

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Penyakit Alzheimer (ALZ) merupakan penyakit neurodegeneratif yang terkait dengan kerusakan sel neuron sehingga menyebabkan penurunan kemampuan kognitif dan daya ingat (Gauthier et al., 2022). Kasus ALZ di seluruh dunia meningkat secara drastis dan kemungkinan akan mencapai 74 juta pada tahun 2030. Prevalensi penyakit ini relatif tinggi di Asia dan Afrika (Beg et al., 2021). Saat ini, diperkirakan sekitar 46,8 atau 50 juta orang yang didiagnosis dengan ALZ, 20,9 juta di Asia Pasifik dan ada sekitar 10 juta kasus baru setiap tahun. Menurut *Alzheimer's Disease International*, di Indonesia sendiri diperkirakan ada sekitar 1,2 juta orang dengan kasus ALZ pada tahun 2016, yang akan meningkat menjadi 2 juta di 2030 dan 4 juta orang pada tahun 2050 (Association, 2024)

Pengobatan terapeutik untuk penyakit ALZ melibatkan penargetan sinapsis kolinergik dan peningkatan kadar asetilkolin di otak. Rivastigmine adalah obat yang banyak digunakan dalam terapi ALZ. Rivastigmine merupakan penghambat ganda asetil kolinesterase dan butiril kolinesterase. Saat ini, rute pemberian rivastigmine yang tersedia adalah rute oral dan transdermal. Namun, pada rute oral, menunjukkan bioavailabilitas yang rendah (36%) dan konsentrasi obat yang rendah di otak sedangkan rute transdermal bersifat non-selektif terhadap target utama di otak (Bhandari et al., 2021; P. Wavikar et al., 2017). Pemberian rute oral juga menyebabkan rivastigmine mengalami metabolisme lintas pertama sehingga menurunkan konsentrasi mencapai target, waktu paruh yang pendek (90 menit), pemberian dosis yang sering dan risiko efek samping kolinergik perifer (Feigin et al., 2019; P. R. Wavikar & Vavia, 2015)

*Blood Brain Barrier* (BBB) membatasi perjalanan inhibitor asetilkolinesterase ke sistem saraf pusat (SSP) (Sharma et al., 2020, Sweeney, 2019). Oleh karena itu, rute baru untuk mengirimkan inhibitor asetilkolinesterase dengan aman ke SSP telah diusulkan, termasuk rute *nose to brain*, yang memungkinkan pengiriman langsung obat dari rongga nasal ke otak (Jadhav et al., 2018; Moinuddin, 2019). Rute *nose to brain* bersifat non-invasif, menghindari paparan sistemik obat, dan mengurangi efek samping perifer, memungkinkan obat dengan penargetan langsung ke SSP (Giunchedi et al., 2020; Gupta & Kumar, 2019).

Gel termosensitif merupakan gel yang dapat merespon rangsangan suhu dengan mengubah bentuknya dari fase cair menjadi gel pada kisaran suhu tertentu



). Karena memiliki sifat yang unik yakni viskositasnya yang amar, formulasi ini dapat diaplikasikan atau disemprotkan dalam rongga hidung dan dapat menyebar luas pada mukosa an cair dan jika bersentuhan dengan mukosa hidung akan karena terjadi peningkatan suhu di rongga hidung. (Liu, L., et me pembersihan mukosiliar di hidung juga merupakan

hambatan signifikan dalam pengiriman dan penyerapan obat untuk mencapai target terapeutik (Giunchedi et al., 2020; Gupta, Kumar, 2019). Dengan demikian, untuk menghindari pembersihan mukosiliar, formulasi dengan sifat mukoadhesif dapat membantu meningkatkan waktu tinggal di rongga hidung. Formulasi agen mukoadhesif ini membentuk interaksi elektrostatis antara formulasi dan mucus yang ada di mukosa hidung, sehingga memaksimalkan penyerapan obat (Martins et al., 2019; Makhlouf et al., 2020). Gel termosensitif dapat diformulasikan dengan menggunakan polimer Pluronic® yang merupakan kopolimer non-ionik. Keuntungan penggunaan Pluronic® yaitu kepekaannya terhadap perubahan suhu serta dapat meningkatkan durasi tinggal obat (Mohanty et al., 2018). Selain itu, Pluronic® juga memiliki toksisitas yang rendah dan biokompatibel (Soliman et al., 2016). Penggunaan kombinasi Pluronic® F127 dengan Pluronic® F68 akan meningkatkan temperatur gelasi gel, sehingga menjadi optimal untuk sediaan gel (Al Khateb et al., 2016).

