

Optimasi Formula Lipid Nanostruktur dengan Pentarget Manosa sebagai Sistem Penghantaran Rifampisin (Formula Optimization of NLC with D-Mannose Targeting for Rifampicin Delivery System)

TRI SUCIATI^{1*}, NURANI ISTIQOMAH¹, BENNY PERMANA¹, ELIN JULIANTI¹,
TITAH YUDISTIRA², MARLIA SINGGIH WIBOWO¹, YANI TRIYANI³

¹Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha No. 10, Bandung 40132, Indonesia

²Sistem Industri dan Tekno-ekonomi, Fakultas Teknik Industri, Institut Teknologi Bandung

³Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Bandung, Jl. Tamansari No. 2, Bandung 40116, Indonesia

*Penulis korespondensi, Hp : 081395075530

e-mail: cicik.tsuciati@gmail.com

Diterima 19 Oktober 2018, Disetujui 12 September 2019

Abstrak: Akumulasi terbatas obat antituberkulosis di dalam makrofag menjadi penghalang keberhasilan terapi tuberculosis laten. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan formula nanopartikel termodifikasi D-manosa sebagai agen pentarget reseptor manosa untuk meningkatkan internalisasi rifampisin ke dalam makrofag. D-manosa dikongjugasi dengan kitosan menggunakan agen pereduksi amin. Kongjugat kitosan-D-manosa dikarakterisasi menggunakan FTIR. Selanjutnya, kongjugat diadsorpsikan pada partikel lipid nanostruktur (Nanostructured Lipid Carrier, NLC) secara elektrostatis. Formula NLC terdiri dari larutan lemak padat-cair dan rifampisin dalam etil asetat dan larutan kongjugat kitosan-D-manosa yang dibuat dengan tehnik emulsifikasi menggunakan emulgator polisorbit 80. Solidifikasi nanopartikel NLC-kitosan-manosa dilakukan dengan metode gelasi ionotropik dan penguapan pelarut. Formula nanopartikel dioptimasi menggunakan metode statistik Box-Behnken. Keberhasilan pembentukan kongjugat kitosan-D-manosa dikonfirmasi dari perubahan bilangan gelombang pita amida dan pembentukan basa Schiff pada spektra FTIR. Formula optimum nanopartikel memiliki diameter $766,1 \pm 57,56$ nm dengan indeks polidispersitas $0,32 \pm 0,02$, efisiensi enkapsulasi $91,54 \pm 0,18\%$ dan *drug loading* $36,62 \pm 0,07\%$. Profil pelepasan rifampisin dari nanopartikel hampir mirip pada pH 5,2 maupun 7,4. Formula NLC termodifikasi manosa ini berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai pentarget antibiotik intraselular pada makrofag.

Kata kunci: NLC, rifampisin, D-manosa.

Abstract: Limited accumulation of anti-tuberculosis drugs in macrophages become a barrier to the success of latent tuberculosis therapy. The purpose of this study is to develop a D-mannose modified nanoparticle formula as a targeting agent to the mannose receptors to increase the internalization of rifampicin into macrophages. D-mannose was conjugated with chitosan using an amine reducing agent. Chitosan-D-mannose conjugate was characterized using FTIR. Subsequently, the conjugate was adsorbed onto the nanostructured lipid carrier (NLC) electrostatically. The NLC formula consisted of an ethyl acetate solution of solid-liquid lipid blend and rifampicin and an aqueous solution of chitosan-D-mannose conjugate, which were emulsified using polysorbate 80. Solidification of the NLC-chitosan-mannose nanoparticles was carried out by ionotropic gelation and solvent evaporation. The nanoparticle formula was optimized using Box-Behnken design. The formation of chitosan-D-mannose conjugate was shown by the change of the amide band wave number and the Schiff base formation of the FTIR spectra. The optimum formula of nanoparticles had a diameter of 766.1 ± 57.56 nm with a polydispersity index of 0.32 ± 0.02 , encapsulation efficiency of $91.54 \pm 0.18\%$ and drug loading of $36.62 \pm 0.07\%$. Rifampicin was released from the nanoparticles at pH 5.2 or 7.4 with a similar rate. This D-mannose modified NLC formula has the potential to be further developed as an intracellular antibiotic targeting to macrophages.

Keywords: NLC, rifampicin, D-mannose.

PENDAHULUAN

TUBERCULOSIS (TB) terus menjadi penyebab umum kematian di seluruh dunia. Diperkirakan sekitar 10,4 juta kasus baru TB, dan 1,4 juta kematian akibat TB telah terjadi di seluruh dunia pada 2015⁽¹⁾. Penyakit tuberkulosis disebabkan oleh infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Mtb memiliki beberapa strategi agar bisa masuk dan bertahan di dalam sel fagosit mononuklear dengan lebih lama. Salah satu caranya yaitu dengan melibatkan suatu reseptor fagosit untuk memulai jalur sinyal spesifik dan memodulasi beberapa proses imunobiologi selama dan setelah proses fagositosis.

Mtb latent memiliki senyawa lipoglikan yang mengandung manosa pada dinding selnya yaitu: mannose-capped lipoarabinomannan (ManLAM), yang secara langsung terlibat dalam regulasi proses ini. Keberadaan ManLAM pada permukaan Mtb membuat molekul ini berada pada posisi yang ideal untuk memediasi interaksi awal antara Mtb dan makrofag. Mtb berada pada fagosom yang tidak berkembang menjadi fagolisosom⁽²⁾. ManLAM pada permukaan Mtb mampu menekan produksi oksida nitrat, oksigen radikal, *inflammatory cytokin*, dan menghambat apoptosis Mtb⁽³⁾. Hal inilah yang menjadi aspek kritis dalam patogenesis tuberkulosis.

Terdapat beberapa jenis obat anti tuberkulosis yang biasanya diberikan secara kombinasi, salah satunya adalah rifampisin. Rifampisin adalah obat antituberkulosis yang diklasifikasikan sebagai *biopharmaceutical classification system* (BCS) kelas 2⁽⁵⁾. Pada penelitian ini, dikembangkan sistem penghantaran obat rifampisin dalam bentuk NLC (*nanostructure lipid carrier*) dengan permukaan yang telah dimodifikasi dengan penambahan agen pentarget berupa D-manosa. D-manosa merupakan monosakarida yang berupa isomer dari glukosa yang dihipotesakan memiliki kemiripan struktur dengan caps manosa pada dinding Mtb.

