

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Vulvovaginal Candidiasis (VVC) merupakan infeksi jamur yang sering dialami oleh wanita, dengan *Candida albicans* sebagai penyebab utama. Sekitar 70-75% wanita mengalami VVC setidaknya sekali seumur hidup, dan 50% di antaranya mengalami infeksi berulang atau *Recurrent Vulvovaginal Candidiasis* (RVVC), terutama pada usia reproduksi (Nyirjesy *et al.*, 2022; Qin *et al.*, 2018). Infeksi ini menyebabkan gejala seperti nyeri, gatal, keputihan abnormal, dispareunia, dan disuria, yang dapat berdampak pada kualitas hidup pasien (Yano *et al.*, 2019). Faktor risiko yang berkontribusi terhadap VVC meliputi penggunaan antibiotik, diabetes yang tidak terkontrol, stres, kadar estrogen tinggi, dan gangguan sistem imun (Farr *et al.*, 2021). Pada beberapa kasus, VVC memerlukan terapi pengobatan jangka panjang dengan obat antijamur untuk mencegah kekambuhan (Yano *et al.*, 2019). Pengobatan VVC umumnya menggunakan krim imidazole intravaginal selama tiga hingga tujuh hari atau dengan antijamur oral untuk kasus berulang hingga enam bulan. Meskipun dinilai cukup efektif, kepatuhan pasien sering menjadi kendala utama karena kebutuhan aplikasi berulang, efek samping sistemik, serta durasi kontak obat yang singkat pada mukosa vagina. Hal ini dapat menyebabkan kegagalan terapi dan kekambuhan infeksi (Workowski & Bolan, 2015). Oleh karena itu, diperlukan inovasi sistem penghantaran obat yang mampu meningkatkan efektivitas terapi.

Ketoconazole (KTZ) adalah antijamur spektrum luas dari golongan imidazole yang efektif terhadap infeksi superfisial dan sistemik. KTZ dipilih dalam penelitian ini karena efektivitasnya yang tinggi terhadap *Candida albicans*, serta telah banyak digunakan dalam pengobatan infeksi jamur. Studi menunjukkan bahwa KTZ memiliki aktivitas antijamur yang lebih kuat dibandingkan miconazole dan sebanding dengan amphotericin B dalam model infeksi *Candida albicans* pada tikus (Heel *et al.*, 1982). Namun, karakteristik farmasetik KTZ sebagai obat dengan kelarutan rendah (*BCS Class II*) membatasi bioavailabilitasnya pada pemberian oral. Dosis tinggi yang diperlukan untuk mencapai konsentrasi terapeutik sering dikaitkan dengan efek samping serius, seperti hepatotoksitas. Selain itu, pengobatan secara topikal seperti krim cenderung memiliki durasi kontak yang singkat dengan mukosa, sehingga menghasilkan penghantaran obat yang tidak konsisten dan tidak berkesinambungan (Conte *et al.*, 2023). Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk meningkatkan kelarutan KTZ dalam air serta merancang sistem penghantaran obat yang lebih aman dengan profil pelepasan terkontrol (Reynaldo *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2023).

Kompleksasi dengan cyclodextrin (CD) telah banyak digunakan dalam beberapa tahun terakhir sebagai pembawa obat untuk meningkatkan bioavailabilitas dan efikasi terapi dari obat-obat dengan kelarutan dalam air yang rendah. CD adalah molekul gula siklik yang memiliki struktur tiga dimensi seperti kerucut terbuka. Struktur uniknya membuat CD memiliki kemampuan