Pada riset ini, rivastigmine dikembangkan dalam *lipid microsphere*. Sistem ini berpengaruh pada pengendapan partikel dalam struktur rongga hidung manusia yang kompleks karena dipengaruhi oleh besar kecilnya ukuran partikel. Partikel yang lebih besar dari 20 µm menunjukkan pengendapan di bagian anterior rongga hidung karena inersia yang tinggi, sedangkan partikel yang berukuran kurang dari 5 µm dapat keluar dari rongga hidung, mengikuti garis aliran udara, serta mengendap di paru-paru (El-Sherbiny et al., 2015; Shi, Kleinstreuer, & Zhang, 2007). salah satu polimer lipid yang digunakan dalam *lipid microsphere* adalah Compritol® 888 ATO. Compritol® 888 ATO (gliseril behenat) adalah senyawa hidrofobik yang memiliki daya serap obat tinggi, juga menunjukkan potensinya dalam menghantarkan obat hidrofilik maupun lipofilik. Senyawa ini juga dipilih untuk formulasi karena karakteristiknya yang menguntungkan seperti sifat non-polar dan sitotoksitas yang rendah dibandingkan dengan lipid lainnya. Compritol® 888 ATO telah digunakan secara luas untuk mencapai pelepasan obat yang terkendali (khairnar et., 2022)

Pengembangan sistem ini diharapkan dapat meningkatkan penghantaran rivastigmine untuk meningkatkan efektivitas serta memberikan kontribusi dalam mengurangi risiko kematian akibat penyakit alzheimer.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi polimer Compritol® 888 ATO terhadap karakteristik *lipid microsphere* yang terbentuk?
2. Bagaimana hasil evaluasi formula *lipid microsphere* terhadap studi cara *in vitro*?
  - a. pengaruh konsentrasi *gelling system* Pluronic® F127 dan Pluronic® F68 dalam formulasi sediaan gel termosensitif mukoadhesif dari sediaan rivastigmine terhadap karakteristik gel yang terbentuk?
  - b. hasil evaluasi formula gel termosensitif *lipid microsphere* terhadap permeasi dan retensi secara *ex vivo*?



### 1.3 Tujuan Penulisan

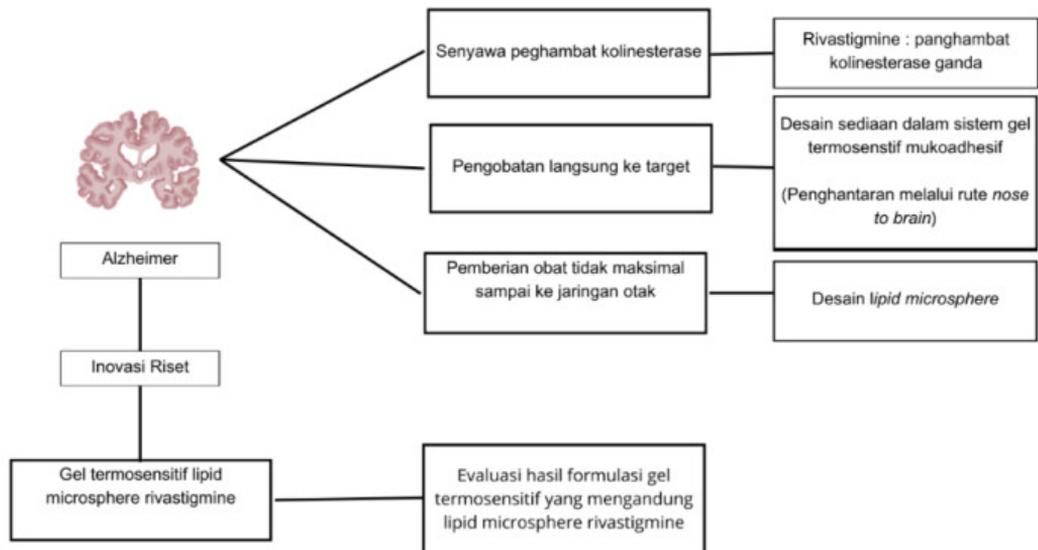
1. Menentukan formula terbaik dari *lipid microsphere* rivastigmine setelah memvariasikan konsentrasi polimer Compritol® 888 ATO sesuai dengan karakteristik yang baik.
2. Mengevaluasi formula optimal dari *lipid microsphere* terhadap studi pelepasan secara *in vitro*.
3. Menentukan formula terbaik dari gel termosensitif mukoadhesif *lipid microsphere* rivastigmine setelah memvariasikan konsentrasi *gelling system* Pluronic® F127 dan Pluronic® F68 sesuai dengan karakteristik yang baik.
4. Mengevaluasi formula optimal gel termosensitif mukoadhesif *lipid microsphere* terhadap studi permeasi dan retensi secara *ex vivo*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengembangan ilmu pengetahuan di bidang ilmu farmasi tentang sistem penghantaran obat khususnya dalam pengobatan alzheimer untuk penghantaran yang lebih efektif dan efisien.