D-manosa memiliki polaritas yang berbeda dengan rifampisin yang bersifat hidrofobik. Oleh karenanya D-manosa dikonjugasikan dengan kitosan yang kemudian ditambahkan pada rifampisin yang berada dalam sistem NLC. NLC merupakan generasi kedua dari teknologi lipid nanopartikel setelah SLN (*Solid Lipid Nanoparticle*). Perbedaan NLC dan SLN dapat dilihat dari komposisi matriks padat. Berbeda dengan SLN yang hanya terdiri dari lipid padat, fase lipid dalam NLC mengandung lipid padat dan cair pada suhu ruang⁽⁶⁾. SLN dan NLC dikembangkan untuk mengatasi keterbatasan pembawa koloid lainnya, seperti emulsi, liposom dan nanopartikel polimer, karena memiliki profil pelepasan yang baik

dan penghantaran obat tertarget dengan stabilitas fisik yang prima. Namun NLC dapat memberikan stabilitas dan kapasitas pemuatan atau loading obat yang lebih baik dibandingkan dengan SLN⁽⁷⁾.

Proses pencarian formula optimum untuk menentukan jenis dan perbandingan komponen formulasi pada umumnya memakan waktu dan biaya yang tidak sedikit karena banyaknya parameter yang harus diteliti. *Design of Experiments* (DOE) adalah salah satu metode yang dapat digunakan untuk meminimalisasi jumlah eksperimen dan mengidentifikasi efek variabel dan interaksi yang dominan⁽⁸⁾. Desain skrining seperti *Full Factorial Design* dapat dipilih untuk menentukan parameter yang paling penting diantara sejumlah variabel independen dengan jumlah percobaan yang terbatas, sedangkan respon permukaan seperti *Box-behnken design* dapat digunakan untuk menentukan daerah optimum dari respon yang sedang diamati. Metode tersebut dapat menghasilkan model matematika spesifik yang menyajikan informasi tentang bagaimana respon dipengaruhi oleh beberapa variabel, yang memberikan prediksi level optimum dari variabel faktor yang dibutuhkan untuk memberikan respon terbaik.

Pada penelitian ini dilakukan optimasi untuk mencari formula optimum NLC pada respon ukuran partikel, efisiensi enkapsulasi, dan *drug loading* dengan menggunakan desain eksperimen, beserta evaluasinya. Formula nanopartikel ini diharapkan menjadi sediaan obat antituberkulosis yang ampuh secara farmakologi karena dapat mentarget langsung, menjanjikan secara industri karena efisiensi enkapsulasi obat pada proses pembuatan tinggi, dan nyaman digunakan oleh pasien karena loading obat yang tinggi sehingga dapat memudahkan pengaturan regimen dosis. Semua itu diharapkan berujung pada peningkatan kualitas terapi untuk pasien terutama pasien tuberkulosis laten.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Rifampisin, asam oleat, stearil alkohol, polisorbitat 80, natrium triasetoksiborohidrida, kitosan, STPP, D-manosa, etil asetat, tetrahidrofuran, asam asetat, natrium hidroksida, metanol, etanol, aquades, aquadeion dan bahan kimia lain yang terdapat pada laboratorium.

Alat. IKA® T-25 ULTRA-TURRAX digital, Thermolyne Plate Magnetic Stirrer (Nuova), sonikator probe (Branson, Model 5510), spektrofotometer UV-Visibel (Becman DU 7500i), freeze dryer (Telstar LyoQuest), spray dryer (EYELA), spektrofotometri infra merah (Jasco FT-IT-4200), Photon Correlation Spectroscopy (DelsaTM Nano C Particle Analyzer, Becman Coulter), alat timbang (Mettler Toledo),

sentrifuga (Hettich EBA 85), lemari pendingin, dan peralatan lain yang umum digunakan di laboratorium.

METODE. Konjugasi Kitosan dan D-manosa.

Dilakukan dengan bantuan agen pereduksi amin yaitu natrium triasetoksiborohidrida. Kitosan dicampurkan dengan natrium triasetoksiborohidrida dalam pelarut tetrahidrofuran, lalu distirer selama 1 jam dalam keadaan tertutup rapat. Kemudian ditambahkan D-manosa dalam aquadeion pH 4 lalu distirer kembali selama 24 jam⁽⁹⁾. Konjugat yang dihasilkan dikarakterisasi dengan spektrofotometri FTIR dan dibandingkan dengan spektra kitosan dan D-manosa.

Pembuatan NLC Metode Emulsifikasi dengan Pelarutan. Lipid padat (stearil alkohol) dicampurkan dengan lipid cair (asam oleat) dan rifampisin. Digunakan etil asetat untuk melarutkan lipid dan rifampisin. Sebagai fasa air, dicampurkan konjugat kitosan-manosa dan polisorbate 80 serta aquadeion. Fasa air dan fasa minyak dicampurkan dengan ultraturax dan dilakukan sonikasi untuk mengecilkan ukuran partikel. Setelah itu sediaan ditetesi dengan larutan STPP sambil distirer selama 30 menit. Evaluasi sediaan yang dilakukan meliputi penentuan ukuran partikel, efisiensi enkapsulasi, dan *drug loading*.

Penentuan Formula Optimum NLC Rifampisin.

Dilakukan dengan metode desain eksperimen (*design of experiment*, DOE) yang terdiri dari 2 tahap yaitu: (1) *fractional factorial design* untuk menentukan komponen formula dan dilanjutkan (2) optimasi komponen formulasi menggunakan desain Box-behnken. Pada tahap 1 dipilih 5 faktor yaitu rifampisin, jumlah lipid (stearil alkohol dan asam oleat 1:1), polisorbate 80 sebagai surfaktan, konjugat kitosan-manosa dan STPP. Sedangkan untuk respon uji yang diteliti adalah ukuran partikel (Y1), efisiensi enkapsulasi (Y2), dan loading obat (Y3). Tahap kedua dengan desain Box-Behnken dipilih 3 faktor yang signifikan pada tahap 1 dengan 3 level konsentrasi dalam 15 formula. Didapat persamaan matematika serta plot kontur dan permukaan dari masing-masing respon. Dilakukan analisis statistika untuk mencari formula yang optimum.