untuk membentuk kompleks inklusi dengan molekul obat (Roy *et al.*, 2023). Pembentukan kompleks inklusi dengan CD terbukti efektif dalam meningkatkan kelarutan, sehingga meningkatkan bioavailabilitas dan membuatnya lebih efektif untuk digunakan dalam terapi (Chaudhary & Patel, 2013). Terdapat beberapa bentuk CD yaitu bentuk alfa, beta dan gamma. Bentuk gamma dari cyclodextrin (γ -CD) memiliki rongga hidrofobik terbesar jika dibandingkan dengan bentuk alfa dan beta-nya (Saokham *et al.*, 2017). Saat ini, turunan γ -CD yang lebih mudah larut dalam air, yaitu hydroxypropyl- γ -CD (HP γ CD), sudah tersedia. Penggunaan turunan hydroxypropyl dari CD umumnya menghasilkan kompleks inklusi dengan kelarutan dan stabilitas yang lebih baik, seperti yang ditunjukkan dalam penelitian oleh Shityakov *et al.*, (2017) yang bertujuan meningkatkan kelarutan Curcumin dalam air. Penelitian mereka memperlihatkan bahwa penggunaan HP γ CD menghasilkan kompleks dengan kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan γ -CD (Shityakov *et al.*, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Ding *et al.*, (2023) menunjukkan bahwa kompleks inklusi griseofulvin dengan HP γ CD, mampu meningkatkan kelarutan griseofulvin dalam air 343 kali lipat dibandingkan dengan griseofulvin murni (Ding *et al.*, 2023).

Selain peningkatan kelarutan, sistem penghantaran obat yang dapat memberikan pelepasan jangka panjang juga menjadi solusi penting dalam pengobatan VVC. Salah satu inovasi yang potensial adalah *Intravaginal Ring* (IVR), yaitu alat kesehatan berbentuk cincin fleksibel yang memungkinkan penghantaran obat lokal secara berkelanjutan dengan hanya satu kali aplikasi (Carson *et al.*, 2021). IVR menawarkan keunggulan dibandingkan sediaan topikal atau oral, terutama dalam menurunkan paparan sistemik serta menyediakan pelepasan obat yang lebih terkontrol di lokasi target (Griffin *et al.*, 2019). Berbagai bahan aktif farmasi telah diteliti untuk penghantaran berbasis IVR. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa IVR mampu memperpanjang pelepasan *in vitro* Disulfiram untuk terapi kanker serviks dan Progesterone (Boyd *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2018). Selain itu, IVR yang mengandung Tenofovir disoproxil fumarate dilaporkan dapat memberikan perlindungan terhadap paparan berulang simian-HIV melalui vagina pada kera (Smith *et al.*, 2013). Dalam bidang terapi antijamur, IVR juga telah menunjukkan potensi sebagai sistem penghantaran untuk Bifonazole dan Clotrimazole (Moroni *et al.*, 2023).

Di antara proses manufaktur untuk produksi IVR, *3D Printing* atau pencetakan 3D merupakan teknik inovatif yang saat ini semakin banyak diteliti dan dikembangkan dalam sektor farmasi (Vaz & Kumar, 2021). Pencetakan 3D memungkinkan pembuatan bentuk sediaan yang fleksibel dan dapat disesuaikan secara khusus untuk setiap pasien, serta mendukung kontrol pelepasan obat yang tepat sesuai kebutuhan klinis (Deshkar *et al.*, 2021). Studi sebelumnya oleh Tiboni *et al.*, (2021) berhasil mengembangkan IVR berbasis cetak 3D yang melepaskan Clotrimazole secara berkelanjutan selama tujuh hari. Terdapat beberapa metode cetak 3D yang umum digunakan dalam dunia farmasetika. Metode tersebut adalah *fused deposition modelling*

(FDM), *semi solid extrusion* (SSE), *stereolithography* (SLA), bioprinting serta modifikasi dari metode-metode ini (Mathew *et al.*, 2020; Castano *et al.*, 2024). Metode *Semi Solid Extrusion* (SSE) dipilih dalam penelitian ini karena memiliki beberapa keunggulan dibandingkan metode pencetakan 3D lainnya. SSE memungkinkan pencetakan formulasi dengan viskositas tinggi dan tidak memerlukan suhu tinggi dalam proses pencetakan, sehingga lebih sesuai untuk bahan aktif yang sensitif terhadap panas (Seoane *et al.*, 2021).