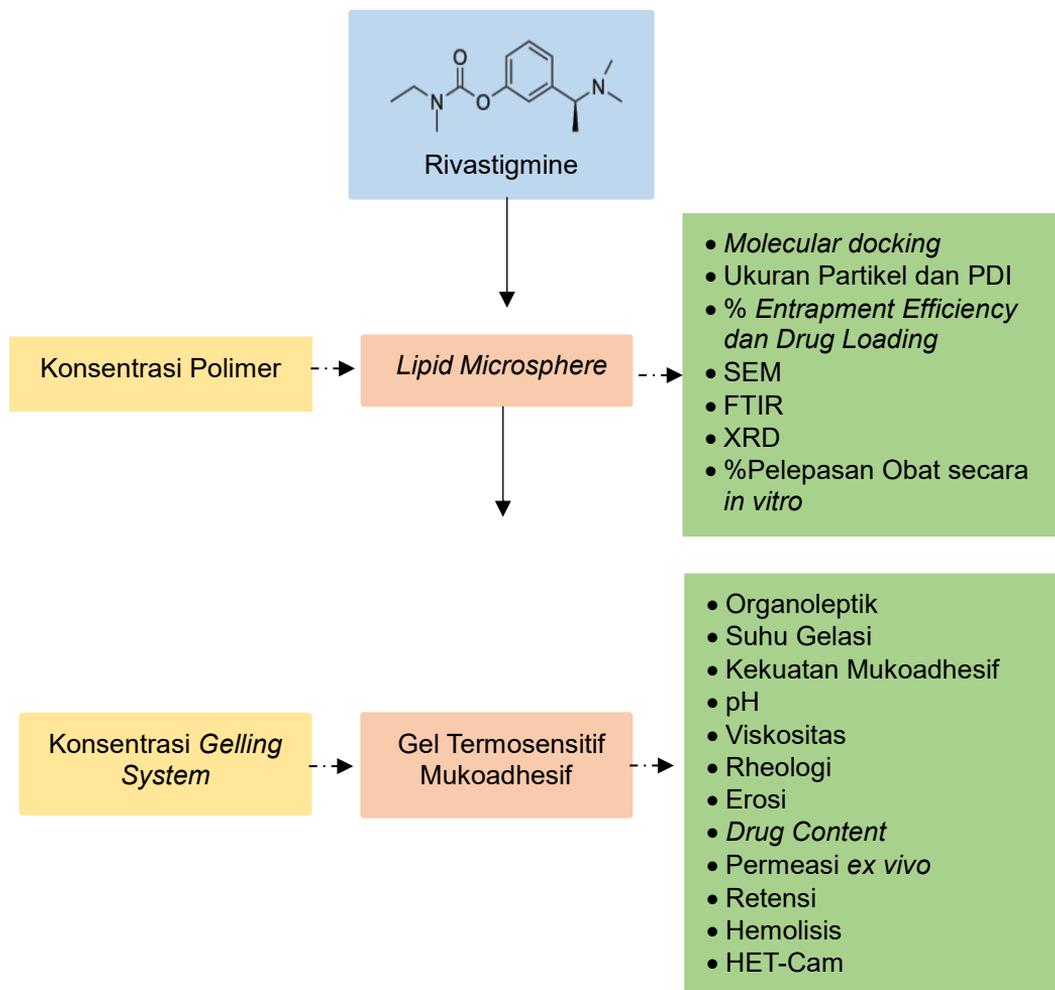
## 1.5 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka teori



## 1.6 Kerangka Konsep



### Keterangan:

Variabel Bebas

Variabel Tergantung



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

Gambar 2. Kerangka konsep

## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### 2.1 Rancangan dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mendesain formula gel termosensitif mukoadhesif berbasis *lipid microsphere* rivastigmine dan melihat aktivitasnya terhadap studi pelepasan secara *in vitro* dan studi 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 dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex®), 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), mikroskop cahaya (Olympus® CX23), oven (Memmert®), orbital shaker (Oregon®), pH meter (PL-700® Tipe PC), pipet mikro, *Scanning Electron Microscopy* (SEM) (Hitachi® TM3030), sel difusi Franz (Diffusion Cell Apparatus® KI-2351-6C), spektrofotometer UV-Vis (Dynamica® HALO XB-10), termometer, timbangan analitik (Sartorius® TE2101), timbangan gram kasar, dan viskometer *Brookfield* (NDJ-5S Viscometer), vortex (B-One®) dan *X-ray Diffractometer* (XRD) (Rigaku®).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu aquadest (Waterone®), Compritol® 888 ATO (Gattefosse®), *coming tube*, eritrosit, kitosan, kloroform, metanol, *microtube*, mukosa nasal babi, natrium alginat, natrium hidroksida (NaOH), natrium klorida (NaCl), *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,4 (Sigma-Aldrich®), Pluronic® F127 (Sigma-Aldrich®), Pluronic® F68 (BASF®), polivinil alkohol (PVA), rivastigmine tartrat (Anhui Biological Technology Co. Ltd. China), span 60, dan tris buffer HCl 1 M pH 7,4.

#### 2.3 Metode Kerja

##### 2.3.1 Metode Analisis Rivastigmine

Metode analisis terhadap RVT dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis, meliputi penentuan panjang gelombang maksimum dan pembuatan kurva baku RVT (Arora et al., 2021).