Setelah didapat formula optimum, dilakukan evaluasi sediaan yang meliputi penentuan ukuran partikel, indeks polidispersitas, dan potensial zeta menggunakan alat *particle size analyzer*. Selain itu juga dihitung efisiensi enkapsulasi (EE) dan *drug loading* (DL) dari sediaan. Penentuan EE dan LO dilakukan dengan metode sentrifuga 13000 rpm selama 3x15 menit dan perhitungan secara tidak langsung dengan mengukur kadar rifampisin yang tidak terjerat yaitu dalam supernatan. Konsentrasi rifampisin diukur menggunakan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang 475 nm.

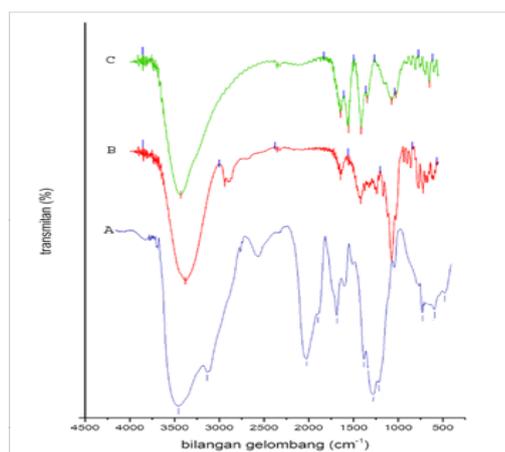
$$EE (\%) = \frac{\text{jumlah rifampisin awal} - \text{rifampisin tidak terjerat}}{\text{jumlah rifampisin awal}} \times 100\%$$

$$DL (\%) = \frac{\text{jumlah rifampisin awal} - \text{rifampisin tidak terjerat}}{\text{jumlah padatan dalam sediaan}} \times 100\%$$

Pelepasan obat ditentukan dengan metode disolusi termodifikasi. Medium yang digunakan adalah dapar fosfat (PBS) pH 7,4 dan pH 5,2 dengan penambahan 500 µg/mL asam askorbat sebagai antioksidan untuk mencegah proses degradasi rifampisin. Kantung dialisis diisi dengan sediaan yang jumlah rifampisinnya diketahui, kemudian ditempatkan dalam 200 mL PBS pH 7,4 atau pH 5,2 dengan suhu 37 °C dan agitasi sedang. Setiap 3 mL *aliquot* diambil pada waktu tertentu dan kemudian diganti dengan 3 mL medium baru. Konsentrasi rifampisin kemudian diukur menggunakan spektrofotometer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konjugasi Kitosan-Manosa. Spektra FTIR konjugat kitosan-D-manosa menunjukkan adanya puncak pada 3426,84 cm⁻¹ yang menandakan adanya gugus N-H. Pada bilangan gelombang 1556,11 cm⁻¹ muncul puncak yang menandakan bahwa amin sekunder telah terbentuk yang mengindikasikan proses konjugasi telah terjadi. Pada bilangan gelombang 1643,97 cm⁻¹ masih terdapat puncak yang menandakan bahwa masih terdapat amin primer yang belum berubah menjadi amin sekunder. Selain itu, terdapat puncak pada bilangan gelombang 1415,80 cm⁻¹ yang menandakan terbentuknya ikatan C=N yang mengindikasikan pembentukan basa Schiff (R-CH=N-R). Hal ini telah dilaporkan peneliti sebelumnya bahwa pembentukan basa Schiff (R-CH=N-R) ditunjukkan dengan adanya N-H bending dari amin sekunder pada 1558.54 cm⁻¹ dan C=N stretch pada 1410.01 cm⁻¹⁽¹⁰⁾. Spektrum inframerah konjugasi kitosan- manosa diperlihatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Spektrum infra merah dari (A) kitosan, (B) D-manosa, (C) konjugat kitosan-manosa

Hasil Desain Eksperimen. Hasil percobaan tahap pertama *fractional factorial design* dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil percobaan menunjukkan bahwa 3 dari 8 formula tidak dapat dilakukan evaluasi karena proses emulsifikasi sediaan gagal. Hal ini dapat disebabkan karena kombinasi level konsentrasi tinggi dan rendah ekstrim yang bertemu dalam satu seri formula yang menyebabkan emulsi tidak terbentuk. Contohnya pada sediaan nomor 2 dimana jumlah rifampisin dan lipid tinggi bertemu dengan Polisorbat rendah dan konjugat tinggi. Dengan kombinasi ini surfaktan tidak

mampu menstabilkan emulsi fasa air dan minyak yang keduanya dalam konsentrasi tinggi sehingga emulsi memisah dan rifampisin tidak terjerat dalam NLC. Hal tersebut menunjukkan bahwa kelima faktor tidak saling independen dan mempengaruhi satu sama lain. Berdasarkan hasil tersebut, dikembangkan desain respon permukaan yaitu Box-behnken design dengan mereduksi faktor, mengurangi rentang level tinggi dan rendah dari faktor, serta memastikan faktor yang dipilih adalah faktor yang paling signifikan.

Tabel 1. Hasil Respon Eksperimen *Fractional Factorial Design*.

Formula	Faktor					Respon		
	Rifampisin (%)	Lipid (%)	Polisorbat 80 (%)	Konjugat (%)	STPP (%)	Ukuran (nm)	EE (%)	DL (%)
1	1,00	0,50	3,00	0,25	0,04	T	T	T
2	1,00	1,00	3,00	0,75	0,04	T	T	T
3	0,75	0,50	6,00	0,75	0,04	800,10	36,91	13,84
4	0,75	1,00	3,00	0,25	0,12	T	T	T
5	0,75	0,50	3,00	0,75	0,12	441,40	46,34	17,38
6	0,75	1,00	6,00	0,25	0,04	415,30	43,38	16,27
7	1,00	0,50	6,00	0,25	0,12	856,10	80,52	29,28
8	1,00	1,00	6,00	0,75	0,12	396,70	29,96	10,90

Keterangan :

*T = Tidak dapat diukur.

