj. Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 363 nm.

2.3.2 Formulasi Nanokristal

Formulasi nanokristal dilakukan dengan menggunakan metode *top down* untuk menyiapkan AMB-NC, dengan sedikit modifikasi (Permana, Paredes, et al., 2021). Berikut tabel komposisi formula dari nanokristal.

Optimized using
trial version
www.balesio.com

formula nanokristal Amfoterisin B

isin B	*Stabilizer*
g	PVA 1% (Polivinil Alkohol 1 g dalam 100 mL air)
g	PVA 2% (Polivinil Alkohol 2 g dalam 100 mL air)

F3	0,2 g	SLS 1% (Sodium Lauril Sulfat 1 g dalam 100 mL air)
F4	0,2 g	SLS 2% (Sodium Lauril Sulfat 2 g dalam 100 mL air)
F5	0,2 g	PL-127 1% (Pluronic® F-127 1 g dalam 100 mL air)
F6	0,2 g	PL-127 2% (Pluronic® F-127 2 g dalam 100 mL air)

Sistem formulasi terdiri atas botol vial berkapasitas 20 mL, dua batang magnet sepanjang 5 cm, dan sebuah pengaduk magnetik. Sebanyak 0,2 g AMB, 20 g zirkonium, dan *stabilizer* dengan konsentrasi sesuai **Tabel 1** dimasukkan ke dalam botol vial. Dua batang magnet kemudian ditambahkan, dan botol vial ditutup rapat. Campuran diaduk selama 24 jam pada kecepatan 1500 rpm menggunakan pengaduk magnetik. Untuk menentukan waktu proses yang optimal, sampel diambil pada interval tertentu (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 24 jam) sebanyak 0,1 mL untuk pengukuran ukuran partikel. Setelah proses selesai, zirkonium dan batang magnet dipisahkan dari dispersi menggunakan ayakan 200 mesh. *Stabilizer* yang digunakan pada penelitian ini adalah PVA, SLS, dan PL-127 dengan konsentrasi 1% b/v dan 2% b/v dalam air. Setelah formula AMB-NC optimal diperoleh, campuran tersebut dituangkan ke dalam beberapa tabung Eppendorf dan disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 30 menit untuk memurnikan nanokristal serta menghasilkan pelet nanokristal. Pelet yang dihasilkan kemudian dikeringkan menggunakan inkubator pada suhu 37°C. Pelet AMB-NC kering digerus hingga halus dan disimpan dalam desikator hingga siap untuk pengujian lebih lanjut.

2.3.3 Evaluasi Nanokristal

Analisis Ukuran Partikel dan Polidispersitas Indeks (PDI). Analisis ukuran partikel dan polidispersitas indeks (PDI) dilakukan untuk mengevaluasi sifat fisikokimia dan stabilitas nanokristal. Pengukuran dilakukan menggunakan program image raster untuk memperoleh data ukuran partikel secara individual. Data tersebut kemudian diolah di Microsoft Excel, di mana nilai PDI dihitung dengan membagi varians ukuran partikel terhadap kuadrat rata-rata ukuran partikel.

owder X-ray Diffraction (PX-RD). Analisis PX-RD enganalisis karakteristik kristalinitas serbuk AMB murni, *g microneedle* dan campuran fisik dari formulasi yang ggunakan instrumen *X-ray Diffractometer* (Rigaku England).

Optimized using
trial version
www.balesio.com

Analisis Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Analisis (FT-IR) dilakukan untuk menganalisis interaksi kimia serbuk AMB murni, AMB-NC, *dissolving microneedle* dan campuran fisik dari formulasi yang dioptimalkan digunakan untuk penelitian ini. Dipreparasi dengan KBr, selanjutnya dianalisa menggunakan instrument FT-IR (Accutrac FT/IR-4100 series, Jasco, Essex, UK) pada rentang bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1}.