**Pembuatan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4.** Larutan PBS pH



larutkan 1,994 gram serbuk PBS ke dalam 1000 mL Waterone® dengan kecepatan konstan dan dihomogenkan menggunakan *magnetic*

**larutan stok rivastigmine.** Larutan stok dibuat 1000 bpj dengan volume sama 10 mg RVT, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, dengan PBS pH 7,4 dan dicukupkan hingga tanda batas, lalu

dihomogenkan. larutan dihasilkan dengan konsentrasi 1000 bpj (Hamdan et al., 2024).

**Penentuan panjang gelombang maksimum.** Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan menggunakan larutan stok RVT dengan konsentrasi 1000 bpj. Pengukuran serapan larutan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan berdasarkan nilai serapan tertinggi yang diperoleh dari sampel (Hamdan et al., 2024).

**Pembuatan kurva baku.** Pembuatan kurva baku RVT dilakukan dengan membuat 6 seri konsentrasi. Larutan stok RVT dicuplik masing-masing sebanyak 62,5, 125, 250, 500, 1000 dan 2000  $\mu\text{L}$ , kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* berukuran 2 mL dan dicukupkan menggunakan PBS pH 7,4 sehingga diperoleh konsentrasi 31,25, 62,5, 125, 250, 500 dan 1000 bpj. Masing-masing konsentrasi larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum yang telah diperoleh. Hasil yang diperoleh dimasukkan dalam *Microsoft excel*<sup>®</sup> hingga diperoleh persamaan garis linear serta  $R^2$ .

### 2.3.2 *Molecular Docking*

*Molecular docking* dilakukan dengan menginteraksikan RVT dengan ketiga matriks lipid yakni Geleol<sup>®</sup>/gliseril monostearat, Precirol<sup>®</sup> 5 ATO/gliseril distearat dan Compritol<sup>®</sup> 888 ATO/gliseril dibehenat. Dalam analisis ini, ketiga matriks lipid berfungsi sebagai reseptor dan RVT berfungsi sebagai ligan. Struktur senyawa dapat diunduh melalui situs *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan CID: Rivastigmine (77991), Geleol<sup>®</sup> (24699), Precirol<sup>®</sup> 5 ATO (102615), dan Compritol<sup>®</sup> 888 ATO (9831860). Struktur yang telah diunduh kemudian dipreparasi menggunakan *software* UCSF Chimera 1.16 (University of California, San Francisco). Chimera digunakan untuk visualisasi dan persiapan docking ligan dan reseptor, sesuai dengan perhitungan muatan Gasteiger. Simulasi penambatan ligan-reseptor dilakukan dengan *software* Autodock Vina (The Scripps Research Institute). Simulasi ini bertujuan untuk mengidentifikasi serta mengevaluasi afinitas dan interaksi molekular yang terbentuk antara ligan dan reseptor. Konformasi energi terendah yang dihasilkan oleh AutoDock dianggap sebagai konformasi pengikatan terbaik antara RVT dan matriks lipid (Butt et al., 2020).

### 2.3.3 *Formulasi Lipid Microsphere Rivastigmine*

Formulasi dilakukan dengan berbagai formula dengan variasi konsentrasi lipid. Lipid yang digunakan adalah Compritol<sup>®</sup> 888 ATO sebagai hasil terbaik dari *molecular docking*. Untuk pembuatan formulasi digunakan metode penguapan pelarut yang dimodifikasi. RVT dan Compritol<sup>®</sup> 888 ATO disiapkan dengan metode emulsi ganda (A/M/A) (Aziz, et al., 2023). Berikut tabel komposisi formula dari *lipid*



Tabel 1. Komposisi formula LM RVT

Kode Formula	A1		M	A2	Kitosan dalam Asam Asetat (%)	Kecepatan Pengadukan (rpm)	Lama Pengadukan (menit)
	RVT (mg)	Span (mg)	Compritol® 888 ATO (mg)	PVA (%)			
F1	100	200	50	2	1,75	2000	5
F2	100	200	100	2	1,75	2000	5
F3	100	200	150	2	1,75	2000	5
F4	100	200	200	2	1,75	2000	5
F5	100	200	250	2	1,75	2000	5
F6	100	200	300	2	1,75	2000	5

Bahan-bahan ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik. Emulsi ganda dibuat melalui dua tahapan yakni mengemulsikan fase air internal (A1) ke dalam fase minyak (M) dilanjutkan dengan mengemulsikan kembali A/M yang terbentuk ke dalam fase air eksternal (A2). Fase A1 diperoleh dengan melarutkan RVT dalam 1 mL aquadest, fase M diperoleh dengan melarutkan Compritol® 888 ATO dan span 60 dalam 10 mL kloroform dan fase A2 diperoleh dengan melarutkan PVA dalam 50 mL aquadest yang telah dipanaskan. Sehingga volume akhir masing – masing formula adalah 61 mL. Fase A1 diemulsikan ke dalam fase M dengan cara dituang tetes demi tetes kedalam fase minyak, dihomogenisasi menggunakan alat homogenizer (Ultra Turrax® Tipe T50 Basic) pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit sehingga diperoleh emulsi A/M. A/M yang terbentuk diemulsikan ke dalam fase A2 dengan kecepatan 2000 rpm dan waktu 5 menit hingga terbentuk emulsi tipe A/M/A.