Pertimbangan faktor yang dipilih beserta level konsentrasinya dilakukan berdasarkan percobaan yang telah dilakukan sebelumnya. Dipilih tiga faktor yaitu jumlah lipid, Polisorbat 80, dan konjugat kitosan-manosa. Sedangkan untuk rifampisin (4:3 terhadap lipid) dan STPP (6,25:1 terhadap konjugat kitosan-

manosa) dibuat tetap. Respon uji yang dipilih adalah ukuran partikel (Y1), efisiensi enkapsulasi (Y2), dan loading obat (Y3) dalam sediaan. Pada desain ini terdapat 3 tingkat konsentrasi dengan 15 percobaan yang dirancang oleh perangkat lunak Minitab 17®. Hasil percobaan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Respon Eksperimen *Box-behnken Design*.

No.	Faktor			Respon eksperimen		
	Lipid (%)	Polisorbat 80 (%)	Konjugat (%)	Ukuran (nm)	EE (%)	DL (%)
1	0,75	5,00	0,75	806,80	91,69	36,67
2	1,00	6,00	0,75	401,00	89,91	38,91
3	0,75	4,00	0,50	754,70	91,88	40,83
4	0,75	5,00	0,75	605,10	91,33	36,53
5	0,50	4,00	0,75	1262,60	89,49	31,23
6	1,00	5,00	1,00	663,10	93,13	37,31
7	1,00	5,00	0,50	1023,60	93,54	44,05
8	0,75	6,00	0,50	937,60	90,39	40,17
9	0,75	6,00	1,00	648,20	89,98	32,75
10	0,75	4,00	1,00	939,60	92,95	33,83
11	0,50	5,00	0,50	755,60	87,26	35,00
12	0,50	6,00	0,75	844,80	84,24	29,40
13	0,75	5,00	0,75	725,40	91,59	36,64
14	0,50	5,00	1,00	736,80	85,24	26,35
15	1,00	4,00	0,75	891,80	93,95	40,66

Analisis statistik juga dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Minitab® 17. Prosedur regresi permukaan respon dipilih untuk menemukan koefisien dan untuk memplot kontur dan respon permukaan.

Analisis kontur dan plot permukaan yang diperoleh digunakan untuk optimasi dan penentuan koefisien interaksi antar berbagai factor⁽¹²⁾. Ekspresi matematis dari desain eksperimental diwakili dalam persamaan polinomial.

$$Y = \alpha_0 + \alpha_A X_A + \alpha_B X_B + \alpha_C X_C + \alpha_{A^2} X_A^2 + \alpha_{B^2} X_B^2 + \alpha_{C^2} X_C^2 + \alpha_{AB} X_A X_B + \alpha_{AC} X_A X_C + \alpha_{BC} X_B X_C \quad (1)$$

Keterangan:

X_A adalah jumlah lipid (%), X_B adalah jumlah Polisorbat 80 (%), dan X_C adalah jumlah konjugat (%).

Dalam persamaan polinomial ini, parameter positif menunjukkan efek sinergis, yang mana output naik dengan kenaikan variabel input. Sebaliknya, tanda negatif menunjukkan efek antagonis dimana output turun dengan elevasi pada variabel input⁽¹³⁾.

Plot kontur (*contour plots*) dan plot respons permukaan (*response surface plots*) adalah diagram yang menggambarkan nilai respon. Plot ini berguna

untuk memproyeksikan besarnya efek untuk setiap variabel dan interaksi, juga dapat menjelaskan hubungan antara variabel independen dan respon dependen. Model yang dikurangi digunakan untuk merencanakan plot kontur dua dimensi dan plot permukaan respons tiga dimensi menggunakan perangkat lunak. Metode *response surface* memberikan kecenderungan matematis yang dapat menemukan tingkat optimum dari faktor-faktor yang diperlukan untuk respon yang dihasilkan⁽¹⁴⁾.

Desain uji Box-Behnken menghasilkan model matematika untuk respon Y_1 (ukuran partikel, nm) sebagai berikut:

$$Y_1 = 1718 - 268 X_A - 531 X_B + 2527 X_C + 899 X_A^2 + 81 X_B^2 + 419 X_C^2 - 73 X_A X_B - 1367 X_A X_C - 474 X_B X_C \quad (2)$$

Berdasarkan uji ANOVA dengan ($\alpha < 0,05$), pada respon ukuran partikel tidak terdapat faktor yang signifikan ($P \text{ value} > 0,05$). Perlu konfirmasi atau eksperimen kembali untuk meyakinkan apakah tidak adanya faktor signifikan tersebut disebabkan oleh kesalahan percobaan atau memang tidak ada faktor yang signifikan untuk respon ukuran partikel diperlihatkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil ANOVA pada Eksperimen Box-behnken Design.

Faktor	Respon eksperimen					
	Ukuran partikel (nm)		Efisiensi enkapsulasi (%)		Loading obat (%)	
	Nilai F	Nilai P	Nilai F	Nilai P	Nilai F	Nilai P
X_A	1,01	0,360	59,39	0,001*	1369,7	0,000*
X_B	2,72	0,160	18,96	0,007*	25,54	0,004*
X_C	0,62	0,468	0,32	0,597	802,8	0,000*
X_A^2	0,25	0,641	9,85	0,026*	51,74	0,001*
X_B^2	0,52	0,505	0,30	0,610	0,81	0,410
X_C^2	0,05	0,827	0,02	0,899	5,50	0,066
X_{AB}	0,03	0,874	0,29	0,612	0,01	0,916
X_{AC}	0,62	0,468	0,52	0,504	6,63	0,050*
X_{BC}	1,19	0,326	0,44	0,535	0,32	0,596

Keterangan :

*faktor signifikan ($\alpha < 0,05$).

Respon ukuran partikel merupakan respon yang sangat dipengaruhi oleh formulasi. Dapat dilihat dari grafik plot interaksi (Gambar 2A) bahwa adanya konjugat mempengaruhi ukuran partikel karena berinteraksi dengan lipid maupun polisorbat 80, digambarkan dengan bentuk grafik yang berpotongan untuk grafik lipid-konjugat dan polisorbat 80-konjugat. Selain itu, berdasarkan empiris waktu tunggu antara proses pengerjaan dengan proses pengukuran ukuran partikel juga mempengaruhi hasil ukuran sehingga

harus dikontrol dengan baik.