2.3.4 Penentuan Kelarutan Jenuh

Media pelepasan yang digunakan untuk uji *in vitro* dan *ex vivo* adalah cairan saliva buatan. AMB ditemukan sulit larut dalam media ini, sehingga senyawa lain digunakan untuk meningkatkan kelarutannya. Dalam pengujian ini, enam formulasi senyawa yang berbeda digunakan, seperti 1% SLS, 2% SLS, 1% tween 80, 2% tween 80, 10% PEG, 20% PEG. Selanjutnya, AMB dilarutkan hingga jenuh dalam setiap pelarut dan dikocok selama 24 jam. Larutan disentrifugasi secara khusus pada 1500 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan. Supernatan yang diperoleh diencerkan 10 kali menggunakan metanol dan diukur pada spektrofotometer UV–Vis dengan panjang gelombang maksimum 360,8 nm. Konsentrasi AMB dihitung menggunakan persamaan regresi kurva standar metanol (Mualim et al., 2024).

2.3.5 Studi Pelepasan *In Vitro*

Studi pelepasan obat secara *in vitro* dilakukan dengan menempatkan sampel uji AMB murni, AMB-NC dan campuran fisik dari formulasi yang dioptimalkan ke dalam tabung dialisis membran selofan sebanyak 10 mg dalam 1 mL cairan fisiologis, sesuai penelitian sebelumnya (Permana et al., 2020). Kemudian kedua ujung tabung dialisis membran selofan disegel. Selanjutnya dimasukkan atau disuspensikan ke dalam botol duran yang berisi cairan saliva buatan sebanyak 100 mL. Lalu, botol dikocok menggunakan alat shaker dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ±37°C selama 24 jam. Pencuplikan sampel dilakukan pada interval waktu tertentu 4, 5, 6, 7, 8, dan 24 jam) sebanyak 1 mL. Pada setiap ıel, segera diganti dengan cairan fisiologis yang baru ıg sama. Selanjutnya sampel dianalisis menggunakan UV-Vis (Dynamica®, HALO XB-10) pada panjang ıum 360,8 nm. Model kinetik mengikuti persamaan di

Optimized using
trial version
www.balesio.com

Orde nol: $Q_t = Q_0 + K_0\, t$ (1)

Orde satu: $lnQ_t = \ln Q_0 + K_1$ (2)

Higuchi: $Qt = K_H\sqrt{t}$ (3)

Korsmeyer–Peppas: $Q_t = K_t n$ (4)

Hixson–Crowell: $Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t$ (5)

Dimana, Q_0 menunjukkan nilai awal Q_t, t menunjukkan waktu, n adalah eksponen pelepasan difusi, dan K_0, K_1, K_H, K_t, dan K_s adalah konstanta laju pelepasan berdasarkan model kinetik masing-masing. Qt (%) menunjukkan persentase AMB yang dilepaskan pada waktu t tertentu. Parameter model dihitung menggunakan DDsolver (China Pharmaceutical University, Nanjing, China) (Y. Zhang et al., 2010).

2.3.6 Uji Aktivitas Antijamur *In Vitro*

Persiapan Kultur *Candida albicans.* Strain jamur yang digunakan adalah *Candida albicans* (ATC®14503) yang disimpan pada suhu 4°C dan disubkultur pada media segar. Kultur jamur dibuat dengan menumbuhkan jamur pada media SDA dengan suhu 37°C. Jamur uji dibuat setara dengan $1{,}5\times10^7$ CFU/mL (Permana et al., 2020).

Pengujian Daya Hambat. Uji aktivitas antimikroba AMB dalam air, AMB dalam DMSO, dan AMB-NC dilakukan menggunakan metode agar difusi. Awalnya, media pertumbuhan SDA yang mengandung 50 mg/mL kloramfenikol disiapkan dalam cawan Petri. Inokulum *C. albicans* kemudian disebarkan untuk menutupi semua permukaan agar. Sejumlah yang setara dengan 400 µg/mL larutan AMB dalam air, AMB dalam DMSO, dan AMB-NC diteteskan ke kertas cakram, yang diletakkan di permukaan agar. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Diameter zona penghambatan setiap sampel yang diuji diukur menggunakan jangka sorong digital (Permana, Utomo, et al., 2021).