Emulsi ganda kemudian diuapkan pelarut organiknya dengan diaduk secara magnetis menggunakan alat *magnetic stirrer* (C-MAG HS 10 digital) dengan kecepatan 1500 rpm selama 4 jam pada suhu kamar untuk membentuk LM. Setelah pelarut menguap, ditambahkan larutan kitosan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 2 jam pada kecepatan 1500 rpm. LM dikeringkan di oven pada suhu 40°C untuk mendapatkan padatan serbuk kering LM RVT (Permana, Ramadhan Aziz, et al., 2023).

### 2.3.4 Karakterisasi *Lipid Microsphere* Rivastigmine



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

an partikel dan polidispersitas indeks (PDI). Semua telah terbentuk, dilakukan karakterisasi ukuran partikel mikroskop. Kurang lebih 200 mg *microsphere* diletakkan diatas nampan menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan kamera partikel diperoleh terhadap rata-rata 300 partikel LM yang digunakan untuk melihat distribusi ukuran partikel dengan namaan seperti berikut: (Wang et al., 2020)

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

**Penentuan % Entrapment Efficiency (EE) dan Drug Loading (DL).** Penentuan % *Entrapment Efficiency* (EE) atau efisiensi penjerapan dilakukan untuk mengetahui gambaran tentang jumlah obat yang berhasil terperangkap di dalam partikel *microsphere*. Untuk penentuan %EE, setiap formula LM yang memuat RVT diambil 1,5 mL dan dimasukkan ke dalam *microtube*. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan tinggi 7000 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian dicuplik untuk mengetahui konsentrasi obat yang tidak terikat dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 262,8 nm (Luo et al., 2024). Sedangkan untuk pengujian %DL, endapan hasil sentrifugasi kemudian dikeringkan pada suhu 37°C. Endapan yang telah kering kemudian ditambahkan pelarut NaOH 1 N dan disonikasi selama 30 menit untuk mengekstraksi lipidnya. Setelah larut, ditambahkan PBS pH 7,4 dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Supernatan yang diperoleh kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 262,8 nm. Penentuan %DL ini dilakukan untuk mengetahui efisiensi penjerapan suatu formula. Efisiensi penjerapan dan *drug loading* dihitung dengan persamaan berikut:

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

$$\% DL = \frac{\text{Obat yang terjerap}}{\text{Bobot total obat}} \times 100 \quad (3)$$

**Analisis Scanning Electron Microscopy (SEM).** Analisis SEM digunakan untuk mengetahui bentuk partikel dari sampel yang dianalisis. Formula optimal dari LM RVT dianalisis menggunakan instrumen SEM (Hitachi® TM3030) (Sulistiawati, Saka Dwipayanti, et al., 2022).

**Analisis Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).** Analisis FTIR dilakukan menggunakan instrumen FTIR (Shimadzu® FTIR8400) untuk melihat kemungkinan interaksi kimia antara obat dan senyawa yang digunakan dalam formulasi. Sampel yang dianalisis berbentuk padatan serbuk yakni RVT murni, formula optimal serbuk LM RVT, Compritol® 888 ATO, PVA dan campuran fisik (RVT, Compritol® 888 ATO dan PVA) (Permana et al., 2021).

**Analisis X-ray diffraction (XRD).** Analisis XRD dilakukan menggunakan instrumen XRD (Rigaku®) untuk menganalisis karakteristik kristalinitas suatu formula. Sampel yang dianalisis adalah yang berbentuk padatan serbuk yakni RVT murni, formula optimal serbuk LM RVT dan campuran fisik (RVT, Compritol® 888 ATO dan PVA) (Permana et al., 2021).



#### Uji Penyerapan Obat secara *In Vitro*

Uji penyerapan obat secara *in vitro* dilakukan dengan metode dialisis yang dilakukan dengan menggunakan membran dialisis. Formula optimal yang digunakan pada pengujian ini adalah formula optimal yang telah ditentukan sebelumnya yang menjadi formula terbaik dari hasil karakterisasi sebelumnya yang menunjukkan bahwa formula optimal adalah formula optimal serbuk LM RVT. Ditimbang RVT murni sebanyak 10 mg dan LM RVT yang

setara dengan RVT 10 mg. Masing-masing dimasukkan ke dalam tabung dialisis membran selofan dan ditambahkan 1 mL cairan PBS pH 7,4. Kemudian tabung dialisis dimasukkan ke dalam botol duran yang telah berisi 100 mL cairan PBS pH 7,4. Botol dikocok menggunakan alat shaker dengan kecepatan 100 rpm pada suhu  $\pm 37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Sebanyak 1 mL sampel dicuplik pada interval waktu (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 24 jam) dan segera diganti dengan cairan PBS pH 7,4 yang baru sesuai jumlah cairan yang dicuplik. Setelah itu, sampel hasil cuplik dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Permana et al., 2019).