Meskipun demikian, pengembangan material tinta masih menjadi tantangan utama pada metode SSE. Tinta yang digunakan harus memiliki sifat reologi yang memadai agar dapat mempertahankan bentuk dan integritas struktur setelah proses pencetakan (B. Zhang *et al.*, 2023). Meskipun proses pengeringan sederhana mungkin cukup untuk formulasi yang mudah terdisintegrasi (Cui *et al.*, 2020), sediaan yang dirancang untuk tetap utuh selama periode pelepasan obat, seperti IVR, memerlukan matriks yang kuat dan stabil (Tiboni *et al.*, 2021). Oleh karena itu, polimer yang dapat mengalami *crosslinking* merupakan kandidat yang ideal karena mampu membentuk struktur yang lebih kokoh dan stabil. Poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) merupakan monomer yang tidak toksik dan biokompatibel yang sebelumnya telah digunakan dalam pencetakan farmasi 3D berbasis *stereolitografi* (Warr *et al.*, 2020). Polimer terakrilasi seperti PEGDA sering dimanfaatkan karena dapat mengalami pemadatan dengan cepat melalui paparan sinar UV. Namun, penggunaan PEGDA secara tunggal umumnya belum mampu memberikan sifat mekanik dan reologi yang optimal. Oleh sebab itu, diperlukan penambahan polimer lain atau bahan tambahan untuk meningkatkan viskoelastisitas, memperbaiki kekuatan struktur, serta mengatur pelepasan obat secara berkelanjutan (Mathiyalagan *et al.*, 2024; Morató-Cecchini *et al.*, 2026; B. Zhang *et al.*, 2023).

Hingga saat ini, belum ada penelitian yang secara khusus mengkaji formulasi kompleks inklusi KTZ dengan HPyCD dalam bentuk IVR yang diproduksi menggunakan metode cetak 3D. Penelitian ini penting karena mengisi kesenjangan dalam literatur mengenai teknik formulasi dan metode fabrikasi inovatif untuk mengendalikan pelepasan dan meningkatkan bioavailabilitas vaginal KTZ. Dengan pendekatan ini, diharapkan dapat memperbaiki efikasi terapi dan memberikan kontribusi signifikan terhadap pengembangan teknologi pengantaran obat.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijabarkan, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana karakteristik fisikokimia, dan aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* secara *in vitro* dari kompleks inklusi KTZ/HPyCD yang diproduksi menggunakan metode *kneading*, *solvent evaporation-1*, dan *solvent evaporation-2*?
2. Bagaimana morfologi dan profil pelepasan obat dari IVR yang mengandung kompleks inklusi KTZ/HPyCD dalam uji pelepasan *in vitro*?

3. Bagaimana karakteristik fisikokimia dan aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* secara *in vitro* dari IVR berbasis kompleks inklusi KTZ/HP γ CD yang dibuat menggunakan teknologi cetak 3D?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dijabarkan, tujuan penelitian dalam penelitian ini adalah:

1. Untuk mengkaji karakteristik fisikokimia, dan aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* secara *in vitro* dari kompleks inklusi KTZ/HP γ CD yang diproduksi menggunakan metode *kneading*, *solvent evaporation-I*, dan *solvent evaporation-II*
2. Untuk menentukan morfologi IVR serta profil pelepasan obat dari IVR yang mengandung kompleks inklusi KTZ/HP γ CD melalui uji pelepasan *in vitro*.
3. Untuk mengevaluasi karakteristik fisikokimia dan aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* secara *in vitro* dari IVR berbasis kompleks inklusi KTZ/HP γ CD yang dibuat menggunakan teknologi cetak 3D.

