

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit sistem saraf telah menjadi masalah kesehatan yang umum di dunia, sebagian terjadi karena dipengaruhi oleh faktor genetik, nutrisi dan gaya hidup (Aderibigbe, 2018). Penyakit Alzheimer (ALZ) adalah salah satu penyakit kronis pada neuron otak dan sistem saraf yang menyebabkan demensia. Etiologi dari ALZ masih belum sepenuhnya diketahui, tetapi fungsi neuron secara bertahap menurun, menyebabkan gangguan dalam daya ingat, perubahan perilaku tiba-tiba, dan gangguan kognitif. Setiap harinya, jumlah kasus yang terkait dengan ALZ semakin bertambah di seluruh dunia (Agrawal et al., 2018). Penyakit ALZ biasa terjadi pada usia lebih dari 65 tahun dan lebih sering terjadi pada perempuan. Diperkirakan sebanyak 115,4 juta orang yang akan mengalami ALZ pada tahun 2050 dan menjadi penyebab utama kematian di seluruh dunia (Moreta et al., 2021). Di Indonesia sendiri terdapat 1,2 juta orang yang mengalami demensia pada tahun 2016 dan diperkirakan meningkat menjadi 2 juta di 2030 dan 4 juta orang pada tahun 2050 (Prince, 2015). Penurunan fungsi dari sel neuron kolinergik merupakan patologi utama dari ALZ. Oleh karena itu, hal ini menjadi isu kesehatan masyarakat yang memerlukan perhatian karena dampaknya yang signifikan pada masyarakat.

Sampai saat ini, belum ada pengobatan yang efektif untuk ALZ, saat ini hanya tersedia pengobatan simtomatik. Obat inhibitor asetilkolinesterase (AChEI) telah digunakan untuk meningkatkan fungsi kolinergik (Giacconi et al., 2019). Donepezil (DPZ) dianggap sebagai pengobatan lini pertama pada ALZ, dan bertindak sebagai agen terapi simtomatik yang efektif (Shehata et al., 2023). DPZ adalah AChEI yang kuat, selektif, nonkompetitif, dan reversibel. DPZ dapat meningkatkan kadar asetilkolin di sinapsis, dan oleh karena itu memberikan peningkatan fungsi kognitif, perbaikan perubahan perilaku lebih baik dibanding rivastigmin (D. D. Li et al., 2019; Sutthapitaksakul et al., 2021).

DPZ merupakan terapi terbaik untuk pasien dengan ALZ ringan hingga sedang dengan meningkatkan kondisi pasien dan memiliki efek samping yang lebih rendah dibandingkan dengan rivastigmin atau galantamin (Moreta et al., 2021). Hal ini dapat terjadi karena DPZ memiliki selektivitas yang tinggi baik pada target maupun jaringan (Q. Li et al., 2018). DPZ tersedia secara komersial dalam bentuk tablet atau kapsul yang ditujukan untuk pemberian oral (Shehata et al., 2023). Namun melalui rute oral, DPZ merupakan *non-targeted delivery*, sehingga menyebabkan efek samping pada



rti mual, anoreksia, diare, pendarahan lambung, kejang otot, serta mengalami *first pass effect* di hati dan sulit menembus atau *blood-brain barrier* (BBB) (D. D. Li et al., 2019; .., 2021).

dikembangkan penghantarannya dalam sediaan transdermal, mengatasi kekurangan rute oral. Walaupun terhindar dari *first pass*

effect di hati, rute ini masih memiliki kekurangan lainnya. Sediaan injeksi bersifat invasif, tidak nyaman, dan susah diaplikasikan sehingga menyebabkan ketidakpatuhan pada pasien. Selain itu sediaan transdermal juga memiliki keterbatasan pada laju penetrasi obat dan memungkinkan infeksi dan inflamasi pada kulit (Zhao et al., 2021). Beberapa penelitian lainnya juga telah dilakukan untuk memperbaiki masalah penghantaran DPZ yaitu dengan memformulasikannya dalam *transdermal patch* (Dinh et al., 2022), *long acting injectable microsphere* (Choi et al., 2021), *orally disintegrating film* (Han et al., 2019). Tetapi, penghantaran tersebut masih memiliki keterbatasan karena akan melalui sirkulasi sistemik yang tidak langsung melewati BBB di otak (Yasir et al., 2022).

Penghantaran melalui rute *nose to brain* merupakan penghantaran obat langsung ke otak yang dapat melewati BBB. Hal ini terjadi karena obat dapat mencapai Sistem Saraf Pusat (SSP) melalui jalur saraf *olfactory* dan trigeminal yang langsung berhubungan dengan lingkungan dan SSP dengan melewati BBB (Zhao et al., 2021). Pemberian melalui rute ini memiliki keuntungan antara lain penggunaannya bersifat non invasif, tanpa rasa sakit, dapat menghindari *first pass effect* di hati sehingga pemberian obat dapat mencapai ke target dengan efek samping yang minimal (Pires & Santos, 2018; Rohrer et al., 2018). Namun, teknik pemberian obat melalui *nose to brain* memiliki beberapa keterbatasan seperti degradasi enzimatis dan waktu tinggal obat yang rendah akibat pengaruh sistem pembersihan mukosiliar hidung (Espinoza et al., 2022).

Beberapa pendekatan telah dilakukan untuk mengatasi kekurangan rute *nose to brain*, seperti memformulasikannya dalam serbuk ataupun tetes hidung, Namun, formulasi serbuk dibatasi oleh ukuran partikel, kelarutan, dan sifat aerodinamis, sehingga membuatnya kurang digunakan (Agrawal et al., 2020). Selain itu, formulasi cair seperti tetes hidung memiliki keterbatasan karena pembersihan mukosiliar hidung yang cepat dapat mempersingkat waktu tinggalnya (Nagaraja et al., 2021). Kombinasi gel termosensitif-mukoadhesif adalah salah satu sistem yang dapat mengatasi kekurangan rute *nose to brain* dan meningkatkan penghantarannya.