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan **h Minimum (KBM).** Nilai KHM dan KBM dari AMB dan n menggunakan teknik pengenceran mikrotiter sesuai *linical and Laboratory Standards Institute.* Larutan AMB C dengan konsentrasi 100µg/mL dimasukkan ke dalam Sampel dimasukkan ke dalam 96-well plate dengan /ml pada sumur pertama. Selanjutnya dilakukan

Optimized using
trial version
www.balesio.com

pengenceran bertingkat dengan penambahan 100µL larutan DMSO 10% ke dalam sumur. Selanjutnya ditambahkan 10µL jamur 100 µL ($1,5\times10^7$ CFU/mL) suspensi jamur dan 90µL media SDB ke dalam sumuran hingga konsentrasi mencapai $7,5\times10^6$ CFU/mL. Semua sumur yang terisi ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Untuk menentukan nilai KBM, 20 µL dari 96-*well plate* dengan KHM terpilih dikultur pada cawan petri yang berisi media SDA dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Setelah itu, ditentukan jumlah jamur dalam koloni cawan petri. KBM didefinisikan sebagai konsentrasi terendah yang menghilangkan 99,9% pertumbuhan jamur (Permana et al., 2020).

2.3.7 Formulasi dan Evaluasi *Dissolving Microneedle*

Dissolving microneedle nanokristal amfoterisin B (AMB-NC-DMN) dibuat dalam lima formula awal yang mengandung kombinasi polimer PVA, PVP K-30, dan aquadest. Berikut tabel komposisi formula dari *dissolving microneedle*.

Tabel 2. Komposisi formula AMB-NC-DMN

Bahan	Komposisi (%b/b)				
	F1	F2	F3	F4	F5
AMB-NC	10	10	10	10	10
PVA	10	10	10	10	10
PVP K-30	10	15	20	25	30
Aquadest	70	65	60	55	50

Formulasi Dissolving Microneedle (DMN). Formulasi DMN dibuat menggunakan nanokristal AMB dengan mencampurkan kombinasi polimer PVP dan PVA berdasarkan perbandingan konsentrasi yang ada pada Tabel 2. DMN dibuat dengan metode sentrifugasi menggunakan cetakan khusus yang diletakkan di rotor alat sentrifus. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Formula DMN dalam cetakan yang telah disentrifugasi selanjutnya dikeringkan pada suhu 37°C selama 2 x 24 ah dikeringkan dilanjutkan ke tahap evaluasi (Permana et

gi. Uji morfologi dilakukan menggunakan mikroskop yang ıgan kamera optilab untuk mengetahui bentuk dan ukuran nbesaran 4 kali. Bentuk DMN yang dihasilkan disimpan mbar untuk keperluan metode selanjutnya. Sedangkan

Optimized using
trial version
www.balesio.com

untuk ukuran tinggi *needle* diukur menggunakan aplikasi optilab yang telah dikalibrasi dengan mikrometer okuler.

Uji Kekuatan Mekanik dan Kemampuan Penetrasi. Kekuatan mekanik DMN dievaluasi dengan mengukur kemampuan DMN menembus 8 lapisan parafilm yang memiliki ukuran dan ketebalan yang sama yang dianggap seperti lapisan jaringan mukosa oral. DMN diletakkan diatas lapisan parafilm yang telah disiapkan, kemudian diberikan beban yang setara dengan 32 N selama 30 detik. Perhitungan presentase kompresi dan perhitungan jumlah lubang yang terbentuk pada lapisan parafilm dihitung persentase kemampuan penetrasi pada setiap lapisan dengan persamaan sebagai berikut (González-Vázquez et al., 2017; Permana, Paredes, et al., 2020):

$$\%\text{Kompresi} = \frac{tinggi\ sebelum\ uji - tinggi\ setelah\ uji}{tinggi\ sebelum\ uji} \times 100\% \quad (6)$$

$$\%\text{Penetrasi Lapisan Ke-n} = \frac{Jumlah\ lubang\ pada\ lapisan\ ke-n}{Total\ jumlah\ lubang} \times 100\% \quad (7)$$

2.3.8 Penentuan *Drug Recovery*

Penentuan Densitas. Penentuan densitas dilakukan dengan mencetak campuran polimer kedalam cetakan khusus yang berbentuk balok pipih, kemudian ditimbang dan dikeringkan. Selanjutnya, hasil cetakan yang telah kering ditimbang kembali dan diukur panjang, tinggi, dan lebarnya untuk menghitung volume balok (Permana et al., 2019). Kemudian, densitas (ρ) dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\rho = \frac{\text{Bobot}}{Volume} \quad (8)$$