BAB II

METEDOLOGI PENELITIAN

2.1 Rancangan dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mendesain *Intravaginal Ring* (IVR) yang mengandung kompleks KTZ/HPyCD dengan metode cetak 3D dan menguji aktivitasnya terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmasetika dan Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat centrifuge (Oregon® LC-04S), Spektrofotometri UV/VIS (Dynamica®), magnetic stirrer (Cimarec®), orbital shaker (Optima®), timbangan analitik (Ohaus®), oven (Mettler®), pH meter (Lutron®), instrumen FTIR, Instrumen HNMR, Tissue Scribe Bioprinter (3D Cultures®), vortex, mikro pipet (Scilogex®), mikro kuvet, dan seperangkat alat gelas (Pyrex®).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah baku ketoconazole (BPFI), ketoconazole (PT. Dian Cipta Perkasa®), HPyCD (Ashland Inc), methanol, Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC), Polivinil Alkohol (PVA) Mw 89-98 kDa, 99% hydrolyzed (Sigma aldrich®), Poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) (Sigma aldrich®), Photoinitiator (2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide (TPO) (Sigma aldrich®), etanol, natrium klorida (NaCl), kalium hidroksida (KOH), kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), asam laktat, asam asetat, gliserol, urea, glukosa, DMSO, air murni, *paper disk*, media *Potato Dextrose Broth* (PDB) (HIMEDIA), dan media *Potatao Dextrose Agar* (PDA) (HIMEDIA).

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Metode Analisis Ketoconazole

Pembuatan Cairan Vagina Buatan. Cairan vagina buatan disiapkan dengan menggunakan NaCl 3,51 gram, KOH 1,4 gram, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,22 gram, asam laktat 2 gram, asam asetat 1 gram, gliserol 0,16 gram, urea 0,4 gram, dan glukosa 5 gram kemudian dilarutkan dalam 1 L air deionisasi kemudian pH larutan tersebut diatur menjadi 4,2-4,3 dengan penambahan HCl 0,1 N (Permana *et al.*, 2023).

Pembuatan Larutan Stok Ketoconazole. Sebanyak 10 mg KTZ BPFI ditimbang menggunakan timbangan analitik. KTZ dipindahkan ke dalam gelas beaker dan dilarutkan dengan 8 mL etanol. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml dan dicukupkan volumenya hingga tanda batas, diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 1000 µg/mL.

Penentuan Panjang Gelombang Ketoconazole. Larutan stok KTZ dipipet sebanyak 50 µL dan dicukupkan hingga 1 mL (50 µg/mL) dengan menggunakan dua pelarut berbeda yaitu cairan vagina buatan dan air. Kedua larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dari serapan tertinggi pada sampel.

Pembuatan Kurva Baku Ketoconazole. Sebanyak 1 ml larutan stok 1000 µg/mL diambil dan dimasukkan dalam labu tentukur 10 ml dan dicukupkan dengan cairan vaginal buatan hingga tanda batas (100 µg/mL). Kurva baku diukur dengan melakukan pengenceran sebanyak 5 konsentrasi 5; 10; 15; 20; dan 25 µg/mL dari larutan stok 100 µg/mL. Absorbansi masing-masing larutan kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum ketoconazole menggunakan spektrofotometri UV-Vis, kemudian dibuat kurva hubungan antara serapan terhadap konsentrasi (Kurva baku 1).

Sebanyak 1 ml larutan stok 1000 µg/mL diambil dan dimasukkan dalam labu tentukur 10 ml dan dicukupkan dengan air murni hingga tanda batas (100 µg/mL). Kurva baku diukur dengan melakukan pengenceran sebanyak 5 konsentrasi 5; 10; 15; 20; dan 25 µg/mL dari larutan stok 100 µg/mL. Absorbansi masing-masing larutan kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum ketoconazole menggunakan spektrofotometri UV-Vis, kemudian dibuat kurva hubungan antara serapan terhadap konsentrasi (Kurva baku 2).

2.3.2 Pembuatan Kompleks Inklusi KTZ/HPyCD

Diagram fase kelarutan dibuat berdasarkan metode Higuchi & Connors. Pertama, kelarutan diukur dengan mendispersikan KTZ dengan jumlah berlebih ke dalam air suling yang mengandung cyclodextrin. Kelarutan diukur dalam satu seri konsentrasi cyclodextrin (0-0,5 mM). Dispersi yang terbentuk digojok dengan agitasi kontinu pada kecepatan 100 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah kesetimbangan dicapai, larutan disaring menggunakan filter dengan ukuran pori nominal 0,45 µm untuk menghasilkan larutan KTZ yang jernih. Konstanta stabilitas (K_c) untuk kompleks KTZ/HPyCD diperoleh dari kemiringan garis (*slope*) diagram kelarutan fase (mM KTZ terlarut vs mM HPyCD) sesuai dengan persamaan 1 (Wang *et al.*, 2023).

$$K_c = \frac{slope}{S_0(1-slope)} \quad (1)$$

di mana S_0 adalah konsentrasi jenuh KTZ dalam pelarut tanpa cyclodextrin.