Gel termosensitif sendiri merupakan sistem gel *in situ* yang sensitif terhadap perubahan suhu, dimana sediaan berbentuk cair pada suhu ruang dan akan mengalami proses gelasi *in situ* membentuk gel pada suhu fisiologis tubuh (32°C-37°C) tergantung pada lokasi penghantaran (Vigani et al., 2020). Adapun keuntungan dari gel *in situ* yaitu pelepasan tertunda, terkontrol, dapat meningkatkan waktu tinggal obat, dan penggunaan yang nyaman (Enggi et al., 2021; Verekar et al., 2020). Beberapa penelitian sebelumnya berhasil menunjukkan keuntungan dari sistem gel termosensitif secara *nose to brain* (Cunha et al., 2022; Verekar et al., 2020).



mukoadhesif juga dapat menghindari pembersihan mukosiliar waktu retensi di rongga hidung (Cunha et al., 2022). Polimer yang adalah kombinasi antara Pluronic® F127-F68 dengan natrium *ogelling* dari Pluronic® menjadikannya pilihan ideal, dan adhesif dari natrium alginat mampu memperpanjang durasi meningkatkan retensinya di rongga hidung (Jeong et al., 2023).

DPZ bersifat lipofilik dengan kelarutan dalam air $< 0,1$ mg/mL dan tergolong dalam *Biopharmaceutical Class System* (BCS) kelas II yang akan menyebabkan terbatasnya pengaplikasian DPZ (Dinh et al., 2022; Lee et al., 2022). Beberapa penelitian telah dilaporkan untuk memperbaiki kelarutan dari DPZ dan meningkatkan penghantarannya melalui intranasal seperti nanoemulsi, *solid lipid nanoparticle* (SLN), *nanostructured lipid carrier* (NLC), nanosuspensi, dll (Bhavna et al., 2014; Espinoza et al., 2022; Yasir et al., 2018, 2022). Adapun limitasi dari nanopartikel yaitu ukurannya yang terlalu kecil mengakibatkan masuknya partikel obat ke saluran pernapasan. Jika partikel berukuran lebih kecil daripada $5 \mu\text{m}$ kemungkinan akan keluar dari rongga hidung, mengikuti aliran udara dan mengendap di paru-paru (El-Sherbiny et al., 2015; Shi et al., 2007). Untuk mengatasi hal tersebut DPZ dienkapsulasi terlebih dahulu ke dalam *lipid microsphere* (LM) (Wolska & Sznitowska, 2013). LM menunjukkan karakteristik yang menguntungkan sebagai pembawa obat yaitu biokompatibilitas yang tinggi dan bersifat *biodegradable*, stabil secara fisikokimia dan dapat melindungi zat aktif dari degradasi. Studi sebelumnya berhasil menghantarkan obat secara signifikan dengan sistem LM melalui rute *nose to brain* sebesar $9,7 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$ yang mana mengindikasikan penghantaran tertarget oleh LM (Trotta et al., 2018). Proses penjerapan obat ke dalam polimer untuk membentuk sistem LM dapat memanfaatkan berbagai lipid padat sebagai pembawanya, yang salah satunya adalah Compritol® 888 ATO. Beberapa penelitian telah menggunakan lipid ini dan berhasil membentuk sistem dengan pelepasan terkontrol dan berkelanjutan (Kopparam et al., 2020; Yasir et al., 2018). Dengan itu sejalan dengan penelitian Nunes, yang menyatakan bahwa karena kombinasi akhir antara mikropartikel dan gel termosensitif-mukoadhesif memberikan pelepasan obat yang terkendali dan berkelanjutan, secara sinergis menggabungkan pola pelepasan obat, menghasilkan peningkatan efektivitas terapeutik (Nunes et al., 2022).

Dalam penelitian ini peneliti mengembangkan potensi dari sistem penghantaran LM dalam menghantarkan DPZ dalam menembus BBB dan kombinasinya dengan gel termosensitif-mukoadhesif akan meningkatkan waktu retensi di mukosa hidung sehingga meningkatkan efektifitas penghantaran DPZ melalui rute *nose to brain*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi Compritol 888® ATO terhadap karakteristik dari *lipid microsphere* donepezil yang terbentuk?
 2. Bagaimana karakteristik formula optimal dari *lipid microsphere* donepezil dan hasilnya terhadap studi pelepasan secara *in vitro*?
 3. Bagaimana pengaruh konsentrasi kombinasi Pluronic® F127, F68, dan *lipid microsphere* donepezil dalam formulasi sediaan gel termosensitif-mukoadhesif dari *lipid microsphere* donepezil?
4. Bagaimana pengaruh kombinasi *lipid microsphere* donepezil dari formula optimal sediaan gel termosensitif-mukoadhesif yang mengandung *lipid microsphere* ke jaringan *ex vivo*?