Penentuan LOD (Loss on Drying) dan Persentase Jumlah AMB dalam Massa Kering. Penentuan LOD bertujuan untuk mengetahui persentase jumlah air yang hilang selama proses pengeringan. Penentuan LOD dilakukan dengan menimbang bobot basah dan bobot setelah eringan microneedle (Putri et al., 2022). Persentase LOD gan menggunakan rumus berikut:

$$\text{.OD}) = \frac{Bobot\ basah - Bobot\ kering}{Bobot\ basah} \times 100\% \quad (9)$$

Optimized using
trial version
www.balesio.com

Persentase jumlah AMB dalam massa kering ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Jumlah NC (massa kering)} = \frac{Bobot\ nanokristal\ AMB}{100\% - kehilangan\ air} \times 100\% \quad (10)$$

Penentuan Volume, Bobot Jarum, dan Bobot AMB-NC. Dilakukan penentuan volume jarum dengan menggunakan rumus berikut :

$$V = \frac{1}{3} \times p \times l \times t \quad (11)$$

$$V_{total} = V \times 100 \text{ jarum (}\textit{needles}\text{)} \quad (12)$$

Jika volume telah diketahui, maka dengan menggunakan rumus densitas, bobot needle total dalam satu cetakan dapat dihitung menggunakan rumus densitas diatas. Kemudian, needle diambil dengan cara dikeruk, ditimbang sebagai bobot teoritis dan dilarutkan dalam cairan saliva buatan (pH 6,8) + 2% b/v SLS. Setelah larut, dilakukan analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan ditentukan jumlah AMB yang terkandung di dalam *needle* (Syafika et al., 2023). Persentasi kandungan obat dalam *needle* dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Kandungan Obat} = \text{Jumlah obat hasil analisis x } 100\% \quad (13)$$

2.3.9 Pengukuran pH Permukaan

DMN ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* berisi 50 mL air suling. DMN dibiarkan membengkak selama 15 menit pada suhu kamar. Kemudian dilakukan pengukuran pH menggunakan elektroda kaca gabungan yang ditempatkan dekat dengan permukaan *microneedles*, dan nilai pH ditentukan setelah waktu kesetimbangan 1 menit (Ananda et al., 2021).

2.3.10 *Water Vapor Transmission* (WVTR)

Water Vapor Transmission dievaluasi dengan memodifikasi botol ansmisi. Botol kaca dengan diameter dan volume yang dengan oven. Kalsium klorida anhidrat ditambahkan dan kan film polimer. Botol kaca kemudian disimpan dalam si kalium klorida selama 7 hari. Penilaian dilakukan setiap mbang botol kaca pada waktu yang telah ditentukan 1). Hasilnya dihitung menggunakan persamaan berikut:

Optimized using
trial version
www.balesio.com

$$\text{WVTR} = \frac{Berat\ vial\ x\ ketebalan\ film}{Luas\ permukaan\ area\ film} \quad (14)$$

2.3.11 *Moisture Absorption Ability* (MAA)

Pengujian MAA digunakan untuk menentukan massa awal setiap formulasi AMB-NC-DMN. Untuk mengevaluasi MAA, banyak formulasi yang terpapar kelembaban relatif (RH) yang tinggi. Natrium nitrit ditempatkan dalam desikator pada kelembaban relatif 69%. DMN kemudian ditempatkan dalam desikator. Pengujian berlangsung selama 14 hari, di mana berat setiap DMN diukur setiap 24 jam (Syafika et al., 2023). Persentase kemampuan penyerapan air dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\%\ \text{MAA} = \frac{Bobot\ akhir\ DMNs - Bobot\ awal\ DMNs}{Bobot\ awal\ DMNs} \quad (15)$$

2.3.12 Uji Waktu Melarut

Uji waktu melarut dilakukan dengan menggunakan mukosa oral babi. DMN di letakkan pada mukosa oral babi dengan memberikan tekanan dari beban seberat 5 g. kemudian diamati pada interval waktu tertentu hingga diperoleh waktu DMN melarut dengan sempurna pada mukosa oral babi. Selanjutnya morfologi DMN diamati dengan menggunakan mikroskop (Roy et al., 2019).