Persamaan model matematika yang dapat digunakan untuk menentukan laju pelepasan obat adalah sebagai berikut:

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

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

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

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

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

Perangkat lunak DD-Solver digunakan untuk menghitung parameter model.

### 2.3.6 Formulasi Gel Termosensitif Mukoadhesif Berbasis *Lipid Microsphere* Rivastigmine

Gel termosensitif disiapkan menggunakan *cold method*. Bahan-bahan ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik. Gel termosensitif dibuat dalam lima formula awal (*preliminary*) pada Tabel 2 dengan memvariasikan konsentrasi *gelling system* yakni Pluronic® F127 dan Pluronic® F68. Berikut tabel komposisi formula awal gel termosensitif.

**Tabel 2. Komposisi formula awal (*preliminary*) GT LM RVT**

Bahan	Konsentrasi (%b/b)				
	G1	G2	G3	G4	G5
LM RVT	1	1	1	1	1
Pluronic® F127	12	14	16	18	20
Pluronic® F68	3	5	7	9	11
Aquadest	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>

Pluronic® F127 dan F68 dimasukkan ke dalam beaker yang berisi aquadest dengan suhu  $4^\circ\text{C}$ , kemudian diaduk dan disimpan hingga diperoleh larutan jernih. Setelah itu, LM RVT ditambahkan ke campuran gel dan diaduk hingga homogen (Permana, et al., 2021). Formula awal kemudian diuji suhu gelasi dan kekuatan mukoadhesifnya, untuk memperoleh formula yang suhu gelasinya sesuai dengan yakni sekitar  $35^\circ\text{C}$ .



akukan pengujian lebih lanjut dengan penambahan 0,6% (b/b) Tabel 3) untuk melihat pengaruh suhu gelasi dari formula awal. gan melarutkan campuran bahan sesuai dengan metode sebelum penambahan LM RVT, ditambahkan terlebih dahulu Pluronic® yang telah jernih dan diaduk hingga larut kemudian

disimpan di dalam kulkas pada suhu 4°C selama 24 jam. Setelah itu, ditambahkan LM RVT.

**Tabel 3. Komposisi formula GT LM RVT dengan penambahan 0,6 (%b/b) NA**

Bahan	Konsentrasi (%b/b)				
	G1	G2	G3	G4	G5
LM RVT	1	1	1	1	1
Pluronic® F127	12	14	16	18	20
Pluronic® F68	3	5	7	9	11
NA	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Aquadest	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>

Setelah melihat pengaruh penambahan NA terhadap suhu gelasi, formula yang sesuai dengan suhu gelasi fisiologis kemudian diformulasikan dengan penambahan NA dengan beberapa variasi konsentrasi seperti pada Tabel 4. Formula ini disebut dengan formula optimum dan akan digunakan untuk karakterisasi dan pengujian lebih lanjut. Masing – masing formula dibuat dalam 50 mL.

**Tabel 4. Komposisi formula optimum GT LM RVT**

Bahan	Komposisi (%b/b)				
	G4a	G4b	G4c	G4d	G4e
LM RVT	1	1	1	1	1
Pluronic® F127	18	18	18	18	18
Pluronic® F68	9	9	9	9	9
NA	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5
Aquadest <i>ad</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>	<i>ad 100</i>

### 2.3.7 Karakterisasi Gel Termosensitif Mukoadhesif dari *Lipid Microsphere Rivastigmine*

**Pengamatan organoleptis.** Formula optimum yang telah diformulasikan diamati bentuk fisiknya melalui tekstur, warna, homogenitas secara langsung (Shaghlil et al., 2022).

**Pengukuran suhu gelasi.** Pengujian ini dilakukan dengan memasukkan sebanyak 2,5 mL formula gel kedalam vial yang tertutup dan dipanaskan di dalam penangas air yang diatur pada suhu awal 20°C hingga mencapai 80°C Setiap adanya kenaikan suhu sebesar 1°C, vial diputar pada posisi 90° dan diamati aliran dari gel yang terdapat dalam vial. Suhu dimana gel berhenti mengalir ketika vial diputar, ditetapkan sebagai suhu gelasi. Tiap pengujian dilakukan triplo (Marzaman et al.,