Apabila dilihat pengaruh masing-masing faktor dalam grafik *main effects* (Gambar 2B), dapat dilihat ketiga grafik memiliki tren cenderung menurun, yang artinya semakin tinggi konsentrasi ketiga faktor maka semakin kecil ukuran partikel. Namun grafik tersebut belum menggambarkan nilai maksimum ukuran partikel yang terkecil karena kurva seharusnya membentuk lembah. Rentang level low dan high perlu diperluas agar mendapat daerah optimum. Akan tetapi

karena pada respon ukuran partikel yang diperlukan adalah rentang ukuran partikel 0,2–1 µm, maka daerah tersebut sudah didapatkan.

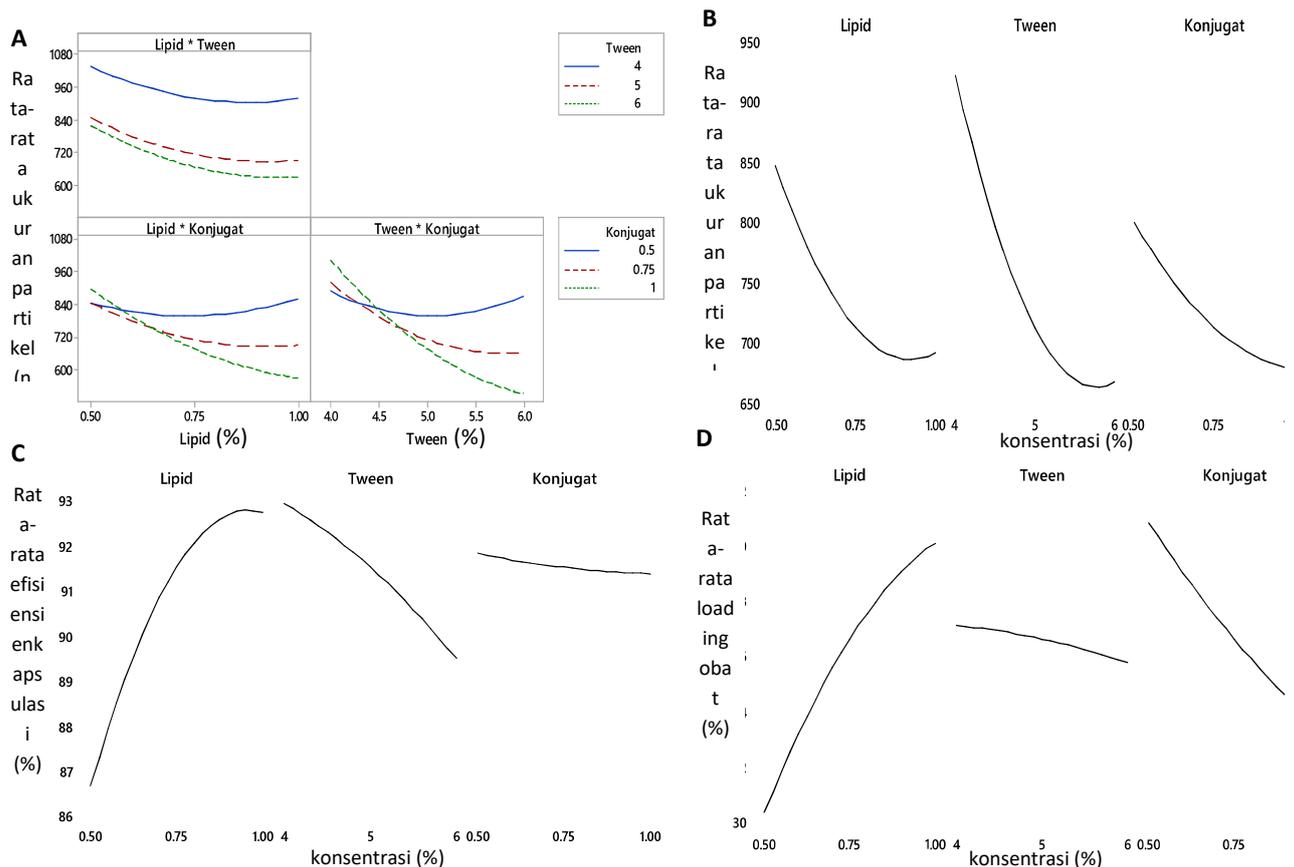
Model matematika yang didapat dari percobaan untuk Y2 (Efisiensi enkapsulasi, %) diberikan dalam Persamaan 3 dengan $r^2 = 0,9474$.

$$Y2 = 70,7 + 45,0 XA + 1,65 XB - 0,1 XC - 29,15 X2A - 0,315 X2B + 1,24 X2C + 1,21 XAB + 6,41 XAC - 1,48 XBC \quad (3)$$

Pada respon efisiensi enkapsulasi, didapat 3 faktor yang signifikan berdasarkan uji ANOVA. Faktor-faktor tersebut yaitu lipid (0,001), polisorbitat 80 (0,007), dan interaksi antara lipid-lipid (0,026). Untuk meningkatkan validitas persamaan, maka faktor lain yang tidak signifikan dapat dihapus menyisakan

variabel yang signifikan saja.

Apabila dilihat pengaruh masing-masing faktor dalam plot *main effects* (Gambar 2C), dapat dilihat untuk faktor lipid, grafik menaik drastis menandakan lipid sangat signifikan untuk mempengaruhi efisiensi enkapsulasi. Akan tetapi grafik ini belum mencapai puncaknya, yang mungkin dapat ditemui apabila rentang diperlebar. Untuk faktor polisorbitat 80, grafik terlihat menurun sehingga jumlah nilai enkapsulasi bisa optimum bila polisorbitat 80 berada pada rentang bawah. Namun hal ini tidak mutlak karena jumlah polisorbitat 80 juga mempengaruhi terbentuknya emulsi, perlu diperhatikan dengan faktor-faktor lainnya. Untuk faktor konjugat, grafik cenderung mendatar yang juga belum terlihat puncak optimumnya. Terlihat bahwa konjugat tidak terlalu berpengaruh terhadap respon efisiensi enkapsulasi.



Gambar 2. Plot interaksi yang terjadi pada (A) respon ukuran partikel dan plot efek utama untuk (B) respon ukuran partikel, (C) efisiensi enkapsulasi, (D) loading Rifampisin.