2.3.13 Analisis Hemolitik secara *In Vitro*

Analisis ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi hemolisis sel untuk menilai biokompatibilitas dan keamanan sistem penghantaran obat yang digunakan. Mengikuti protokol yang ditetapkan, uji hemolisis *in vitro* dilakukan untuk memeriksa aktivitas hemolitik AMB-NC-DMN, AMB-NC, dan AMB murni. Eritrosit diperoleh dari darah tikus *Sprague-Dawley* betina yang sehat melalui prosedur pengambilan darah, kemudian disentrifugasi pada 2000 rpm selama 20 menit. Darah tersebut kemudian dicuci menggunakan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) melalui tiga siklus sentrifugasi pada kecepatan yang

cucian, eritrosit disuspensikan kembali dalam PBS hingga
asi akhir 10% v/v. Setiap sampel 900 µL diencerkan dalam
sentrasi yang berbeda (5, 50, dan 500 µg/mL). Kemudian,
trosit yang telah disiapkan ditambahkan ke setiap sampel.
t disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 10 menit dan
uhu 37°C selama 60 menit. Hemoglobin bebas diukur

Optimized using
trial version
www.balesio.com

menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang puncak 360,8 nm dengan menggunakan Dynamica HALO XB-10, dan absorbansi supernatan dianalisis. PBS dan air suling digunakan sebagai kontrol hemolisis negatif dan positif. Perubahan warna dalam campuran sampel juga diamati selama penilaian hemolisis. Percobaan dilakukan dalam tiga ulangan untuk setiap konsentrasi. Persentase hemolisis dihitung menggunakan persamaan berikut (Mahfufah et al., 2023).

$$\% \text{ Hemolitik} = \frac{abs\ sampel - abs\ kontrol\ negatif}{abs\ kontrol\ positif - abs\ kontrol\ negatif} \text{x}100\% \quad (16)$$

2.3.14 Analisis HETCAM secara In Vitro

Uji HET-CAM dilakukan menurut pedoman yang diuraikan dalam "Protokol Metode Uji yang Direkomendasikan ICCVAM" untuk menilai potensi iritasi mata dari formulasi nanokristal dan DMN, seperti yang direkomendasikan oleh Komite Koordinasi Antarlembaga untuk Validasi Metode Alternatif (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), 2010). Uji ini menggunakan telur ayam White Leghorn yang telah dibuahi. Telur ditempatkan dalam inkubator dan diinkubasi selama 8 hari pada suhu 38,3 ± 0,2°C (58 ± 2% RH). Setelah 8 hari, telur diperiksa kesuburannya menggunakan senter. Telur yang tidak subur atau cacat dibuang, dan telur yang subur ditempatkan kembali dalam inkubator. Pada hari ke-9, telur dikeluarkan dari inkubator. Telur dengan perkembangan embrio yang baik digunakan dalam uji ini. Sel-sel udara dari telur yang ditandai kemudian dipotong dengan hati-hati menggunakan pisau bergigi gergaji yang berputar. Kulit telur dikupas dan dikeluarkan dengan sangat hati-hati untuk memastikan bahwa membran bagian dalam telur tidak rusak. Kemudian, 0,3 mL sampel ditambahkan ke membran korioalantois (CAM) yang sangat vaskular. Selain itu, 0,9% b/v NaCl dan 0,1 M NaOH digunakan sebagai kontrol negatif dan positif. Selama 5 menit setelah sampel uji diberikan, tanda-tanda iritasi, seperti lisis, pendarahan, atau koagulasi, diamati dan didokumentasikan (Wu et al., 2023).

si *Ex-Vivo*

***Patch* Bukal AMB.** Formulasi *patch* bukal digunakan tuk pengujian permeasi secara ex vivo pada jaringan mula optimal *patch* bukal dari penelitian yang telah Charyulu et al. (2014), digunakan sebagai formula acuan

patch bukal dalam penelitian ini. Kompoisisi *patch* bukal dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Komposisi Formula *Patch* Bukal AMB

Bahan	Komposisi
Amfoterisin B	200 mg
Hidroksipropil Metilselulosa (HPMC)	550 mg
Carbopol	50 mg
Polietilen Glikol (PEG) 400	0,2 mL
Aquadest	*ad*. 10 mL