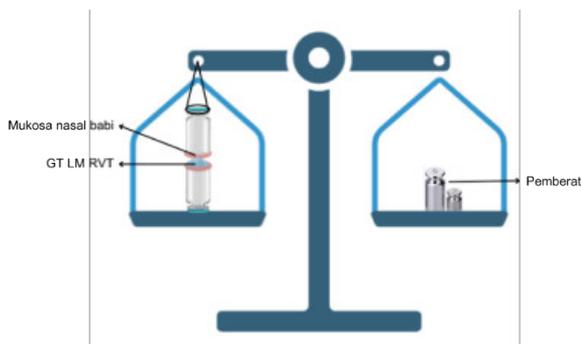


**Mukoadhesif.** Uji kekuatan mukoadhesif dilakukan menggunakan salib babi. Jaringan mukosa dilekatkan pada vial (atas dan bawah) dengan gel dari tiap formula ditempatkan di antara mukosa nasal sisi kiri neraca (Gambar 3). Di sisi kanan neraca, beban 1 g ditambahkan di atas piring timbang hingga permukaan kedua vial terpisah,

pengujian dilakukan pada suhu 35°C. Tiap pengujian dilakukan triplo (Enggi et al., 2021). Bobot minimum untuk memisahkan vial kemudian dihitung untuk memperoleh kekuatan mukoadhesif menggunakan persamaan:

$$\text{Muchoadhesion strength (dyne}\times\text{cm}^2) = \frac{m \times g}{A} \quad (9)$$

di mana m adalah bobot yang dibutuhkan untuk kedua vial terpisah (g), g adalah gravitasi (980 cm/s<sup>2</sup>), dan A adalah luas membran yang terpapar (cm<sup>2</sup>).



**Gambar 3. Ilustrasi pengujian kekuatan mukoadhesif**

**Pengukuran pH.** Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter dengan cara merendam elektroda ke dalam formulasi pada suhu ruang. Pengukuran dilakukan secara triplo (Cunha et al., 2021).

**Uji viskositas.** Uji viskositas pada gel dilakukan dengan menggunakan *viscometer Brookfield* yang sesuai. Pada penelitian ini, formula gel dievaluasi pada suhu 4°C (suhu penyimpanan), 25°C (suhu ruang), dan 35°C (suhu fisiologis nasal). Pengukuran dilakukan pada kecepatan 50 rpm dan tiap pengukuran dilakukan secara triplo (Sulistiawati, Enggi, et al., 2022)

**Uji rheologi.** Uji rheologi pada gel dilakukan dengan menggunakan *viscometer Brookfield*. Pada penelitian ini, formula gel 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 gel termosensitif mukoadhesif (Marzaman et al., 2022).

**Uji erosi.** Uji erosi dilakukan secara triplo. Tiap formula gel ditimbang sebanyak 5 g dan dimasukkan ke dalam vial yang beratnya telah ditimbang dan dicatat wal. Kemudian sebanyak 2 mL larutan PBS bersuhu 35°C m vial. Vial kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu l waktu yang ditentukan (0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 24 anti dengan larutan PBS baru. Gel yang tersisa dalam wadah ang. Nilai uji erosi gel ditentukan melalui perhitungan *weight* (1).



$$\text{Weight loss} = \frac{\text{Bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100 \quad (10)$$

**Uji drug content recovery.** *Drug content recovery* dilakukan dengan menimbang 1 mg masing-masing formula gel optimum dan dicukupkan dengan metanol ke dalam labu tentukur 10 mL. Campuran kemudian disonikasi selama 30 menit hingga larut sepenuhnya. Setelah itu, disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Untuk menentukan jumlah obat, supernatan dianalisis dengan mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Dynamica, HALO XB-10, Dynamica Scientific Ltd., Hong Kong) pada 263 nm.

### 2.3.8 Uji Permeasi dan Retensi secara *Ex Vivo*

**Pembuatan tetes hidung RVT.** Formula tetes hidung digunakan sebagai formula kontrol pada pengujian permeasi. Formula pada penelitian ini dibuat berdasarkan formula optimal dari penelitian yang telah dikembangkan oleh Guo (2024). Berikut tabel komposisi formula tetes hidung RVT.

**Tabel 5. Komposisi formula tetes hidung RVT**

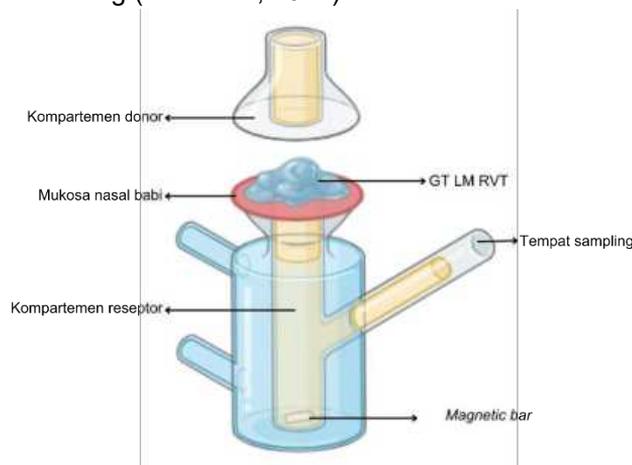
Bahan	Komposisi (%b/v)
RVT	1
Na <sub>2</sub> EDTA	0,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,10
NaCl	0,75
Avicel pH 101	0,10
Aquadest <i>ad</i>	<i>ad</i> 100

Larutan awal disiapkan dengan melarutkan 500 mg Na<sub>2</sub>EDTA dan 100 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dalam 100 mL aquadest. Kemudian ditambahkan NaCl sebanyak 750 mg sebagai pengisotonis dan RVT sebanyak 1 g. Setelah itu, ditambahkan 100 mg Avicel pH 101 dan dihidrasi selama 2 jam. Larutan tetes hidung kemudian disaring menggunakan syringe filter 0,2 µm (H. Guo et al., 2024).