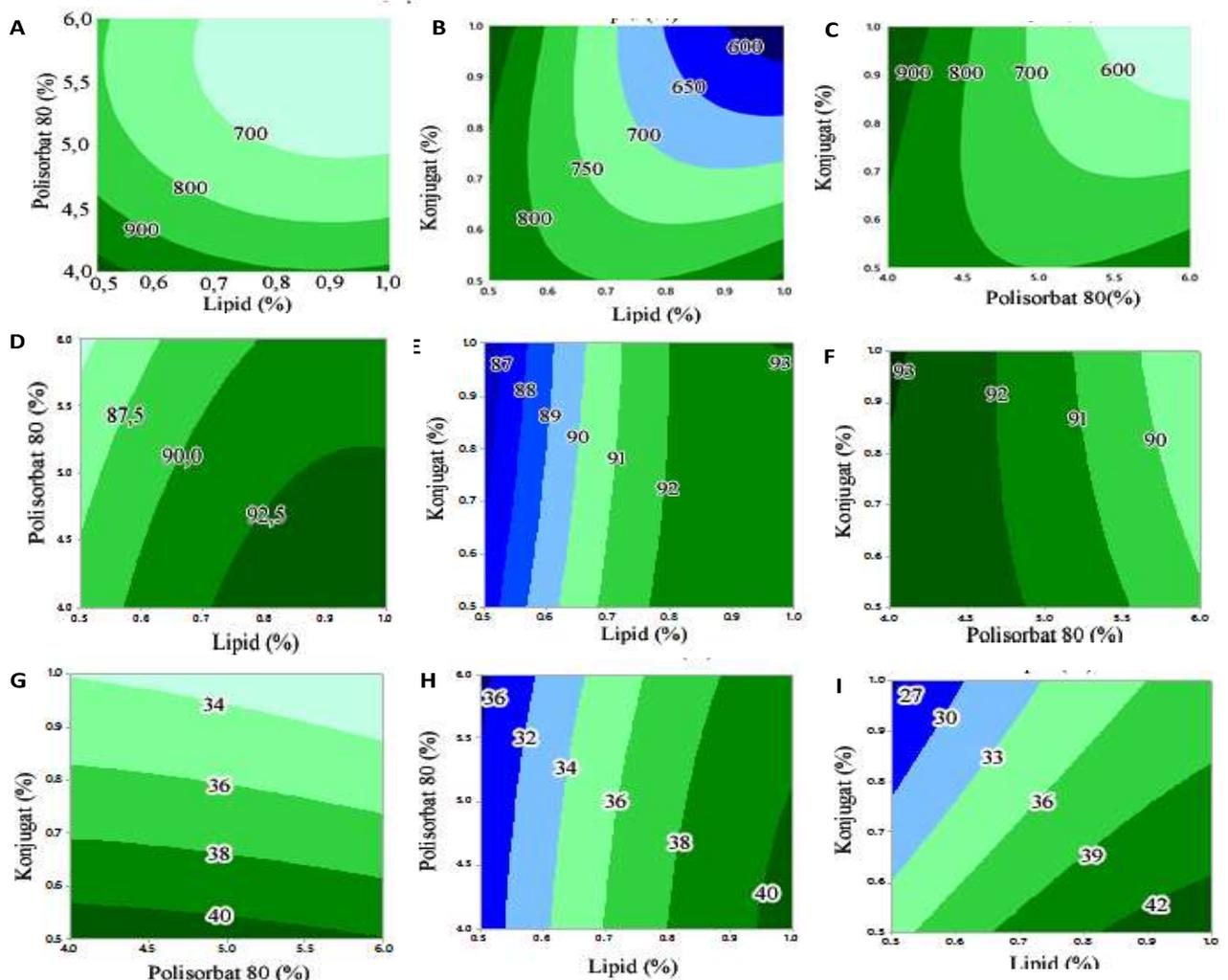
Pengaruh tiap level terhadap respon efisiensi enkapsulasi digambarkan dalam plot kontur dan permukaan (Gambar 3 D, E, F), yang dapat dengan jelas dilihat daerah dari masing-masing nilai respon. Kontur yang baik adalah yang berhasil menggambarkan daerah puncak, seperti terlihat pada respon ukuran partikel yang telah mencapai daerah optimum (Gambar 3 A, B, C). Kontur yang didapat kali ini belum bisa mencapai daerah puncak yang disebabkan oleh rentang level yang terlalu sempit. Model matematika yang didapat dari percobaan untuk Y3 (*Drug Loading*, nm) adalah sebagai berikut.

$$Y3 = 26,75 + 46,74 XA + 1,33 XB - 29,44 XC - 22,28 X2A - 0,174 X2B + 7,26 X2C + 0,082 XAB + 7,66 XAC - 0,421 XBC \quad (4)$$

Pada respon *drug loading*, didapat 5 faktor yang signifikan berdasarkan uji ANOVA. Faktor-faktor tersebut yaitu lipid (0,000), polisorbate 80 (0,004), konjugat (0,000), interaksi lipid-lipid (0,001), dan

interaksi lipid-konjugat (0,050). Dengan banyaknya faktor yang signifikan maka persamaan yang didapat bisa lebih memprediksi hasil percobaan. Untuk meningkatkan validitas persamaan, maka faktor lain yang tidak signifikan dapat dihapus menyisakan variabel yang signifikan saja.

Faktor lipid dan konjugat terlihat sangat mempengaruhi *drug loading*. Hal ini karena lipid dan konjugat memberikan kontribusi massa yang signifikan terhadap sediaan NLC, sehingga mempengaruhi nilai *drug loading*. Apabila dilihat pengaruh masing-masing faktor dalam grafik *main effects* (Gambar 2D), dapat dilihat grafik lipid cenderung menaik namun belum mencapai titik optimumnya, untuk polisorbate 80, grafik cenderung mendatar yang menandakan tidak terlalu mempengaruhi nilai *drug loading*, sedangkan untuk konjugat, grafik cenderung menurun dan belum terlihat titik optimumnya. Pengaruh tiap level terhadap respon *drug loading* digambarkan dalam plot kontur dan permukaan (Gambar 3 G, H, I), yang dapat dengan jelas dilihat daerah dari masing-masing nilai respon.