1.3 Tujuan Penulisan

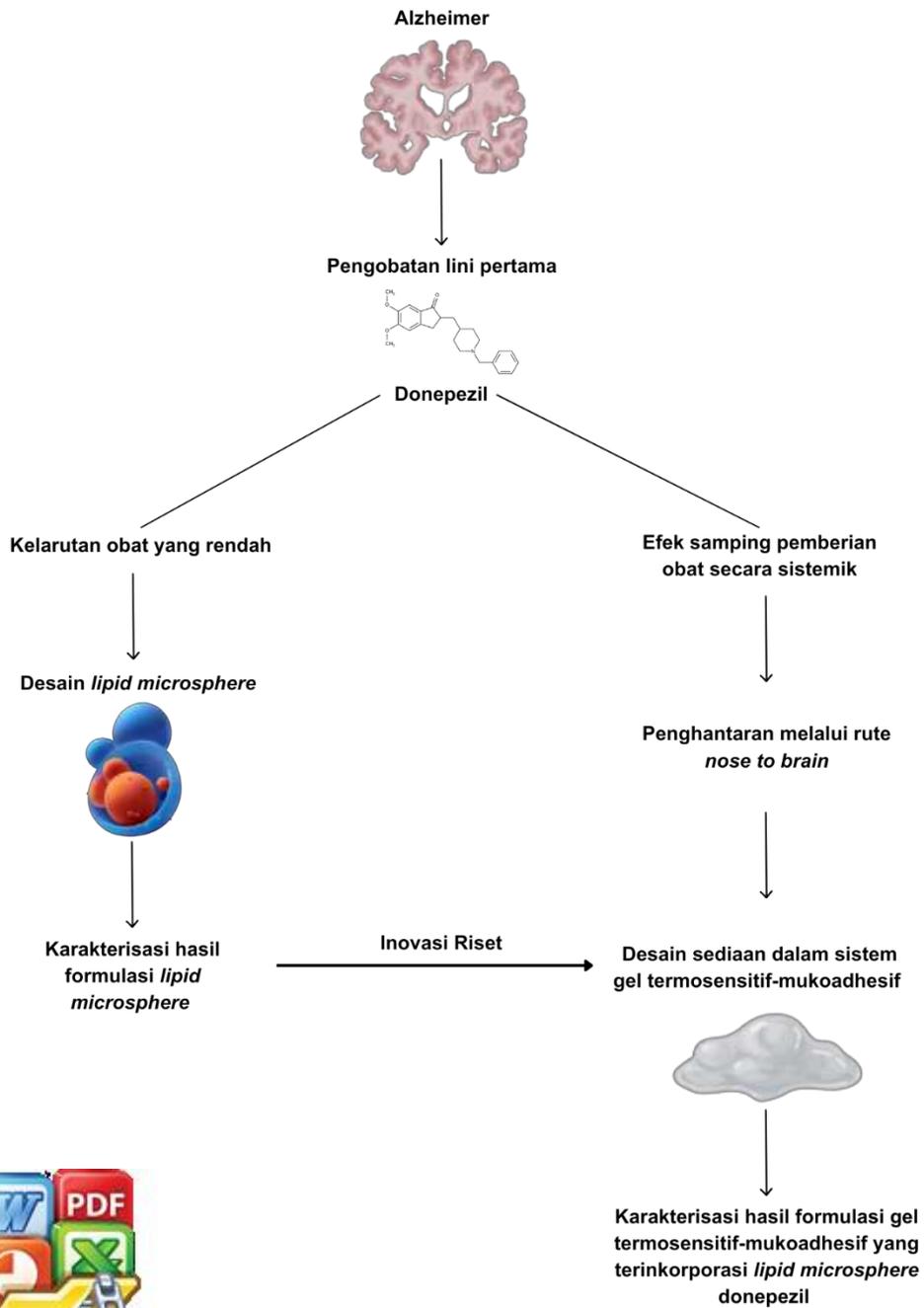
1. Menentukan pengaruh konsentrasi Compritol 888® ATO terhadap karakteristik dari *lipid microsphere* donepezil yang terbentuk.
2. Mengevaluasi formula optimal dari *lipid microsphere* donepezil terhadap studi pelepasan secara *in vitro*.
3. Menentukan pengaruh konsentrasi kombinasi Pluronic® F127, F68, dan natrium alginat dalam formulasi sediaan gel termosensitif-mukoadhesif dari *lipid microsphere* donepezil
4. Mengevaluasi penghantaran donepezil dari formula optimal sediaan gel termosensitif-mukoadhesif yang mengandung *lipid microsphere* ke jaringan nasal 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 alzheimer yang lebih efektif dan efisien.