Metode Kneading. Kompleks inklusi disiapkan dengan rasio molar 1:1, sebanyak 531,4 mg KTZ dan 1587,5 mg HPyCD ditimbang dan dimasukkan kedalam lumpang. Campuran KTZ dan HPyCD kemudian dihancurkan dan digerus dengan 150 µL larutan metanol-air (1:1, v/v) hingga terbentuk pasta yang homogen. Pasta tersebut diaduk selama 5 menit, dengan penambahan beberapa tetes pelarut untuk menjaga konsistensi. Produk yang

terbentuk dikeringkan pada suhu ruang, kemudian dikeringkan lebih lanjut di oven pada suhu 50°C selama 24 jam. Produk *kneading* yang sudah kering dihancurkan dan diayak menggunakan ayakan berukuran 75 µm (Sbarcea *et al.*, 2019).

Metode Solvent Evaporation-I. Sebanyak 531,4 mg KTZ dan 1587,5 mg HPyCD ditimbang dan dilarutkan dalam 300 ml metanol 50%. Campuran disonikasi hingga larut dan diuapkan pada suhu 80°C. Selanjutnya, campuran dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 24 jam. Kompleks yang sudah kering kemudian dihancurkan dan diayak menggunakan ayakan berukuran 75 µm.

Metode Solvent Evaporation-II. Sebanyak 1587,5 mg HPyCD ditimbang dan dilarutkan dalam 300 mL air. Campuran diaduk pada suhu 80°C hingga bening. KTZ sebanyak 531,4 mg dilarutkan dengan sedikit metanol, lalu ditambahkan perlahan-lahan tetes demi tetes ke dalam larutan cyclodextrin. Selanjutnya, campuran diuapkan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 24 jam. Kompleks yang sudah kering kemudian dihancurkan dan diayak menggunakan ayakan berukuran 75 µm (Conte *et al.*, 2023).

2.3.3 Evaluasi dan Karakterisasi Kompleks Inklusi

Pengujian Saturation Solubility. Pengujian dilakukan dengan menggunakan dua media, yaitu air murni dan cairan vagina buatan. Prosedur pengujian dilakukan dengan memasukkan KTZ murni dan kompleks inklusi KTZ/HPyCD dalam jumlah berlebih ke dalam vial berbeda yang berisi air dan cairan vagina buatan (pH 4,2). Semua botol vial dikocok menggunakan alat *orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Setelah kesetimbangan dicapai, kemudian disentrifugasi untuk memisahkan endapan yang tersisa. Kemudian supernatannya dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi yang diperoleh kemudian dihitung konsentrasinya menggunakan persamaan regresi yang telah diperoleh (Andor *et al.*, 2024).

Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Study. Sampel KTZ murni, kompleks inklusi KTZ/HPyCD, *Physical Mixture* KTZ/HPyCD dan HPyCD murni dianalisis menggunakan ATR-FTIR (*Attenuated Total Reflectance Fourier transform infrared spectrometer*) dalam rentang 500–4000 cm^{-1} (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) (Ding *et al.*, 2023).

Proton NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Study. Spektrum NMR proton dari larutan HPyCD dan kompleks inklusinya dalam D_2O dan larutan ketoconazole dalam $\text{DMSO-}d_6$ direkam menggunakan spektrometer Bruker (400 MHz) (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany) (Ding *et al.*, 2023).

Scanning electron microscopy (SEM). Karakteristik morfologi permukaan KTZ, HPyCD, campuran fisik, serta kompleks inklusi diamati menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) tipe TM3030 yang dilengkapi dengan detektor elektron sekunder. Seluruh sampel dianalisis pada tegangan percepatan sebesar 15 kV.