Gambar 3. *Contour plot* hasil optimasi NLC yang termodifikasi kitosan-manosa konjugat dengan metoda Box Behnken terhadap parameter I. ukuran partikel (A, B, C), II. enkapsulasi efisiensi (D, E, F), dan III. loading obat (G, H, I) sebagai respon dari perubahan konsentrasi lipid, polisorbate 80, dan konjugat.

Formula optimum yang dipilih adalah formula titik tengah (center) dari analisis kontur yang didapat serta kestabilan fisik formula. Tiga percobaan titik tengah (center) dilihat kedekatannya antara hasil eksperimen dengan prediksi melalui persamaan polinomial yang didapat pada tiap respon. Dapat dilihat pada Tabel 4 bahwa untuk tiap formula menghasilkan perbedaan kecil antara hasil prediksi dengan hasil rata-rata eksperimental untuk ukuran, EE, dan DL. Dengan demikian, nilai dari center points dianggap mewakili sebagai formula optimum sediaan NLC rifampisin.

Tabel 4. Perbandingan Hasil Eksperimen dan Hasil Prediksi dari tiga center points.

Respon eksperimen	Rata-rata hasil eksperimen	Hasil prediksi	Galat (%)
Ukuran Partikel (nm)	712,433	703,437	1,263
EE (%)	91,537	91,644	0,117
DL (%)	36,615	36,614	0,003

Tabel 5. Formula Optimum COS-ACE-NLC dengan Rifampisin terenkapsulasi.

Faktor	Jumlah (%)
Rifampisin	1,00
Lipid (Stearil Alkohol : Asam Oleat 1:1)	0,75
Polisorbat 80	5,00
Konjugat kitosan-mannosa	0,75
STPP	0,12
Ad aquadeion	

Ukuran NLC rifampisin berada pada target yang diharapkan, yaitu 0,2–1 μm . Ukuran partikel diharapkan dapat berukuran nano agar lebih mudah masuk ke dalam target, namun karena ditargetkan untuk makrofag, ukuran maksimum yang dapat difagosit adalah bisa sampai 1 μm , yang mana dengan ukuran yang lebih besar maka makrofag akan lebih mudah mengenali zat tersebut sebagai benda asing⁽¹⁵⁾. Indeks polidispersitas berada pada angka 0,324 (<0,5) yang menunjukkan homogenitas ukuran globul yang terbentuk cukup seragam.

Zeta potensial salah satunya dapat digunakan untuk memprediksi keberhasilan proses konjugasi. Nilai zeta yang positif kemungkinan besar menandakan berhasilnya proses manasilasi NLC karena proses penambahan polimer pada formula (stearilamin) menyebabkan nanopartikel memiliki muatan positif dari gugus amin pada permukaan⁽¹⁶⁾. Begitu pula dengan kitosan pada percobaan ini yang memiliki muatan positif dari gugus amin. Nilai negatif, atau pengurangan nilai zeta potensial disebabkan oleh pelingkupan dengan manosa yang menutupi muatan positif sehingga menurunkan nilai zeta potensial yang menandakan berhasilnya pengikatan manosa

Evaluasi Formula Optimum Nanopartikel.

Formula yang digunakan untuk evaluasi adalah formula optimum pada Tabel 5. Formula tersebut diujikan dengan pengukuran ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial, efisiensi enkapsulasi, drug loading, dan uji pelepasan.

Ukuran Partikel, Indeks Polidispersitas, dan Zeta Potensial. Evaluasi ukuran partikel, indeks polidispersitas dan zeta potensial dilakukan terhadap sampel. Hasil yang didapat adalah ukuran partikel $766,1 \pm 57,56$; indeks polidispersitas $0,324 \pm 0,01$; dan zeta potensial sebesar $-3,20 \pm 1,75$ mV.

pada gugus amin⁽¹⁶⁾. Pada percobaan ini didapatkan nilai negatif kemungkinan karena terlalu banyaknya manosa yang terikat pada permukaan nanopartikel sehingga membuat muatan menjadi negatif.

Nilai zeta yang tinggi menandakan stabilitas fisik dari tumbukan elektrostatik antarpartikel⁽¹⁶⁾. Oleh karenanya nilai yang didapat pada percobaan ini menandakan formula kurang stabil karena nilainya mendekati netral. Dapat dilakukan perbaikan dengan pengurangan jumlah STTP yang digunakan untuk menetralkan sisa muatan konjugat setelah proses adsorpsi pada permukaan NLC. Selain itu, proses pengeringan dapat dijadikan alternatif untuk menjaga kestabilan.

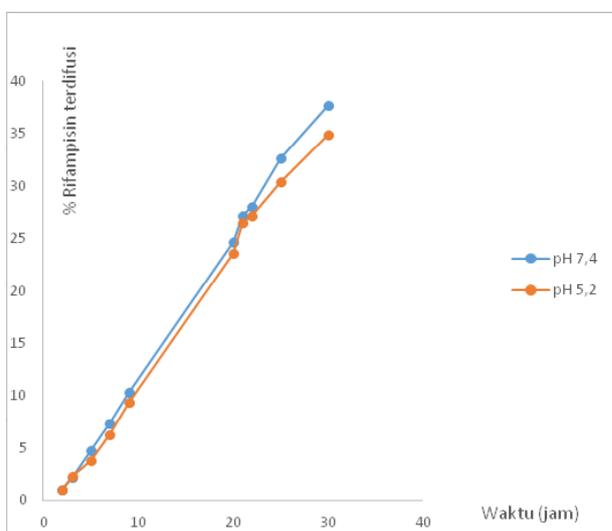
Efisiensi Enkapsulasi dan Drug Loading. Nilai efisiensi enkapsulasi dan drug loading didapatkan dengan metode sentrifuga. Perhitungan dilakukan dengan cara tidak langsung yaitu dengan mengukur kadar rifampisin yang terdapat dalam supernatan. Dari tiga sediaan didapat efisiensi enkapsulasi sebesar $91,537 \pm 0,184$ % dan drug loading sebesar $36,615 \pm 0,073$ %. Dengan nilai ini maka dapat dinyatakan formula optimum NLC memiliki efisiensi enkapsulasi dan drug loading yang baik, yang berarti sistem

NLC ini cocok untuk membawa rifampisin. Nilai % yang tinggi ini memang diharapkan, karena NLC adalah salah satu sistem utama untuk membawa atau menggabungkan obat-obat lipofilik, salah satunya rifampisin⁽¹⁶⁾.