Patch bukal diformulasikan menggunakan metode *solvent casting*. HPMC sebanyak 550 mg dan Carbopol sebanyak 50 mg ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 10 mL aquadest dengan pengadukan kontinu hingga homogen. PEG 400 sebanyak 0,2 mL ditambahkan sebagai *plasticizer* untuk meningkatkan fleksibilitas *patch*, dan larutan diaduk hingga tercampur sempurna. Amfoterisin B dengan dosis total 200 mg didispersikan ke dalam larutan polimer yang telah homogen, diikuti dengan pengadukan perlahan hingga tercampur merata. Volume larutan disesuaikan dengan menambahkan aquadest hingga mencapai total 10 mL. Larutan kemudian ditutup menggunakan kertas aluminium atau plastik dan didiamkan semalaman pada suhu ruang untuk menghilangkan gelembung udara. Larutan yang telah homogen dan bebas gelembung dituangkan ke dalam cetakan kaca berukuran 5 cm x 5 cm dengan permukaan rata, kemudian disebarkan merata di dalam cetakan. Larutan yang dicetak dikeringkan dalam oven udara panas pada suhu 40 °C hingga terbentuk lapisan film fleksibel yang kering. Film kering yang dihasilkan dipotong menjadi *patch* berukuran 1,5 cm x 1,5 cm.

Uji Permeasi *Ex-Vivo.* Uji permeasi ditentukan dengan ifusi franz. Uji ini dilakukan dengan cara meletakkan DMN oral babi. Kemudian, mukosa oral babi ditempatkan ke n donor sel difusi franz menggunakan perekat. Medium akan adalah cairan saliva buatan pH 6,8 dikombinasikan Baja silinder dengan berat 5 g diletakkan di atas DMN Pengujian dilakukan dengan kecepatan 500 rpm

Optimized using
trial version
www.balesio.com

menggunakan bantuan *magnetic stirrer* pada suhu 37±1°C. Pencuplikan sampel dilakukan pada interval waktu tertentu (0, 30 menit, 45 menit, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 24 jam) sebanyak 0,5 mL. Pada setiap pengambilan sampel, segera diganti dengan kompartemen reseptor yang baru dengan volume dan suhu yang sama. Selanjutnya sampel dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Permana, Utomo, et al., 2021).

2.3.16 Uji Retensi

Pengujian retensi dilakukan dengan melepaskan mukosa oral babi dari sel difusi Franz pada pengujian permeasi sebelumnya, lalu dibilas dengan air deionisasi. Selanjutnya ekstraksi nanokristal dalam mukosa oral babi dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol sebanyak 30 mL. Sampel dihomogenizer dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit lalu disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Supernatan diukur serapannya menggunakan spektofotometer UV-Vis (Ananda et al., 2021).

2.3.17 Uji Kinetik Mukosa Oral *Ex-Vivo*

Penentuan kinetik mukosa oral secara *ex-vivo* dari *dissolving microneedle* nanokristal AMB dilakukan untuk mengetahui profil farmakokinetika seperti konsentrasi obat maksimum (C_{maks}), waktu pada konsentrasi maksimum (t_{maks}), kurva konsentrasi obat pada waktu 0 (t_0) hingga 24 jam (t_{24}), luas area di bawah kurva (AUC) dan *mean residence time* (MRT). Pengujian kinetik mukosa oral nanokristal AMB dalam sistem *dissolving microneedle* dilakukan dengan modifikasi metode menggunakan mukosa oral babi. Kemudian, mukosa oral babi ditempatkan ke dalam kompartemen donor sel difusi franz menggunakan perekat. Medium reseptor yang digunakan adalah cairan saliva buatan pH 6,8 dikombinasikan dengan 2% SLS. Baja silinder dengan berat 5 g diletakkan di atas DMN. Pengujian dilakukan dengan kecepatan 500 rpm menggunakan bantuan *magnetic stirrer* pada suhu 37±1°C. Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0,5,

ɪ 24 jam. Kemudian ditentukan nilai C_{maks}, t_{maks}, AUC, $t_{1/2}$, ınakan PkSolver edisi 2.0, yang dianalisis secara 1 ɜtiawati et al., 2022).

Optimized using
trial version
www.balesio.com

2.3.18 Analisis Statistik

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis dengan pendekatan statistik menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistic® 27 dan diolah ke dalam bentuk grafik menggunakan aplikasi GraphPad Prism®.

Optimized using
trial version
www.balesio.com