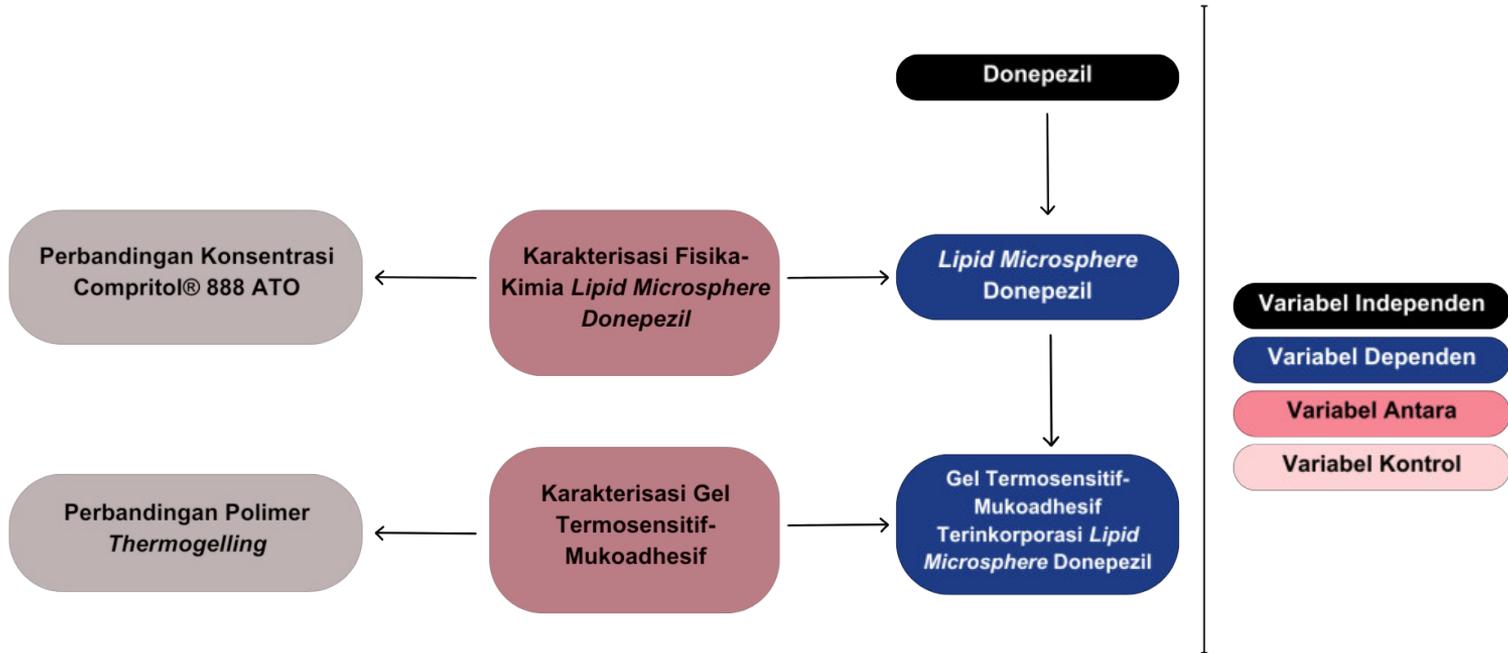


1.5 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka teori

1.6 Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka konsep



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengembangkan formula gel termosensitif-mukoadhesif yang terinkorporasi *lipid microsphere* (LM) donepezil dan menguji aktivitasnya terhadap permeasi secara *ex vivo*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasetika dan Laboratorium Biofarmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (Iwaki[®]), cawan porselen, *centrifuge* (Oregon[®] LC-04S), *fourier transform infrared* (FTIR) (Shimadzu[®] FTIR-8400), *homogenizer* (Ultra Turrax Tipe T50 Basic), *hot plate magnetic stirrer* (Joan Lab[®] SH-2), inkubator, *magnetic stirrer* (IKA[®] C-MAG MS 7), mikro pipet, neraca, oven Memmert[®], pH meter (PL-700[®] Tipe PC), sel difusi Franz (Diffusion Cell Apparatus[®] KI-2351-6C), *scanning electron microscopy* (SEM) (Hitachi, TM3030), spektrofotometer UV-Vis (Dynamica[®], HALO XB-10), timbangan analitik (Sartorius[®]), termometer, vortex (B-One[®]), viskometer *Brookfield* (NDJ-5S Viscometer), dan *X-ray Diffractometer* (XRD) (Rigaku).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *aquadest* (Waterone[®]), Compritol 888[®] ATO (Gattefosse[®]), donepezil (DPZ) (BOC Science), *corning tube*, eritrosit, kloroform, *microtube*, mukosa nasal babi, natrium alginat, natrium hidroksida (NaOH), natrium klorida (NaCl), PEG 400, *phosphate buffer saline* pH 7,4 (Sigma-Aldrich[®]), Pluronic[®] F127 (Sigma-Aldrich[®]), Pluronic[®] F68 (BASF[®]), polivinil alkohol (PVA), SLS, *syringe filter* 0,2 μm (Chromafil[®] Xtra), tris *buffer*, dan Tween 80.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Analisis Donepezil Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Pembuatan Larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4. Larutan PBS pH 7,4 dibuat dengan melarutkan 1,994 gram serbuk PBS ke dalam 1000 mL Waterone[®] lalu diaduk dengan kecepatan konstan dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*.

Larutan Stok. Larutan stok donepezil (DPZ) dibuat untuk penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan stok dibuat dalam dua pelarut berbeda yaitu, dalam metanol dan dalam media pelepasannya yaitu PBS + PEG 400 20%. Dibuat larutan stok DPZ 1000 bpj dengan menimbang 10 mg DPZ kemudian dimasukkan ke 10 mL dan dicukupkan menggunakan pelarut metanol hingga itu larutan stok dipipet sebanyak 0,5 mL dan dicukupkan dengan media hingga 10 mL (50 bpj).

Gelombang Maksimum dalam Metanol. Panjang gelombang serapan maksimum pada larutan stok DPZ dipipet dari larutan stok konsentrasi 1000



bpj sebanyak satu mL dimasukkan ke dalam vial dan dicukupkan volumenya dengan pelarut metanol 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 (Yasir et al., 2019). Panjang gelombang maksimum ditentukan dari serapan tertinggi pada sampel.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dalam PBS pH 7,4 + PEG 400 20%.

Panjang gelombang DPZ diukur dalam PBS pH 7,4 + PEG 400 20% sebagai media pelepasan. Panjang gelombang serapan maksimum dilakukan dengan cara larutan stok DPZ dipipet dari larutan stok konsentrasi 1000 bpj sebanyak satu mL dan dicukupkan volumenya dengan media dengan 10 mL ke dalam vial (100 bpj). Larutan hasil pengenceran dimasukkan ke dalam kuvet kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 200 – 400 nm (Yasir et al., 2019). Panjang gelombang maksimum ditentukan dari serapan tertinggi pada sampel.