2.3.4 Aktivitas Antijamur *In vitro*

Penyiapan Kultur *Candida albicans* (CA). Strain *C. albicans* ATCC 14053 digunakan dalam penelitian ini. Biakan *Candida albicans* ditumbuhkan dalam media agar miring PDA pada suhu 37°C selama 24 jam. Penyiapan inokulum dilakukan dengan mensuspensikan sel khamir dengan larutan NaCl fisiologis hingga memperoleh kekeruhan setara standar 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ CFU) menggunakan densitometer DEN-1 (Biosan).

Uji Daya Hambat. Pengujian aktivitas antijamur dengan metode difusi cakram dilakukan dengan mengikuti metode uji CLSI M44-3rd ed. (2018) dengan modifikasi. *Cotton swab* dicelupkan ke dalam suspensi biakan *C. albicans* yang telah disiapkan. Swab kemudian digoreskan secara merata di atas permukaan media PDA. Sampel uji (KTZ 12,5 mg dan kompleks KTZ/HPyCD 49,84 mg) masing-masing dilarutkan dalam 5 ml DMSO. Sebanyak 20 µL sampel uji dimasukkan ke dalam *paper disc* (50 µg/disc) dan diletakkan di atas media. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk kemudian diukur menggunakan jangka sorong.

2.3.5 Pembuatan *IntraVaginal Ring* (IVR) Cetak 3D

Desain *Printlet*. *Printlet* didesain menggunakan aplikasi web *Tinkercad 3D Design* (<https://www.tinkercad.com/>) dengan detail desain sebagai berikut:

Bentuk : *Intravaginal Ring*

Diameter : 20 mm

Ketebalan : 1 mm

File hasil desain kemudian diunduh dalam bentuk obj dan nantinya digunakan sebagai model *Vaginal Ring* di dalam *Tissue Scribe* yang akan digunakan.

Formulasi *IntraVaginal Ring* (IVR)

Tabel 1. Komposisi formula IVR

Bahan	Formula (g)					
	H ₃ P ₀	H _{2,5} P _{0,5}	H ₂ P ₁	H _{1,5} P _{1,5}	H ₁ P ₂	H _{0,5} P _{2,5}
KTZ/HPyCD	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
HPMC 3% (<i>in water</i>)	3	2,5	2	1,5	1	0,5
PVA 10% (<i>in water</i>)	0	0,5	1	1,5	2	2,5
PEGDA	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Gliserin	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
TPO 0,1% (<i>in 70% Et-OH</i>)	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl

Proses Pencetakan IVR. Desain 3D yang diperoleh kemudian di-“slice” menggunakan aplikasi UltiMaker Cura 5.6.0 untuk menghasilkan file G-Code (**gcode*) dengan detail parameter sebagai berikut:

<i>Layer Height</i>	: 0,5 mm
<i>Line Width</i>	: 0,5 mm
<i>Wall Thickness</i>	: 0 mm
<i>Wall Line Count</i>	: 0
<i>Infill Density</i>	: 100%
<i>Infill Layer Thickness</i>	: 0,5 mm
<i>Printing Temperature</i>	: 0°C
<i>Build Plate Temperature</i>	: 0°C
<i>Print Speed</i>	: 50 mm/s
<i>Travel Speed</i>	: 120 mm/s
<i>Print Cooling</i>	: OFF
<i>Support</i>	: OFF
<i>Build Plate Adhesion Type</i>	: None
Ukuran Nozzle	: 1,63 mm

File yang diperoleh selanjutnya dipindahkan ke *memory card* untuk dipasangkan ke alat *Tissue Scribe*. Kemudian, formula pasta yang mengandung polimer dan kompleks inklusi KTZ dimasukkan ke dalam spuit 10 mL (BD) yang selanjutnya dipasang dengan *Printing nozzle*. Alat cetak selanjutnya dijalankan untuk memperoleh sediaan IVR yang mengandung KTZ-CD.