Uji Pelepasan. Pelepasan rifampisin secara *in vitro* dari NLC diukur dalam medium disolusi fisiologis simulasi untuk memprediksi keefektifan formula secara *in vivo*. Pada percobaan ini uji dilihat pengaruh pH terhadap pelepasan obat pada sediaan. Pada percobaan ini dilihat pengaruh pH 5,2 dan 7,4 dalam pelepasan rifampisin. Kedua pH tersebut merepresentasikan kondisi dalam makrofag, yang mana pH 5,2 merupakan pH dalam fagolisosom sedangkan 7,4 adalah pH dalam sitoplasma. Pelepasan obat dari NLC terjadi karena proses difusi terkontrol.

Dari kurva pada Gambar 4 terlihat bahwa jumlah rifampisin yang dilepaskan terhadap waktu pada pH 5,2 dan 7,4 menghasilkan profil pelepasan yang hampir mirip (berimpit). Secara teori, kelarutan kitosan yang lebih tinggi pada pH 5. Pada pH 5, kitosan berada dalam keadaan terprotonasi sehingga kelarutannya dalam PBS meningkat. Namun hal tersebut berlaku untuk kitosan dengan BM tinggi, sedangkan pada formula NLC rifampisin ini yang digunakan adalah kitosan dengan BM rendah, sehingga secara umum profil kelarutannya akan sama. Harapannya, rifampisin akan cepat melepas pada pH 5,2 yaitu pada makrofag, namun proses pelepasan pada makrofag juga dipengaruhi oleh enzim yang mana pada percobaan *in vitro* kali ini tidak ditambahkan.

Pelepasan rifampisin yang juga terjadi pada pH 7,4 bukan merupakan suatu masalah karena NLC yang berukuran kecil dapat terabsorpsi dan masuk ke peredaran darah sehingga bekerja membunuh Mtb melalui jalur sistemik.



Gambar 4. Grafik profil pelepasan rifampisin dari nanopartikel terhadap waktu dalam pH 5,2 dan 7,4.

Pelepasan yang lebih tinggi pada pH asam dapat menguntungkan di mana agen etiologis TB berada di dalam sel yang terinfeksi⁽¹⁶⁾. Pelepasan obat yang jauh lebih rendah pada nilai pH yang lebih netral, mencegah obat tersebut dilepaskan pada sel yang tidak terinfeksi. Untuk penelitian lebih lanjut dapat diselidiki pelepasan pada pH 6,2 yakni pH cairan nasal dan fagosom⁽¹⁶⁾.

SIMPULAN

Formula NLC optimum dari penelitian ini terdiri dari jumlah lipid padat dan lipid cair (stearil alkohol dan asam oleat 1:1) sebanyak 0,75%, Polisorbat 80 sebanyak 5%, konjugat kitosan-manosa 0,75%, rifampisin 1% dan STPP 0,12%. Formula optimum memiliki ukuran partikel $766,1 \pm 57,56$ nm, zeta potensial $-3,20 \pm 1,75$ mV, efisiensi enkapsulasi $91,54 \pm 0,18$ %, dan *drug loading* $36,62 \pm 0,07$ %. Formula nanopartikel NLC-kitosan-D-mannose ini diharapkan dapat meningkatkan targeting rifampisin pada sel makrofag melalui antaraksi dengan reseptor manosa. Lebih lanjut, rifampisin dapat dilepaskan pada kecepatan yang hampir sama pada pH 5,2 dan 7,4 yang mengindikasikan potensi aktivitasnya dalam endosome maupun sitoplasma.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini disponsori oleh hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi, Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. 2016.
2. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E & Schlesinger LS. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *Journal of Experimental Medicine*. 2005. 202(7): 987-999.
3. Torrelles JB, & Schlesinger LS. Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannose cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis*. 2010. 90(2): 84-93
4. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. 2015.
5. Becker C. Preparation of biowaiver recommendations for antituberculosis drugs [dissertation]. Senckenberg: Universitätsbibliothek Johann Christian. 2009.
6. Pardeike J, Hommoss A, & Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International journal of pharmaceutics*. 2009. 366(1): 170-184

7. Naseri N, Valizadeh H, & Zakeri-Milani P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2015. 5(3): 305.
8. Yang X, Patel S, Sheng Y, Pal D., & Mitra AK. Statistical design for formulation optimization of hydrocortisone butyrate-loaded PLGA nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*. 2014. 15(3): 569-587.
9. Chaubey P, & Mishra B. Mannose-conjugated chitosan nanoparticles loaded with rifampicin for the treatment of visceral leishmaniasis. *Carbohydrate polymers*. 2014. 101: 1101-1108.
10. Gribble GW & Ferguson DC. Reactions of sodium borohydride in acidic media. Selective reduction of aldehydes with sodium triacetoxyborohydride. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1975. (13): 535-536.
11. Nkuzinna OC, Menkiti MC, Onukwuli OD, Mbah GO, Okolo BI, & Egbujor MC. Application of Factorial Design of Experiment for Optimization of Inhibition Effect of Acid Extract of *Gnetum africana* on Copper Corrosion. *Natural Resources*. 2014. 5(07): 299.
12. Trinh TK & Kang LS. Application of response surface method as an experimental design to optimize coagulation tests. *Environmental Engineering Research*. 2010. 15(2): 63-70.
13. Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments*. 4th Wiley. New York; 1997. p. 704.
14. McCarron PA, Woolfson AD, & Keating SM. Response surface methodology as a predictive tool for determining the effects of preparation conditions on the physicochemical properties of poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 1999. 193(1): 37-47.
15. Hirota K & Terada H. Endocytosis of particle formulations by macrophages and its application to clinical treatment. In *Molecular Regulation of Endocytosis*. InTech. 2012.
16. Pinheiro M, Ribeiro R, Vieira A, Andrade F, & Reis S. Design of a nanostructured lipid carrier intended to improve the treatment of tuberculosis. *Drug design, development and therapy*. 2016. 10:2467.