Pembuatan Kurva Baku Donepezil dalam Metanol. Kurva baku diukur dengan mengambil larutan stok DPZ dari konsentrasi 50 bpj secara berturut-turut 125 μ L, 125 μ L, 125 μ L, 250 μ L, 500 μ L, dan 1000 μ L kemudian dicukupkan dengan 7875 μ L, 3875 μ L, 1875 μ L, 1750 μ L, 1500 μ L, dan 1000 μ L metanol sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,78125, 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5, dan 25 bpj.

Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan kemudian dimasukkan dalam *Microsoft exce^l*® hingga diperoleh persamaan garis linear serta R^2 .

Pembuatan Kurva Baku Donepezil dalam PBS pH 7,4 + PEG 400 20%. Kurva baku diukur dengan mengambil larutan stok DPZ dari konsentrasi 50 bpj secara berturut-turut 125 μ L, 125 μ L, 125 μ L, 250 μ L, 500 μ L, dan 1000 μ L kemudian dicukupkan dengan 7875 μ L, 3875 μ L, 1875 μ L, 1750 μ L, 1500 μ L, dan 1000 μ L PBS pH 7,4 + PEG 400 20% sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,78125, 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5, dan 25 bpj. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan kemudian dimasukkan dalam *Microsoft exce^l*® hingga diperoleh persamaan garis linear serta R^2 .

2.3.2 Molecular Docking

Analisis *molecular docking* dilakukan dengan menginteraksikan donepezil dengan ketiga matriks lipid yakni Compritol® 888 ATO/gliseryl dibehenat, Geleol®/gliserol monostearat, dan Precirol® ATO 5/gliseryl distearat. Analisis *molecular docking* dilakukan dengan menggunakan UCSF Chimera 1.16 (University of California, San Francisco) dan Autodock Vina (The Scripps Research Institute). Dalam analisis ini,



berfungsi sebagai reseptor dan donepezil berfungsi sebagai ligan sebelumnya dengan sedikit modifikasi (Enggi et al., 2024). Unduh melalui situs PubChem, dengan CID tiap senyawa yaitu; seril dibehenat (9831860); gliseril monostearat (24699); dan (2615). Struktur yang telah diunduh kemudian dipreparasi ke Chimera. UCSF Chimera digunakan untuk visualisasi dan

persiapan *docking* ligan dan reseptor, sesuai dengan perhitungan muatan Gasteiger. Simulasi penambatan ligan-reseptor dilakukan dengan *software* AutoDock Vina. Simulasi ini bertujuan untuk mengidentifikasi serta mengevaluasi afinitas dan interaksi molekular yang terbentuk antara ligan dan reseptor. Hasil dari penambatan molekular ligan-reseptor selanjutnya diidentifikasi serta dievaluasi afinitas pengikatnya berdasarkan nilai energi bebas ikatan. Konformasi energi terendah yang dihasilkan oleh AutoDock dianggap sebagai konformasi pengikatan terbaik antara donepezil dan matriks lipid.

2.3.3 Formulasi *Lipid Microsphere* Donepezil (LM-DPZ)

Formulasi *lipid microsphere* dibuat menggunakan metode emulsifikasi-penguapan pelarut M/A dengan sedikit modifikasi (Nurul Fitri Marzaman et al., 2022). Tabel komposisi formula dari *lipid microsphere* dapat dilihat pada Tabel 1.

Pertama-tama fase air yang mengandung PVA seberat 1 g sebagai penstabil dicukupkan dengan *aquadest* (Waterone®) hingga mencapai volume 50 mL, kemudian dipanaskan hingga PVA larut sepenuhnya dan membentuk larutan homogen. Selanjutnya, 50 mg DPZ dan Compritol® 888 ATO (100–350 mg) dilarutkan dalam 10 mL kloroform sebagai fase minyak. Fase minyak ini kemudian diteteskan secara perlahan ke dalam fase air sambil dihomogenisasi menggunakan *ultra turrax* pada kecepatan 4000 rpm.

Setelah itu, pelarut organik dalam emulsi diuapkan dengan cara mengaduk emulsi menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu ruang dengan kecepatan 1500 rpm hingga terbentuk LM. Sementara itu, larutan kitosan 1,75% disiapkan dengan melarutkan kitosan dalam 10 mL asam asetat 1%. Setelah pelarut organik sepenuhnya menguap, larutan kitosan 1,75% ditambahkan secara bertahap ke dalam emulsi untuk melapisi LM, kemudian dilakukan pengadukan selama dua jam. Terakhir, untuk memperoleh partikel serbuk kering, campuran tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C.



Tabel 1. Komposisi Formula *Lipid Microsphere Donepezil*

Kode Formula	Jumlah DPZ dalam Campuran (mg)	Compritol® 888 ATO dalam Kloroform (mg)	PVA dalam Air (%)	Kitosan dalam Asam Asetat (%)	Kecepatan pengadukan (rpm)	Waktu Pengadukan (menit)	<i>Aquadest</i> (%)
LM1	50	100	2	1,75	4000	5	<i>ad 100</i>
LM2	50	150	2	1,75	4000	5	
LM3	50	200	2	1,75	4000	5	
LM4	50	250	2	1,75	4000	5	
LM5	50	300	2	1,75	4000	5	
LM6	50	350	2	1,75	4000	5	



2.3.4 Karakterisasi *Lipid Microsphere Donepezil (LM-DPZ)*

Pengujian *saturation solubility*. Uji *saturation solubility* dilakukan untuk menilai kelarutan DPZ dalam media PBS pH 7.4, dikombinasikan dengan SLS 1%, SLS 2%, Tween 80 1%, Tween 80 2%, PEG 400 10%, dan PEG 400 20% dan dilakukan menggunakan metode *shake flask* (Mittapelly et al., 2017). Disiapkan 21 botol vial yang diisi dengan dua mL media, kemudian dimasukkan 10 mg donepezil. Semua botol vial dikocok menggunakan alat *orbital shaker* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Setelah kesetimbangan dicapai, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan endapan yang tersisa. Supernatan yang terbentuk disaring, kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 234 nm (Amareshwar, 2017).