Uji Daya Sebar. Pengujian daya sebar dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,5 g pasta hasil formulasi, kemudian ditempatkan di atas lempeng kaca. Sampel selanjutnya ditutup menggunakan lempeng kaca lain dengan ukuran yang sama, lalu diberi beban awal hingga mencapai 100 g dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah itu, diameter penyebaran pasta diukur pada arah vertikal, horizontal, dan diagonal. Prosedur yang sama diulangi dengan penambahan beban secara bertahap sebesar 100 g pada setiap pengujian hingga beban maksimum 500 g. Data hasil pengujian daya sebar kemudian dihitung menggunakan persamaan 2 dan dipetakan dalam bentuk grafik untuk mengevaluasi kemampuan penyebaran antar formula (Pintea *et al.*, 2022).

$$S = d^2 \frac{\pi}{4} \quad (2)$$

Keterangan:

S = Luas area sebaran (cm²)

d = Diameter (cm)

2.3.6 Karakterisasi Morfologi

Scanning Electron Microscopy (SEM). Sampel IVR cetak 3D dari setiap formulasi diperiksa dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) untuk menganalisis morfologi permukaan dan potong-lintang sediaan (Chen *et al.*, 2022).

Optical Coherence Tomography (OCT). Analisis struktur internal dan morfologi sampel dilakukan menggunakan Telesto Thorlabs TEL321 OCT System (Thorlab OCTG (OCT probe), LSM03/OCT-LK3 (kamera objektif), OCT-XYR1/M). Sampel ditempatkan pada platform pengukuran kemudian kamera optik difokuskan hingga diperoleh penampang melintang yang melintasi area sampel untuk proses pengambilan data tomografi. Akuisisi data 2D dan 3D dilakukan dengan sensitivitas 76 kHz menggunakan referensi indeks refraksi 1, kemudian hasil akuisisi 3D divisualisasikan menggunakan ThorImageOCT versi 5.7.3.

2.3.7 Uji Pelepasan *In vitro*

Pelepasan KTZ/HPyCD secara *in vitro* dari IVR cetak 3D dievaluasi dalam cairan vagina buatan. Untuk penelitian ini, IVR yang dicetak 3D ditempatkan dalam botol kaca tertutup dengan 50 mL media pelepasan. Botol-botol tersebut kemudian disimpan dalam inkubator orbital shaker pada suhu 37°C, dengan kecepatan 100 rpm selama tujuh hari berturut-turut. Selama hari pertama, 1 mL sampel diambil setiap jam selama 6 jam pertama dan volume yang diambil digantikan dengan media segar untuk memastikan *sink condition* tetap terjaga. Kemudian, setiap 24 jam, sampel diambil untuk dianalisis dan total volume media pelepasan diganti dengan yang baru. Jumlah KTZ/HPyCD yang dilepaskan dari IVR diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Pelepasan obat dari IVR dievaluasi dalam tiga kali replikasi (Tiboni *et al.*, 2021).

2.3.8 Karakterisasi Fisiko Kimia

Fourier-transform infrared (FT-IR). Spektroskopi *Fourier-transform infrared* (FTIR) dilakukan menggunakan spektrofotometer FTIR (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) dengan mode *attenuated total reflectance* (ATR) yang memindai rentang 4000 cm⁻¹ hingga 500 cm⁻¹. Untuk setiap analisis, 32 pemindaian diambil pada resolusi 2 cm⁻¹ untuk mengkarakterisasi puncak serapan polimer dan obat (Chen *et al.*, 2022).

Differential Scanning Calorimetry (DSC). Data *differential scanning calorimetry* (DSC) dikumpulkan menggunakan instrumen DSC Q20® (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA). Sekitar 5 mg sampel ditempatkan dalam wadah aluminium dan dipanaskan dengan laju pemanasan tetap sebesar 10°C/menit dari 0 hingga 400°C (Tiboni *et al.*, 2021).