**Uji permeasi pada jaringan nasal.** Uji permeasi 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. Uji permeasi dilakukan menggunakan set *diffusion cell apparatus* (Gambar 4). 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. Membran mukosa yang diperoleh kemudian dihidrasi menggunakan larutan PBS pH 7,4 selama 1 jam. Setelah dihidrasi, membran diletakkan pada kompartemen reseptor diisi dengan larutan PBS pH 7,4 dengan lalu dilakukan pengadukan dengan kecepatan 100 rpm menggunakan *static stirrer*. Suhu pengujian diatur pada 37±1°C. Sebanyak 1 g sampel ke dalam kompartemen donor. Sampel kemudian dicuplik pada 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 24 jam lalu diganti dengan 1



mL PBS pH 7,4 yang baru. Hasil cuplikan sampel kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh. Konsentrasi obat dalam cuplikan kemudian dihitung (Koo et al., 2024).



**Gambar 4. Ilustrasi pengujian permeasi secara ex vivo**

**Uji Retensi.** Uji retensi dilakukan 24 jam setelah uji permeasi *ex vivo*. Jaringan mukosa nasal yang digunakan pada uji permeasi *ex vivo* dicuci sebanyak tiga kali dengan PBS pH 7,4 untuk menghilangkan sisa formula. Jaringan mukosa nasal ditambahkan buffer tris-HCl 1 M pH 7,4 dan homogenizer pada kecepatan 100 rpm selama 15 menit. Campuran tersebut kemudian disonikasi selama 1 jam dan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 262,8 nm. Hasil pengukuran kemudian diolah untuk mengetahui jumlah RVT yang terlokalisasi setelah pemberian formula.

### 2.3.9 Uji Hemolisis

Uji hemolisis dilakukan untuk menentukan potensi toksisitas dari formulasi yang telah dikembangkan. Sampel darah tikus segar digunakan dalam pengujian ini. Sampel darah yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 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 dalam PBS pH 7,4 hingga mencapai konsentrasi akhir 10% (v/v). Sampel uji seperti RVT murni, LM RVT, GT LM RVT dan formula tanpa zat aktif (Blanko) disiapkan pada konsentrasi 500, 50, dan 5 bpj menggunakan PBS pH 7,4. Setiap konsentrasi pengenceran diambil sebanyak 900



dan 100  $\mu$ L suspensi eritrosit. Campuran tersebut kemudian disimpan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Dynamica, HALO XB-10, Dynamica Scientific Ltd., pada panjang gelombang 540 nm untuk mengestimasi kadar hemoglobin (Koo et al., 2022). Penelitian ini menggunakan aquadest sebagai kontrol

positif dan PBS pH 7,4 sebagai kontrol negatif. Persen (%) rasio hemolitik (HR) dapat dihitung dengan persamaan berikut:

$$\% \text{ Hemolisis} = \frac{\text{Formula uji} - \text{Kontrol Negatif}}{\text{Kontrol Positif} - \text{Kontrol Negatif}} \times 100\% \quad (11)$$

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

Uji HETCAM merupakan metode yang dilakukan untuk mengetahui potensi iritasi suatu formula. Uji ini mengevaluasi iritasi permukaan seperti lisis, perdarahan, dan koagulasi pada permukaan membran telur. Pada uji ini digunakan telur ayam jenis *White Leghorn*. Telur diinkubasi dalam inkubator rotasi otomatis pada suhu  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  dan kelembapan relatif  $58 \pm 8\%$  terlebih dahulu selama tujuh hari. Sebanyak 0,3 mL sampel uji yang mengandung RVT murni, LM RVT, GT LM RVT dan sampel blanko dioleskan pada permukaan membran telur dan diamati perubahannya selama lima menit. Pada uji ini NaOH 0,1 N bertindak sebagai kontrol positif, sedangkan NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif.

### 2.3.11 Analisis Statistika

Data hasil penelitian yang diperoleh kemudian ditabulasi dan dianalisis menggunakan beberapa aplikasi dan *software*. Microsoft Excel® 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) digunakan untuk menghitung rata-rata dan standar deviasi (SD). Data dianalisis secara statistika menggunakan *IBBM SPSS Statistic*® 27 dan histogram dibuat menggunakan GraphPad Prism® versi 6 (GraphPad Software; San Diego, California, USA). Perbedaan yang signifikan secara statistika ditunjukkan ketika nilai p kurang dari 0,05 ( $p < 0,05$ ) (Permana et al., 2022).