Ukuran partikel dan polidispersitas indeks (PDI). Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel diukur menggunakan metode mikroskopik yang dilengkapi dengan kamera digital terhadap 300 partikel untuk melihat bentuk dan permukaan dari LM-DPZ. Analisis distribusi ukuran partikel dengan melihat nilai polidispersitas indeks (PDI) menggunakan persamaan 1.

$$\text{PDI} = \left(\frac{\text{standar deviasi pengukuran}}{\text{rata-rata ukuran partikel}} \right)^2 \quad (1)$$

Entrapment efficiency (EE) dan drug loading (DL). Penentuan *entrapment efficiency* dan *drug loading* dari *lipid microsphere donepezil* dilakukan dengan menggunakan kurva baku DPZ pada media metanol (Wolska & Brach, 2022). Untuk penentuan %EE, setiap formula diambil satu mL kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya untuk mengukur %DL, LM-DPZ yang sudah tersentrifugasi sebelumnya disimpan endapannya dan dikeringkan pada suhu 37°C . Endapan yang terbentuk kemudian ditimbang dan ditentukan bobot teoritisnya. Kemudian ditambahkan pelarut diklorometan dan disonikasi selama 30 menit untuk mengekstraksi lipidnya. Setelah larut, ditambahkan metanol dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Supernatan yang diperoleh dari keduanya dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 232 nm. Persentase dari *entrapment efficiency* dan *drug loading* dapat diukur menggunakan persamaan berikut.

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{obat total} - \text{obat bebas}}{\text{obat total}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{DL (\%)} = \frac{\text{obat yang terjerap}}{\text{bobot teoritis obat}} \times 100 \quad (3)$$

Analisis *Scanning Electron Microscopy (SEM)*. Formula optimal dari LM-DPZ divisualisasikan dengan menggunakan SEM kemudian dianalisis bentuk dan permukaannya (Dermana et al., 2020).



Transform *Infra Red Spectroscopic (FTIR)*. Analisis FTIR spektrofotometer FTIR untuk memeriksa kemungkinan interaksi DPZ dan senyawa yang digunakan dalam memformulasi LM-

Analisis X-Ray Diffraction (XRD). Analisis XRD dilakukan menggunakan *X-ray Diffractometer* untuk melihat kristalinitas dari LM-DPZ, DPZ murni dan campuran fisik dari formula LM.

2.3.5 Studi pelepasan Obat secara *In Vitro*

Studi pelepasan obat secara *in vitro* dilakukan menggunakan metode dialisis dengan sedikit modifikasi (Permana et al., 2019). LM5 sebagai formula optimal diuji pada tahap ini. Awalnya ditempatkan sampel DPZ murni sebanyak 10 mg dan LM-DPZ sebanyak 27 mg (ekuivalen dengan 10 mg DPZ murni) ke dalam tabung dialisis membran selofan yang berisi satu mL PBS 7.4 + PEG 400 20% sebagai media pelepasan. Selanjutnya dimasukkan atau disuspensikan ke dalam botol duran yang berisi media sebanyak 100 mL. Lalu, botol dikocok menggunakan alat *shaker* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Sebanyak satu mL sampel dicuplik pada interval waktu 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, dan 24 jam. Pada setiap pencuplikan sampel, segera diganti dengan media yang baru dengan dengan jumlah yang sama. Selanjutnya sampel dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Berbagai model matematika digunakan untuk menentukan laju pelepasan obat sebagai berikut (Permana et al., 2019)

$$\text{Kinetika Orde 0: } C_t = C_0 + k_0t \quad (4)$$

$$\text{Kinetika Orde 1: } \ln C_t = \ln C_0 + K_1t \quad (5)$$

$$\text{Higuchi: } C_t = k_H O t \quad (6)$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas: } C_t = k_{kp} t^n \quad (7)$$

$$\text{Hixson Crowell: } C_t^{1/3} - C_0^{1/3} = K_{HC}^t \quad (8)$$

2.3.6 Formulasi Gel Termosensitif-Mukoadhesif Terinkorporasi Lipid *Microsphere Donepezil (GTM-LM-DPZ)*

Gel termosensitif-mukoadhesif LM-DPZ (GTM-LM-DPZ) dibuat dalam lima formula awal yang mengandung kombinasi Pluronic® F127 dan Pluronic® F68, dan *aquadest*. Berikut tabel komposisi formula dari gel termosensitif-mukoadhesif.

Formulasi awal (G1-G5) dibuat menggunakan kombinasi Pluronic® F127 dan F68 sebagai polimer. Bahan-bahan ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik. Gel termosensitif-mukoadhesif disiapkan menggunakan *cold method*. Pluronic® F127 dan Pluronic® F68 dimasukkan ke dalam beaker berisi *aquadest* dan diaduk pada suhu 4°C , kemudian disimpan hingga diperoleh larutan jernih.

Selanjutnya, formula awal yang sesuai (G3) kemudian diformulasikan kembali dengan lima variasi konsentrasi natrium alginat untuk dilakukan evaluasi lebih lanjut dan mendapatkan formula optimal yang selanjutnya ditandai dengan G3a-G3e.

Formula awal yang sesuai dengan metode sebelumnya. Kemudian natrium alginat ditambahkan hingga larut kemudian disimpan di dalam kulkas pada suhu 4°C hingga mendapat campuran yang bening. Setelah itu, LM-DPZ dimasukkan ke dalam campuran gel dan diaduk hingga homogen (Permana, Utomo, 2019). Formula G3 merupakan formula optimal setelah melalui proses evaluasi masing-masing formula dibuat dalam 50 mL.