Thermogravimetric Analysis (TGA). Analisis dilakukan menggunakan instrumen TGA Q50® (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA). Pemindaian dilakukan dari suhu ruang hingga 400°C dengan laju pemanasan 10°C/menit di bawah aliran nitrogen dengan laju 30 mL/menit (Tiboni *et al.*, 2021).

2.3.9 Uji Daya Hambat IVR

Intravaginal ring (IVR) yang mengandung kompleks inklusi KTZ/HPyCD hasil pencetakan 3D disterilkan menggunakan sinar ultraviolet (UV) selama 30 menit, kemudian disimpan dalam cawan petri steril hingga digunakan. Uji aktivitas antijamur dilakukan menggunakan metode difusi agar yang dimodifikasi. *Candida albicans* ATCC 14053 diremajakan pada media *potato dextrose agar* (PDA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, suspensi mikroba disiapkan dan disesuaikan hingga mencapai konsentrasi sekitar $1-5 \times 10^6$ CFU/mL. *Cotton swab* steril dicelupkan ke dalam suspensi *C. albicans* tersebut, kemudian digoreskan secara merata pada seluruh permukaan media PDA. Sampel IVR yang telah disterilkan diletakkan di atas permukaan media PDA yang telah diinokulasi. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam untuk mengevaluasi terbentuknya zona hambat pertumbuhan jamur di sekitar sampel uji. Diameter zona bening yang terbentuk diarea luar dari IVR diukur menggunakan jangka sorong.

2.3.10 Uji Time Kill Assay

Dalam penelitian ini, cairan vagina buatan (CVB) digunakan untuk meniru kondisi lingkungan vagina yang terinfeksi *Candida albicans*. CVB disiapkan sesuai metode yang telah dijelaskan sebelumnya, disterilisasi menggunakan filtrasi membran 0,22 µm, dan disimpan pada suhu 4°C hingga digunakan. Dua hari sebelum pengujian, tabung steril berisi 19 mL CVB dipersiapkan untuk proses kondisioning IVR. Satu IVR yang mengandung kompleks KTZ/HPyCD dimasukkan ke dalam tabung dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dengan pengocokan perlahan (100 rpm). Satu hari sebelum pengujian, IVR kedua dengan komposisi yang sama dimasukkan ke dalam tabung steril lain berisi 19 mL CVB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan pengocokan perlahan (100 rpm). Pada hari pengujian, satu IVR tambahan yang tidak mengalami proses kondisioning langsung digunakan sebagai pembanding. Selanjutnya, 1 ml suspensi *Candida albicans* yang setara dengan 0,5 McFarland ditambahkan ke masing-masing tabung sehingga diperoleh tiga kelompok perlakuan, yaitu IVR tanpa kondisioning, IVR dengan kondisioning 24 jam, dan IVR dengan kondisioning 48 jam. Seluruh tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan pengocokan ringan (100 rpm). Pada titik waktu yang telah ditentukan (hingga tujuh hari: 0, 24, 72, 120, dan 168 jam), sebanyak 100 µL sampel diambil secara aseptik dari setiap tabung, diencerkan dalam larutan NaCl fisiologis 0,9%, dan disebar sebanyak 100 µL secara triplikate ke permukaan media

PDA. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dan jumlah unit pembentuk koloni (*colony-forming units*, CFU/mL) dihitung. Seluruh percobaan dilakukan dalam tiga kali pengulangan (triplikat) (Moroni *et al.*, 2023).

2.3.11 Analisis Data

Analisis statistik dilakukan menggunakan GraphPad Prism (versi 10,0). Data terlebih dahulu diuji normalitasnya sebelum dilakukan analisis statistik lanjutan. Apabila data berdistribusi normal, perbandingan lebih dari dua kelompok dianalisis menggunakan One-way ANOVA. Sedangkan, jika data tidak berdistribusi normal perbandingan lebih dari dua kelompok dianalisis menggunakan Kruskal–Wallis test. Nilai $p < 0,05$ dianggap menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik. Data yang diperoleh selanjutnya diolah menggunakan OriginPro untuk menghasilkan visualisasi grafis yang informatif dan memperjelas hubungan antarvariabel yang diteliti.