Tabel 2. Komposisi formula GTM-LM-DPZ

Formula	LM-DPZ (setara dengan DPZ murni (mg))	Pluronic® F127 (%b/b)	Pluronic® F68 (%b/b)	Natrium Alginat (%b/b)	Aquadest (%b/b)
G1	1	16	7	-	ad 100
G2	1	17	7,5	-	
G3	1	18	8	-	
G4	1	19	8,5	-	
G5	1	20	9	-	
G3a	1	18	8	0,25	
G3b	1	18	8	0,5	
G3c	1	18	8	0,75	
G3d	1	18	8	1	
G3e	1	18	8	1,25	

2.3.7 Karakterisasi Gel Termosensitif-Muko adhesif Terinkorporasi Lipid *Microsphere* Donepezil (GTM-LM-DPZ)

Pengamatan organoleptis. Formula dari GTM-LM-DPZ yang telah diformulasikan diamati secara visual bentuk fisiknya melalui tekstur, warna dan homogenitas.

Uji suhu gelasi. Penentuan suhu pembentukan gel dilakukan dengan menggunakan *tube inverting method*. Sebanyak dua mL formula dimasukkan ke dalam *test tube* dan disimpan pada suhu 4°C. Setelah itu, *test tube* direndam dalam air pada suhu 20°C dengan peningkatan suhu 1°C secara berkala hingga 65°C. Pembentukan gel diamati dengan cara membalik *test tube* 90° untuk setiap peningkatan suhu. Suhu gelasi ditentukan berdasarkan suhu terendah diperlukan oleh cairan formula menjadi sukar mengalir dan membentuk gel. Pengukuran ini dilakukan secara triplo (Permana, Utami, et al., 2021).

Uji kekuatan muko adhesif pada jaringan nasal. Mukosa nasal babi dilekatkan pada vial (atas dan bawah), kemudian satu gram gel dari tiap formula ditempatkan di antara mukosa nasal yang digantung di sisi kiri neraca. Di sisi kanan neraca, beban satu gram ditaruh setiap 30 detik di atas piring timbang hingga permukaan kedua vial terpisah. Tiap pengujian dilakukan triplo pada suhu 35°C (Enggi et al., 2021).

Uji pH. Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter dan dilakukan secara triplo.



Uji *in vitro* drug content. Pengujian *drug content* dilakukan dengan menimbang lima formula GTM-LM-DPZ dan dicukupkan metanol ke dalam muidian disonikasi selama 30 menit. Setelah itu disentrifugasi 300 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk diukur kali menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang Dynamica, HALO XB-10).

Uji viskositas. Uji viskositas pada gel dilakukan dengan menggunakan *viscometer Brookfield* yang sesuai. Pada studi ini, formula GTM-LM-DPZ dievaluasi pada suhu 4°C, 25°C, dan 35°C. Pengukuran dilakukan pada kecepatan 50 rpm dan tiap pengukuran dilakukan secara triplo (Aiyalu et al., 2016).

Uji reologi. Uji reologi pada gel dilakukan dengan menggunakan *viscometer Brookfield*. Pada studi ini, formula GTM-LM-DPZ dievaluasi pada suhu 35°C. Pengukuran dilakukan secara triplo pada kecepatan 5, 10, 20, 50 dan 100 rpm dengan menggunakan spindle no. 7. Hasil pengukuran yang diperoleh kemudian diolah menjadi bentuk grafik, sehingga dapat ditentukan sifat aliran dari sediaan GTM-LM-DPZ (Permana, Utomo, et al., 2021).

Uji erosi. Uji erosi dilakukan secara triplo. Tiap formula gel ditimbang sebanyak lima gram dan dimasukkan ke dalam botol vial dan dicatat sebagai bobot awal. Kemudian sebanyak dua mL larutan PBS bersuhu 37°C ditambahkan ke dalam vial. Vial kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 35°C. Setelah interval waktu yang ditentukan (0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 24 jam), larutan PBS diganti dengan larutan PBS baru. Gel yang tersisa dalam wadah vial kemudian ditimbang dan dimasukkan sebagai bobot akhir. Nilai uji erosi gel ditentukan melalui perhitungan weight loss (Enggi et al., 2021).

$$\text{Weight loss} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\% \quad (9)$$

2.3.8 Uji Permeasi dan Retensi secara *Ex Vivo*

Pembuatan Tetes Hidung DPZ (TH-DPZ). Formula TH-DPZ digunakan sebagai formula kontrol untuk pengujian permeasi secara *ex vivo* pada jaringan nasal. Formula optimal tetes hidung dari penelitian yang telah dikembangkan oleh Guo (2024), digunakan sebagai formula acuan tetes hidung dalam penelitian ini (H. Guo et al., 2024). Komposisi TH-DPZ dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi formula TH-DPZ

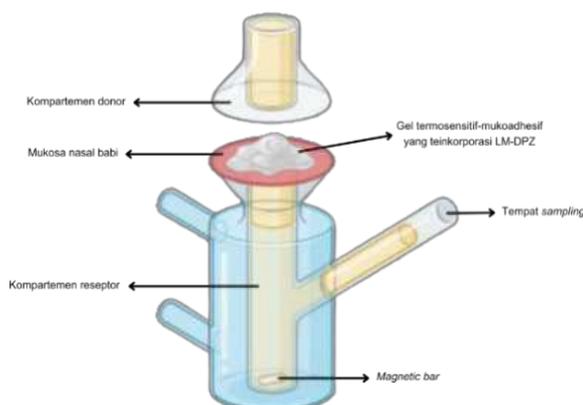
Komposisi	Konsentrasi (% b/v)
DPZ	1
Na ₂ EDTA	0,5
Na ₂ HPO ₄	0,10
NaCl	0,75
Avicel pH 101	0,10
<i>Aquadest</i>	<i>ad 100</i>

Larutan awal disiapkan dengan melarutkan 500 mg Na₂EDTA dan 100 mg Na₂HPO₄ dalam 100 mL *aquadest*. NaCl sebanyak 750 mg kemudian ditambahkan. sebanyak 1000 mg ditambahkan dalam larutan. Selanjutnya, icel pH 101 ditambahkan dan dihidrasi selama 2 jam. Larutan ian disaring menggunakan *syringe filter* 0,2 µm (H. Guo et al.,



permeasi dilakukan untuk mengetahui perbandingan profil M-DPZ yang diperoleh dari formula optimal setelah dievaluasi,

GTM-DPZ, TH-DPZ, dan dilakukan dengan membelah organ nasal babi menjadi dua rongga nasal kanan dan kiri. Mukosa nasal kemudian dipisahkan dari jaringan di bawahnya menggunakan pisau bedah dan pinset. Sebelum uji permeasi dilakukan, tiap membran mukosa dipreparasi menggunakan 1 mL kloroform : metanol (2:1 v/v) selama 60 menit untuk mengekstraksi lipid dari membran mukosa (Karasulu et al., 2008). Membran mukosa yang diperoleh kemudian dihidrasi menggunakan larutan PBS pH 7,4 + PEG 400 20% selama satu jam. Setelah dihidrasi, pada kompartemen reseptor diisi dengan larutan PBS pH 7,4 + PEG 400 20% dengan kapasitas 13 mL lalu dilakukan pengadukan dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam menggunakan *magnetic stirrer* dan dicuplik sebanyak satu mL pada interval waktu 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 24 jam. Pada setiap pencuplikan sampel, segera diganti dengan media yang baru dengan dengan jumlah yang sama. Kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 235 nm.



Gambar 3. Skema uji permeasi *ex vivo* menggunakan sel difusi franz (dibuat menggunakan [website Biorender.com](https://www.biorender.com))

Uji retensi. Uji retensi dilakukan pada 24 jam setelah uji permeasi *ex vivo*. Membran mukosa nasal yang telah digunakan pada uji permeasi *ex vivo* dicuci tiga kali dengan air suling untuk menyingkirkan formula yang tersisa. Kemudian membran mukosa nasal seberat 90 mg ditambahkan 840 μ L tris *buffer*, kemudian disonikasi selama 30 menit. Setelah itu, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian diukur absorbansinya secara triplo menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 235 nm (Stephanie et al., 2024).

2.3.9 Aktivitas Hemolitik secara *In Vitro*



dilakukan untuk mengetahui biokompatibilitas dan keamanan gunakan sel darah tikus. Darah disentrifugasi pada kecepatan menit untuk memisahkan plasma dari sel darah merah. Setelah dengan PBS. Konsentrasi 10% v/v PBS digunakan untuk ah merah. Pengujian dilakukan dengan menambahkan 100 μ L μ L sel darah merah dan campuran diinkubasi pada suhu 37°C h itu, sampel disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama

10 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Dynamica, HALO XB-10) (Mir et al., 2020). Prosedur tersebut direplikasi sebanyak tiga kali. Perhitungan persen (%) rasio hemolitik (HR) disajikan dalam persamaan berikut.

$$HR (\%) = \frac{OD_{uji} - OD_{neg}}{OD_{pos} - OD_{neg}} \times 100 \quad (10)$$

Keterangan:

OD_{uji} = Sampel uji

OD_{positif} = Larutan 100% lisis

OD_{negatif} = Larutan tanpa perlakuan

2.3.10 Uji *Hen's Egg Test-Chorioallantois Membrane (HET-CAM)*

Potensi Iritasi yang ditimbulkan oleh formulasi LM-DPZ, GTM-LM-DPZ diuji menggunakan metode HET-CAM. Telur ayam White Leghorn diinkubasi dalam inkubator otomatis yang berputar pada suhu $37 \pm 0,5$ °C dan kelembaban relatif $58 \pm 8\%$ selama tujuh hari sejak hari pertama (Ilyas et al., 2024). Pada hari kedelapan, hanya telur yang telah dibuahi yang dipilih dan dipersiapkan untuk uji HET-CAM setelah 24 jam. Bagian atas cangkang diangkat dengan hati-hati menggunakan alat kedokteran gigi untuk membuka membran dalam. Setelah membran dalam diangkat akan terlihat membran korioalantois. Kemudian, untuk mengevaluasi iritasi permukaan seperti lisis, perdarahan, dan koagulasi pada CAM, 0,3 mL DPZ murni, campuran fisik, LM blanko, LM-DPZ, GTM blanko, dan GTM-LM-DPZ diberikan dan diamati selama lima menit. Kontrol positif diberi 0,1 M NaOH, sementara kontrol negatif diberi NaCl 0,9% w/v.

2.3.11 Analisis Statistika

Data hasil penelitian yang diperoleh kemudian ditabulasi dan dianalisis menggunakan Microsoft Excel® dan diolah menjadi bentuk grafik menggunakan aplikasi GraphPad Prism® V5.0. Pendekatan secara analisis juga dilakukan dengan menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistic® 25 dengan metode *One Way ANOVA*. Pembahasan akan diolah dan disusun berdasarkan hasil analisis data serta kesimpulan diperoleh dari hasil pembahasan.

